

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»

Высшая школа естественных наук и технологий
(наименование высшей школы / филиала / института)

Кисиль Оксана Ярославовна
(ФИО обучающегося)

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)**

19.04.01 Биотехнология

(код и наименование направления подготовки / специальности)

Промышленная биотехнология и биоинженерия

(наименование направленности образовательной программы (профиля / специальности / название магистерской программы))

Изучение состава сообщества и первичного метаболизма бактерий
криолитозоны на примере района Ханымей (Западная Сибирь)

(тема ВКР)

Утверждена приказом от «29» ноября 2018 г. № 2873

Руководитель ВКР

Аксенов А. С., зав. каф.,
к.т.н., доцент

Консультанты

Рецензент

Нормоконтроль

Руководитель ОПОП

Аксенов А. С., зав. каф.,
к.т.н., доцент

Аксенов А. С., зав. каф.,
к.т.н., доцент

(дата)

(подпись)

(ФИО, должность / степень / звание)

Постановление ГЭК от «14» июня 2019 г.

Признать, что обучающийся (-аяся)

О.Я. Кисиль
(инициалы, фамилия)

выполнил(-а) и защитил(-а) ВКР с отметкой

(отметка прописью)

Председатель ГЭК

(подпись)

В.А. Сеницкая
(инициалы, фамилия)

Секретарь ГЭК

(подпись)

К.С. Болотова
(инициалы, фамилия)

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»

Высшая школа естественных наук и технологий
(наименование высшей школы / филиала / института)

ЗАДАНИЕ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

19.04.01 Биотехнология

(код и наименование направления подготовки / специальности)

Тема ВКР: Изучение состава сообщества и первичного метаболизма бактерий
криолитозоны на примере района Ханымей (Западная Сибирь)

Утверждена протоколом заседания кафедры от « 30 » октября 20 18 г. № 3

Обучающемуся (-ейся):

Кисиль Оксана Ярославовне

(Ф.И.О.)

Курс: II

Группа: 301751

Срок сдачи выпускником законченной работы: « 14 » июня 20 19 г.

Исходные данные к работе Образцы мерзлого торфа, отобранные на различной глубине
бугристого болота, локализованного в зоне прерывистой вечной мерзлоты, Западная Сибирь;
Данные химического состава слоев, геоботанический состав слоев

Основные разделы работы с указанием вопросов, подлежащих рассмотрению _____

1. Аналитический обзор. В аналитическом обзоре рассмотрены масштабы распространения
криолитозоны, возможные последствия деградации, современные методы изучения
бактериального сообщества

2. Методическая часть. Методическая часть содержит описание объекта исследования, а
также используемые методы для изучения бактериального сообщества торфяного керна
бугристого болота

3. Экспериментальная часть. В экспериментальной части отражены результаты проделанной
работы

База проведения исследований САФУ имени М.В. Ломоносова. Высшая школа естественных
наук и технологий, кафедра биологии, экологии и биотехнологии

Перечень обязательных приложений к работе _____

Перечень графического материала презентационные слайды

Консультанты по работе

по разделу	_____	_____	_____
по разделу	_____	_____	_____
по разделу	_____	_____	_____

(дата)

(подпись)

(ФИО, должность)

Дата выдачи задания «31» января 20 19 г.

Руководитель ВКР

(подпись)

А. С. Аксенов

(инициалы, фамилия)

Задание принял к исполнению «31» января 20 19 г.

Обучающийся (-аяся)

(подпись)

О. Я. Кисиль

(инициалы, фамилия)

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»

ПРОТОКОЛ
проверки выпускной квалификационной работы
в системе «Антиплагиат-вуз»

13 июня 2019 г.

г. Архангельск

Текст магистерской диссертации

Кисиль Оксаны Ярославовны

по теме Изучение состава сообщества и первичного метаболизма бактерий криолитозоны на примере района Ханымей (Западная Сибирь)

выполненной на кафедре биологии, экологии и биотехнологии,
проверен на наличие заимствований при помощи системы «Антиплагиат-вуз».

Дата и время проверки: 13.06.2019 г. 10:00

Учетная запись, использованная при проверке: Аксенов Андрей Сергеевич

Результат проверки:

По данным системы доля оригинального текста – 73,8%
число %

Ссылки на заимствования, показанные системой, объясняются:
использованием общеупотребимых выражений

По признаку отсутствия заимствований работу можно считать выполненной
самостоятельно и допустить к защите.

Научный
руководитель

к.т.н., доцент, зав. кафедрой

Аксенов А.С.

РЕФЕРАТ

Кисиль О. Я. Изучение состава сообщества и первичного метаболизма бактерий криолитозоны на примере района Ханымей (Западная Сибирь).
Руководитель выпускной квалификационной работы – зав. каф., к.т.н., доцент Аксенов А.С.

Выпускная квалификационная работа содержит 70 страниц, 20 иллюстраций, 77 литературных ссылок.

Ключевые слова: криолитозона, торфяники, углерод, сообщества микроорганизмов, метагеномное секвенирование гена 16S рРНК

Целью работы является изучение состава сообщества микроорганизмов бугристого торфяного болота, локализованного в пределах островной криолитозоны.

Структура ВКР: состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованных источников, приложений.

В первой главе рассмотрены генезис и масштабы распространения криолитозоны, виды мерзлых торфяников, последствия деградации криолитозоны, адаптационные механизмы бактерий к условиям криолитозоны, современные методы изучения бактериальных сообществ криолитозоны.

Во второй главе представлено описание объекта исследования, методики прямой и непрямой экстракции ДНК, метод проведения высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК.

В третьей главе представлены результаты проделанной работы. Дана характеристика объекта исследования, подобраны оптимальные методы выделения ДНК для метагеномного секвенирования гена 16S рРНК, а также представлен состав бактериального сообщества на основе результатов метагеномного секвенирования участка гена 16S рРНК.

Дипломник

(дата)

(подпись)

Кисиль О. Я.

(Фамилия И.О.)

Руководитель проекта

(дата)

(подпись)

Аксенов А. С.

(Фамилия И.О.)

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	4
ОГЛАВЛЕНИЕ	6
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	8
ВВЕДЕНИЕ	9
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР	11
1.1 Криолитозона – временное хранилище углерода и криобанк микроорганизмов	11
1.1.1 Генезис и развитие криолитозоны Северного полушария	12
1.1.2 Типы вечной мерзлоты	15
1.1.3 Лед в структуре криолитозоны	18
1.1.4 Криолитозона: феномен мирового масштаба	19
1.1.4.1 Распространение криолитозоны на территории России	21
1.1.5 Торфяные болота как часть криолитозоны	22
1.1.5.1 Бугристые торфяники	24
1.1.5.2 Полигональные торфяники	27
1.1.6 Запасы углерода в массивах криолитозоны	29
1.1.7 Жизнь в вечной мерзлоте	29
1.2 Методы изучения экологии микроорганизмов криолитозоны	32
1.2.1 Метагеномное секвенирование маркерного гена 16S рРНК	33
1.2.2 Гены <i>mscA</i> и <i>rpoA</i> как альтернатива 16S рРНК в филогенетическом анализе популяций метаногенов и метанотрофов	33
1.2.3 Мечение ДНК стабильными изотопами как метод выявления активных форм бактерий	34
1.2.4 Метод фингерпринтов	36
1.2.4.1 Терминальный полиморфизм длин рестрикционных фрагментов	36
1.3 Исследования состава сообществ микроорганизмов криолитозоны	37
1.3.1 Структура микробных сообществ двух торфяно-болотных почв Сибири	37
1.3.2 Эффект оттепели на бактериальные сообщества вечной мерзлоты	38
1.4 Выводы по аналитическому обзору	40
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 Объект исследования	42
2.2 Методы исследования	43
2.2.1 Непрямая экстракция ДНК	43
2.2.2 Методы прямой экстракции ДНК	44
2.2.2.1 Выделение ДНК коммерческим набором PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit	44

2.2.2.2 Экстракция ДНК с использованием TENC буфера.....	45
2.2.2.3 Гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция.....	46
2.2.2.4 Экстракция ДНК с помощью СТАВ буфера.....	47
2.2.3 Постановка полимеразной цепной реакции.....	47
2.2.4 Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	48
2.2.5 Электрофоретическое определение молекулярной массы ДНК	49
2.2.6 Высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК	49
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	51
3.1 Характеристика объекта исследования	51
3.1.1 Общее количество микроорганизмов	53
3.2 Сравнение методов экстракции ДНК из мерзлого торфа.....	54
3.3 Таксономическая структура торфяника	58
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	64

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем текстовом документе применяются следующие определения, обозначения и сокращения:

ММП – многолетнемерзлые породы

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

МЛП – малый ледниковый период

Пг – петаграмм

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

П.о. – пара оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ММО – метанмонооксигеназа

T-RFLP – терминальный полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
(англ. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

ОМБ – олиго-мезотрофное болото

ПБ – кустарничково-осоковое болото

СТАВ – цетилтриметиламмоний бромид (англ. cetyltrimethylammonium bromide)

C_{орг} – Органический углерод

ВВЕДЕНИЕ

Более 20 % поверхности Земли подстилается вечной мерзлотой, в которой заключено от 25–50 % общего глобального углеродного пула почвы. Снижение микробной активности в условиях криолитозоны в значительной степени защищает этот углерод от микробного разложения, но продолжающееся изменение климата может привести к крупномасштабному таянию вечной мерзлоты, тем самым открывая огромные запасы углерода для деградации. Предполагается, что микробная активность в почвах вечной мерзлоты может стать одним из основных факторов, изменяющих цикл органического углерода и азота, вызывая положительную динамику изменения климата. Эта гипотеза особенно верна для мерзлых торфяников – естественных стоков атмосферного углерода (C), локализованных на территории Западной и Северной Сибири, которые содержат значительные количества $C_{\text{орг}}$ как в верхнем (оттаявшем) торфяном слое, так и в замороженных органических и минеральных горизонтах. Тем не менее, мерзлые торфяные почвы остаются практически не охарактеризованными с точки зрения физиологического разнообразия и метаболического потенциала бактерий [2].

В свою очередь технологии высокопроизводительного секвенирования и другие – омиксные технологии дают возможность изучить механизмы, с помощью которых микробные сообщества регулируют деградацию углерода и выбросы парниковых газов из районов вечной мерзлоты. Анализ нуклеиновых кислот и белков, взятых непосредственно из торфяных почв, позволяет по-новому взглянуть на микробные сообщества и их функции в условиях криолитозоны.

Таким образом, в условиях современного глобального потепления является актуальным изучение бактериального сообщества криолитозоны, поскольку она на протяжении многих тысячелетий накапливала органические вещества, выступая в качестве поглотителя атмосферного углерода, для выявления обратной связи деградации криолитозоны, на глобальный цикл углерода. Особенно это касается торфяников Западной Сибири, которые в течение последних десятилетий, активно деградируют. Однако, несмотря на то, что современные генетические методы позволяют избежать ошибочной оценки таксономического и количественного состава микробоценоза, надежность и достоверность молекулярных исследований зависит от качества выделенной ДНК. В результате чего, в данной работе для

изучения таксономического состава микробиома бугристого болота, были использованы прямые и непрямые методы экстракции ДНК, для сравнения их эффективности, а также проведен метагеномный анализ участка гена 16S рРНК.

1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

1.1 Криолитозона – временное хранилище углерода и криобанк микроорганизмов

Криолитозона представляет собой область верхнего слоя земной коры, характерной чертой которого является отрицательная или нулевая температура пород и почв [4] независимо от присутствия и фазового состояния воды в них [5]. Однако, в большинстве случаев, в ее пределах наблюдается наличие подземных оледенений [6] и их распределение в массивах [7]. Криолитозона современного мира сформировалась в результате процессов многолетнего криогенеза литосферы [7] и занимает примерно 23,9 % площади суши Северного полушария [8]. Основную ее часть составляют многолетнемерзлые породы (ММП), также называемые многолетней или вечной мерзлотой [4], под которой понимается почва, горные породы и осадочные образования, имеющие в течение двух и более лет подряд температуру $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже [9], и в которых хотя бы часть воды находится в кристаллическом состоянии [4]. В свою очередь в англоязычной литературе термин «вечная мерзлота» включает мерзлый грунт, как содержащий включения в виде льда, так и не имеющий лед в своей структуре вовсе [9]. Верхний слой почвы в районах криолитозоны, сезонно оттаивающий и промерзающий, получил название «активный слой», но при этом по определению он не входит в состав мерзлоты [10]. Кроме ММП в состав криолитозоны входят морозные породы, в толщах которых, несмотря на отрицательную температуру, вследствие низкой влажности отсутствует лед, охлажденные – породы с отрицательной температурой и насыщенные минерализованными водами, и криопеги – насыщенные минерализованные подземные воды, непромерзающие даже при температуре ниже $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ [4; 5].

Только в северной части криолитозоны заключено порядка 1700 петаграмм (Пг) органического углерода, что в два раза превышает количество углерода, содержащегося в атмосфере [11]. Предполагается, что деградация вечной мерзлоты, в современных климатических условиях, приведет к активному микробному разложению глобального запаса углерода, и впоследствии к переносу углерода из биосферы в атмосферу, способствуя тем самым усилению изменения

климата [12]. Таким образом, в настоящее время является актуальным изучение микробного сообщества криолитозоны, его активность и функциональный потенциал.

1.1.1 Генезис и развитие криолитозоны Северного полушария

Происхождение и развитие криолитозоны Земли обусловлено криогенезом геосферной оболочки Земли – литосферы. Криогенез – это совокупность химических, физико-химических и физико-механических процессов, протекающих в породах и в осадочных образованиях разного состава и абсолютного геологического возраста, вызванных их охлаждением и нагреванием, промерзанием и оттаиванием, а также изменением давления в результате однократного или многократного перехода температуры через нулевую отметку [7; 13]. К таким процессам относятся: цикличные фазовые превращения в системах вода-лед-пар, вода+газ-газовые гидраты-газ+лед, образование и деградация кристаллогидратов, миграция газов и флюидов в толщах пород, изменение их состава, свойств и эманация в земной коре. Вследствие криогенеза формируется и развивается строение мерзлых грунтов, в том числе их криотекстура, криоструктура и образование залежей льда [7].

Являясь производной климата, вечная мерзлота зародилась совместно с его похолоданием в конце неогенового периода. По представлениям современной геокриологии выделяют четыре стадии эволюции криолитозоны [6; 7].

Первая стадия охватывает период времени с позднего плиоцена до начала верхнего плейстоцена кайнозойской эры (более 1,5 млн. л.н.). Отличительной особенностью данного этапа является прогрессирующее направленное глобальное похолодание климата, имеющее вместе с тем прерывистый характер с нарастающей частотой и амплитудой температурных колебаний. Начиная с конца плиоцена (порядка 3 млн. л.н.) в Северном полушарии заметно понижается температура воздуха, что сопровождается появлением первых континентальных ледников в Исландии и Гренландии, при этом в Северо-Восточной части России наблюдаются первые следы подземного оледенения, в том время как в Западной и Восточной Европе постепенно исчезают теплолюбивые растения. Около 1,1–1,0 млн. л. н. наступает резкое стабильное похолодание и переход к свойственной для

плейстоцена цикличной смене холодных периодов – криохронов и теплых – термохронов, что привело к появлению оледенений на территории Восточной и Западной Сибири, Европы, а также Северной Америки [6; 7]. В данный геологический период развития Земли криолитозона могла доходить до 54–55° с.ш. на территории Западной Сибири, тогда как в Восточной Европе до 57° с.ш. [7].

Второй этап, временные рамки которого от 150 тыс. л.н. до 8–9 тыс. л.н., характеризуется главенством на севере Евразии и Северной Америки суровых климатических условий [7]. В северной части Евразии возникают покровные оледенения, центры которых локализованы как в материковой (Скандинавия, Таймыр и др.), так и островной (Исландия, Новая Земля и др.) частях субматерика. Порядка 20–18 тыс. л.н. на Северо-Востоке Азии формируется оледенение в горном рельефе, а в более южных регионах Евразии в горах развивается горно-долинное оледенение [14]. На этот период приходится максимум распространения льдов и сдвиг южных границ криолитозоны до 48–49° с.ш. на Восточно-Европейской равнине и до 47–49° с.ш. в Западной Сибири [7].

Во время третьего периода (климатический оптимум), начавшегося в эпоху среднего голоцена, в связи с потеплением, наступившим примерно 11–10 тыс. л.н., происходит деградация вечной мерзлоты и резкое смещение ее границ к северу, а также накопление отложений торфа [14]. Криолитозона в европейской части России поднимается выше Полярного круга, а в Западной Сибири продвигается примерно до 68° с.ш. Таким образом, климатические изменения сопровождаются исчезновением мерзлых пород южной части криолитозоны и оттаиванием поверхностных оледенений, расположенных выше южной границы вечной мерзлоты. Между тем формируется реликтовый слой мерзлоты, сохранившийся до наших дней на севере Восточно-Европейской платформы и Западно-Сибирской плиты [7].

Четвертая стадия берет начало в позднем голоцене и длится примерно 3–4,5 тыс. лет. В это время происходит аградация мерзлоты и миграция ее границ экспансии к югу, в связи с понижением температуры окружающей среды [7; 14]. В рамках данного этапа выделяют четыре фазы эволюции криолитозоны в зависимости от темпов промерзания пород [15].

Первая фаза представлена тысячелетним похолоданием в позднеголоценовый период с точкой максимального снижения температуры на рубеже новой эры. На данном этапе эпигенетически промерзают отложения на дне термокарстовых котловин на севере и залежи торфа на юге, образованные в климатический оптимум; в результате промерзания аласов образуются бугры пучения; происходит морозобойное растрескивание и распространение полигонально-жильных льдов в трещинах мерзлых торфяников [14; 15].

Вторая фаза характеризуется очередной сменой криохрона термохроном, пик которого выпадает на конец первого тысячелетия. От Северного полярного круга в сторону юга растет глубина активного (сезонно оттаивающего и промерзающего) слоя мерзлых пород; повсеместно активизируются термокарстовые процессы; протаивают жильные льды торфяных массивов; развиваются плоско- и крупнобугристые торфяники [7; 14].

Третья фаза (малый ледниковый период или МЛП), которая продолжается от начала второго тысячелетия н. э. до XVIII в. включительно, отмечается установлением нового этапа похолодания и активным расширением области распространения криолитозоны к южной стороне света [7]. Сокращается площадь таликов, нарастает морозобойное растрескивание и экспансия полигонально-жильных льдов в торфяниках, песчаных и суглинистых грунтах, приостанавливаются процессы термокарста и развиваются многолетние бугры пучения [14].

В середине XIX века на смену МЛП приходит смягчение климатических условий с максимум проявления в 50–60-е гг. Изменение климата повлекло за собой проседание кровли мерзлоты на глубину 10–20 м в северной области двухслойных мерзлых толщ, усилились процессы термокарста, увеличилась глубина несквозных таликов [7; 14]. В южной части мерзлоты постепенно разрушается микрорельеф пятна-медальоны и формируется бугристый микрорельеф [14].

