

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

На правах рукописи

Кудинова Алина Гранитовна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОКАРИОТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОЧВ
ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИКИ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Л.В. Лысак

Москва-2017

Содержание	
ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. Обзор литературы	8
1.1. История почвенных исследований и современные представления о почвах Антарктиды.....	8
1.1.1. История почвенных исследований в Антарктиде.....	8
1.1.2. Современные представления о почвах в Антарктиде.....	9
1.2. Микроорганизмы в почвах Антарктиды.....	20
1.3. Механизмы выживания бактерий в экстремальных условиях	28
1.4. Нанотрансформация бактерий в неблагоприятных условиях.....	34
Глава 2. Объекты и методы исследования	41
2.1. Объекты исследования.....	41
2.2. Методы исследования.....	48
Глава 3. Результаты и обсуждение	
3.1. Определение общей численности, биомассы и потенциальной жизнеспособности прокариот.....	59
3.2. Определение общей численности, жизнеспособности и морфологии фильтрующихся форм прокариот (ФФП).....	71
3.3. Изменения прокариотного комплекса по ходу сукцессии.....	76
3.4. Исследования разнообразия прокариот на уровне филумов при помощи метода FISH.....	83
3.5 Потенциальная биологическая активность антарктических почв.....	89
Заключение	94
Выводы	96
Список литературы	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Интерес к полярным областям планеты со стороны научного и экономического сообщества неуклонно растет, это связано с тем, что полярные области являются важными климатообразующими регионами планеты и источниками многих полезных ископаемых. Актуальной задачей является проведение в Антарктике комплексных научных исследований и мониторинга состояния компонентов природной среды. В настоящее время проводятся интенсивные исследования почвообразования в холодных биотопах Антарктиды. В 2010 году была принята государственная долгосрочная программа «Стратегия развития деятельности Российской Федерации в Антарктиде на период до 2020 года и на более отдаленную перспективу». Согласно плану, принятому в 2014 г. на «Совещании по определению главных научных проблем исследований Антарктики и Южного океана на период до 2035г.», изучение живых организмов на территории Антарктиды является одним из шести приоритетных направлений полярных исследований. Таким образом, развитие комплексных научных исследований Антарктиды является важной задачей для нашей страны.

Исследования почвообразовательных процессов в Антарктиде проводилось в основном в районе Сухих Долин, станции Мак-Мердо и Трансантарктических гор, а также на Антарктическом полуострове и прилегающих островах (Cameron et. al., 1970; Friedmann, 1982; Vishniac, 1993).

Данные по численности отдельных эколого-трофических групп и разнообразию микроорганизмов в антарктических почвах, полученные традиционными микробиологическими методами, обобщены в работах зарубежных авторов и относятся, в основном, к территориям Западной Антарктики (Amann et. al., 1995, Friedman et. al., 1996, Gilichinsky et. al., 2007). Приводящиеся в настоящее время интенсивные молекулярно-генетические исследования таксономического разнообразия антарктических почв также

приурочены к этим районам (Yergeau et. al., 2007, Zeng et. al., 2010). Опубликованные данные свидетельствуют о значительной заселенности антарктических почв жизнеспособными микроорганизмами и их значительном разнообразии.

Сравнительно недавно началось систематическое изучение примитивных почв и почвоподобных тел в районе российских антарктических станций, в том числе не исследованных ранее оазисов береговой части Восточной Антарктики (Gilichinsky et al., 2010; Абакумов, 2011; Горячкин и др., 2012; Мергелов и др., 2012). Менее исследованными остаются почвы береговой части Восточной Антарктики.

В оазисах Восточной Антарктики полностью отсутствуют такие мощные почвенные преобразователи и источники гумуса как сосудистые растения с корневыми системами. Доминирование мхов, лишайников и цианобактерий создают уникальные экониши для развития микроорганизмов. В этих местообитаниях ведущая роль в процессах почвообразования принадлежит почвенным микроорганизмам, как наиболее хорошо приспособленным к жизни в экстремальных условиях.

Изучение почв Антарктиды важно не только с точки зрения понимания того, как меняется минеральный субстрат при длительном воздействии факторах с очень низким почвообразующим потенциалом, но и в качестве современных аналогов почвенных тел, существовавших на планете до появления высших сосудистых растений с корневыми системами.

Целью настоящей работы было охарактеризовать прокариотные комплексы примитивных почв Восточной Антарктиды (оазисы Холмы Ларсеманн и Холмы Тала) для получения знаний о структуре и функционировании этих сообществ.

Задачи работы:

1. Определить показатели общей численности, биомассы и потенциальной жизнеспособности прокариот в образцах почв Восточной Антарктиды;
2. Определить показатели численности и потенциальной жизнеспособности фильтрующихся форм прокариот (ФФП) и изучить морфологию ФФП при помощи просвечивающей электронной микроскопии;
3. Охарактеризовать особенности изменения почвенных прокариотных комплексов по ходу сукцессии при фиксированной влажности и двух разных температурах (+5°C и +20°C);
4. Охарактеризовать таксономическую структуру прокариотных комплексов исследуемых почв при помощи классических (метода посева) и молекулярно-биологических методов;
5. Оценить биологическую активность исследуемых почв с использованием методов газовой хроматографии (продуцирование CO₂, активность азотфиксации и денитрификации).

Научная новизна

Впервые исследовано распределение биомассы прокариот по почвенным микропрофилям оазисов Восточной Антарктиды и оценена потенциальная жизнеспособность клеток прокариот, выделенных из антарктических почв, с использованием красителя L7012.

Впервые установлено, что численность и содержание фильтрующихся форм прокариот (ФФП) в образцах антарктических почв были высоки, численность составила от десятков до сотен миллионов клеток в 1 г почвы, доля колебалась от 5 до 90% от общей численности, что значительно выше, чем в почвах умеренной зоны (Лысак и др., 2010).

С помощью метода FISH среди бактерий обычного размера и среди наноформ обнаруживались одни и те же филогенетические группы, что

подтверждает предположение о нанотрансформации бактерий в условиях воздействия неблагоприятных факторов среды.

Впервые оценена потенциальная биологическая активность почв с использованием газохроматографических методов.

Практическая значимость работы

Полученные в ходе работы данные могут быть использованы в планировании и осуществлении будущих микробиологических исследований в Антарктике и Арктике.

Прокариотные сообщества Антарктиды могут также рассматриваться в качестве моделей для астробиологических исследований и экстраполяции (Gilichinsky *et. al.*, 2007).

Изучение прокариотных сообществ таких крайне суровых для большинства живых организмов биотопов как Антарктида позволяет лучше понять способы сохранения жизнеспособности, разнообразия прокариот и эволюции жизни в экстремальных местообитаниях, а также определить степень участия бактерий в первичном почвообразовании в отсутствие высших сосудистых растений с развитыми корневыми системами.

Коллекция бактерий, сформированная в процессе работы, может быть использована в биотехнологии, а также в учебных целях.