Поскольку период термохрона длится и по сей день, а глобальная температура поверхности в течение последних десятилетий продолжает повышаться, растет и риск деградации вечной мерзлоты. В исследованиях С. Wang, на основе 17 климатических моделей показано, что при повышении приземной

температуры на 1,5 °С средняя протяженность вечной мерзлоты к 2027–2036 годам может сократиться на 25 % при концентрации парниковых газов в эквиваленте CO₂ 936 единиц, тогда как при 412 единиц на 23 %, при этом большая часть криолитозоны все еще сохранится. Также скорость и масштабы деградации могут зависеть от специфики локальных топографических, ландшафтных и иных условий отдельных регионов. Таким образом, в настоящее время нет точных прогнозов как быстро, и насколько сократятся масштабы распространения криолитозоны в будущем [16].

1.1.2 Типы вечной мерзлоты

Большая часть вечной мерзлоты была сформирована в течение последних ледниковых периодов и в зависимости от ее прерывистости на местности подразделяется на четыре типа: сплошная, прерывистая, спорадическая (островная) и изолированная (редкоостровная) [5; 10]. Сплошная мерзлота соответствует вечной мерзлоте, занимающей 90–100 % площади, в то время как прерывистая вечная мерзлота охватывает 50–90 % площади, спорадическая покрывает 10–50 % территории и окружена грунтами, не подверженными мерзлоте, а изолированная покрывает лишь 0–10 % [9; 10]. Граница сплошной мерзлоты по мере продвижения с запада на восток смещается все больше на юг [17]. Вместе с тем двигаясь от Высокой Арктики к южным границам криолитозоны, распространение сплошной мерзлоты уменьшается, тогда как прерывистой увеличивается и ближе к югу заканчивается в виде спорадических и изолированных участков (рисунок 1) [10].

В случае островного распространения многолетнемерзлые породы наблюдаются лишь в условиях благоприятного сочетания природных факторов и всегда представлены разновидностями глинистых отложений. При прерывистом распространении территория, занимаемая мерзлотой, увеличивается зонально с севера на юг, а в горных районах согласно высотной поясности - от подножий к вершинам [5].

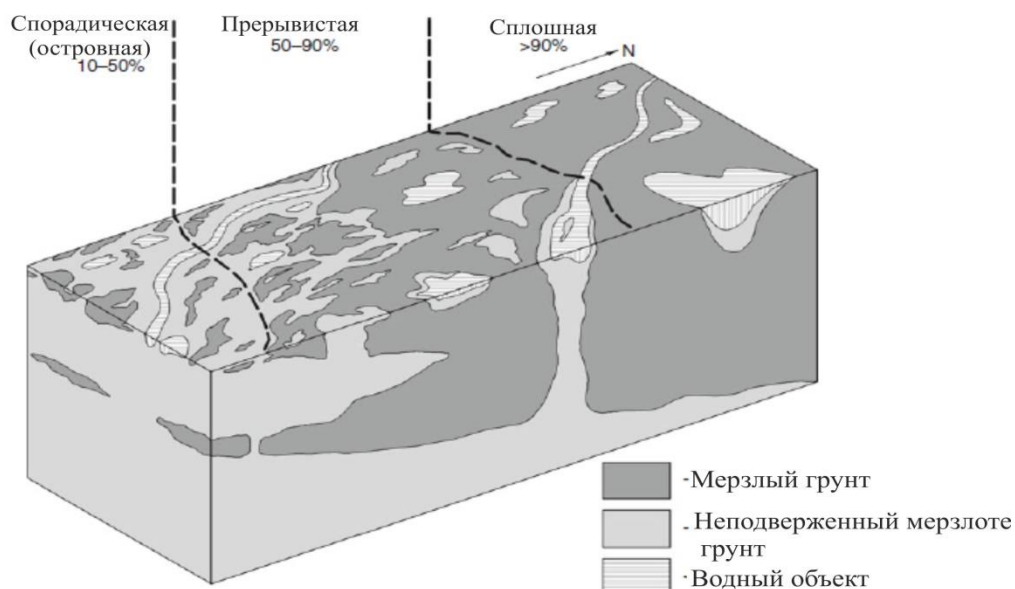


Рисунок 1 – Распределение вечной мерзлоты в области непрерывной, прерывистой и спорадической мерзлоты [9]

По своему географическому положению криолитозона подразделяется на субаэральную – расположенную в пределах континента, шельфовую или субмаринную – под акваторией морей и океанов и субгляциальную – под ледниками [6; 17].

Субаэральная криолитозона является наиболее распространенной и, как правило, представлена многолетнемерзлыми породами [17]. В пределах субаэральной криолитозоны мерзлота подразделяется на три вида: горная мерзлота (в скальных породах), возвышенных равнин (в скальных породах, перекрытых маломощным рыхлым осадочным чехлом) и аккумулятивных равнин. Данное разделение обусловлено, прежде всего, тем, что на равнинных участках природные и криогенные процессы изменяются преимущественно в соответствии с географической зональностью, в то время как в горных районах смена природных условий и ландшафтов подчиняется вертикальной поясности, то есть они сменяются по мере возрастания абсолютной высоты местности [6].

Субгляциальная криолитозона – это вечная мерзлота, расположенная под ледниковыми покровами. Считалось, что ледники и вечная мерзлота являются антагонистами и их совместное существование невозможно. Однако при исследовании Гренландского ледникового покрова было показано, что температура на подошве составляет $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$. Из чего можно предположить, что горные породы,

залегаящие под ледником, должны быть мерзлыми и на большую глубину. Анализ температурного поля ледников и теплофизических свойств льда, а также изучение их эволюции во времени, позволило сделать вывод о возможности формирования мерзлоты под ледниковыми покровами при установлении определенных условий [18].

Шельфовая криолитозона приурочена к территории Арктического бассейна и представлена многолетнемерзлыми и охлажденными породами. Возникновение и существование шельфовой мерзлоты связывают с климатическими и гляциоэвстатическими (регрессия и последующая трансгрессия) колебаниями уровня Мирового океана [19]. В зависимости от глубины моря криолитозона шельфа подразделяется на несколько типов [6]:

– Новообразованная

Мерзлота, образованная на глубине от 0 до 2,5 м, где в зимний период припайный лед смыкается с дном [6]. В данном случае протекает непосредственный теплообмен донных отложений с атмосферой и свободный отток тепла из грунтов, в результате чего они беспрепятственно промерзают [20].

– Новообразованная сингенетическая

Мерзлота, встречающаяся на глубине от 40–50 до 250 м. Данное явление связано с тем, что на глубине от 35 до 200 м наблюдается явление гомотермии, когда температура придонной воды всегда отрицательная (от $-1,5$ °C до $-1,8$ °C) и уже не подвержена сезонным изменениям [20].

– Спорадическая

Мерзлота, расположенная на глубине более 250 м. По причине того, что с увеличением глубины температура придонной толщи воды плавно идет на повышение (на глубине 500 м может достигать $-0,8$ °C), мерзлые породы наблюдаются лишь спорадически [6; 20].

– Многолетнеохлажденные породы

Охлажденные породы, локализованные на глубине от 7–8 м до 40–50 м, и более 250 м. Температуры придонной воды на таких глубинах отрицательные, но при этом недостаточно низкие для промерзания соленых донных грунтов, поэтому они не содержат льда [6].

– Реликтовая

Мерзлота, сформированная в субэаральных условиях во время позднеплейстоценовой регрессии моря и ныне погруженная под воду голоценовой морской трансгрессией [6].

1.1.3 Лед в структуре криолитозоны

Лед, содержащийся в многолетнемерзлом грунте, вне зависимости от образования, условий залегания, размера, формы и характера распределения называют подземным. Большинство исследователей подразделяют подземные льды на три основные группы: пластовые, повторно-жильные и погребенные [21].

1. Внутригрунтовые субгоризонтально направленные пластовые или линзовидные ледяные скопления, возникшие вследствие промерзания горных пород, получили название пластовые льды. Пластовые залежи формируются в результате действия различных механизмов льдовыделения: инъекционных, миграционно-сегрегационных и др. [22]. Как правило, пластовые льды подразделяются на:

– Инъекционные льды

Представлены интрузивными пластами и плосковыпуклыми линзами, которые возникли при замерзании грунтовых и других подземных вод, внедряющихся под напором вдоль границ мерзлых или промерзающих пород [22].

– Миграционно-сегрегационные льды

В случае миграционно-сегрегационных механизмов формируются внутригрунтовые пластовые, линзовидные залежи льда либо ледяные шлиры. Подобного типа льды развиваются при кристаллизации воды, мигрирующей к фронту промерзания. Такие льды часто встречаются в структуре торфяных бугров [22].

2. Повторно- или полигонально-жильные льды представлены скоплением вертикально направленных ледяных клиньев и жил, возникающих преимущественно при многократно повторяющемся ледообразовании в трещинах, периодически возникающих в одном и том же месте, после морозобойного растрескивания. Глубина этих жил варьируется от 0,5 до 40 м, а ширина в верхней части до 8–10 м и более. Они подразделяются на эпигенетические и сингенетические ледяные жилы [21; 22].

– Эпигенетические

К данному типу причисляют ледяные жилы, возникающие в осадочных отложениях, промерзание которых происходит после их аккумуляции и последующего преобразования сверху. Они широко распространены в пределах мерзлых оторфованных озерно-болотных, лагунных отложений и торфяников, расположенных в условиях плоских заболоченных равнин. Как правило, их размер составляет 3–5 м по высоте и 1,5–2 м по ширине [22].

– Сингетические

К ним относят ледяные жилы, развивающиеся совместно с протеканием процесса формирования отложений, синхронно аккумуляции осадков. Достигают огромных размеров до 50–60 м по высоте и 8–10 м по ширине [22].

3. Льды, сформированные в субэдральных условиях или в пределах водоемов, а впоследствии захороненные наносами под землю либо под донные отложения в результате циклов регрессии и трансгрессии моря и ныне входящие в состав мерзлоты, называются погребенными. Они могут быть различного генезиса: ледникового, снежного, морского, речного и озерного. В структуре ММП они наблюдаются на различной глубине в зависимости от последующего количества геологических осадков. Поскольку первичная среда образования льда может не совпадать со средой, в которую он погребен, его геохимический состав может значительно отличаться от льда образованного непосредственно в условиях вечной мерзлоты [21].

1.1.4 Криолитозона: феномен мирового масштаба

В настоящее время криолитозона охватывает примерно 23×10^6 км² площади суши Северного полушария, что составляет около 15 % от общей площади суши Земли. Она простирается от 26° с.ш. в Гималаях до 84° с.ш. в северной Гренландии. Приблизительно 63 % криолитозоны распространено в Восточном полушарии, главным образом в северной и восточной части России, в северной части Монголии и в северо-восточном Китае. Остальные 37 % распространены в Западном полушарии, в основном на Аляске, в северной части Канады и в Гренландии [8]. Вечная мерзлота встречается также в Скандинавии, но пространственная

протяженность намного меньше, чем на соответствующих широтах Северной Америки, из-за согревающего влияния Гольфстрима (Рисунок 2) [23].

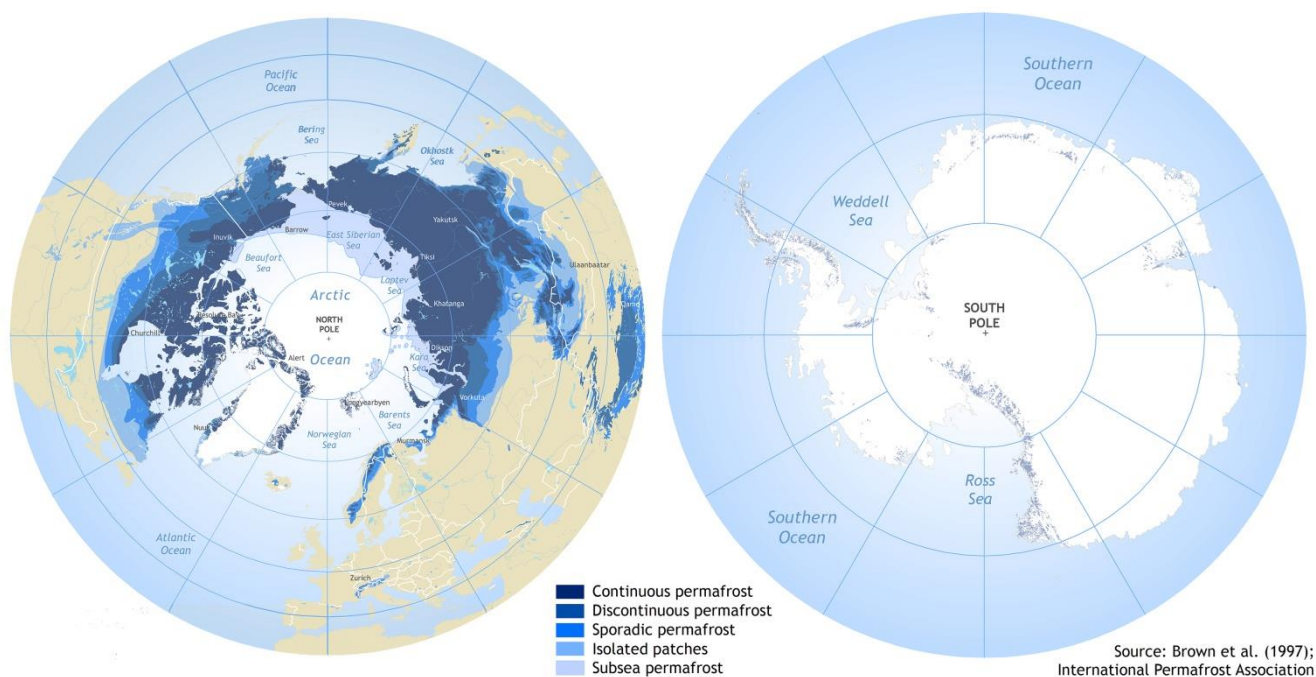


Рисунок 2 – Географическое распространение криолитозоны [24]

Как правило, криолитозона с высоким содержанием льда (более 20 % по объему) локализована в основном вдоль арктического побережья северной Аляски, в северной части Северо-Западных территорий Канады, в прибрежных районах Карского, Восточно-Сибирского морей и моря Лаптевых, а также в Западной Сибири (в области спорадической криолитозоны). Общая площадь криолитозоны, богатой льдом, составляет приблизительно $1,95 \times 10^6$ км², что составляет 8,57 % от общей площади распространения вечной мерзлоты [8].

Криолитозона со средним содержанием грунтового льда (от 10 до 20 % по объему) встречается по большей части в центральной и северной Аляске, за исключением хребта Брукс; на равнинах, расположенных к востоку от гор Маккензи и низменности Гудзонова залива, Канада; на севере Европейской России; в горных районах Азиатской части России; в центральной части китайского плато Цинхай-Сизан (Тибет). Общая площадь вечной мерзлоты со средним содержанием грунтового льда составляет приблизительно $5,7 \times 10^6$ км², что составляет 24,9 % от общей площади криолитозоны [8].

Криолитозона с низким содержанием грунтового льда (менее 10 % по объему) встречается в основном вдоль Западной Кордильеры, в Центральной и Восточной Канаде, в центральной и южной частях России, в горах китайского плато Цинхай-Сизан (Тибет), в горах Казахстана и Юго-Западной Азии. Общая площадь криолитозоны с низким содержанием грунтового льда составляет приблизительно $15,2 \times 10^6$ км² и составляет около 66,5 % от общей площади криолитозоны [8].

На самом южном континенте Земли, Антарктиде, также локализована вечная мерзлота (Рисунок 2). Лишь около 0,35 % или 45000 км² от общей площади континента составляет открытая поверхность, но всю эту территорию занимает криолитозона. Ученые также считают, что вечная мерзлота существует под толстым ледяным щитом, который покрывает остальную часть Антарктиды. Однако изучить вечную мерзлоту здесь сложно, поскольку ледниковый щит Антарктиды имеет толщину в несколько тысяч футов [25].

1.1.4.1 Распространение криолитозоны на территории России

В России криолитозона занимает площадь более 11 млн. км², включая северные и северо-восточные регионы, что составляет около 65 % территории страны [4]. Около 80 % вечной мерзлоты локализовано на территории Сибири. Наибольшей мощности (более 1 км) криолитозона достигает в Якутии, где тепловой поток Земли не превышает 30 мВт/м². В других районах Сибири, где тепловой поток достигает 50–70 мВт/м², толщина вечной мерзлоты не превышает 400–600 м [17]. Так, например, в Западной Сибири максимальную мощность имеет реликтовая криолитозона (60–64° с.ш.), которая может залегать на глубину от первых десятков до 100–300 м, иногда до 400 м [26].

На площади в 7 млн. км² криолитозона имеет практически сплошное распространение, на 1,8 млн. км² – прерывистое и на 2,5 млн. км² – островное и редкоостровное [4].

По величине зона сплошной вечной мерзлоты превосходит прерывистую и островную (Рисунок 3). Начиная с северной части Европейской России, она тянется вдоль побережья полосой шириной от 100 до 200 км. В районе Западно-Сибирской

низменности ее южная граница приблизительно совпадает с полярным кругом. В Восточной Сибири ее границы расширяются до широты Байкала.

Зона прерывистой мерзлоты простирается очень узкой полосой на Европейском севере, а затем в Западной Сибири она расширяется до нескольких сотен километров. На востоке она в основном локализована в межгорных впадинах или на прибрежных равнинах, расположенных южнее 60-й параллели.

Островная и редкоостровная криолитозона раскидывается до широты полярного круга в Европе и до 60-й параллели в Западной Сибири. В более восточных регионах она простирается до южной границы России [17].

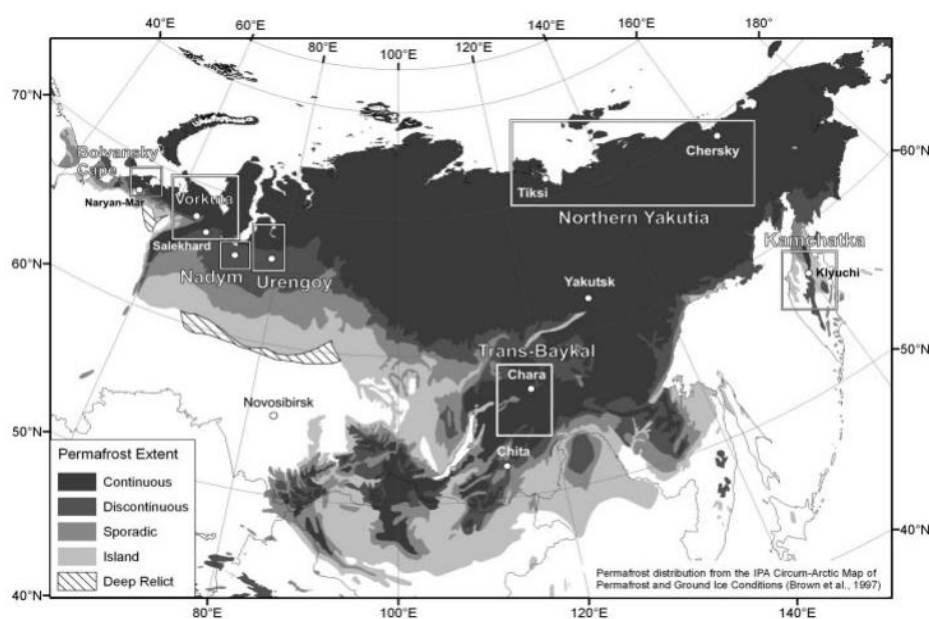


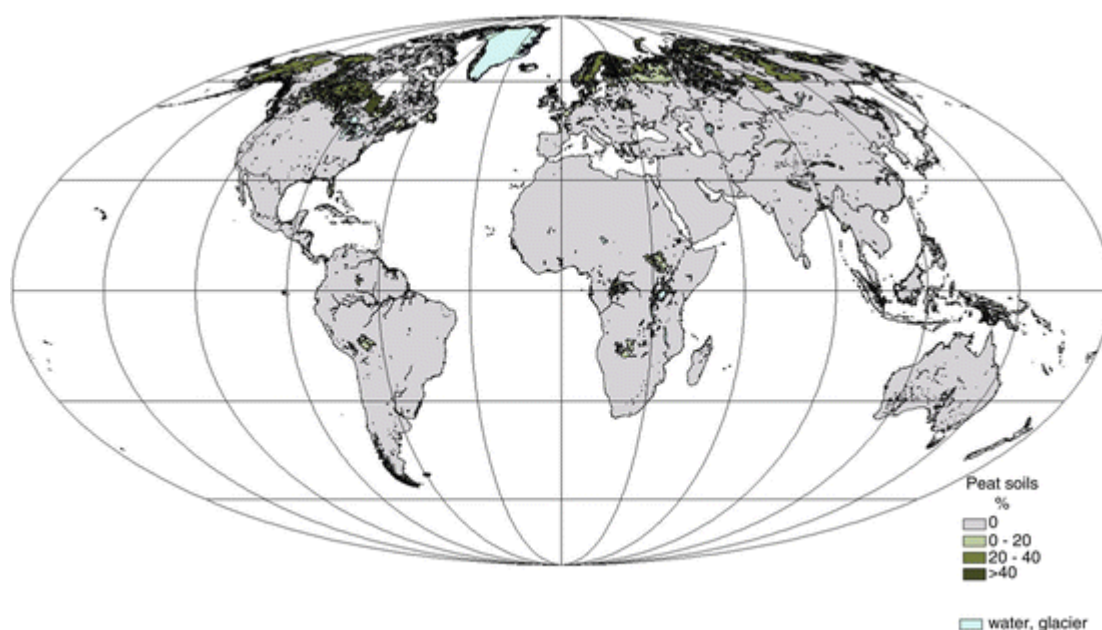
Рисунок 3 – Распределение криолитозоны на территории России [27]

1.1.5 Торфяные болота как часть криолитозоны

Торфяник или торфяное болото – это водно-болотная экосистема, которая характеризуется естественным накоплением слоя органического вещества – торфа (не менее 30 см в осушенном состоянии), образующегося в результате отмирания и неполного разложения растительного материала в условиях периодической или постоянной водонасыщенности и низкого содержания кислорода [28; 29]. Однако чаще всего данный термин применим к болотам, осушенным или дренированным естественным путем, то есть утратившим признаки избыточного увлажнения и специфичность растительного покрова [30]. Данные экосистемы играют ключевую роль в биосфере. Они консервируют огромные запасы пресной воды, депонируют

углерод, стабилизируют макроклимат, являются мощными естественными биофильтрами, поглощающими токсичные элементы из атмосферы [31].

Торфяные болота являются наиболее распространенным видом водно-болотных угодий и покрывают приблизительно 4 млн. км² Земли (около 3 % площади суши) [28]. Основная часть торфяников (около 80 %) расположена в бореальной и субарктической зонах Северного полушария [32]. Примерно одна третья торфяных болот локализовано в Северной Америке, при этом 87 % расположено в Канаде и из них 36 % находят под влиянием вечной мерзлоты [33]. Большая часть, порядка 60 %, всех торфяников расположена на территории России, преимущественно на Западно-Сибирской равнине (Рисунок 4) [34]. И более 20 % торфяных болот России распространено в зоне криолитозоны [35].

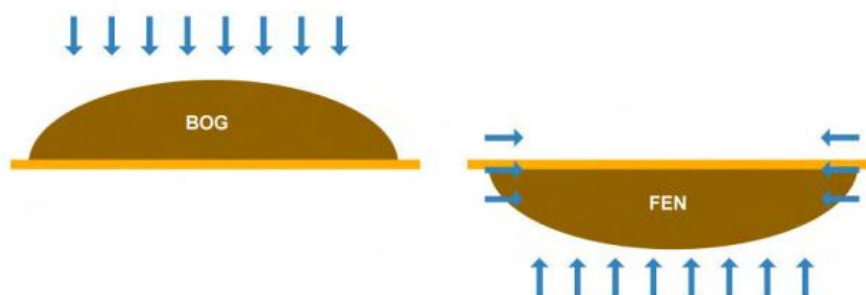


Peat soil – торфяная почва; water - вода

Рисунок 4 – Распространение торфяников [29]

В результате взаимодействия воды, растительности и торфа в течение длительного времени («самоорганизация») развиваются различные морфологические типы торфяников с типичными формами и рельефом поверхности [36]. Как правило, они подразделяют на два основных типа в зависимости от условий водно-минерального питания: верховые, которые питаются атмосферными осадками, где содержится мало минеральных веществ, и низинные, формирующиеся в условиях богатого минерального питания грунтовыми и поверхностными водами (Рисунок 5) [28; 29]. Для верховых

торфяников характерно наличие сфагнового мха, кустарников, осоки или вечнозеленых деревьев, корни которых проникают глубоко в слой торфа. В свою очередь в пределах низинных торфяников преобладают осоки и травы, укорененные в торфе [32].



Стрелка – поток воды; bog – верховой торфяник; fen – низинный торфяник

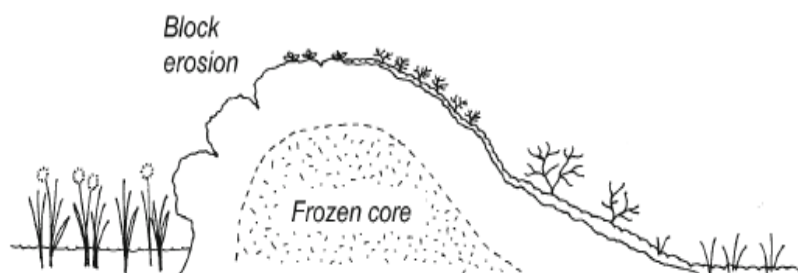
Рисунок 5 – Иллюстрация различия между верховыми и низинными торфяниками [28]

Помимо процесса самоорганизации на структуру макро- и микрорельефа торфяника могут влиять внешние механизмы, в частности формирование льда в зоне вечной мерзлоты. Ледообразование в арктической, субарктической и бореальной зонах привело к появлению специфических морфологических типов торфяников: полигональных и бугристых. В районе сплошной криолитозоны распространены полигональные торфяники, тогда как в зоне прерывистой и островной встречаются бугристые торфяники [28; 35].

1.1.5.1 Бугристые торфяники

Бугристые торфяники образуют уникальные экосистемы в бореальных и арктических регионах, характерные для зоны прерывистой и островной криолитозоны. Они представляют собой сочетание низких (плоских) или высоких (куполообразных) торфяных бугров, содержащих мерзлое «ядро», которое состоит из чередующихся слоев льда и торфа и/или ила. Ядро, выступающее над уровнем увлажненных межбугорных понижений, покрыто относительно сухим торфяным слоем, который оттаивает в теплое время года (активный слой) (Рисунок 6) [37; 38; 39]. Летом торфяной слой высыхает, и его теплопроводность снижается, в результате чего он изолирует мерзлое ядро и предотвращает его деградацию во время короткого летнего периода. В период осенних дождей влажность торфяного

слоя повышается, вместе с этим увеличивается и его теплопроводность, что позволяет холоду проникать глубоко в торфяные слои [38; 40]. Таким образом, поверхностный торфяной слой поддерживает существование вечной мерзлоты.



Frozen core – постоянно мерзлое ядро; block erosion – участок эрозии

Рисунок 6 – Схематичное изображение поперечного сечения бугристого [41]

Для формирования бугристых торфяников требуются определенные условия окружающей среды: температура воздуха ниже 0 °С в течение продолжительного времени, тонкий снежный покров и низкое количество атмосферных осадков в летний период [42]. Даже небольшое повышение температуры (1 °С) и выпадение осадков (10 %) может привести к значительным потерям площадей, пригодных для развития бугристых торфяников [37]. При установлении благоприятных условий формирование бугристого торфяника протекает в несколько стадий:

1. Формирование торфяника происходит, когда под действием ветров снежный покров на болоте становится настолько тонким, что пронизывающий холод проникает глубоко в водонасыщенный торф с высокой теплопроводностью, в результате чего мерзлота более стабильна в летний период [42]. Протекание криогенных процессов в толще торфа вызывает подъем поверхности болота (рисунок 7 А, В) [38].

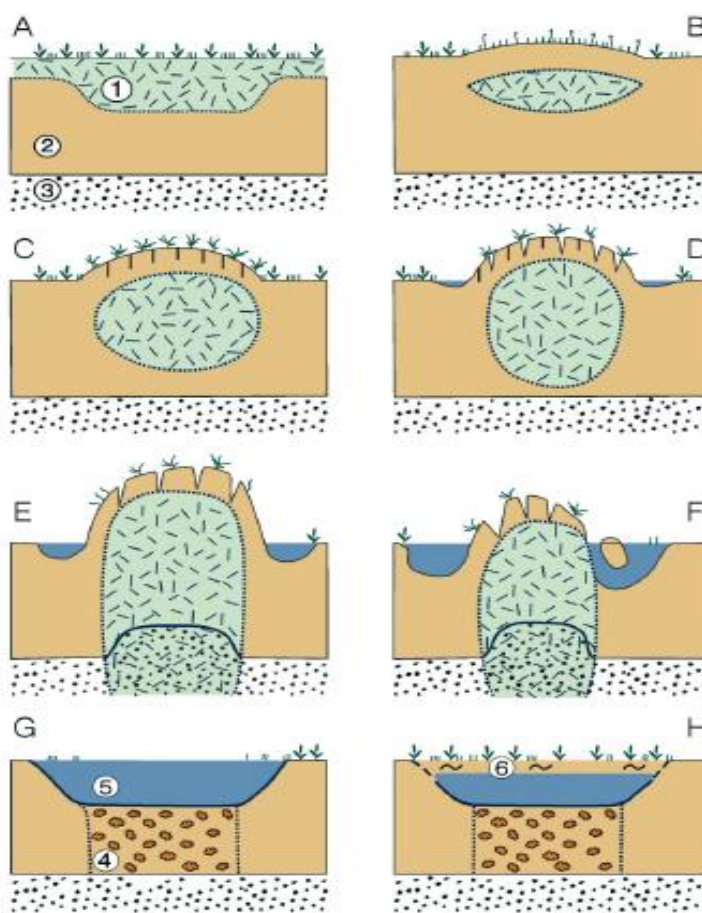
2. В течение последующих зим холод проникает все глубже, процесс формирования ускоряется, и происходит дальнейшее вздутие бугра из-за замерзания поровой воды и ледовыделения [42]. Когда поверхность поднимается, ветер более эффективно воздействует на бугор и способствует высыханию верхнего торфяного слоя (Рисунок 7 С) [38].

3. Когда холод доходит до слоя ила, форма бугристого торфяника достигает зрелой стадии. Как правило, к этому времени бугор расположен намного выше поверхности болота (Рисунок 7 D, E).

4. После чего начинается деградация, и торфяные блоки у краев бугра разрушаются вдоль открытых трещин. На более поздних стадиях растительность может быть полностью удалена, в результате чего поверхность бугра подвергается дефляции и эрозии атмосферными осадками (Рисунок 7 F).

5. Старые бугристые торфяники подвергаются частичному разрушению термокарстом и приобретают форму провальной воронки. Они также могут быть представлены: открытыми прудами или открытыми торфяными залежами, не имеющими растительности (Рисунок 7 G).

6. На месте мертвого торфяника может сформироваться новый бугристый торфяник после возобновления процесса торфообразования, и цикл развития бугра начинается с самого начала (Рисунок 7 H) [38; 42] .



1 – промерзший торф; 2 – торфяной слой; 3 – слой ила; 4 – оттаявший торфяной слой; 5 – пруд округлой формы; 6 – новый слой торфа

Рисунок 7 – Общая модель формирования бугристого торфяника

1.5.1.2 Полигональные торфяники

Полигональные торфяные болота – это тип болот с сетчатой структурой поверхности, возникшей в результате морозобойного растрескивания мерзлого торфа, образуя 4–6 угольные блоки-полигоны с размерами сторон 8–15 м, иногда до 20–25 м. Эти болота обычно мелко залежные. Средняя глубина торфяной залежи в северной половине зоны – 0,5 м, в южной – около 1,0 м. Исключением являются реликтовые болота на водораздельных пространствах, на которых мощность торфяной залежи достигает 3–5 м [43].

Полигональные болота представляют собой очень сложные и динамичные экосистемы, которые широко распространены в зоне сплошной мерзлоты субарктического и арктического регионов, где быстрое падение температуры в зимний период приводит к тепловому сжатию открытого грунта, в результате чего происходит морозобойное растрескивание почвы. Подобно высыхающей глине, эти трещины образуют на поверхности многоугольный узор. Весенняя талая вода заполняют трещины, замерзает и образует вертикальные ледяные жилы. Со временем, после многочисленных циклов замерзания-оттаивания, жилы становятся все шире и шире и впоследствии превращаются в ледяные клинья. Поскольку ледяные клинья занимают все больше места, прилегающий почвенный грунт отодвигается в сторону и накапливается в виде валиков, которые окружают депрессию (понижение на земной поверхности). Подземный дренаж влажной депрессии, в период короткого лета, предотвращается малой глубиной залегания мерзлоты, что создает условия для торфонакопления в углублениях [44; 45].

Полигональные торфяные болота в основном образуются в регионах, с годовым количеством осадков менее 250 мм, поскольку слишком большой снежный покров препятствует быстрому охлаждению вечной мерзлоты и образованию трещин. С другой стороны, климат должен быть достаточно влажным, чтобы поддерживать рост растений [45]. Данные торфяники широко распространены в прибрежных районах Восточной Сибири, Аляски и Северо-Западной Канады. Также они встречаются на плохо дренированных земельных участках, таких как речные террасы и поймы, и на дне осушенных термокарстовых озер [44].

В основе классификации полигональных болот, главным образом, лежит характер поверхности полигона и форма мезорельефа. Выделяют 4 группы микроландшафтов: плоскополигональные, вогнутополигональные, полигонально-валиковые и полигонально-бугристые [43].

– Вогнутополигональные

Они представлены комплексом вогнутых полигонов и глубоких трещин. Накопление на их поверхности воды и протаивание мерзлоты в центральной части полигона привело к формированию вогнутой поверхности. В результате этого внутри полигона формируются либо внутриполигональные мочажины, либо микроозерки. Мощность торфяной залежи на полигонах составляет порядка 1–2 м. В трещинах ниже торфа наблюдаются ледяные клинья, пронизывающие всю толщину полигона [43; 44].

– Плоскополигональные

Их отличительной особенностью являются плоские иногда слегка выпуклые полигоны. Они обособлены друг от друга либо узкими (20–50 см) и неглубокими (до 20–30 см), либо широкими (до 1–2 м) и глубокими (0,6–1,0 м) трещинами в виде канав. В морозобойных трещинах под торфяным слоем (30–50 см) часто локализованы ледяные клинья [43; 44]. Мощность торфяных залежей на водораздельных участках может достигать до 3 м, а на пойменных и террасных – около 20–50 см [43].

– Полигонально-валиковые

Они характеризуются наличием сухих валиков по краям полигонов, которые образовались в связи с поднятием краев полигонов из-за расширения трещин. Высота валиков обычно 15–20 см, иногда до 50 см, ширина их – 20–50 см. Их поверхность ниже валиков на 0,7–1,0 м. Мощность торфяной залежи на полигонах в этих комплексах на водораздельных пространствах порядка 1,5–2,5 м, а на пойменных и террасных участках – около 1,0 м [43; 46].

– Полигонально-бугристые

Представляют собой более позднюю стадию развития полигональных болот. Трещины и мочажины часто сливаются между собой, расширяя свою площадь. В результате образуются широкие топи со следами более древней полигональной

структуры. Мощность залежей торфа здесь порядка 1,0–1,5 м, редко достигает до 3 м [43].

1.1.6 Запасы углерода в массивах криолитозоны

Криолитозона является одним из главных резервуаров углерода биосферы. Хотя ее площадь составляет всего около 16 % от общей площади почвы, в ней сосредоточено 50 % мирового запаса почвенного органического углерода [47]. В среднем в ее массивах содержится около 1700 Пг углерода. Основная часть углерода распределена в северной циркумполярной мерзлотной области и составляет около 1672 Пг, из них 277 Пг заключено в торфяниках, 407 Пг в лессовых отложениях Сибири (на глубине ниже 3 м) и 421 Пг в глубоких аллювиальных отложениях ниже 3 м в речных дельтах арктических рек. Все почвы, локализованные в пределах циркумполярной вечной мерзлоты, включая торфяники, содержат 1024 Пг. Содержание углерода может варьироваться в зависимости от региона и от глубины криолитозоны [48]. Согласно базе данных содержания углерода в почве северной циркумполярной области (The Northern Circumpolar Soil Carbon Database) на глубине 0–30 см количество углерода достигает 191,29 Пг, на глубине 0–100 см 495,80 Пг и 1024,00 Пг на глубины 0–300 см (не считая лессовые и аллювиальные отложения) [49]. Большая часть этого запаса защищена от разложения по причине ограниченной микробной активности в мерзлых грунтах [1]. Однако продолжающийся рост глобальной температуры вызывает деградацию вечной мерзлоты, что в будущем может сделать доступным данный углеродный пул для микробного разложения. В связи с этим, ожидается, что в результате своей жизнедеятельности микроорганизмы трансформируют этот углеродный пул в парниковые газы, тем самым способствуя дальнейшему усилению изменения климата [50]. Особенно это актуально для торфяников, – экосистем постоянного стока атмосферного углерода, поскольку они чувствительны даже к незначительному повышению температуры [51].