Результаты проведенного исследования используются при чтении лекций по курсам «Биология почв», «Общая экология» и «Экология бактерий».

Декларация личного участия

Диссертационная работа является результатом исследований автора за период с 2012 по 2016 гг. Автор принимал участие в проведении лабораторных работ, обработке полученных данных, интерпретации полученных результатов, написании текста диссертации.

Выполнение работы было поддержано проектом РФФИ №16-04-01776а «Эндолитные и гиполитные биокосные системы как протопочвенные образования Земли: география, свойства, процессы».

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю д.б.н. Лысак Л. В., к.г.н. Мергелову Н. С., к.г.н. Долгих А. В., д.б.н. Абакумову Е. В. за предоставленные образцы антарктических почв, к.б.н. Соиной В. С. за помощь в работе методом электронной-микроскопии, д.б.н. Манучаровой Н. А. за помощь в освоении метода FISH, к.б.н. Костиной Н. В. за помощь в освоении методов газовой хроматографии, д.б.н. Петровой М. А. за освоение современных молекулярно-биологических методов, к.б.н. Лапыгиной Е. В. за содействие в люминисцентно-микроскопических исследованиях и моральную поддержку.

1. Обзор литературы

1.1. История почвенных исследований и современные представления о почвах Антарктиды

1.1.1. История почвенных исследований в Антарктиде

Первые химические анализы образцов антарктической почвы были выполнены Х. Йенсеном в 1916 г. (Jensen, 1916). Однако масштабные почвенные исследования российскими учеными в Антарктиде начались в конце 1950-х гг. В рамках первых советских антарктических экспедиций К.К. Марковым была собрана обширная коллекция образцов пород и почвоподобных тел в оазисах Восточной Антарктиды (Марков, 1968), что позволило в 1958 г. М. А. Глазовской начать исследования процессов почвообразования и первичного выветривания на гранитах и долеритах, ставшее классическим в мировой литературе (Глазовская, 1958).

В конце 1950-х годов появились пионерные работы новозеландских исследователей по химии, минералогии и микробиологии почв Сухих долин Антарктиды (Горячкин и др., 2010).

Первая классификационная схема антарктических почв холодных пустынь была предложена Дж. Тедроу и Ф. Уголини, которые разделили почвы на безгумусовые, эвапориты, проторанкеры, орнитогенные, регосоли и литосоли (Tedrow, Ugolini, 1966).

Многочисленные исследования наземных сообществ мхов, лишайников, водорослей, микроорганизмов доказали принципиальную возможность применения понятия «почва» к биогенно-преобразованным минеральным субстратам Антарктиды. При этом существует целый ряд субстратов, имеющих профильное строение, но признаки макрожизни в них не обнаружены. Очевидно, что они должны стать объектом изучения почвенных микробиологов, а их статус (почва, почвоподобное тело, кора выветривания и др.) в будущем будет уточнен (Горячкин и др., 2011).

В 1987 г. все доступные на тот момент данные по факторам

почвообразования, разнообразию и распространению, процессам физического и химического выветривания, классификации и экологии антарктических почв были обобщены И. Кэмпбеллом и Г. Клэриджом. Они констатировали, что почвы Антарктиды аридные, что здесь идет как приморское, так и континентальное соленакопление, а в качестве природных зон основная масса исследователей, вслед за Дж. Тедру, выделяли холодные пустыни (cold deserts) основной части континента и полярные пустыни (polar deserts) Антарктического полуострова. Также были глубоко изучены орнитогенные почвы, в которых выявлены интенсивные органо-аккумулятивные и гумусово-иллювиальные процессы, весьма редкие для Антарктики (Горячкин и др., 2011).

Российский этап почвенных исследований Антарктиды, начатый в 50-х гг. 20 века работами М. А. Глазовской, был продолжен в 1994-1998 гг., когда Д.А. Гиличинский, Д.Г. Федоров-Давыдов, В.А. Сороковиков и В.Е. Остроумов с зарубежными коллегами исследовали почвы в Сухих долинах. Результатом этих исследований стала серия публикаций с американскими соавторами посвященных изучению микроорганизмов, обитающим в почве и мерзлоте (Friedmann et al., 1996; Gilichinsky et al., 2007). Начиная с 2008-2009 гг. почвенные и мерзлотные исследования в районах расположения российских антарктических станций и полевых баз ведутся коллективами Института географии РАН, г. Москва (Горячкин и др., 2009), Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, г. Пущино (Gilichinsky et al., 2010) и сотрудниками Санкт-Петербургского Государственного Университета (Абакумов, 2011).

1.1.2. Современные представления о почвах Антарктиды

Для понимания специфики формирования почв Антарктиды принципиально важно, что подавляющая часть почвенно-генетических работ выполнялась зарубежными исследователями в районе Сухих долин, станции Мак-Мёрдо и Трансантарктических гор, а также на Антарктическом

полуострове и прилегающих островах. Лишь недавно началось серьезное исследование российскими специалистами новых объектов – почв и почвоподобных тел в береговой части Восточной Антарктики и на труднодоступных участках Западной Антарктики, расположенных в области российских антарктических станций. Начиная с 2008-2009 гг. почвенные и мерзлотные исследования в районах расположения российских антарктических станций и полевых баз (станции Беллинсгаузен, Дружная, Молодежная, Новолазаревская, Прогресс, Русская и др.) систематически ведутся коллективом, созданным Д.А. Гиличинским и состоящим из сотрудников Института ФХ и БПП (Пушино) (Е. Ривкина, Д. Федоров-Давыдов, А. Лупачев, А. Абрамов, Н. Демидов, Е. Караевская, К. Кривушин, Д. Шмелев), Института географии РАН (С. Горячкин, А. Долгих, Э. Зазовская, Н. Мергелов, В. Шишков) и Почвенного института РАН (Д. Конюшков, В. Миронов).

В настоящее время предложено разделить Антарктику на восемь свободных ото льда районов, которые составляют 47 000 км² (0,35%) континента и его прибрежных островов. Почвы покрывают большую часть этой площади. На почвы Антарктиды в первую очередь влияют региональные различия в климате и возрасте исходных пород. Преобладающие почвообразующие процессы включают в себя рубефикацию, засоление/подщелачивание, карбонизацию, гумификацию, криотурбацию, образование пустынных «мостовых» покрытий, оподзоливание, образование вечной мерзлоты (Bockheim, 2014).

Почвы Антарктиды обычно имеют грубую текстуру с обильными крупными фрагментами (>2 мм) и преобладанием песка во фракции меньше 2 мм. Многие почвы Антарктиды, имеют низкое содержание влаги. Почвы вдоль побережья содержат меньше солей и более высокие уровни органических углерода и общего фосфора (Bockheim, 2014; Cary et al., 2010).

Наиболее распространенными в большинстве районов Антарктиды являются такие почвы как Gelisols (классификация по Soil Taxonomy), которые

формируются под воздействием вечной мерзлоты, но в прибрежных районах могут присутствовать Inceptisols и Histosols (классификация по Soil Taxonomy) (Vockheim, 2014; Barrett et al. 2006; Cary et al., 2010).