1.1.7 Жизнь в вечной мерзлоте

Несмотря на низкотемпературные условия, низкую водообеспеченность, отсутствие поступления энергии и питательных веществ, криолитозона считается

огромным хранилищем древних жизнеспособных клеток [52]. В вечной мерзлоте Арктики концентрация клеток достигает 10^5 – 10^9 клеток/г сухой массы, в вечной мерзлоте Альп 10^{10} – 10^8 клеток/г сухой массы, а в криолитозоне Сибири 10^7 – 10^8 клеток/г сухой массы [53; 54]. При этом последние исследования демонстрируют, что в условиях вечной мерзлоты у некоторых бактерий не только активно протекает процесс метаболизма, но они также растут и делятся [55].

Выживание микроорганизмов в пределах вечной мерзлоты сопряжено с множеством стрессовых факторов [55]. При низких температурах снижается структурная гибкость белков, в результате чего они становятся склонными к «холодной» денатурации, клеточные мембраны часто теряют свою текучесть, что влияет на транспорт питательных веществ, происходит стабилизация вторичной структуры нуклеиновых кислот, что приводит к ингибированию процессов репликации, транскрипции и трансляции [52]. Также при низких температурах может увеличиваться концентрация активных форм кислорода, которые повреждают ДНК, РНК, белки и липиды. Наряду с этим сообщества микроорганизмов подвергаются воздействию фонового гамма-излучения от минералов почвы на уровне примерно 2 мГр в год [55]. Таким образом, чтобы преодолеть воздействие неблагоприятных факторов среды обитания, микроорганизмы должны обладать специальными адаптационными механизмами [52].

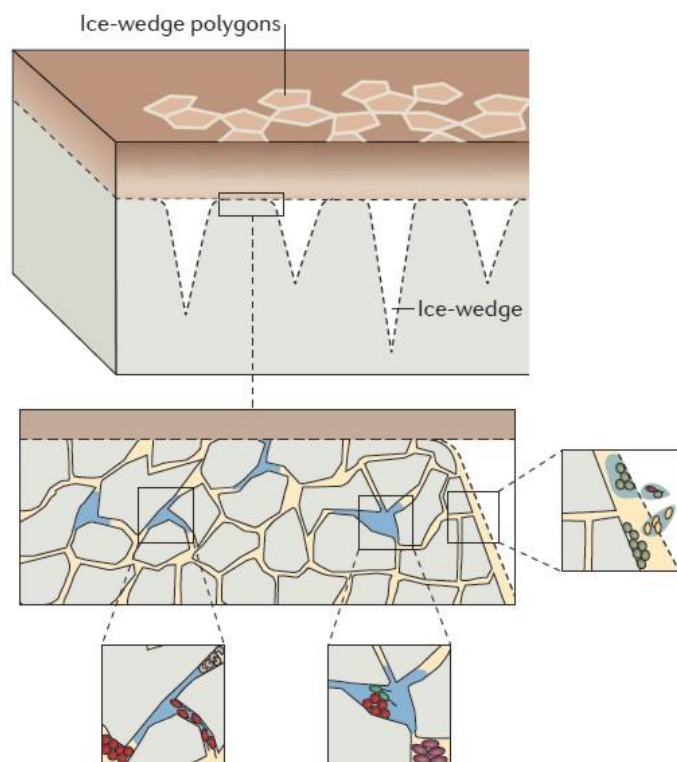
У микроорганизмов существует несколько стратегий выживания в условиях вечной мерзлоты. Одной из таких стратегий является переход в состояние покоя с низкой метаболической активностью (анабиоз), а другая включает изменение текучести мембран, выработку специфических белков или иных органических молекул, увеличение синтеза осмолитов и веществ с антиоксидантной активностью и др. [52; 56; 57].

Большинство прокариот, для того чтобы уменьшить вязкость мембраны при понижении температуры окружающей среды, приспособились изменять состав жирных кислот липидов, поскольку они влияют на плотность их упаковки, что в свою очередь, определяет температуру фазового перехода. Чем выше плотность упаковки, тем выше температура фазового перехода, и наоборот [56]. Так, например, при изучении адаптации к низкотемпературным условиям штамма

Psychrobacter sp. 273-4, выделенного из вечной мерзлоты Восточно-Сибирской низменности, было выявлено, что профили жирных кислот включали как жирные кислоты с прямолинейной цепью, так и ненасыщенные жирные кислоты, а жирные кислоты с разветвленной цепью вовсе отсутствовали. При этом общий состав ненасыщенных жирных кислот увеличивался с понижением температуры (от 24 °С до 4 °С), а также при увеличении концентрации соли (5 %) [58].

По мере подавления общих метаболических функций в стрессовых условиях роста синтез и накопление резервных углеводов имеет важное значение для выживания клеток в условиях ограниченного поступления питательных веществ. Так при исследовании адаптивных механизмов на молекулярном уровне бактерии *Planococcus halocryophilus* Or1, выделенной из вечной мерзлоты Канады, было обнаружено, что несколько генов оперона, отвечающего за синтез гликогена (Phal2841-Phal2844) индуцируются в условиях высокой концентрации соли, и, вероятно, отвечают на потребность в углеводах при стрессе [57]. Так же предполагается, что микроорганизмы в вечной мерзлоте могут запасать углеводы в виде полигидроксиалканоатов, полифосфатов, триглицеридов и восковых эфиров [52].

Помимо адаптации на молекулярном уровне, существованию микроорганизмов в столь экстремальной экосистеме способствует их разрозненное распределение в массивах криолитозоны. Чаще всего они локализованы в криопегах, которые могут понижать температуру замерзания из-за высокой концентрации соли. Также они могут быть сосредоточены в надмерзлотном слое, который представляет собой физическую границу между активным слоем и вечной мерзлотой, по причине проникновения талой воды через верхние слои почвы. Полигональные болота могут поддерживать микробную жизнь в жилках, заполненных рассольной водой, и постулируется, что в них сосредоточено относительно высокое содержание клеток, поскольку микроорганизмы концентрируются из воды, которая просачивается через почву (Рисунок 8) [52].



Ice-wedge polygons – полигональное болото; Ice-wedge – ледяной клин

Рисунок 8 – Распределение микроорганизмов в пределах полигонального болота [52]

В условия глобального потепления, учитывая чувствительность криолитозоны к изменению климата, а также наличие больших запасов углерода и микроорганизмов, решающее значение приобрело исследование жизнеспособности, структуры и возможных реакций сообществ на изменяющиеся условия среды с целью выявления ответной реакции деградации криолитозоны на глобальный цикл углерода.

1.2 Методы изучения экологии микроорганизмов криолитозоны

Сложность исследования микробных сообществ природных экосистем, в том числе и криолитозоны, обуславливается необычайно высоким уровнем генетического разнообразия микроорганизмов, обитающих в них, и тем, что большинство из них являются некультивируемыми формами. Благодаря быстрому развитию технологий высокопроизводительного секвенирования появилась возможность работать с большими объемами генетической информации и перейти к изучению разнообразия ранее неизвестных микроорганизмов [59]. А правильная комбинация данного метода с другими существующими молекулярно-

генетическими методами дает возможность определять видоспецифичные биогеохимические функции различных таксонов.

1.2.1 Метагеномное секвенирование маркерного гена 16S рРНК

В настоящее время для изучения микробоценозов криолитозоны часто применяется так называемое метагеномное секвенирование маркерных генов, при котором секвенируется не весь геном, а лишь те его регионы, по которым можно установить таксономическую принадлежность. В качестве такого гена выступает ген 16S рРНК, который представляет собой нуклеотидную последовательность длиной приблизительно 1600 пар оснований (п.о.), включающую в себя девять гипервариабельных областей (доменов) различной консервативности (v1–v9). Более консервативные домены используют для определения таксонов высокого ранга, тогда как более быстро изменяющиеся (v1–v4) для идентификации родов или видов [60].

На сегодняшний день самыми распространёнными технологиями секвенирования являются 454 Life Sciences (эмульсионная ПЦР + пиросеквенирование), Illumina (мостиковая ПЦР + секвенирование синтезом), Ion Torrent (эмульсионная ПЦР + полупроводниковое ПЦР) и Pacific Biosciences (секвенирование синтезом одиночных молекул). Метод пиросеквенирования позволяет получать фрагменты длиной до 600 п.о., Illumina и Ion Torrent являются более высокопроизводительными платформами, однако, длины фрагментов там составляют до 250 п.о. Платформа Pacific Biosciences основана на наблюдении в реальном времени за единичной молекулой ДНК-полимеразы и позволяет получать фрагменты длиной до 60000 п.о. [61].

Данный подход широко распространён при изучении состава бактериальных сообществ криолитозоны Канады [57], Аляски [12; 63], Сибири [51; 58] и др.

1.2.2 Гены *mcrA* и *pmoA* как альтернатива 16S рРНК в филогенетическом анализе популяций метаногенов и метанотрофов

Поскольку криолитозона является значительным резервуаром углерода, который может быть в будущем трансформирован в метан в результате жизнедеятельности микроорганизмов, чрезвычайно важно понимать, насколько

многочисленны и широко распространены сообщества микроорганизмов, отвечающих за образование (метаногены) и поглощение (метанотрофы) метана [51].

Для идентификации метаногенов используют консервативный маркерный ген *mcrA*. Данный ген кодирует α -субъединицу метил-коэнзим М редуктазы, которая является терминальным ферментом, катализирующим восстановление метильной группы, связанной с коферментом М, с сопутствующим высвобождением метана [10; 62].

Наиболее консервативным и широко используемым в качестве функционального маркера для идентификации метанотрофных бактерий является ген, кодирующий метанмонооксигеназу (ММО). Метанмонооксигеназа является ключевым ферментом, ответственным за начальную стадию превращения метана в метанол. Известны две формы этого фермента, растворимая и мембрансвязанная (мММО). Ген *pmoA*, кодирующий β -субъединицу мембрансвязанной монооксигеназы, является наиболее часто используемым маркером, поскольку он присутствует у большинства аэробных метанотрофных бактерий, за исключением *Beijerinckiaceae*. Он также присутствует у анаэробных денитрифицирующих бактерий [63].

С использованием данного подхода в исследованиях В. А. Barbier показано, что оба сообщества широко распространены вдоль вертикального профиля активного слоя в зоне криолитозоны Канады [62].

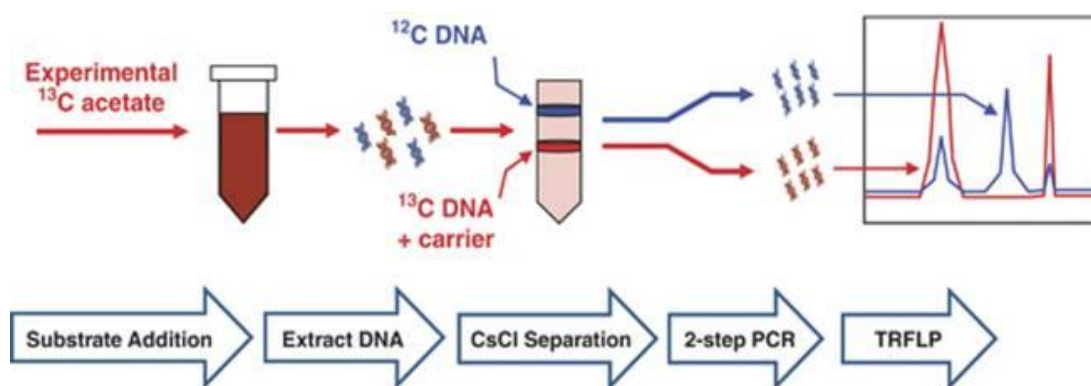
Основным недостатком выше указанных методов, относительно изучения бактериального разнообразия вечной мерзлоты, является то, что низкотемпературные условия в ее массивах способствует сохранению всего генетического материала, а, следовательно, не все обнаруженные последовательности могут принадлежать активным или даже жизнеспособным клеткам [52].

1.2.3 Мечение ДНК стабильными изотопами как метод выявления активных форм бактерий

Для выявления активных сообществ микроорганизмов криолитозоны, используют технику зондирования ДНК стабильными изотопами (DNA stable-

isotope probing – DNA-SIP) [64]. Как правило, в качестве меток используют редко встречающиеся в природе атомы ^{13}C , ^{18}O и ^{15}N . Однако изотопы ^{18}O и ^{15}N применяются реже, поскольку в составе ДНК атомов кислорода и азота по количеству меньше чем атомов углерода, что снижает эффективность физического разделения меченой нуклеиновой кислоты [65]. Включение метки также может определяться в РНК или в мембранных липидах клеток [66].

Метод мечение стабильными изотопами ДНК основан на следующем: во время инкубации образца в среде, содержащей меченый субстрат, активные формы бактерий ассимилируют его, после чего метка встраивается в структуру их ДНК и в ходе репликации содержание тяжёлого изотопа в клетке растёт. После инкубации ДНК экстрагируют из клеток и подвергают ультрацентрифугированию в градиенте плотности хлорида цезия для разделения немеченых и меченых нуклеиновых кислот, затем ДНК можно использовать для метагеномного анализа, фингерпринтинга и т.д. [65; 66]. Для отрицательного контроля образец инкубируют в среде с нативным (например, ^{12}C) субстратом. Общая схема проведения мечения ДНК с последующим анализом представлена на рисунке 9 [62].



Синяя линия – неактивные формы; красная – активные

Рисунок 9 – Общая схема мечения ДНК с последующим анализом [64]

С помощью данного метода S. J. Tuorto показал, что большинство (80 %) бактериальных таксономических единиц, обнаруженных в вечной мерзлоте Аляски, были активными и могли синтезировать ДНК меченную изотопом ^{13}C при добавлении ^{13}C -ацетата при температуре от 0 до $-20\text{ }^\circ\text{C}$ [64].

Основным преимуществом мечения ДНК стабильными изотопами является то, что обогащённая тяжёлыми изотопами ДНК заключает в себе весь геном каждого функционально активного члена сообщества, что открывает возможность

для более тщательного геномного анализа некультивируемых форм. Недостатком анализа меченой ДНК является необходимость проводить эксперимент длительное время для того, чтобы произошла репликация [66].

1.2.4 Метод фингерпринтов

Фингерпринтинг представляет собой быстрый метод детекции изменения в структуре бактериального сообщества. Фингерпринты отражают профиль сообщества, на котором отдельная полоса ДНК или пик соответствует одной популяции бактерий. Если после внесения питательного вещества популяция увеличила свою долю и заняла доминирующее положение в сообществе, предполагается, что она ассимилирует добавленное вещество [66]. Однако данный подход не дает конкретной информации о том, какая именно популяция микроорганизмов изменились [10].

Чаще всего при изучении изменений в структуре бактериального сообщества криолитозоны используют метод терминального полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – T-RFLP).

1.2.4.1 Терминальный полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

В основе метода T-RFLP лежит детекция флюоресцентно меченных терминальных фрагментов рестрикции гена 16S рНК. Данный метод отражает распределение доминирующих таксонов в сообществе микроорганизмов.

Метод T-RFLP осуществляется следующим образом: первоначально проводят амплификацию целевого гена 16S рНК с определенным набором праймеров, меченных флуоресцентной меткой, амплифицированный фрагмент обрабатывают эндонуклеазами рестрикции и разделяют в условиях капиллярного электрофореза с флюоресцентной детекцией. Поскольку каждый вид микроорганизмов обладает уникальной нуклеотидной последовательностью гена 16S рНК, в результате обработки рестриктазами образуются фрагменты различной длины, характерной для конкретной популяции микроорганизмов. По окончании капиллярного электрофореза получают электрофореграмму с пиками, где ось X отражает размеры фрагментов, а ось Y – интенсивность их

флуоресценции. Каждый пик соответствует одному генетическому варианту в исходном образце, тогда как его высота или площадь соответствуют его относительной численности в конкретном сообществе [59].

Данный метод был использован S. J. Tuorto при выявлении жизнеспособных клеток криолитозоны после мечения ДНК стабильными изотопами (Рисунок 9) [64].

1.3 Исследования состава сообществ микроорганизмов криолитозоны

Молекулярно-генетические методы в настоящее время широко используются в микробной экологии криолитозоны для более подробного изучения структуры микробных сообществ, выявления видоспецифичных функций, а также для отслеживания влияния факторов окружающей среды на состав микробных сообществ. Далее представлены несколько исследований, которые демонстрируют, как может отличаться структура микробного сообщества в одном географическом положении, а также как может влиять изменение температуры на состав микробоценозов.

1.3.1 Структура микробных сообществ двух торфяно-болотных почв Сибири

Для оценки роли бактериального сообщества (в основном метаногенов и метанотрофов) криолитозоны в глобальном цикле углерода необходимо, понимать, насколько разнообразны, многочисленны и широко они распространены в ее пределах.

Гродницкая И. Д., на примере двух болот различного генезиса (олиго-мезотрофное болото (ОМБ), обладающее большей биогенностью, и кустарничково-осоковое болото (ПБ)), локализованных в районе вечной мерзлоты Сибири, продемонстрировала существенное различие качественного состава архей (в том числе метаногенных) на основе гена 16S рРНК в почвах ОМБ и ПБ. Как показал анализ данных, на домен *Archaea* в буграх ОМБ приходится от 0,1 до 0,7 % и от 0,3 до 2,2 % содержится в западинах, от всех последовательностей гена 16S рРНК, тогда как в ПБ – 0,1–1,0 %. Домен *Archaea* в буграх представлен тремя типами *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, в западинах, помимо выше

указанных трех, наблюдаются еще и *Pasearchaeota*, *Woesearchaeota*. В ПБ обнаружено лишь три типа *Crenarchaeota*, *Pasearchaeota* и *Euryarchaeota*, причем количество представителей *Euryarchaeota* увеличивается с глубиной (30–35 см) (Рисунок 10).

Метанооксиляющие бактерии в ОМБ распределены по всей глубине профиля, вплоть до мерзлотного слоя (20–35 см). На буграх и западинах доминировали метанотрофы II типа двух семейств *Methylocystaceae* (10–20 см) и *Beijerinckiaceae* (10–30 см). В пределах ПБ метанотрофов найдено существенно меньше. На глубине 5–10 см найдены последовательности гена 16S рРНК метанотрофов семейства *Methylocystaceae*, на глубине 15–20 см семейства *Methylococcaceae*.

Несмотря на то, что большее разнообразие последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов выявлено в ОМБ, и распределены они по всей глубине профиля, а на участке ПБ метанотрофы были найдены лишь в верхних (до 20 см) слоях почвы, метанотрофная активность ПБ была выше в 2,3 раза, чем в ОМБ. Метаногенная активность ПБ также была больше чем ОМБ [51].

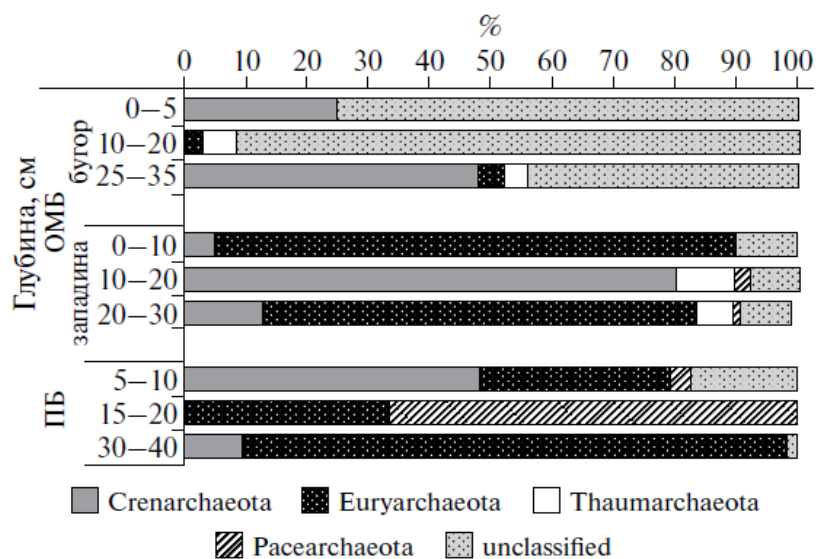


Рисунок 10 – Состав популяции метаногенных архей в ПБ и ОМБ

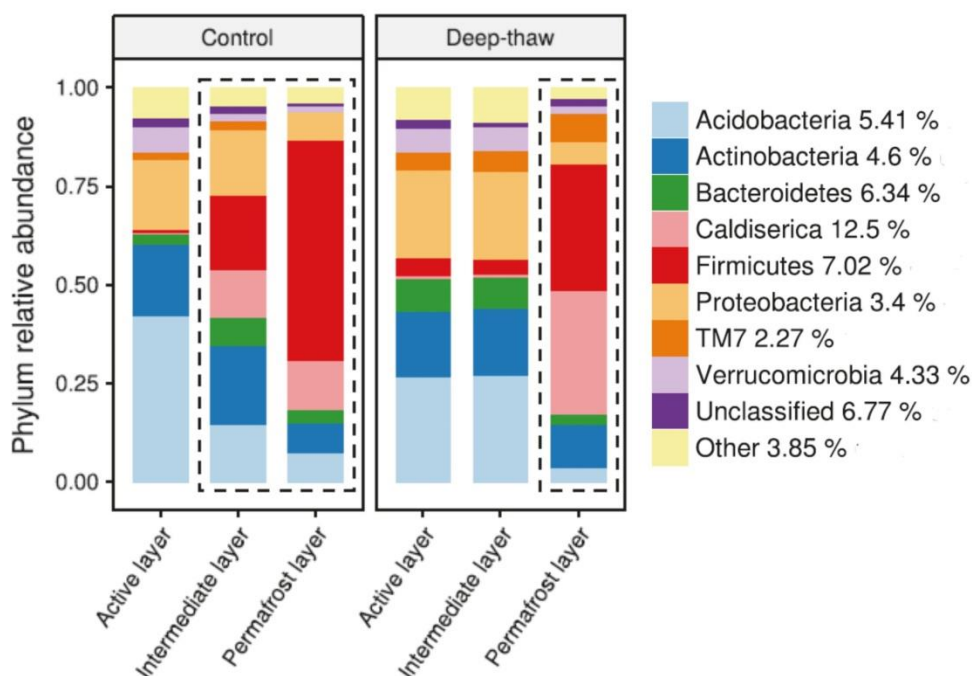
1.3.2 Эффект оттепели на бактериальные сообщества вечной мерзлоты

Скорость разложение крупных запасов органического углерода в почве при оттаивании вечной мерзлоты может зависеть не только от активации бактериального сообщества, но и от изменения его структуры в ходе потепления.

Однако малоизвестно о том, как может повлиять оттепель в течение длительного периода на микробоценоз.

Monteux S. был исследован эффект длительной оттепели на состав бактериального сообщества мерзлого бугристого болота, локализованного недалеко от Абиску, Северная Швеция. Толщина активного слоя торфяного болота в 2015 году составляла $69,3 \pm 3,7$ см, а глубина грунтовых вод – $30,2 \pm 2,8$ см. Начиная с 2005 г. на участке площадью 10 м каждую зиму, в течение 10 лет, создавался эффект оттепели путем увеличения снежного покрова на 1 м при этом температура почвы (на глубине 15 см) в зимний период увеличилась на 1,5 °С. В качестве контроля служил участок с естественным покровом снега 6–9 см.

Эффект оттепели вызвал переход надмерзлотного слоя в сезонно-талый слой, при этом состав сообщества стал практически идентичен с таковым в активном слое. Этот переход от многолетнемерзлого состояния к сезонно-талому на уровне бактериального сообщества характеризовался значительным снижением относительного содержания представителей филумов *Firmicutes* и *Caldiserica*, но при этом ростом относительного содержания представителей *Acidobacteria* (Рисунок 11).



Active layer – активный слой; Intermediate layer – надмерзлотный слой; Permafrost layer – слой вечной мерзлоты

Рисунок 11 – Структура бактериального сообщества на основе гена 16S рРНК.

В контрольной пробе с глубиной прослеживалось снижение признаков аэробного дыхания. Однако такая же тенденция прослеживалась и после воздействия оттепели, что предположительно было связано с постепенным лабильным истощением запасов углерода [1].

Таким образом, молекулярно-генетические методы позволяют не только идентифицировать таксономическую принадлежность, но и дают возможность предсказать, как потепление в зоне криолитозоны может отразиться на глобальном круговороте углерода.

1.4 Выводы по аналитическому обзору

Более 20 % земной поверхности Земли покрыто вечной мерзлотой с огромными запасами органического углерода, значительная часть которого заключена в торфяниках – стоков атмосферного углерода с голоценового периода. Высокие темпы потепления климата могут вовлечь существенную часть этой органики в глобальный цикл углерода, что делает эти экосистемы крупнейшим источником парниковых газов. Однако этот процесс в значительной степени зависит от микробных реакций. Несмотря на успехи в использовании молекулярно-генетических инструментов в изучении численности и разнообразия бактерий в надмерзлотном и сезонно-талом слоях минеральных и торфяных почв, мерзлые торфяники и подстилающие минеральные почвы остаются практически не охарактеризованными с точки зрения физиологического разнообразия и метаболического потенциала бактерий.

Целью работы является изучение состава сообщества микроорганизмов бугристого торфяного болота, локализованного в пределах островной криолитозоны, Западная Сибирь. Для достижения данной цели поставлены следующие задачи:

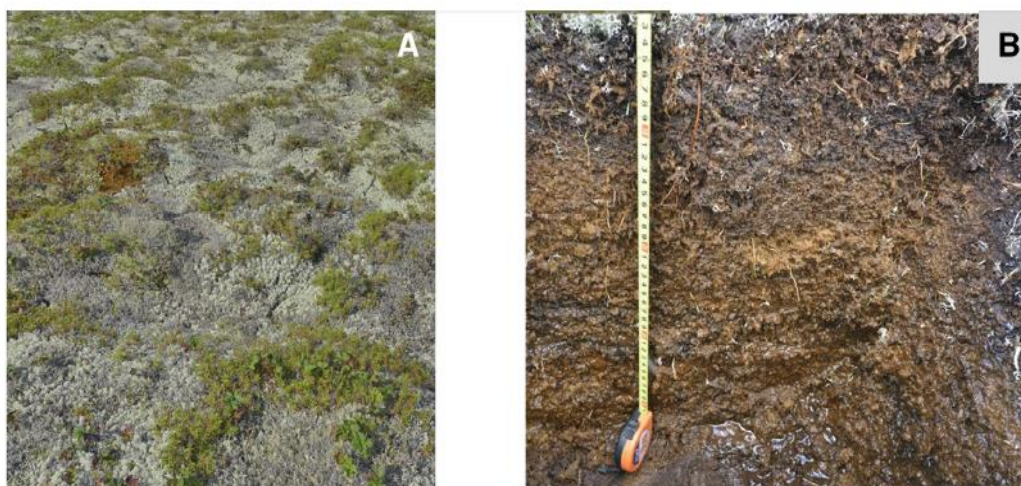
- На основе литературных данных охарактеризовать объект исследования – торфяной профиль бугристого болота, локализованного в районе Ханымей;
- Получить зависимость концентрации микроорганизмов от глубины залегания торфяного профиля;
- Сравнить методы выделения тотальной ДНК из гетерогенной многофазной среды – мерзлого торфа;

– Анализ структуры сообщества микроорганизмов мерзлого торфяного профиля бугристого болота.

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали образцы торфяных кернов, отобранные в 2018 г с различной глубины (0-110 см) бугристого (торфяного) болота, расположенного на участке водораздела, в зоне прерывистой вечной мерзлоты вблизи полигона Ханымей ($N63^{\circ}47'50,10''$, $E75^{\circ}33'21,90''$), локализованного в северной части Западно-Сибирской равнины. Торф (толщиной 1,0 м) образован непосредственно на песчаном грунте с небольшим количеством глины и ила. На исследуемой территории доминируют плоскобугристые болота, в которых существенная доля почвенного покрова состоит из типичной торфяной мерзлотной почвы (в составе бугров) и типичной торфяной почвы (в просадке). Диаметр бугров и просадок составляет менее 1 м, а глубина просадки 40–50 см (Рисунок 12 А, В) [2].



А – бугристое торфяное болото; В – торфяной горизонт

Рисунок 12 – Территория отбора торфяного керна [2]

Отбор образца, а также характеристика торфяного керна и территории исследования были осуществлены сотрудниками ФИЦКИА РАН имени академика Н. П. Лаврова, центра биотестирования безопасности нанотехнологий и наноматериалов НУ ТГУ и института «Науки о земле и окружающей среде» Тулузы.

2.2 Методы исследования

Способы выделения тотальной ДНК из природных объектов подразделяют на два принципиально разных подхода. Одним, из которых является очистка нуклеиновых кислот, полученных на прямую *in situ* с помощью лизиса бактериальных клеток (прямая экстракция). Второй же, напротив, основан на первоначальном отделении клеток с их последующим лизисом и очисткой нуклеиновых кислот (непрямая экстракция) [67].

2.2.1 Непрямая экстракция ДНК

В пробирку типа falcon на 50 мл помещали примерно 15 см³ торфа, после чего в нее добавляли 25–30 мл физраствора и тщательно перемешивали на вортексе в течение 2–3 мин. Для удаления взвеси торфа проводили центрифугирование на скорости 1000 об/мин при комнатной температуре. Для осаждения клеточной массы надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и центрифугировали при 7000–8000 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант удаляли, а клеточную массу переносили с помощью 1 мл нагретого до 60 °С лизис буфера (500 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), 4 % додецилсульфат натрия (SDS)) в пробирку на 2 мл с завинчивающейся крышкой и вносили 400 мг матрикса для гомогенизации (соотношение 0,1 мм – 300 мг; 0,4 мм – 100 мг). После чего гомогенизацию осуществляли на приборе FastPrep со следующими параметрами программы: обработка 1 мин на 5 м/с, пауза 5 мин, обработка 1 мин на 5 м/с. Лизат инкубировали 15 мин при 70 °С в твердотельном термостате при 300 оборотах. Далее смесь центрифугировали 10 мин при максимальной скорости. Аккуратно отбирали с самого верха 800 мкл супернатанта и помещали в заранее подготовленные пробирки на 2 мл. После чего к раствору добавляли 400 мкл фенола и 400 мкл хлороформа. Содержимое пробирки активно перемешивали 2-3 минуты и центрифугировали 10 мин при максимальной скорости. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, не погружая глубоко носик наконечника и избегая любой агитации интерфазы. К отобранной водной фазе добавляли хлороформ в соотношении 1:1 и перемешивали 2–3 мин. После чего

снова центрифугировали при тех же условиях, что и на предыдущей стадии, и водную фазу переносили в новую пробирку. Вышеуказанную процедуру с хлороформом проводили еще раз. Водную фазу отбирали в заранее подготовленные пробирки на 2 мл, содержащие этиловый спирт и ацетат натрия (1100 мкл этилового спирта и 50 мкл 3 М ацетата натрия). Кратковременно перемешивали переворачиванием пробирки и инкубировали 1 ч при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (на этой стадии образцы могут храниться несколько дней при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Затем содержимое пробирки центрифугировали 20 мин при максимальной скорости на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого удаляли супернатант и вносили 500 мкл 80 % этанола и аккуратно вручную перемешивали плавным переворачиванием пробирки. Повторили процедура центрифугирования в течение 5 мин при максимальной скорости на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После чего еще раз осуществили обработку спиртом и последующие стадии. Полученный осадок сушили при комнатной температуре ориентировочно 15 мин. После удаления спирта осадок растворяли в 50–100 мкл стерильной деионизированной воде (Выделенный препарат ДНК можно хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2.2 Методы прямой экстракции ДНК

2.2.2.1 Выделение ДНК коммерческим набором PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit

В пробирку с мелкодисперсным материалом для гомогенизации вносили 600 мкл лизис буфера – S1. Туда же вносили примерно 0,25 г замороженного торфа, плотно закрывали крышку и тщательно перемешивали на вортексе. Затем вносили 100 мкл буфера S2, усиливающего лизис, плотно закрывали крышку и немедленно перемешивали. Содержимое пробирки инкубировали в термостате при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. Для равномерного протекания лизиса пробу периодически перемешивали. После чего осуществляли гомогенизацию на приборе MagNa Lyser Instrument (Roche, Швейцария) при максимальной скорости 7 м/с в течение 15 мин, при этом через каждую минуту пробу охлаждали на ледяной бане для предотвращения разрушения ДНК при перегреве. Далее гомогенизат центрифугировали на центрифуге Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия) скорости 14000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. После этого 400 мкл

супернатанта переносили в чистый микроцентрифужный эппендорф, не затрагивая мелкодисперсный материал (если переносится < 250 мкл супернатанта, то к перенесенному супернатанту необходимо добавить столько лизирующего буфер - S1, чтобы в конечном итоге общий объем составил 400 мкл). К супернатанту добавляли 250 мкл очищающего буфера S3 и сразу же перемешивали. Полученную смесь инкубировали на льду в течение 10 мин. Для отделения взвеси пробу центрифугировали при 14000 об/мин в течение 1 мин. Далее 500 мкл надосадочной жидкости переносили в чистую пробирку, избегая агитации осадка.

Для связывания ДНК с колонкой к 500 мкл пробы внесли 900 мкл связывающего буфера – S4 и быстро перемешали. После чего 700 мкл полученной смеси переносили на колонку с приемником и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре. Жидкость из приемника удаляли, и остаток смеси (700 мкл) переносили на колонку и снова центрифугировали при тех же условиях.

Для отмывки и элюирования ДНК колонку переносили в новый приемник, туда добавляли 500 мкл отмывочного буфера – S5, затем центрифугировали при 13400 об/мин в течение 1 мин. После удаления жидкости из приемника проводили центрифугирование еще раз при 14000 об/мин в течение 30 секунд для тщательного удаления отмывающего буфера – S5. Спин-колонку переносили в новый приемник и вносили 100 мкл элюирующего буфера – S6, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин. После этого колонку центрифугировали при 14000 об/мин в течение 1 мин, затем колонку выбрасывали так, как ДНК перешла в раствор. Хранения ДНК осуществляли при -20 °С (также возможно хранить пробу при -4 °С).

2.2.2.2 Экстракция ДНК с использованием TENC буфера

Один грамм замороженного торфа ресуспензировали в 2 мл TENC буфера (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM фосфатный буфер, 1,5 M NaCl, pH 8), после чего центрифугировали до полного осаждения взвеси при 4200 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и осадок снова ресуспензировали в 2 мл TENC буфера, затем вносили 200 мкл 20 % бромид цетилтриметиламмония (СТАВ), 200 мкл 20 % SDS и 50 мкл протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл). После этого

содержимое пробирки типа falcon и инкубировали на водяной бане с перемешиванием BioSan WB-4MS (BioSan, Латвия) при температуре 55 °С в течение 2 ч, при этом содержимое периодически перемешивали для равномерного протекания лизиса. После инкубации полученную смесь центрифугировали при скорости 4200 об/мин до осветления супернатанта. Далее супернатант отбирали в 2 пробирки на 2 мл и центрифугировали при 14000 об/мин. Надосадок снова переносили в новые пробирки и вносили равный объем хлороформа, а затем тщательно перемешивали на вортексе. Смесь центрифугировали в 2 этапа: 1 – 1500 об/мин 5 мин; 2 – 4500 об/мин 10 мин. После этого надосадок отбирали в чистые пробирки, не задевая промежуточной фазы белков. К растворам ДНК добавляли равный объем изопропанола и инкубировали при – 20 °С в течение часа. Далее смесь центрифугировали при 14000 в течение 30 мин. Изопропанол удаляли, а осадок дважды аккуратно промывали 70 % этанолом. После удаления этанола осадок высушивали при 50 °С и затем растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера.

2.2.2.3 Гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция

Для выделения ДНК в пробирку объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой отбирали навеску 0,2 г замороженного торфа. Вносили приблизительно равное по объему количество матрикса для гомогенизации, 350 мкл раствора А (Натрий-фосфатный буфер 200 mM и гуанидин изотиоцианат 240 mM, pH 7,0), хорошо перемешивали на вортексе и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 350 мкл раствора Б (Трис–HCl 500 mM и SDS 1%, pH 7,0) и 400 мкл смеси фенол-хлороформ (1:1). Пробирку помещали в гомогенизатор и разрушали образец в течение 10 мин при скорости 5,5 м/с. При этом пробу через каждую минуту охлаждали на ледяной бане. Затем центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Водную фазу аккуратно отбирали, к ней добавляли 400 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), интенсивно встряхивали в течение 1-3 мин, центрифугировали также, как и на предыдущей стадии и аккуратно отбирали водную фазу. К неочищенному экстракту ДНК добавляли один объем изопропилового спирта (добавление солей не требуется). После этого интенсивно перемешивали, центрифугировали на 14000 об/мин в течение 5 мин и осадок ДНК промывали холодным 70 % этанолом. Далее осадок слегка

подсушивали на воздухе и растворяли при 65 °С в течение 5-10 мин в 100 мкл стерильной воды.

2.2.2.4 Экстракция ДНК с помощью СТАВ буфера

Замороженный торф в количестве 0,5 г помещали в пробирку с равным количеством матрикса, туда же вносили 0,5 мл экстрагирующего буфера (10 % СТАВ, 1 М NaCl, 0,1 М (NH₄)₂SO₄) и 0,5 мл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1). После этого смесь тщательно перемешивали. Далее осуществляли гомогенизацию при скорости 5,5 м/с 10 мин, при этом периодически охлаждали пробу на ледяной бане. После гомогенизации пробы центрифугировали на скорости 14000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант переносили в чистую пробирку на 2 мл и добавляли к нему равный объем смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1). Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Затем аккуратно отбирали надосадочную жидкость, не задевая интерфазы, и переносили в новую пробирку. Из полученного раствора экстрагировали ДНК 2 объемами смеси 30 % полиэтиленгликоль/1,6 М NaCl в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее проводили центрифугирование 10 мин при 14000 об/мин и 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок ДНК промывали холодным 70 % этанолом и подсушивали на воздухе. После чего ДНК растворяли в стерильной воде в течение 10 мин при 65 °С. Раствор ДНК хранили при –20 °С.