Цельного почвенного покрова Антарктического континента не существует, выделяют «острова педосферы», которые в большей степени зависят от окружающих их ледников и от собственных размеров, чем от широтного положения (Горячкин, 2006).

В Антарктиде выделяют следующие почвенно-климатические зоны: субантарктическая тундра, низкоантарктическая тундропустошь и антарктическая холодная пустыня. Основные почвенные процессы в перечисленных зонах распределяются следующим образом: в субантарктических тундрах и низкоантарктических тундропустошах доминируют процессы накопления органического вещества, оглеения и альфегумусовой иммобилизации минеральных компонентов. В среднеантарктических тундропустошах и холодных пустынях Антарктики доминирующую роль играют процессы засоления, криогенных турбаций и формирования «пустынных (или каменных) мостовых» (Горячкин, 2006).

Выветривание является главным почвообразующим процессом в Антарктиде и, по-видимому, выражается в основном в физической дезинтеграции пород и в аридно-аккумулятивном процессе (соленаккумуляции) (Абакумов, 2011).

Почвенный покров прибрежных континентальных оазисов характеризуется чередованием почв «влажных долин» межсопочных пространств и сухих водоразделов, и склонов с эндолитными и «безгумусовыми» почвами, откуда сдуваются выпадающие исключительно в твердом виде осадки. Органо-минеральные микрогоризонты почв «влажных долин» представляют собой смесь минеральных зерен и органического вещества разной степени разложенности, образованного из остатков мхов, лишайников, водорослей и грибов. Повышенная увлажненность почв талыми

снежниковыми водами не приводит к уменьшению окислительно-восстановительного потенциала почвенных вод и проявлению оглеения (Горячкин и др., 2011).

В высоко-антарктических холодных пустынях широко распространены почвы с низким содержанием (около 0.001 % C) органического вещества и щелочными значениями pH; влажных почв в почвенном покрове очень мало, и они характеризуются повышенным засолением (Fountain et al., 2011).

Для средне-антарктических снежниковых криптогамных пустошей характерен контрастный почвенный покров слабокислых почв, сильно различающихся по влажности и содержанию органического вещества в зависимости от влияния талых вод снежников (Beyer, Boelter, 2002; Абакумов, 2011).

Низко-антарктические тундропустоши (здесь на фоне преобладания криптогамных, появляются и цветковые растения) характеризуются разреженным почвенным покровом, развивающимся в условиях гумидного климата, в том числе и выпадающих жидких осадков, где возможны местообитания со 100% почвенно-растительным покровом, развитием торфообразования, гумусообразования и иллювиирования органо-минеральных соединений (Beyer, Boelter, 2002; Абакумов, 2011).

Анализ распространения и выраженности почвенных процессов в Антарктике показывает, что, в отличие от Арктики, здесь происходит принципиальное изменение их характера – в «холодных пустынях» преобладают континентальные условия, отсутствует накопление органического вещества, нет признаков оглеения и активно протекают процессы засоления и формирования «пустынных мостовых». Но, несмотря на разницу в факторах, набор почв в Арктике и Антарктике, за исключением холодных пустынь, почти одинаков. Это связывается со следующими причинами: 1) холодный климат обуславливает, в первую очередь, разорванность почвенного покрова; 2) реакция жизни на критические условия – самоорганизация и концентрация в

локальных убежищах; 3) внесение морского органического вещества в почвы птицами частично компенсирует биоклиматически низкую продуктивность биоты суши (Горячкин, 2010).

По характеру проявлений органо-минеральных взаимодействий предложена следующая классификация основных групп почв Антарктиды (Горячкин и др. 2011):

1) Органо-минеральные почвы с макропрофилями (при привносе органических веществ из моря – «орнитогенные» и «пост-орнитогенные» и из озер) – в них идет взаимодействие гуано или донных органических остатков с минералами почв;

2) Органо-минеральные почвы с микропрофилями в первые несколько сантиметров на мелкозем под мхами, лишайниками и водорослями;

3) «Безгумусовые» (“ahumic soils”) профильно анизотропные почвы на мелкозем без видимых признаков макрожизни – анизотропность создается абиогенными процессами: криогенным оструктурированием, выдуванием мелкозема из верхних горизонтов, засолением (Tedrow, Ugolini, 1966);

4) Эндолитные почвы, продуктом педогенеза в которых являются внутритрещинный мелкозем и новообразованные минералы – гидроксиды железа, как остающиеся в трещинах, так и попадающие на поверхность камней и придающие им буроватую и красноватую окраску; по площади это самые распространенные почвы Антарктиды. Из-за больших перепадов температур в плотных породах образуются многочисленные мелкие трещины, куда под прозрачные пропускающие свет минералы проникают автотрофы – водоросли, роль которых в преобразовании минералов очень высока. В трещинах идет растворение железистых минералов, выход двухзарядного железа из решетки и его окисление, в результате чего на породе, имеющей зеленовато-серую окраску, формируются как поверхностные, так и внутритрещинные пленки красно-бурого и даже красного цвета. Кроме того, внутри глыб идет травление полевых шпатов и кварца и формирование мелкопесчаного и пылеватого

мелкозема;

5) Эпилитные почвы под лишайниками на камнях (Selbmann et. al., 2013);

6) Эпилитные и эндолитные почвоподобные тела, сформированные на поверхности камня или внутри трещин, по-видимому, без участия организмов, например, за счет окисления тех минералов, которые могут окисляться и абиогенно. К ним относится часть «пустынных» или «скальных загаров» (Wierzchos et. al., 2005);

7) «Ледовые почвы» – органо-аккумулятивные образования, возникающие в углубленных проталинах льда, где накапливаются продукты гетеротрофного разрушения фотосинтезирующих микроорганизмов, поселяющихся непосредственно на льду (Таширев, 2009).

Поскольку в нашей работе проводилось изучение микробных комплексов в оазисах Ларсеманн и Тала, остановимся на их характеристике более подробно. Детальное описание этих почв приведено в работах сотрудников Института географии РАН Мергелова Н. С., Горячкина С. В., Долгих А. В. и др. (Мергелов, Горячкин, 2012; Долгих и др., 2014).

Важнейший структурный элемент ландшафтов оазисов – межсопочные долины, занимающие не менее четверти их площади. Днища и низкие борта долин выполнены мелкоземисто-щебнистыми субстратами смешанного моренного, элюво-делювиального и аллювиального генезиса, что естественно для аккумулятивных позиций. Основной фракцией мелкозема является крупный песок (1-0,5 мм) кварц-полевошпатового состава. Межсопочные долины – это области максимального развития антарктической биоты и, по-видимому, максимального биоразнообразия. Здесь формируются моховые, лишайниковые, водорослевые покровы, обнаруживаются альго-бактериальные маты, многочисленные колонии микромицетов. Перечисленная биота участвует в образовании органо-минеральных почв с *микрпрофилями* по типу GP¹-O-W-

ВС (GP – пустынные, каменные мостовые) мощностью в пределах 10-20 см. В связи с практически полным отсутствием жидких осадков и мощным ветровым и морозным иссушением грунта определяющим фактором для развития организмов в оазисе является доступность влаги. Основным источником последней – тающие снежники.

В самом днище долины в зоне течения талых вод формируются аллювиальные почвы с 1) черной пленкой водорослей на поверхности пустынной мостовой, 2) оливковым органо-минеральным горизонтом, образованным в основном скоплениями живых водорослей на песчаной подушке пустынной мостовой, 3) буровато-серым органо-аккумулятивным горизонтом, представляющим собой смесь биомассы водорослей (преимущественно мертвых частей) и мелкозема. В формировании последнего существенную роль играют постепенный привнос материала и погребение.

При продвижении к бортам долины и выходе из зоны постоянного течения талых вод в растительном покрове появляются, а затем доминируют мхи. Моховая подстилка развивается под щебнистой броней пустынной мостовой и иногда куртинами выходит на поверхность. Под подстилкой имеется отдельный минеральный горизонт с активным развитием микромицетов, макроморфологически диагностируемый по обильному белесому налету грибного мицелия на зернах крупного песка. Выше по склону следуют почвы, в которых из визуальных признаков жизни имеется лишь оливковый органо-минеральный горизонт, образовавшийся за счет развития колоний водорослей в песчаной подушке пустынной мостовой. Жизнь в этой тонкой прослойке поддерживается за счет капиллярного подтягивания надмерзлотной влаги, редких снегопадов и защиты щебнистой броней пустынной мостовой от выдувания ветром и агрессивного ультрафиолетового излучения. Выше по склону внутрипочвенная влага недоступна для макроорганизмов, развиваются «безгумусовые» почвы. Скалистые борта долины заняты эндолитными и эпилитными почвами.

Почвы и грунты изученных влажных долин не вскипают во всей массе. Признаков оглеения также не обнаружено, несмотря на постоянное переувлажнение. Почвы имеют слабокислые и нейтральные значения рН, а содержание углерода и азота сильно варьирует в зависимости от количества примесей органического вещества, достигая 10,4% углерода и 0,5% азота. Даже в «безгумусовых» почвах содержание углерода в верхнем горизонте достигает 0,4% (0,7% гумуса), источник которого пока не вполне ясен. Возможно, что это «эндолитная память» материала почв, то есть органическое вещество, сформировавшееся на почвенных частицах, когда они были в эндолитной системе.

Особого внимания заслуживают эндолитные почвы, формирующиеся на поверхности скальных пород. У системы «эндолитные организмы–порода–продукты выветривания» имеются все признаки почвы: есть слой породы, подверженный воздействию внешних абиогенных факторов; в нем функционируют живые организмы, синтезирующие и разлагающие органическое вещество; в результате воздействия биогенных и абиогенных факторов происходит трансформация исходной породы *in situ*, накапливаются и выносятся продукты трансформации, формируется вертикальная неоднородность в виде микрогоризонтов, закладывается микропрофиль (Мергелов, Горячкин, 2012).

Часть эндолитных организмов представлена литотрофами, которые могут использовать минеральные компоненты для осуществления биосинтеза, а также воздействовать на породу метаболитами/экссудатами (преимущественно органическими кислотами). В приповерхностном объеме породы (граниты, гнейсы) эндолитные цианобактерии, зеленые водоросли и лишайники выступают единственными первичными продуцентами органического вещества, образование которого идет за счет фотосинтеза, так как порода содержит пропускающие свет зерна кварца и полевых шпатов (Friedmann, 1982).

Синтезируемое ими органическое вещество, которое впоследствии разлагается эндолитными гетеротрофами (микробицетами), становится важным компонентом поверхностного слоя породы. Компоненты мертвого и живого органического вещества участвуют в химическом выветривании силикатов, физической дезинтеграции и биогенном/криогенном структурировании выветрелой минеральной массы.

Таким образом, почвенный покров на территории оазиса Холмы Ларсеманна представлен почвами, которые по классификации отечественных исследователей могут быть отнесены к следующим группам: органо-минеральные почвы с макропрофилями, органо-минеральные почвы с микропрофилями, безгумусовые, эндолитные почвы, эпилитные почвы под лишайниками на камнях, эпилитные и эндолитные почвоподобные тела, ледовые почвы.

Оазис Холмы Тала расположен в западной части Земли Эндерби. Данный оазис состоит из двух участков: Молодежный и Вечерний, общей площадью около 20 км². Климат оазиса Холмы Тала более суров по сравнению с наиболее теплыми прибрежными оазисами Восточной Антарктиды (Вестфоль, Ларсеманн). Это связано с его небольшой площадью, вытянутостью в субширотном направлении, близком расположении к леднику. Большая часть территории оазиса Холмы Тала занимают скалистые гряды и холмы, в том числе и низкие горы (до 280 м). Эти территории имеют наиболее тяжелый гранулометрический состав, формируются структурные грунты. Они могут быть безжизненными или покрыты фрагментарной растительностью (мхи и водоросли) (Долгих и др., 2014).

Для скальных обнажений характерны стратифицированные корки выветривания, эндолитные и эпи-эндолитные почвоподобные тела.

Межгрядовые долины с тающими летом снежниками являются важными объектами биоразнообразия и органо-минеральных взаимодействий. Структура почвенного покрова таких влажных долин сходна с таковой во влажных

долинах оазиса Ларсеманн. В днище долины под водными потоками на мелкоземистых отложениях аллювиального генезиса широко развиты водорослевые покровы. Водоросли могут образовывать сплошные черные пленки. По классификации Soil Taxonomy (11th edit.) почвы отнесены к (Oxy)Aquic и Fluventic Haploturbels, Fluventic Haploorthels.

На выходе из зоны водотоков растительность меняется. Появляются мхи *Bryum sp.* и *Ceratodon sp.*, которые развиваются под каменистой (или пустынной) мостовой. Под моховыми подушками располагается минеральный горизонт с грубым органическим веществом. Ниже располагается минеральный горизонт с активным развитием микромицетов, выраженным в обильном распространении грибного мицелия на зернах крупного песка. Криотурбации выражены слабо. Здесь распространены почвы типа Typic Haploturbels и Typic Haploorthels (по классификации Soil Taxonomy (11th edit.)).

Выше по склону долины растительность на поверхности не встречается. Под каменистой мостовой формируются оливковый органо-минеральный горизонт мощностью 1-2 см с водорослями. Привнос влаги здесь связан здесь с таянием снега весной, а также летними снегопадами. Летом верхняя часть часто бывает сухой. Здесь формируются почвы Typic Haploorthels и Typic Haploturbels (по классификации Soil Taxonomy (11th edit.)).

Выше по склону количество влаги в верхней части профиля резко падает. Здесь доминируют «безгумусовые» почвы Typic Haploturbels/Haploorthels (Soil Taxonomy (11th edit.)). Данные почвы являются наиболее распространенными не только в долинах, но и в других территориях с гравелисто-песчаными отложениями.