2.2.3 Постановка полимеразной цепной реакции

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) основан на многократной амплификации в пробирке необходимых фрагментов ДНК при помощи фермента ДНК-полимеразы в ходе повторяющихся температурных циклов.

ПЦР-продукт из выделенной ДНК получали следующим образом:

1. Отбирали от 0,5 до 1,0 мкл выделенной ДНК (в зависимости от концентрации полученной ДНК, необходимое количество не более 200 нг на реакцию) прямо на дно пробирки для ПЦР.

2. Готовили стоковые растворы праймеров Eub338 (ACTCCTACGGGA GGCAGCAG) и Eub518 (ATTACCGCGGCTGCTGG) с концентрацией 10 мкМ. Конечная концентрация в реакционной смеси 0,1 мкМ.

3. Оттаивали Taq-буфер, содержащий MgCl₂ (хранится в морозилке, расход 2,5 мкл на пробу при общем объеме 25 мкл) и термостабильную Taq-полимеразу (концентрация 5 ед/мкл), на пробу идет 0,7-0,8 ед.

4. Готовили стоковый раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) Σ dNTP с концентрацией 10 мМ. Раствор Σ dNTP хранился в морозилке. Конечная концентрация в реакционной смеси 0,2 мМ.

3. В отдельную пробирку на 0,5 мл вносили рассчитанное количество необходимых компонентов для всех проб, причем приготовление велось в расчете на одну пробу больше. Например, на 4 пробы вносили 12,5 мкл Taq-буфера, 2,5 мкл Σ dNTP, 1,3 мкл прямого праймера, 1,3 мкл обратного праймера, 1,3 мкл Taq-полимеразы, 102 мкл деионизированной воды. Вносили в следующей последовательности: вода, буфер, нуклеотиды, праймеры, полимеразы. После внесения всех компонентов пробирку слегка встряхивали и откручивали на вортексе. Приготовленный раствор из всех компонентов вносили во все пробы (если вначале объем пробы ДНК был 0,5 мкл, то вносили по 24,5 мкл смеси).

4. Полимеразную цепную реакцию осуществляли в амплификаторе T100TM Thermal Cycle (Bio-Rad, США). ПЦР проводили со следующим температурным профилем: Смесь денатурировали при 95 °С – 15 минут, после чего следовало 40 циклов: 95 °С – 1 мин, 53 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин. Финальная элонгация проводилась при 72 °С 5 мин [68].

Продукты ПЦР детектировали и анализировали с помощью гель-электрофореза в агарозном геле.

2.2.4 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Приблизительную оценку численности микроорганизмов в образцах проводили с использованием ПЦР с детекцией в реальном времени. В качестве контроля для бактерий использовали клонированные фрагменты рибосомного оперона *Escherichia coli* (Sigma), для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum* (штамм предоставил Г. Юргенс, Университет Хельсинки). Были

использованы следующие праймеры: Eub338/Eub518 – для бактерий, arc915f/arc1059r – для архей. Определение для каждого образца проводили в трех повторностях. Количественные оценки приведены к числу рРНК оперонов на грамм почвы.

2.2.5 Электрофоретическое определение молекулярной массы ДНК

Для контроля выделения ДНК проводили горизонтальный геле-электрофорез, который основан на разделении молекул в соответствии с их молекулярной массой.

Для проведения электрофореза готовили пластину 1,5 % агарозного геля. В колбу на 100 мл вносили 0,6 г агарозы и 40 мл электрофорезного 1x трис-ацетатного-ЭДТА буфера (ТАЕ) и нагревали смесь в микроволновой печи до полного растворения агарозы (смесь должна покипеть несколько минут). Затем раствор агарозы остужали до 60 °С и вносили 2 мкл бромистого этидия из расчета, что конечная концентрация должна быть 0,5 мкг/мл. На заливочный столик, расположенный внутри электрофорезной камеры Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad, США), с установленными гребенками выливали расплавленную агарозу. Извлечение гребенок осуществляли после того как агароза полностью застыла. За счет гребенок образовывались лунки, в которые затем вносили образцы ДНК. Для того, что бы проба равномерно опустилась на дно лунки и была возможность следить за ходом электрофореза, образцы смешивали с 2 мкл 1× буфера для внесения, содержащего бромфеноловый синий. После чего электрофорез вели при напряжении 70 В в течение 30–40 мин. Гель дополнительно окрашивали в бромистом этидии (5 мкл на 100 мл ТАЕ-буфера). Результат выделения ДНК детектировали с помощью гельдокументирующей системы Bio-Print-CX4/20M (Vilber, Франция).

2.2.6 Высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК

Экстракцию ДНК из образцов мерзлого торфа сотрудники ГНУ ВНИИСХМ РАСХН осуществляли с помощью набора macherey-nagel nucleospin soil kit (Macherey-nagel, Германия) согласно инструкции производителя.

Таксономический анализ бактериального сообщества проводили с использованием универсальных праймеров F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) на переменный участок гена 16S рНК v3–v4, специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи [69]. Все праймеры имели служебные последовательности содержащие линкеры и баркоды (необходимые для секвенирования по технологии Illumina). ПЦР была проведена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 – 1 единицу активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP. Смесь денатурировали при 94 °С 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 30 с. Финальная элонгация проводилась при 72 °С 3 мин. ПЦР продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием AMPureXP (BeckmanCoulter, США). Дальнейшую подготовку библиотек проводили в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2*300 н). Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывались с использованием пакетов ПО «Trimmomatic» и «QIIME». На первом этапе производился первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (basepairquality), объединение парно-концевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований, а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 180 п.н. На втором этапе обработки осуществлялось удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), а также последовательностей, содержащих протяженные гомополимерные повторы. При анализе бактериальных сообществ использовался de novo ОТЕ-пикинг. Таксономическая идентификация ОТЕ проводилась с помощью базы данных RDP.

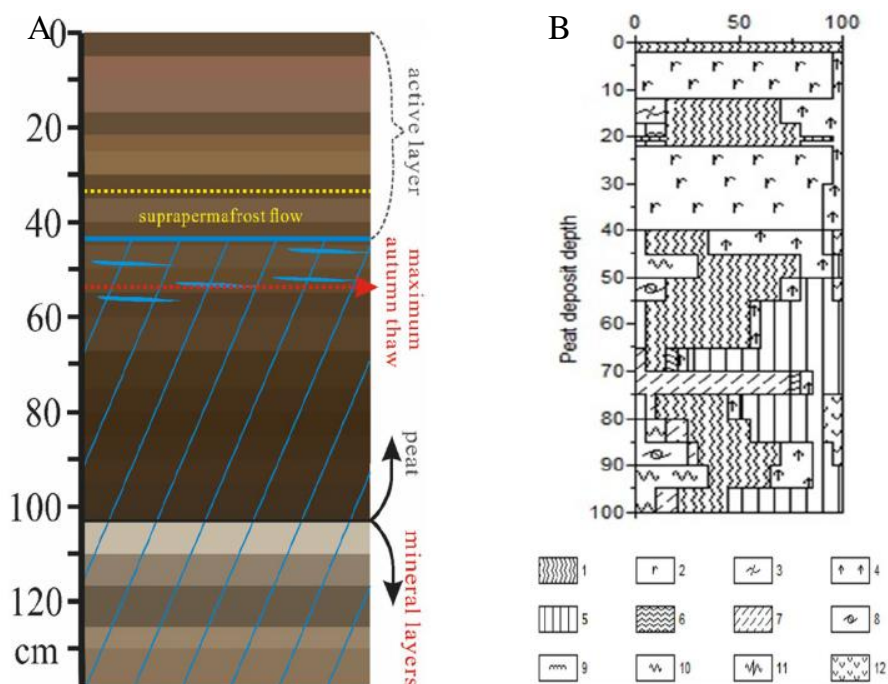
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Характеристика объекта исследования

В многолетнемерзлых породах Северного полушария содержится около 1700 Пг органического углерода, порядка 28 % которого находится в отложениях торфа. При этом только в торфяниках Западно-Сибирской равнины законсервировано 50–70 Пг $C_{орг}$. Однако недавние исследования показали, что вечная мерзлота на данной территории, в течение последних десятилетий, активно деградирует [1; 70]. А продолжающееся изменение климата грозит высвобождением данного углерода, что сделает его доступным для микробного разложения, с последующей эмиссией парниковых газов. Несмотря на это, разнообразие и метаболическая активность микробоценоза торфяников, локализованных в зоне вечной мерзлоты Сибири, остаются практически неизученными [2].

Исследуемое бугристое болото имеет толщину активного слоя от 145 ± 20 см в просадках и до 41 ± 5 см в буграх (Рисунок 13А) [2]. Подобная толщина активного слоя характерна и для других торфяников, локализованных в пределах вечной мерзлоте. Например, толщина активного слоя торфяных болот, расположенных в зоне вечной мерзлоты Центральной Эвенкии (Центральная Сибирь), варьируется от 18 см до 60 см [71]. Степень разложения торфяного профиля в верхних слоях составила 5–10 %, 10–20 % на глубине 40–60 см и 30–45 % в нижележащих слоях торфа. Торфяной керн в основном состоит из сфагнового мха (*Sphagnum rubellum*), лишайников (*Cladonia stellaris*), карликовых кустарников, зеленых мхов, древесины хвойных пород и березовой коры. Сфагнум и лишайники доминируют на глубине 0–40 см, лишайники и карликовые кустарники преобладают на глубине 40–55 см, а на глубине от 60 см до 100 см присутствуют лишайники и древесные остатки (Рисунок 13В) [2]. Сфагновые мхи являются распространённой растительностью практически всех торфяников криолитозоны [1, 51]. Например, торфяная залежь олиго-мезотрофного болота (Центральная Эвенкия) на всю глубину образована *Sphagnum fuscum*, *Sph. compactum*, *Sph. palustre*, *Sph. magellanicum*, *Sph. rubellum*, *Sph. angustifolium*) [51]. В составе торфяных почв заболоченных лиственничных лесов (Центральная Эвенкия) преобладают *Sph.*

fuscum, зеленые мхи *Dicranum undulatum* Ehrenb., *Polytrichum commune* Hedw. и лишайники *Cladonia* и *Cetraria* [72].



А – торфяной горизонт; В – ботанический состав торфяного профиля: 1 – лишайники (*Cladonia stellaris*, *Cladonia stygia*); 2 – *Sphagnum rubellum*; 3 – *Sphagnum* sp.; 4 – карликовые кустарники; 5 – древесина; 6 – *Eriophorum* sp.; 7 – зеленые мхи; 8 – *Sphagnum* sect. *Cuspidata*; 9 – *Sphagnum magellanicum*; 10 – *Sphagnum* sect. *Acutifolia*; 11 – *Sphagnum fuscum*; 12 – неопознанные остатки трав

Рисунок 13 – Торфяной керн бугристого болота [2]

В 2014 г температура на месте исследуемого профиля торфяной почвы в летний период варьировала от 15 ± 5 °C в верхнем слое (0–20 см) до 4 ± 2 °C на границе вечной мерзлоты (40–80 см). Степень насыщения кислородом надмерзлотных вод колебалась от 80 до 20 %. Водородный показатель (pH) составлял $3,5 \pm 0,2$ и не изменялся систематически с глубиной активного слоя [2].

Концентрация С и N изменяется не систематически по всей длине торфяного керна с максимальной концентрацией N на глубине около 80 см, а углерода на глубине порядка 90 см. На глубине 40–70 см заметно явное снижение концентрации С, с последующим ее ростом по мере углубления. Содержание С и N резко снижается в минеральном слое (Рисунок 14) [2]. Несинтетическое распределение С также было отмечено для торфяного слоя термокарстового озера Аляски (максимальная концентрация 55 % на глубине 0–20 см) и для мерзлого торфяника Канады (максимальная концентрация 50 % на глубине 0–50 см) [48].

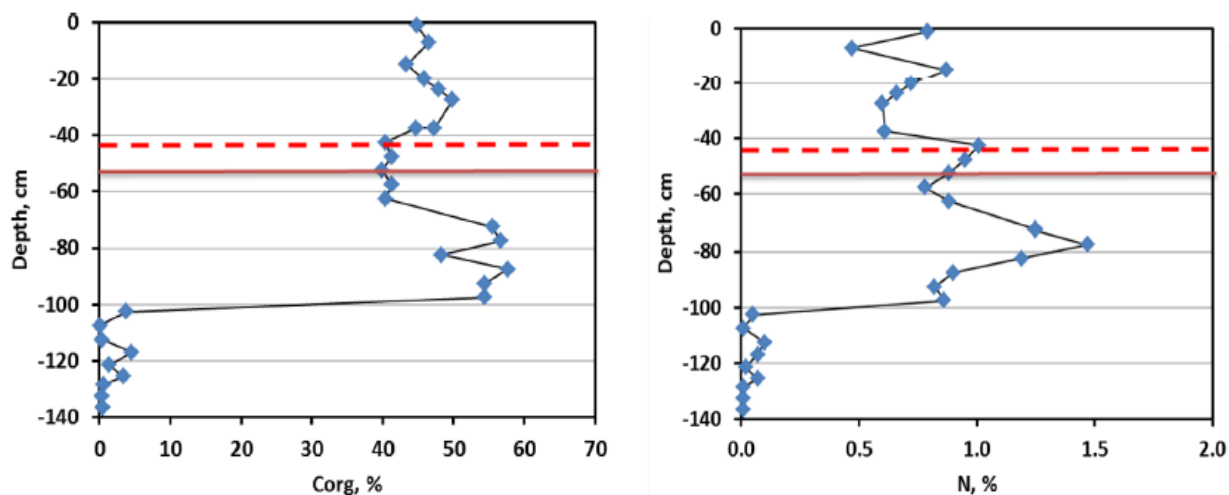


Рисунок 14 – Изменение концентрация С и N по всей длине торфяного керна [2]

3.1.1 Общее количество микроорганизмов

Несмотря на то, что вечная мерзлота является враждебной средой для обитания многих живых организмов, она представляет собой огромное хранилище древних жизнеспособных клеток [53]. Общее количество клеток, подсчитанное с помощью эпифлуоресцентной микроскопии в вечной мерзлоте Сибири составляет 10^7 – 10^8 клеток/г сухой массы [52]. Общее количество микроорганизмов в исследуемом торфяном керне было определено с помощью ПЦР в реальном времени и составило в сумме по слоям $2,26 \times 10^{10}$. Превышение на порядок количества микроорганизмов в исследуемом образце, по сравнению с литературными данными может быть обусловлено геоморфологической неоднородностью участков, а также тем, что на них воздействуют различные параметры окружающей среды в зависимости от их географического положения. Большая часть микроорганизмов торфяника распределена в активном слое, где условия окружающей среды сравнительно мягче, чем в толще мерзлоты. Однако по мере углубления наблюдается тенденция к снижению количества микроорганизмов с $1,35 \times 10^{10}$ до $2,27 \times 10^7$ (рисунок 15), что связано с ужесточением условий. С глубиной снижается температура, водонасыщенность, количество биодоступного органического углерода [52], в результате чего ряд бактерий погибает.

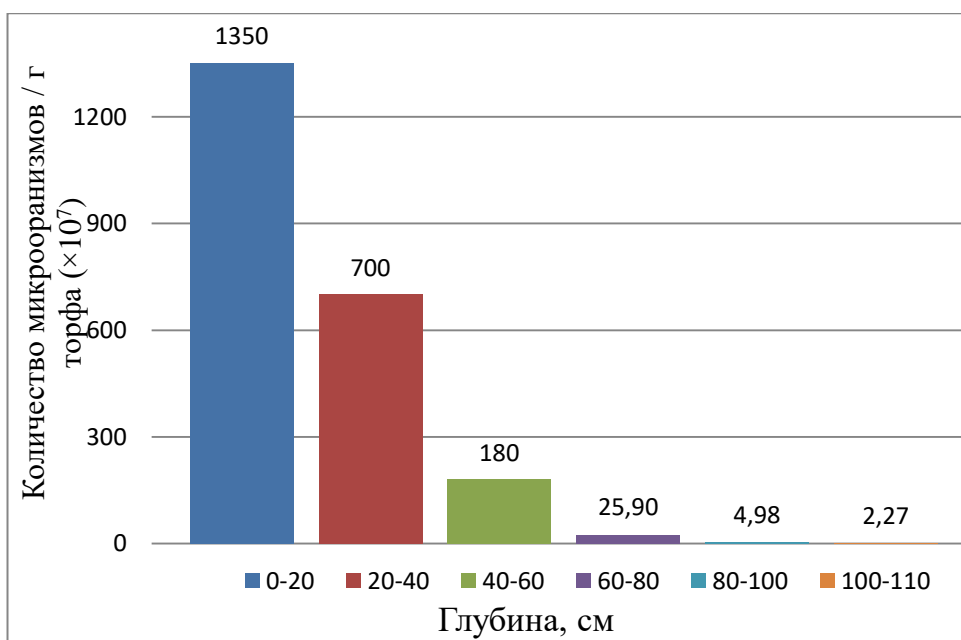


Рисунок 15 – Численность микроорганизмов по результатам ПЦР с детекцией в реальном времени

В 2014 г сотрудниками ФИЦКиА РАН было определено общее количество микроорганизмов данного участка путем высева на питательные среды. Общее число микроорганизмов с глубиной также снижалось (с 17×10^6 до $4,75 \times 10^6$), но количество клеток было значительно меньше, что связано с тем, что данный метод отражает лишь культивируемые формы. А как показывают многочисленные исследования, культивированию поддается лишь от 0,1 до 1 % всех бактерий. Следовательно, подсчет бактерий путем высева на питательные среды может привести к недооценке фактического количества микроорганизмов в исследуемом природном объекте, а по обнаруженным таксономическим единицам нельзя судить об истинной структуре популяции [73].

3.2 Сравнение методов экстракции ДНК из мерзлого торфа

Появление молекулярно-генетических методов в арсенале микробиологии радикально изменило способы исследования микробиома почвы, в том числе торфяной, создав новое направление – молекулярную экологию. Эти методы позволяют избежать этапы изоляции и культивирования отдельных штаммов в лабораторных условиях на питательных средах, которые приводят к ошибочной оценке таксономического и количественного состава микробиоценоза почвы [67]. В

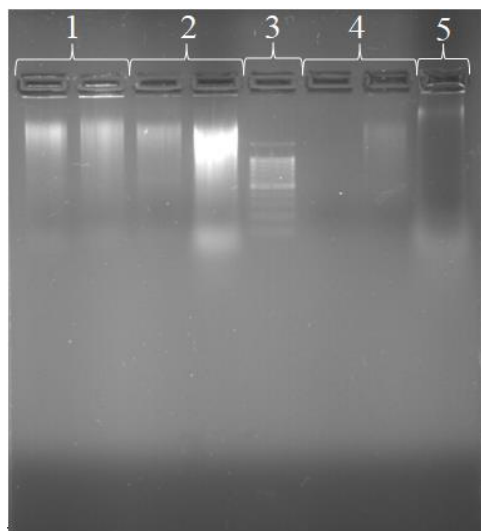
свою очередь, надежность и достоверность молекулярных исследований зависит от качества выделенной ДНК.

Обычно при экстракции ДНК из почвы совместно с ней выделяются и гуминовые кислоты (ГК), поскольку они имеют схожий размер и заряд. Однако присутствие гуминовых кислот (даже 1 мкг) в растворе ДНК может полностью ингибировать Таq-полимеразу, эндонуклеазы рестрикции, снижать эффективность амплификации участков ДНК во время ПЦР, что в свою очередь, приводит к ложноотрицательным результатам или заниженным количественным показателям содержания ДНК [67; 73]. Несмотря на это, все еще нет единого протокола, который бы подошел для всего разнообразия почв. И при работе с конкретным видом почвы необходимо подбирать те или иные условия, хаотропные вещества и детергенты.

Сотрудниками ФИЦ Биотехнология РАН для выделения ДНК из слоев мерзлого торфа был применен непрямой метод экстракции ДНК (п. 2.2.1), однако концентрации выделенной ДНК было недостаточно для проведения ПЦР. Данный факт, скорее всего, обусловлен тем, что клетки в почве в основном локализованы в склеенных агрегатах и микроагрегатах почвенных частиц, что затрудняет их отделение во время диспергирования [67].

По этой причине для подбора более эффективного метода выделения ДНК из торфа (0-20 см), пригодной для дальнейшего исследования, нами был выбран метод прямой экстракции ДНК. Мы отработали метод прямой экстракции, но с применением различных детергентов, параметров лизиса и экстрагентов ДНК. Качество выделенной ДНК (степень очистки и раздробленность) детектировали с помощью гель-электрофореза.

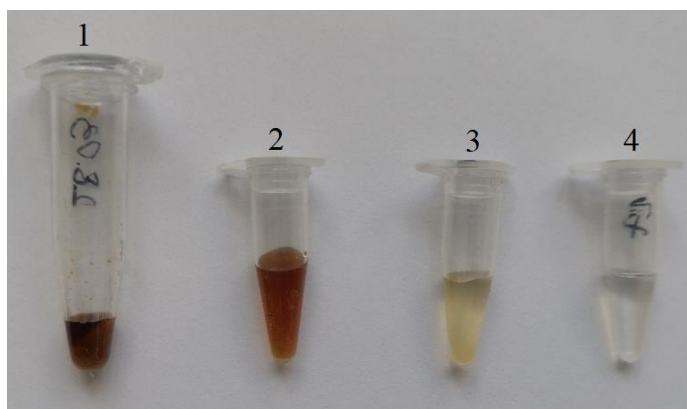
Первый метод был основан на применение коммерческого набора. Согласно инструкции производителя для выделения ДНК была взята навеска замороженного торфа в 0,25 г (0,02 г а.с.). Однако ДНК выделить не удалось, из чего мы сделали вывод, что данной навески недостаточно, поскольку клетки в торфяной почве по всему горизонту распределены неравномерно. В результате чего, мы взяли такую же навеску, но лиофильно высушенного препарата, что дало положительный результат. Концентрация выделенной ДНК была низкая (Рисунок 16–4) но при этом из сырого экстракта были удалены все примеси.



1 – Сырой экстракт, полученный с помощью СТАВ (1 дорожка – 0,5 г замороженного торфа; 2 дорожка – 0,1 г абсолютно сухого торфа); 2- ДНК, выделенная с помощью фенол-хлороформной экстракции (3- дорожка 0,2 г замороженного торфа, 4 дорожка – 0,1 г абсолютно сухого); 3 – маркер 100 bp; 4 – ДНК, выделенная с помощью коммерческого набора (6 дорожка – 0,25 г замороженного торфа, 7 дорожка 0,25 г абсолютно сухого); 5 – ДНК, выделенная с использованием TENC буфера

Рисунок 16– Электрофоретическое разделение сырого экстракта

При использовании в качестве лизирующего агента TENC буфер в сыром экстракте ДНК наблюдалась высокое содержание гуминовых веществ (Рисунок 17– 1), а также низкая концентрация ДНК, что может быть связано с неравномерным протеканием лизиса, вследствие отсутствия постоянного перемешивания. Однако раздробленность ДНК была меньше (Рисунок 16 – 5) по сравнению с ДНК, полученной с помощью коммерческого набора, что обусловлено более мягкой экстракцией.



1 – Сырой экстракт после использования TENC – буфера; 2 – Сырой экстракт после проведения гуанидин изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции; 3 – Сырой экстракт после использования СТАВ; 4 – Сырой экстракт после использования коммерческого набора

Рисунок 17 – Сырой экстракт ДНК

Наибольшая концентрация ДНК наблюдалась в результате гуанидин-изотиоционат-фенол-хлороформной экстракции (г-и-ф-х экстракция) и с использованием в качестве литического агента СТАВ с последующей экстракцией ДНК PEG6000 (Рисунок 16–1,2). Сырой экстракт ДНК, полученный с использованием СТАВ, большую степень очистки от гуминовых веществ (Рисунок 17–3), что обусловлено способностью СТАВ связываться с денатурированными белками, полисахаридами и остатками клеток, образуя нерастворимые соединения, а также избирательным действием PEG на ДНК. Относительно низкий выход ДНК независимо от увеличения навески может быть связан с рядом факторов: неравномерным распределением клеток, связыванием ДНК с частицами почвы, загрязнением пробы ДНКзами [67]. Наибольшей выход с увеличением навески наблюдается для гуанидин-изотиоционат-фенол-хлороформной экстракции, поскольку гуанидин является сильным хаотропным агентом, необратимо инактивирующим как ДНКзы, так и РНКзы, в результате чего данный метод используется и для выделения РНК. (Рисунок 16 4 дорожка). Высокое содержание гуминовых веществ обусловлено отсутствием дополнительной очистки (Рисунок 17–3). Сырой экстракт, полученный с помощью СТАВ и г-и-ф-х экстракции, был не пригоден из-за присутствия гуминовых веществ. А концентрации ДНК, полученной с помощью коммерческого набора было недостаточно для ПЦР (рисунок 18–4). Однако, после очистки сырого экстракта, полученного с помощью СТАВ и г-и-ф-х экстракции, амплификация прошла успешно (рисунок 18 –1, 2).



1 – ПЦР продукт, после СТАВ; 2 – ПЦР – продукт после гуанидин изотиоционат-фенол-хлороформной экстракции; 3 – маркер 50 bp; 4 – после набора; 5 – холостая проба

Рисунок 18 – Электрофоретическое разделение ПЦР продуктов

В результате данной работы, было показано, что наиболее эффективным методом выделения ДНК является гуанидин изотиоционат-фенол-хлороформная экстракция. Однако совместно с ДНК выделяется большое количество гуминовых веществ. Таким образом, данный метод требует модификации. Так, например, до экстракции ДНК можно включить стадию предварительной промывки почвы неионными детергентами для удаления контаминантов [67]. Однако стоит учитывать, что включение дополнительных стадий может привести к существенным потерям ДНК.

В тоже время, сотрудники ГНУ ВНИИСХМ РАСХН с помощью набора macherey-nagel nucleospin soil kit (Macherey-nagel, Германия) успешно выделили ДНК из каждого торфяного горизонт для метагеномного анализа. Что еще раз демонстрирует, что почва, в том числе и торфяная, является сложной гетерогенной системой, и при работе с ее генетическим материалом необходимо либо адаптировать имеющиеся методы под данный тип почвы либо разрабатывать новые модификации, что также применительно и к коммерческим наборам.

3.3 Таксономическая структура торфяника

Несмотря на столь экстремальные условия, в вечной мерзлоте наблюдается относительно высокое микробное разнообразие, хотя в составе сообществ существуют некоторые различия в зависимости от структуры вечной мерзлоты, содержания органических веществ и возраста [52].

Разнообразие бактерий в вечной мерзлоте, как правило, выше, чем разнообразие архей или грибов [52]. Как видно из таблицы 1, на долю бактерий в исследуемом торфянике приходится практически 99 % последовательностей. В свою очередь, на долю архей приходится всего 0,3–0,5 %.

В бактериальном сообществе торфяника доминируют следующие филы: *Proteobacteria*, при это они преобладают практически по всей глубине (19–89 %) (Рисунок 19), *Acidobacteria* (1,8–58,2 %) также встречаются по всему профилю торфяника, *Actinobacteria* (1,7–19,6 %), *Firmicute* (до 15,8 %) в основном на глубине 80–100 см, *Verrucomicrobia* (до 8,4 %), *Planctomycetes* (до 7,9 %) и от 1 до 12 % приходится на не идентифицированные типы бактерий. При этом сдвиг в составе сообщества с глубиной предполагает определенный уровень локальной адаптации.

Бактериальные типы, которые обычно встречаются в вечной мерзлоте Арктики, согласно исследованиям последовательностей гена 16S рРНК, также включают филы *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* (такие как *Intrasporangiaceae* и *Rubrobacteriaceae*) и *Bacteroidetes* [52]. Данные филы также встречаются в торфяных почвах Сибири. Так в торфяной почве ОМБ, локализованной в зоне распространения вечной мерзлоты (Центральная Эвенкия), на долю домена *Bacteria* приходилось от 96,6 до 98,7 % последовательностей. В основном доминировали представители *Proteobacteria* (34,0–24,8 %) и *Actinobacteria* (19,8–18,2 %), *Acidobacteria* (8,0–13,9 %) и *Verrucomicrobia* (13,3–13,9 %) [51]. Аналогично обстоит ситуация и в полигональных торфяниках Канадского Арктического архипелага. Последовательности, принадлежащие *Proteobacteria*, составляли 40–50 % от всех последовательностей, после чего следовали *Bacteroidetes* (20–40 %) и *Acidobacteria* (10–15 %) [74].

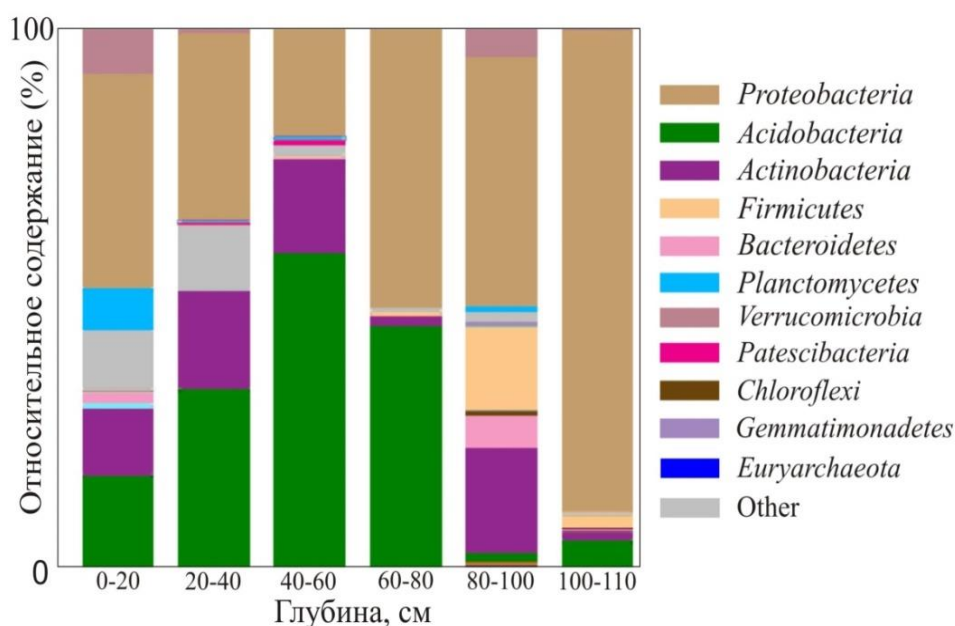


Рисунок 19 – Распределение фил микроорганизмов по преобладанию в горизонтах торфяного болота

Филум *Proteobacteria* встречается во всех слоях и занимает в среднем по слоям до 47 % (Рисунок 19). Тип *Proteobacteria* представляет собой наиболее многочисленную группу бактерий и включает подавляющее большинство известных грамотрицательных бактерий. К данному типу принадлежит множество фототрофов, гетеротрофов и хемолитотрофов [75].

J. Tourto показал, что представители типов *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, обнаруженные в вечной мерзлоте Аляски, способны синтезировать меченную ^{13}C ДНК при температуре от 0 до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [64], что может объяснять наличие представителей *Proteobacteria* на глубине 60–110 см, где температура составляет $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Данный тип, в исследуемом торфянике, преимущественно представлен классом *Alphaproteobacteria* (варьирует по слоям от 5,1–50 %) и *Gammaproteobacteria* с максимальным распространением на глубине 100–110 см (84 %) (Рисунок 20).

Отличительной характеристикой класса *Alphaproteobacteria* является то, что они представлены в основном олиготрофами, организмами, способными жить в средах с низким содержанием питательных веществ и при этом могут усваивать разнообразные источники углерода. Данный факт обуславливает их распространение по всему горизонту торфяника (Рисунок 20). Более того, Fierer показал рост относительной численности *Alphaproteobacteria* при дополнительном внесении азота [76], что также может объяснять доминирование данного класса на глубине 60–80 см, где содержание азота достигает максимума (Рисунок 14).

Основным представителем является клада *Sphingomonadales* (19 %) (Приложение Б) на глубине 80–100 см. Представители данной клады способны деградировать лигноцеллюлозные остатки. Поскольку с глубиной количество продуктов разложения растений, в том числе корней, увеличивается, количество данных бактерий также растет и достигает максимума с глубиной. Также на глубине 0–20 см встречаются представители порядка *Rhizobiales*. В данный порядок входят граммотрицательные почвенные бактерии, способные к фиксации азота и к симбиозу с растениями.

Одним из основных представителей *Gammaproteobacteria* является род *Steroidobacterales*, локализованный в основном на глубине 0–20 см (1 %), как известно представители данного рода способны трансформировать нитраты в закись азота [76].

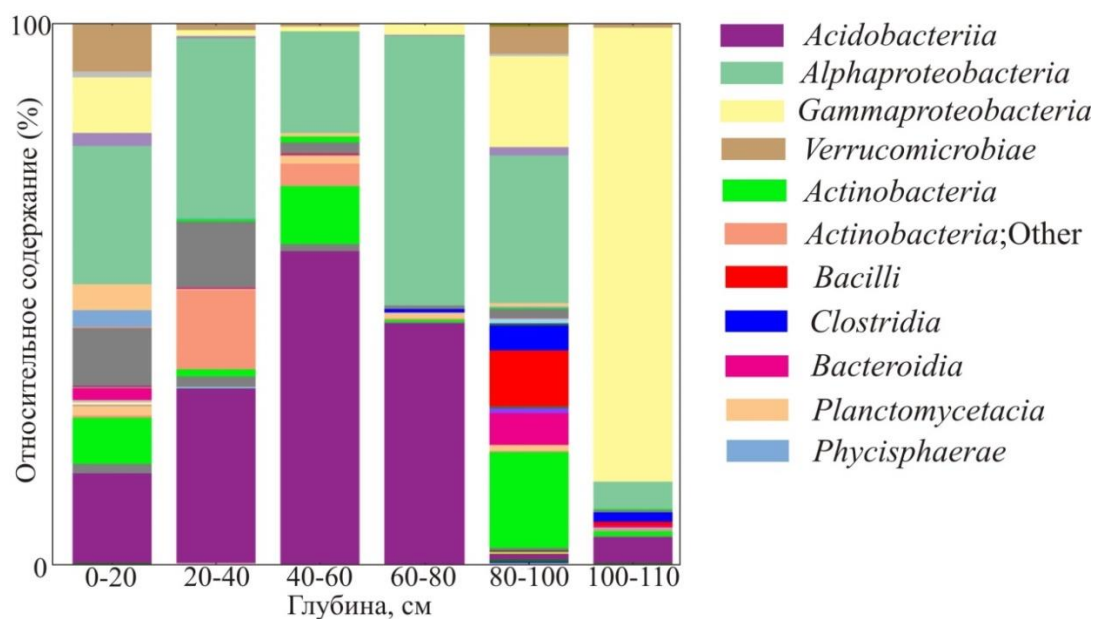


Рисунок 20 – Вариабельность представителей бактериальных классов

Хотя *Acidobacteria* были признаны как тип относительно недавно, их распространенность в целом ряде экосистем, особенно в почвах, потребовала изучения их экологии. Этот тип в почвах может составлять до 52 % от общего бактериального сообщества. Подавляющее большинство изолятов, культивируемых до настоящего времени, относятся к классу *Acidobacteriia*. Все они гетеротрофные, большинство видов являются аэробными или микроаэрофильными, а некоторые виды (*Telmatobacter bradus*, *Acidobacterium capsulatum*) являются факультативными анаэробными бактериями [77].

Высокое содержание питательных веществ может быть ограничивающим фактором развития, так как известно, что представители этого типа ведут олиготрофный образ жизни. Экологические исследования в различных природных средах обитания показали распределение ацидобактерий в области низкой доступности питательных веществ или кислого pH, что указывает на то, что взаимодействие обоих параметров играет важную роль для данного сообщества. Большинство представителей *Acidobacteria*, принадлежат к подгруппе 4 (класс *Holophagae*), которые чаще всего распространены в низкоуглеродистых почвах. Недавно был описан штамм *Blastocatella fastidiosa* gen. nov., sp. относящийся к данной подгруппе, который в отличие от других изолятов *Acidobacteria*, не мог использовать простые сахара, но при этом ассимилировал протокатеховую кислоту и обладал слабым ростом на средах с хитином, целлюлозой и крахмалом. Это

означает, что члены подгруппы 4 *Acidobacteria* могут играть значительную роль в деградации высокомолекулярных веществ в таких холодных наземных средах обитания [76]. В исследуемом нами торфяном керне также встречаются представители класса *Blastocatellia*, но их доля составляет всего 0,1 %. Представители типа *Acidobacteria* распространены по всему горизонту торфяника, однако, их количество на глубине 80-110 см значительно снижается, в связи с увеличением концентрации углерода.

Тип *Actinobacteria* включает грамположительных бактерий, отличительной особенностью которых является высокое содержание гуанидина и цитозина. *Actinobacteria* также составляли важную часть бактериального сообщества по всему профилю торфяника, что, вероятно, обусловлено их способностью ассимилировать широкий спектр субстратов в качестве единственного источника углерода и их адаптацией к низким температурам, в том числе за счет высокого содержания гуанидина и цитозина [77].