Почвы ветровых убежищ. Максимум растительности в оазисе приурочен к ветровым убежищам на элюво-делювии и наскальных ваннах. Орография оазиса способствует широкому распространению таких убежищ. Здесь формируются мощные моховые покровы с лишайниками, а под ними органо-минеральные почвы с торфяно-перегнойными горизонтами до 15 см.

Радиоуглеродный возраст нижней части органогенного горизонта 360 ± 60 лет позволяет предположить, что такие убежища с моховыми покровами функционируют не менее 500 лет. Эти почвы встречаются в оазисе повсеместно, однако площадь их незначительна. Почвы имеют различную мощность органо-минерального горизонта от 2-3 см под мхами до 15 см. Ниже расположен срединный горизонт аккумуляции железа Vf. Эти почвы классифицируют как Lithic Psammorthels, Spodic Psammorthels и Typic Haplorthels (Soil Taxonomy (11th edit.)) (Долгих и др., 2014)

Береговая линия небольших озер в теплый летний период отступает. Подводные организмы (альго-бактериальные маты, мхи) в такие периоды оказываются на поверхности. Е.В. Абакумовым эти почвы было предложено назвать амфибиями (Абакумов, 2011). Поверхность таких почв в оазисе Холмы Тала покрыта альгобактериальными матами мощностью до 5 см. Под ним располагается органо-минеральный горизонт мощностью до 10 см. Органическое вещество здесь озерного генезиса. Гранулометрический состав здесь более тяжелый по сравнению с другими почвами оазиса. Эти почвы относят к Typic Aquorthel (Soil Taxonomy (11th edit.)) (Долгих и др., 2014)

На участке Вечерний, расположенном поблизости от колоний пингвинов *Pygoscelis adeliae*, были описаны орнитогенные почвы, расположенные на скальных обнажениях. Мощность отложений гуано в этих почвах не превышает 35 см. Данные почвы можно классифицировать как Lithic Historthels (Soil Taxonomy (11th edit.)). Площадь распространения таких почв тесно связана с границами колоний. Местами поверхность покрыта водорослями *Prasiola crispa*, здесь формируются Typic Haploturbels и Typic Haplorthels (Soil Taxonomy (11th edit.)) с повышенным содержанием С, Р, N в верхней части профиля. Во влажных долинах на расстояниях в первые сотни метров от колоний пингвинов моховой покров имеет больше площади, что связано с дополнительным привнесением органики. Здесь, под моховым покровом площадью более 60 м², обнаружена пост-орнитогенная почва с мощным

органогенным слоистым горизонтами до 20 см со среднеразложившимся органическим веществом. Ниже располагается срединный горизонт с аккумуляцией железа и нижний криотурбированный глеевый горизонт. Данная почва является близкой к почвам ветровых убежищ. Однако формирование верхних горизонтов безусловно связано с привносом органического материала. Данные почвы можно классифицировать как Typic Histoturbels или Typic Haploturbels (Soil Taxonomy (11th edit.)).

Таким образом, структура почвенного покрова на территории оазиса Холмы Тала сходна с таковой во влажных долинах оазиса Ларсеманн. В днище долины широко развиты почвы, отнесенные к (Oxy)Aquic и Fluventic Haploturbels, Fluventic Haploorthels с развитым водорослевым покровом. На выходе из зоны водотоков появляются мхи, которые развиваются под каменистой (или пустынной) мостовой. Здесь распространены почвы Typic Haploturbels и Typic Haploorthels. На склонах долины где растительность на поверхности не встречается, формируются почвы типа Typic Haploorthels и Typic Haploturbels. Еще выше по склону количество влаги в верхней части профиля резко падает, здесь доминируют «безгумусовые» почвы Typic Haploturbels/Haploorthels, данные почвы являются наиболее распространенными не только в долинах, но и в других территориях с гравелисто-песчаными отложениями.

1.2. Микроорганизмы в почвах Антарктиды

Первые исследования микроорганизмов, обитающих в почвах Антарктиды, были начаты в 80-х гг. прошлого века. При помощи классических методов микробиологии, было показано, что в антарктических почвах обнаруживаются бактерии, которые были идентифицированы как представители родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Flavobacterium*,

Streptomyces, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Aeromonas* и *Planococcus*. Исследуемые штаммы бактерий были морфологически разнообразны, выделялись клетки, представленные палочками, кокками, конгломератами кокков, цепочками палочек и отдельными длинными нитевидными клетками. (Vishniac, 1993).

Грамположительные бактерии родов *Arthrobacter* и *Corynebacterium* доминировали среди микроорганизмов, выделенных из 425 образцов различных антарктических почв. В почвах прибрежных районов сухих долин Мак-Мёрдо бактерии вида *Corynebacterium sepedonicum* составляли 85% выделенных видов, *C. bovis* составлял 40%, а *C. sepedonicum* - 25% (Cameron et.al., 1972).

Род *Arthrobacter* преобладал в почвах внутренних районов Антарктиды. В мерзлых прибрежных почвах были обнаружены бактерии видов *Azotobacter chroococcum* и *A. indicus* (Boyd, 1962).

В почвах района оазиса Ширмахера, численность бактерий варьировала от 2×10^3 до 1.2×10^5 КОЕ в 1 г почвы, среди них были обнаружены грамположительные неспорообразующие палочки (60%) и кокки (11%), грамотрицательные подвижные (22%) и неподвижные (7%) палочки. Микрофлора острова Сайни (одного из группы островов в Южном океане), представлена в основном грамположительными коринеформными бактериями (71%) родов *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Kurthia*. Роды *Bacillus* и *Micrococcus* составляли 3% и 4%, соответственно, грамотрицательные палочки (12%) представлены родами *Pseudomonas* и *Flavobacterium* (Vishniac, 1993).

В минеральных почвах пустыни Росса коринеподобные бактерии составляли 56%; наиболее распространенным был род *Corynebacterium* (23%); встречались представители родов *Micrococcus* (20%), *Bacillus* (7%), *Nocardia* (3%), *Streptomyces* (3%) и 6% приходилось на долю *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*. Автор исследования считает, что биоразнообразие бактерий в почвах зависит от локальных климатических

условий, запасов питательных веществ и изменяется с глубиной как в органогенных торфах приморской Антарктиды, так и в аридных почвах континентальной пустыни Росса. Например, численность бактерий во мху острова Сайни увеличивалась от 486 кл/г на глубине 1-2 см до 2200 кл/г на глубине 11-12 см (Vishniac, 1993).

В ходе исследований антарктических почв и слоев вечной мерзлоты прямым микроскопическим методом было обнаружено, что количество клеток, наблюдаемых в эпифлуоресцентный микроскоп, было минимальным (10^3 - 10^4 клеток в 1 г сухого субстрата) в поверхностном активном слое почвы и 10^5 - 10^6 клеток в 1 г сухого субстрата в слое вечной мерзлоты (Gilichinsky et. al., 2007).

Методом посева было показано, что микробная популяция представлена аэробными бактериями (грамм положительными спорообразующими и неспорообразующими бактериями, а также грамм отрицательными) и анаэробными бактериями (метаногенами, сульфатредуцирующими бактериями). Так же были обнаружены дрожжи и мицелиальные грибы. Филогенетический анализ 16S рРНК позволил определить две доминантные группы: *Proteobacteria* и грамположительные бактерии. Количество бактерий уменьшалось с увеличением возраста вечномерзлых отложений, но видовое разнообразие оставалось примерно одинаковым (Gilichinsky et. al., 2007).

Исследования орнитогенных почв показали, что на участках, сильно загрязненных экскрементами птиц, численность бактерий составляет $2,11 \times 10^{10}$ клеток в 1 г, а на относительно чистых участках их содержание снижалось до $0,11 \times 10^{10}$ клеток в 1 г почвы, причем во всех изученных пробах количество метаболически активных бактерий составляло менее 8%, данный показатель авторы определяли с помощью автордиографического исследования с ^3H -глюкозой (Ramsay, 1983).

Среди эукариот были обнаружены дрожжи, значительный процент которых составили психрофильные формы. В антарктических почвах доминировали базидиомицетные дрожжи родов *Rhodotorula* и *Cryptococcus*, и

психрофильные формы с оптимумом роста около 10°C составляли 40%. Облигатно-психрофильные дрожжи *Candida sp.* имели оптимальную температуру роста 5°–10°C и могли расти при -7°C. Дрожжи, в почвах сухой долины Райта, с численностью (7-7.5) × 10⁴ клеток в 1 г были представлены в основном психротрофными видами родов *Cryptococcus* (4 вида), *Sporobolomyces* (1 вид) и *Rhodotorula minuta* (2 вида) и только один вид *Candida scottii* являлся облигатным психрофилом (Straka, Stokes, 1960).

Также дрожжи были выделены из образцов Субантарктических почв (остров Кинг-Джордж), их количество во всех образцах было низким, максимальная численность (концентрация) дрожжей достигала 5 × 10⁴ КОЕ в 1г почвы. Из исследованных образцов было выделено 61 штамм дрожжей, которые относились как к психротрофным так и к психрофильным видам. Психротрофные дрожжи были представлены восемью родами: *Cryptococcus*, *Leucosporidiella*, *Rhodotorula*, *Guehomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cystofilobasidium*, and *Debaryomyces*. Большинство штаммов были идентифицированы как базидиомицетные анаморфы, которые представлены родами *Cryptococcus* (12 видов) и *Rhodotorula* (9 видов). Среди отдела Ascomycota, дрожжевые штаммы были представлены родами *Candida*, *Metschnikowia* и *Debaryomyces*. Психрофильные штаммы были идентифицированы как *Glaciozyma antarctica*, *Phenoliferia psychrophenolica* (synonymy of *Rhodotorula psychrophenolic*) и *Mrakia frigida* (Martinez A. et al., 2016).

В почвах приморской Антарктиды и пустыне Росса было обнаружено значительное количество микромицетов, относящихся к аскомицетам и зигомицетам. Среди них обнаружены представители следующих родов: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Mortierella*, *Mucor* и *Rhizopus*. Микромицеты *Chrysosporium verrucosum*, *S. pannorum*, *Acrodontium antarcticum*, *Chalara antarctica*, *Phialophora dancoii*, *Thelebolus microsporus*, *Mortierella antarctica*, *M. alpina*, *Trichoderma viride*,

Penicillium sp. относятся к аборигенным видам и обнаружены только в Антарктиде. Психрофильные и психротрофные грибы широко распространены как в орнитогенных так и в минеральных почвах. Многие аборигенные виды способны расти при температурах около -6°C . Термофильные грибы *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermomyces lanuginosus*, способные к росту при 45°C , были выделены из орнитогенных почв прибрежной Антарктиды. Встречаемость грибов во внутренних районах Антарктиды чрезвычайно низка. Количество микромицетов составляло 10^6 КОЕ/г в мохово-торфяных сообществах, 8.6×10^3 КОЕ/г на скальных горных породах, 3.7×10^3 КОЕ/г в гумусе и около 200 клеток в 1г в минеральных почвах пустыни Росса (Власов и др., 2006, Озерская и др., 2008).

Поверхностные маты и колонии водорослей встречались на увлажненных участках, среди них доминировали нитчатые цианобактерии родов *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Schizothrix* или одноклеточные *Microcoleus*, *Gloeocapsa*. Среди цианобактерий часто встречались активные азотфиксаторы видов *Nodularia harveyana*, *Scytonema myochrous*, *Calothrix parietina* и *Tolypothrix tenuis*. На богатых солями увлажненных почвах острова Росса наблюдали непрерывные маты осцилляториевых или зеленых нитчатых водорослей *Urospora sp.* площадью вплоть до 500 м^2 . На орнитогенных почвах встречались колонии *Prasiola crispa*, ассоциированные с *Navicuula muticopsis* и *Oscillatoria sp.* На юге Земли Виктории были обнаружены черные корки цианобактерий *Calothrix parientina* и *Scytonema sp.* Цианобактерии *Ocellatum sp.*, *Gloeocapsa sp.*, *Phormidium autumnale* и *Leptolyngbya fragilis* были обнаружены в горных районах на высоте 1200-1750 метров (Абакумов, 2011).

Также, в настоящее время проводятся интенсивные исследования таксономического разнообразия микроорганизмов антарктических почв с помощью современных методов молекулярной биологии (Lee et. al., 2012; Makhalanyane et. al., 2016).

С помощью, анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК

был определен состав микробных сообществ поверхностного снега в районе четырех русских антарктических станций (Дружная, Прогресс, Мирный и Ленинградская). Наиболее многочисленными являлись представители классов *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Таксономический состав бактерий, заметно отличается в образцах из удаленных друг от друга областей Антарктиды, и изменялся со временем. Метагеномное секвенирование тех же образцов антарктического снега выявило гены, кодирующие белки клеточного ответа на окислительный стресс, и гены устойчивости к тяжелым металлам (Lopatina et al., 2013).

Анализ тотальной 16S рДНК почвы из оазиса Ширмахера, показал наличие в образцах бактерий, принадлежащих к следующим филогенетическим группам: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Gemmatimonas*, *Bacterioidetes*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и *Chlamydiae*. Кроме того, семь клонов из филумов *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и *Chlamydiae* были отнесены к неизвестным и некультивируемым формам. Культивируемые бактерии относились к следующим родам: *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Brevundimonas*, *Rhodococcus* и *Microbacterium*. Также результаты данного исследования, впервые показали присутствие в антарктических образцах бактерий, принадлежащих к родам: *Brevundimonas*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Nevskia*, *Gemmatimonas*, *Xanthomonas* и *Flexibacter* (Shivaji et al., 2004).