Тип *Bacteroidetes* являются крупнейшим типом грамотрицательных анаэробных бактерий. Локализация представителей типа *Bacteroidetes* на глубине 80-100 м объясняется тем, что эти микроорганизмы включают в себя несколько психрофильных представителей, которые могут процветать в условиях стабильного холода. Представители данного типа были обнаружены в более глубоком активном слое вблизи надмерзлотного слоя. Филум *Bacteroidetes* являются доминирующим представителям полигональных тундровых почв в дельте реки Лена [74].

Немаловажная роль в процессах разложения органики в почвах отводится споровым бактериям, обладающим мощным ферментативным аппаратом. В торфянике на глубине 80-100 см найдены спорообразующие бактерии (фила *Firmicutes*) до 15 % от общего числа последовательностей гена 16S рРНК, и представлены они двумя классами – *Clostridia* (4,7 %) и *Bacilli* (10,32 %). Из *Clostridia* доминируют порядок *Clostridiales* (4,7 %) (Приложение Б). В состав порядка *Clostridiales* входит большое количество видов грамположительных анаэробных спорообразующих бактерий. Как правило, большинство видов данного порядка являются сапрофитными организмами почв [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В вечной мерзлоте накапливается большое количество органического углерода. Однако в условиях современного глобального потепления прогнозируется усиленная деградация криолитозоны и высвобождение значительного количества законсервированного в настоящее время органического вещества для микробного разложения глобального запаса углерода, с последующей эмиссией парниковых газов, способствуя тем самым усилению изменения климата. Что особенно актуально для мерзлых торфяников Западно-Сибирской равнины, поскольку недавние исследования показали, что вечная мерзлота на данной территории, в течение последних десятилетий, активно деградирует. Несмотря на это мерзлые торфяные почвы остаются практически не охарактеризованными с точки зрения таксономической структуры микробоценоза и их метаболического потенциала.

С целью улучшить наше понимание возможных текущих и будущих последствий деградации криолитозоны, а так же оценить возможный потенциал бактериального сообщества криолитозоны, с помощью современных молекулярно-генетических методов была изучена структура бактериального сообщества торфяных горизонтов, отобранный на различной глубине (до 1 м) бугристого (торфяного) болота, расположенного в зоне прерывистой вечной мерзлоты вблизи района Ханымей. По мере углубления, количество микроорганизмов снижается с $1,35 \times 10^{10}$ до $2,27 \times 10^7$ что связано с ужесточением условий окружающей среды.

В бактериальном сообществе торфяника доминировали следующие филы: *Proteobacteria* (19–89 %), *Acidobacteria* (1,8–58,2 %), *Actinobacteria* (1,7–19,6 %), *Firmicute* (до 15,8 %), *Planctomycetes* (до 7,9 %).

Acidobacteria и *Proteobacteria* были обнаружены в каждом горизонте почвы. Однако, после надмерзлотного слоя (40-60 см) количество представителей *Acidobacteria* снижается. Данный факт, связан с тем, что более высокое содержание питательных веществ является ингибирующим фактором, так как известно, что представители этого типа ведут олиготрофный образ жизни.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Long-term in situ permafrost thaw effects on bacterial communities and potential aerobic respiration [Text] / S. Monteux [et all.] // The ISME Journal. – 2018. – Iss. 12. – P. 2129–2141.
2. Bacteria primarily metabolize at the active layer/permafrost border in the peat core from a permafrost region in western Siberia [Text] / Y. N. Morgalev [et all.] // Polar Biol. – 2017. – Iss. 40. – P. 1645–1659.
3. Metagenomic Insights into Anaerobic Metabolism along an Arctic Peat Soil Profile [Text] / A. D. Lipson [et all.] // Plos one. – 2013. – Iss. 8(5). – 11 p.
4. Континентальная многолетняя мерзлота [Текст] // Методы оценки последствий изменения климата для физических и биологических систем / под ред.: С. М. Семенова. – М. : НИЦ «Планета», 2012. – Гл. 8. – С. 301–359.
5. Романовский, Н.Н. Подземные воды криолитозоны [Текст] / Н. Н. Романовский. – М. : МГУ, 1983. – 232 с.
6. Шполянская, Н. А. Плейстоцен-голоценовая история развития криолитозоны Российской Арктики «глазами» подземных льдов [Текст] / Н. А. Шполянская. – М.–Ижевск : Институт компьютерных исследований, 2015. – 344 с.
7. Романовский, Н. Н. Основы криогенеза литосферы [Текст] / Н. Н. Романовский. – М. : МГУ : Москва, 1993. – 336 с.
8. Statistics and characteristics of permafrost and ground-ice distribution in the Northern Hemisphere [Text] / T. Zhang [et all.] // Polar Geography. – 1999. – Iss. 23:2. – P. 132–154.
9. Shur, Y. Permafrost [Text] // Encyclopedia of Snow, Ice and Glaciers / Y. Shur, M. T. Jorgenson, M. Z. Kanevskiy. – Dordrecht : Springer, 2011. – P. 841–848.
10. Arctic soil microbial diversity in a changing world [Text] / A. Blaud [et all.] // Research in Microbiology. – 2015. – Iss. xx. – 18 p.
11. Expert assessment of vulnerability of permafrost carbon to climate change [Text] / E. A. G. Schuur [et all.] // Climatic Change. – 2013. – Iss. 119(2). – P. 359–374.
12. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes [Text] / J. Hultman [et all.] // Nature. – 2015. – Iss. 521(7551) – P. 208–212.

13. Рогов, В.В. Основы криогенеза [Текст] : учеб.-метод. пособ. / В. В. Рогов ; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Тюменский научный центр; Московский гос. ун-т им. М.В. Ломоносова. - Новосибирск : «Гео», 2009. – 203 с.
14. Евсеева, Н. С. Палеогеография конца позднего плейстоцена и голоцена (корреляция событий) [Текст]: учеб. пособ. : Томский гос. ун-т / Н. С. Евсеева, Т. Н. Жилина. – Томск : НТЛ, 2010. – 180 с.
15. Историко-геологические закономерности формирования геокриологических условий [Текст] // Геокриология СССР. Западная Сибирь. / В. В. Баулин [и др.]. – М. : Недра, 1989. – С. 20–38.
16. Wang, C. Most of the Northern Hemisphere Permafrost Remains under Climate Change [Text] / C. Wang [et all.] // Scientific reports. – 2019. – Iss. 9(1). – 10 p.
17. Melnikov, V.P. Distribution of Permafrost in Russia [Text] // Advances in the geological storage of carbon dioxide / V.P. Melnikov, D.S. Drozdov. – Dordrecht : Springer, 2006. – P. 69–81.
18. Шполянская, Н. А. Вечная мерзлота и глобальные изменения климата [Текст] / Н. А. Шполянская. – М.-Ижевск: Иститут компьютерных исследований, НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2010. – 200 с.
19. Гаврилов, А. В. Типизация арктических шельфов по условиям формирования мерзлых толщ [Текст] / А. В. Гаврилов // Криосфера Земли. – 2008. – Т. XII, № 3. – С. 69–79.
20. Шполянская, Н. А. Позднекайнозойская история криолитозоны Арктики и тенденции ее будущего развития [Текст] / Н. А. Шполянская, Г. Э. Розенбаум. – М. : Научный Мир, 2000. – 110 с.
21. Stephen, A. Ground ice in permafrost: thermokarst and hydrogeological implications [Text] / A. Stephen // The Permafrost Calculator : Conference : GeoOttawa 2017. – Ottawa, 2017. – 8 p.
22. Ершов, Э. Д. Основы геокриологии [Текст]. В 2 ч. Ч. 2. Литогенетическая геокриология / Э. Д. Ершов. – М. : МГУ, 1996. – 399 с.
- Shur, Y. Permafrost [Text] // Encyclopedia of Snow, Ice and Glaciers / Y. Shur, M. T. Jorgenson, M. Z. Kanevskiy. – Dordrecht : Springer, 2011. – P. 841–848.
23. Osterkamp, T. E. Permafrost [Text] // Encyclopedia of Atmospheric Sciences / T. E. Osterkamp, C. R. Burn. – Elsevier, 2015. – 2nd Edition, Vol. 2. – P. 1717–1729.

24. Circum-Arctic map of permafrost and ground-ice conditions [Map] : Geological Survey in Cooperation with the Circum-Pacific Council for Energy and Mineral Resources ; J. Brown [et all]. –1:10,000,000. – U.S. Circum-Pacific Map Series CP-45, 1997.
25. The influence of global climate change on the environmental fate of anthropogenic pollution released from the permafrost: Part i. Case study of antarctica [Text] / J. Potapowicz [et all.] // Science of the Total Environment. – 2019. – Iss. 651. – P. 1534–1548.
26. Ananjeva, G. V. Relict permafrost in the central part of Western Siberia [Text] / G. V. Ananjeva, E. S. Melnikov, O. E. Ponomareva // Proceedings of the 8th International Conference on Permafrost. – 2003. – Iss. 1. – P. 2003–5.
27. Thermal state of permafrost in Russia [Text] / V. E. Romanovsky [et all.] // Permafrost and Periglacial Processes. – 2010. – Iss. 21(2). – P. 136–155.
28. Assessment on peatlands, biodiversity and climate change [Text] / Parish F. [et all.]. – Wageningen : Global Environment Centre, 2008. – 206 p.
29. Finlayson, C. M. Peatlands [Text] // The Wetland Book. Distribution, Description, and Conservation / C. M. Finlayson, G. R. Milton. – Dordrecht : Springer, 2018. – P. 227–244.
30. Пьявченко, В. И. Торфяные болота, их природное и хозяйственное значение [Текст] / В. И. Пьявченко. – М. : Наука, 1985. – 152 с.
31. Инишева, Л. И. Болота и биосфера [Текст] / Л. И. Инишева // материалы VII Всерос. с междунар. участием науч. школы. 13-15 сент. 2010 г. / Томск. гос. пед. ун-т : сос Л. И. Инишева. – Томск : ТГПУ, 2010. – 283 с.
32. The role of peatlands and their carbon storage function in the context of climate change [Text] // Interdisciplinary Approaches for Sustainable Development Goals. GeoPlanet: Earth and Planetary Sciences / K. M. Harenda [et all.]. – Cham : Springer, 2018. – P. 169–187.
33. Martini, I. P. Peatlands [Text]. In 9 Volume. 9 vol. Evolution and records of environmental and climate changes / I. P. Martini, A. Martinez Cortizas, W. Chesworth. – Elsevier, 2007. – 606 p.

34. Mäkilä, M. Carbon accumulation in boreal peatlands during the Holocene – impacts of climate variations [Text] / M. Mäkilä, M. Saarnisto // Peatlands and climate change / ed. M. Strack. – Finland, 2008. – Chapter 1. – P. 24–43.
35. Minayeva, T. Y. Peatland biodiversity and climate change [Text] / T. Y. Minayeva, A. A. Sirin // Biology Bulletin Reviews. –2012. – Iss. 2(2). – C. 164–175.
36. Schumann, M. Global peatland restoration manual [Text] : Manual ; Institute of Botany and Landscape Ecology / M. Schumann, H. Joosten. – Germany : Greifswald University, 2008. – 103 c.
37. Permafrost distribution drives soil organic matter stability in a subarctic palsa peatland [Text] / A. Pengerud [et all.] // Ecosystems. – 2013. – Iss. 16(6). – P. 934–947.
38. Seppälä, M. Palsa mires in Finland [Text] / M. Seppälä // The finnish environment. – 2006. – Iss. 23. – P. 155–162.
39. Strong degradation of palsas and peat plateaus in northern Norway during the last 60 years [Text] / A. F. Borge [et all.] // The Cryosphere. – 2017. – Iss. 11(1). – 16 c.
40. Seppälä, M. The role of buoyancy in palsa formation [Text] / M. Seppälä, K. Kujala // Geological Society. – 2009. – Iss. 320 (1). – P. 51–56.
41. Future vegetation changes in thawing subarctic mires and implications for greenhouse gas exchange – a regional assessment [Text] / J. Bosiö [et all.] // Climatic change. – 2012. – Iss. 115(2). – P. 379–398.
42. Seppälä, M. Synthesis of studies of palsa formation underlining the importance of local environmental and physical characteristics [Text] / M. Seppälä // Quaternary Research. – 2011. – Iss. 75(2). – P. 366–370.
43. Усова, Л. И. Практическое пособие по ландшафтному дешифрированию аэрофотоснимков различных типов болот Западной Сибири [Текст] / Л. И. Усова. – СПб. : Нестор-История, 2009. – 80 с.
44. Holocene ice-wedge polygon development in northern Yukon permafrost peatlands (Canada) [Text] / M. Fritz [et all.] // Quaternary Science Reviews. – 2016. – Iss. 147. – P. 279–297.
45. Distribution, diversity, development and dynamics of polygon mires: examples from Northeast Yakutia (Siberia) [Text] / N. Donner [et all.] // Peatlands International. – 2007. – P. 36–40.

46. Инишева, Л. И. Болотоведение [Текст] : учеб. для вуз. / Л. И. Инишева ; Том. гос. пед. университет. – Томск : Томский государственный педагогический университет, 2009. – 210 с.

47. The Effect of Geocryological Conditions and Soil Properties on the Spatial Variation in the CO₂ Emission from Flat-Topped Peat Mounds in the Isolated Permafrost Zone of Western Siberia [Text] / A. A. Bobrik [et all.] // Eurasian Soil Science. – 2016. – Iss. 49(12). – P. 1355–1365.

48. Vulnerability of permafrost carbon to climate change: Implications for the global carbon cycle [Text] / E. A. G. Schuur [et all.] // BioScience. – 2008. – Iss. 58(8). – P. 701–714.

49. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region [Text] / C. Tarnocai [et all.] // Global biogeochemical cycles. – 2009. – Iss. 23(2). – 11 p.

50. Zhang, X. Sources of organic matter in sediments of the Colville River delta, Alaska: A multi-proxy approach [Text] / X. Zhang, T. S. Bianchi, M. A. Allison // Organic geochemistry. – 2015. – Iss. 87. – P. 96–106.

51. Структура микробных сообществ торфяных почв двух болот тундровой и лесной зон Сибири [Текст] / Д. И. Гродницкая [и др.] // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 1. – С. 79–92.

52. Jansson, J. K. The microbial ecology of permafrost [Text] / J. K. Jansson, N. Taş // Nature Reviews Microbiology. – 2014. – Iss. 12(6). – P. 414–425.

53. Altshuler, I. Microbial life in permafrost [Text] // Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology / I. Altshuler, J. Goordial, L. Whyte. – Springer, Cham, 2018. – P. 153–179.

54. Bacteria in permafrost [Text] // Bacteria in permafrost. In Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology / D. Gilichinsky [et all.]. – Berlin : Springer, 2008. – P. 83–102.

55. Mackelprang, R. Microbial survival strategies in ancient permafrost: insights from metagenomics [Text] / R. Mackelprang [et all.] // The ISME journal. – 2017. – Iss. 11(10). – P. 2305–2318.

56. Новотоцкая-Власова, К. А. Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых осадков [Текст] : дис. ... на соиск. учен. степ. канд. биол. наук : 03.02.03 / Новотоцкая-

Власова Ксения Александровна ; [Место защиты : Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН]. – Пушино, 2015. – 171 с.

57. Bacterial growth at– 15 C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1 [Text] / N. C. Mykytczuk [et all.] // The ISME journal. – 2013. – Iss. 7(6). – P 1211 – 1226.

58. Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria [Text] / M. A. Ponder [et all.] // FEMS microbiology ecology. – 2005. – Iss. 53(1). – P. 103–115.

59. Изучение структуры микробного сообщества почв разной степени засоления с использованием T-RFLP и ПЦР с детекцией в реальном времени [Текст] / Андронов Е. Е.[и др.] // Почвоведение. – 2012. – №. 2. – С. 173-173.

60. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results [Electronic resource] / Y. S. Bakin [et all.] // Scientific data. – 2019. – Electronic text data. – <https://www.nature.com/articles/sdata20197>, free access (03.06.2019). – Title from screen.

61. Иванова, И. И. Молекулярная экология планктомицетов северных переувлажненных экосистем и анализ геномов типичных представителей [Текст] : дис. ... на соиск. учен. степ. канд. биол. Наук : 03.02.03 / Иванова Анастасия Александровна; [Место защиты : Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского]. – Москва, 2018. – 124 с.

62. Methane-cycling communities in a permafrost-affected soil on Herschel Island, Western Canadian Arctic: active layer profiling of *mcrA* and *pmoA* genes [Text] / B. A. Barbier [et all.] // FEMS microbiology ecology. – 2012. – Iss. 82(2). – P. 287-302

63. Knief, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker [Text] / C. Knief // Frontiers in microbiology. – 2015. – Iss. 6. – 38 p.

64. Bacterial genome replication at subzero temperatures in permafrost [Text] / S. J. Tuorto [et all.] // The ISME journal. – 2014. – Iss. 8(1). – P. 139–149.

65. Dunford, E. A. DNA stable-isotope probing (DNA-SIP) [Text] / E. A. Dunford, J. D. Neufeld // Journal of Visualized Experiments. – 2010. – Iss. 42. – 6 p.

66. Колмакова, О. В. Определение видового состава планктонных бактерий бассейна реки Енисей молекулярно-генетическими методами и экспериментальное

исследование их биогеохимических функций [Текст] : дис. ... на соиск. учен. степ. канд. биол. Наук : 03.03.10 / Колмакова Олеся Владимировна ; [Место защиты : Сибирский федеральный университет]. – Красноярск, 2014. – 120 с.

67. Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики [Текст] / Е.В. Першина. – СПб. : Информ-Навигатор, 2017. – 288 с.

68. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays [Text] / N. Fierer [et all.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Iss. 71(7). – P. 4117–4120.

69. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil [Text] / S. T. Bates [et all.] // *The ISME journal.* – 2011. – Iss. 5(5). – P. 908–917.

70. High carbon emissions from thermokarst lakes of Western Siberia [Text] / S. Serikova [et all.] // *Nature communications.* – 2019. – Iss. 10(1). – 1552 p.

71. Microbial activity of peat soils of boggy larch forests and bogs in the permafrost zone of central Evenkia [Text] / I. D. Grodnitskaya [et all.] // *Eurasian soil science.* – 2013. – Iss. 46(1). – P. 61-73.

73. High-quality Dna from peat soil for metagenomic studies: a minireview on Dna extraction methods [Text] / M. A. M. Roslan [et all.] // *Sci. Heritage J.* – 2017. – Iss. 1(2). – P. 1–7.

74. Microbial functional potential and community composition in permafrost-affected soils of the NW Canadian Arctic [Text] / B. A. Frank-Fahle [et all.] // *PLoS One.* – 2014. – Iss. 9(1). – 12 p.

75. Gupta, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes [Text] // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2000. – Iss. 24(4). – P. 367–402.

76. Bacterial community structure and soil properties of a subarctic tundra soil in Council, Alaska [Text] / H. M. Kim [et all.] // *FEMS microbiology ecology.* – 2014. – Iss. 89(2). – P. 465-475.

77. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes [Text] / A. M. Kielak // *Frontiers in microbiology.* – 2016. – Iss.7 – 17 p.