Исследование микробного разнообразия с помощью анализа полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов (T-RFLP-анализ) и пиросеквенирования ампликона гена 16S рРНК в трех типах эдафических мест обитания в оазисе Виктория (сухие долины Мак-Мердо), а именно: в литобионтах (гиполиты, эндолиты) и в поверхностных горизонтах почв показало, что тип местообитания значительно влиял на состав бактериальных сообществ, несмотря на то, что для всех образцов доминирующий филум был

представлен актинобактериями (41% от общего количества). В значительной степени литобионты были колонизированы малоизученными филотипами *Gemmatimonas* и *Leptolyngbya*). В тоже время, распределение филотипа *Cyanobacteria* незначительно зависело от среды обитания, в почвах были обнаружены цианобактерии, специфичные для эндолитов (Van Goethem et al., 2016).

Предположение о том, что тип местообитания значительно влияет на состав бактериальных сообществ сухих долин Антарктиды подтверждено и в работах других авторов (Kim et al., 2015, Hogg et al., 2006, Ferrari et al., 2016). Показано, что структура прокариотных сообществ зависела от типа местообитания (биотопа), который, в свою очередь, определяется физико-химическими факторами, главным образом, рН и содержанием воды в почве.

Исследование разнообразия бактериальных сообществ в четырех различных типах почв с острова Кинг-Джордж (был использован метод 454-секвенирование со специфичными праймерами к гену 16S рРНК) показало, что филумы *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Verrucomicrobia* были доминирующими почти во всех образцах почв. Такие факторы как рН, содержание фосфатов, органического углерода и органического азота играли ключевую роль в распределение почвенных бактерий (Wang et al., 2015).

Из вышеупомянутых работ, можно сделать вывод о том, что в почвах Антарктиды обнаружено значительное разнообразие микроорганизмов, однако остается неясным в какой степени эти микроорганизмы активны и жизнеспособны. Чтобы получить ответ на этот вопрос была использована комбинация из нескольких молекулярных подходов для определения филогенетического состава микробных сообществ и их функционального потенциала и активности в почвах, представляющих различные стадии оттаивания грунтов: неповрежденная вечная мерзлота, сезоннопротаивающий или активный слой почвы, термокарстовое болото (Hultman et al., 2015).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что микробные сообщества в вечной мерзлоте имели более низкий общий функциональный потенциал, чем талый слой почвы, что дает представление о стратегиях адаптации к жизни в условиях вечной мерзлоты. Все измеренные скорости процессов (аэробное и анаэробное дыхание, метаногенез, денитрификация, аэробное окисление метана, нитрат- и сульфатредукция), в целом, были низкими в мерзлоте, но относительное обилие транскриптов и ферментных белков для некоторых конкретных физиологических процессов, таких как окисление метана, было сходным с активностью в сезоннопротаивающем слое почвы. Возможно, что некоторые РНК и белки сохраняются в течение длительного периода в вечной мерзлоте. Они также могут сохраняться в микроорганизмах, которые переживают неблагоприятные условия в состоянии покоя.

В термокарстовом болоте были зафиксированы высокие скорости метаногенеза и, соответственно, высокое относительное содержание генов, транскриптов и белков, участвующих в метаногенезе, что по мнению авторов работы, демонстрирует потенциальную связь между молекулярными данными и скоростями процессов на уровне экосистем (Hultman et al., 2015).

Почвы и растительность играют важную роль в обмене углерода в Морской (Maritime) Антарктиде (о. Кинг-Джордж), но мало что известно о пространственной изменчивости процессов трансформации углерода в Антарктике. Была изучена интенсивность дыхания экосистемы в четырех почвах под различными типами растительности: мохово-дерновое сообщество, мохово-ковровое сообщество, фанерогамное антарктическое сообщество, мохово-ковровое (*Sanionia uncinata*) и голый грунт на полуострове Келлер. Интенсивность дыхания варьировала от 0,08 до 2,26 мкмоль CO_2 / m^2 в сек. В целом, уменьшение показателей интенсивности дыхания следовали порядку: фанерогамное сообщество → мохово-ковровое сообщество → мохово-дерновое сообщество → голый грунт → мохово-ковровое сообщество преимущественно

с *Sanionia uncinata*. Максимальной величины интенсивность почвенного дыхания достигла 2,26 мкмоль CO_2 / m^2 в сек. на участке фанерогамного сообщества, где температура почвы была выше 7,53°C. Это в 9 раз выше, чем на голом грунте. Минимальное значение показателя наблюдалась на участке мохово-коврового сообщества с доминированием *Sanionia uncinata* (0,08 мкмоль CO_2 / m^2 в сек.), здесь же чистое поглощение составило 1,54 мкмоль CO_2 / m^2 в сек., что связано с более высокой влажностью почвы. Авторы считают, что интенсивность дыхания напрямую зависит от влажности и температуры почвы (Thomazini et al., 2016.).

Противоположной точки зрения придерживаются исследователи, проводившие исследования на территории оазиса Тейлор (Сухие долины Мак-Мердо, континентальная Антарктида) они сделали вывод, что основной вклад в динамику CO_2 в почве вносят абиотические процессы. Небольшие изменения температуры почвы, способны приводить к значительным изменениям концентрации CO_2 в почве. Из изотопных данных следует, что биологическое дыхание вносит незначительный вклад в потоки CO_2 в почве в сухих долинах (Shanhun et al., 2012).

Таким образом, в почвах Антарктиды обнаружено значительное разнообразие микроорганизмов, представленных как эукариотами (грибы и водоросли), так и прокариотами, в связи с чем, позволяет предположить важную роль микроорганизмов в процессах трансформации углерода и деструкции минералов и горных пород при формировании почв и почвоподобных тел Антарктиды.

1.3. Механизмы выживания бактерий в экстремальных условиях

Пределные сроки сохранения жизнеспособности микроорганизмов в природе точно не известны. Теоретические расчеты говорят о возможности весьма длительного сохранения жизнеспособности микроорганизмов в

условиях торможения большинства биохимических реакций (Беккер и др., 1981; Калакуцкий, Сидякина, 1988).

Данные микробиологических исследований вечномерзлых отложений свидетельствуют о присутствии в них многочисленных жизнеспособных клеток прокариотных и эукариотных микроорганизмов (Соина и др., 1992; Дмитриев и др., 2001).

Однако остается невыясненным вопрос о физиологическом состоянии микроорганизмов *in situ*. С помощью метода низкотемпературного фракционирования было показано, что микроорганизмы в условиях вечной мерзлоты находятся в покоящемся, анабиотическом состоянии в течение геологически значимого периода времени. Выделенные микробные клетки были отнесены к покоящимся цистоподобным формам (Дмитриев и др., 2004).

По мнению ряда исследователей, интервал температур от 0 до -80° считается критическим при длительном хранении микроорганизмов в замороженном состоянии, и значительная часть микроорганизмов быстро гибнет (Лозина-Лозинский, 1972). В работах других исследователей было показано, что многие микроорганизмы не теряют своей жизнеспособности в результате хранения более 2 лет в состоянии анабиоза при температуре -20° (Колесов, 1959). В результате исследований из ледниковой толщи Антарктиды в интервале от 0 до 320-метровой глубины, были выделены различные группы бактерий, в том числе актиномицеты и мицелиальные грибы. (Абызов и др., 1982)

Характерной особенностью микробных сообществ вечномерзлого грунта является быстрое восстановление их активности после оттаивания образцов: активизируются ферменты, синтез РНК опережает синтез ДНК, проявляется способность к утилизации разнообразных субстратов, выделяются газы (CO_2 , CH_4 , N_2O , H_2S) (Vorobyova et al., 1997, 2001, Gilichinsky et. al., 2007).

В разных слоях вечной мерзлоты были обнаружены жизнеспособные клетки прокариот, а также показано как меняется состав микробного

сообщества и его активность с глубиной на примере вечной мерзлоты на острове Десеппин (Антарктида). Образцы (до глубины 4,2 м) анализировали с помощью специального чипа (Life Detector Chip 300, иммуносенсор, содержащий более 300 антител, нацеленных на бактериальные и архейные антигены). Положительные реакции с антителами к белкам и пептидам выявили наличие азотфиксации (NifHD, GlnB, HscA), метаногенеза (McrB), трансформации железа. Наиболее активным являлся верхний слой вечной мерзлоты, в котором преобладали такие филумы как *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и фототрофы *Cyanobacteria* и *Chloroflexi*. *Actinobacteria* и *Firmicutes* доминировали на глубинах от 0,5 до 2 м, а филум *Betaproteobacteria* - от 3 до 4,2 м (Blanco et al. 2012).

В исследованных почвах Антарктики было выявлено, что напряженность цикла азота определяется колебаниями температуры и внесением минеральных соединений азота. Повышение температуры почвы, отрицательно влияло на численность и разнообразие сообщества архей способных окислять аммиак (Jung. et al., 2011, Yergeau et al., 2007).

Электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов сконцентрированной микробной биомассы в просвечивающем электронном микроскопе показало, что не менее половины бактерий (70-80%) в древних вечномерзлых осадках (район Колымской низменности) представлены «карликовыми» формами (100 – 400 нм). Своеобразной особенностью клеток прокариот является наличие капсульных слоев, покрытых органо-минеральными частицами на наружной поверхности клеточной стенки, что защищает клетки от внешних механических воздействий. Среди бактерий было обнаружено как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии (Никитин, 1964; Soina, Vorobyova, 1994; Soina et al., 1995; Дмитриев и др., 2001; Соина и др., 2012).

Известно много работ, посвященных механизмам переживания прокариотами неблагоприятных условий (низких температур, низкой

доступности влаги, высоким ультрафиолетовым излучением и др.). Так, для прокариот известно несколько способов переживания неблагоприятных условий (Bej et al., 2009; Chattopadhyay, 2006):

1. Продолжение роста с соответствующим изменением организации и состава вегетативных клеток в ходе физиологических и биохимических адаптаций;

2. Прекращение роста и переход к «переживанию», что осуществляется в виде специализированных покоящихся клеток или в виде перехода вегетативных клеток в анабиотическое состояние (Калакуцкий, Сидякина, 1988).

К первой группе способов переживания холодных условий среды можно отнести следующие механизмы адаптации:

- синтезирование специфических белков (Caps – Cold adaptive proteins) адаптации к холоду, которые синтезируются в течение длительного роста при низких температурах (Mojib et al., 2008; Aliyu et al., 2016);

- сравнительно недавно был обнаружен и исследован белок бактерий из морского льда (IBP – Ice binding protein). IBP связывался с кристаллической решеткой льда и предотвращал его кристаллизацию, тем самым защищая бактерию от замораживания-повреждения клеточной мембраны. Белки IBP, обнаруженные у разных видов диатомовых водорослей, различались по аминокислотным последовательностям (Raymond, J.A., et al., 2007). Во многих работах было показано, что значительное число видов бактерий, выделяющихся из антарктических почв, экспрессируют ген, ответственный за синтез IBP, белка с антифризной функцией. Роль подобных белков представляется решающей для выживания бактерий в суровых условиях Антарктиды (Kawahara et al. 2004; Chattopadhyay, 2006; Mojib et al., 2008);

- синтез белков-антифризов (AFP – antifreeze protein) характерен для микроорганизмов, выживающих в мерзлых осадках (Gilbert et al., 2004; Dolev et al., 2016).

В работе по изучению экспрессии гена адаптации к холоду *CapB* и связывающегося со льдом белка *IBP* с использованием метода вестерн-блотов (Western blot) показано, что оба типа белков обнаруживаются в 6 из 8 изученных изолятов из оазиса Ширмахер (Антарктида). Так как структура белка *CapB* и *IBP* сильно варьировала у изученных микроорганизмов, то исследователи предположили, что некоторые изоляты (штаммы) могут иметь другой тип подобных белков. Экспрессия генов белков *CapB* и *IBP* у исследованных штаммов бактерий позволяет предположить, что подобные белки необходимы для выживания в холодных и низких температурах Антарктики, они защищают клетку от повреждений при замораживании-оттаивании (Mojib et al., 2008).

Ко второй группе способов переживания холодных условий среды относят переход клеток в покоящееся состояние. Согласно общепринятому и устоявшемуся в литературе определению под покоящимся состоянием понимают такое обратимое состояние бактериальной клетки, при котором уровень метаболической активности значительно снижен, а клетка может существовать в таком состоянии длительное время. Такие клетки, как правило, отличаются от вегетативных форм особенностями ультраструктурной организации, проявляющимися в измененной морфологии клеток, утолщении клеточной стенки. Такие клетки характеризуются экспериментально не выявляемым уровнем метаболизма, резко сниженным или отсутствующим эндогенным дыханием, обладают повышенной устойчивостью к экстремальным воздействиям – температура, облучение, действие спиртов, кислот, ксенобиотиков и т.п. (Karelyants et al., 1993; Демкина и др. 2000; Мулюкини др., 1997; Эль-Регистан и др., 2006).

Покоящиеся формы микроорганизмов, как правило, морфологически отличны от вегетативных клеток и характеризуются следующими особенностями: дополнительными внешними покровами, которые изолируют протопласт от внешней среды; утолщением или уплотнением клеточной стенки;

изменением ультраструктурной организации протопласта. Процессы формирования покоящихся форм, помимо модификации клеточных структур, всегда сопровождаются приобретением клетками свойств повышенной устойчивости к внешним факторам среды, что необходимо для переживания неблагоприятных условий (Соина и др., 2001).

Часто исследователи сталкиваются с таким явлением, когда бактерии не регистрируются методами посева, но, тем не менее, не погибают и могут быть выделены и учтены после процедуры «пробуждения». Подобное состояние бактериальных клеток известно в отечественной литературе как «ЖНС» – жизнеспособное некультивируемое состояние (Головлев, 1998), а в зарубежной – VBNC (viable but non culturable) (Colwell et al., 1996).

Многие неспорообразующие бактерии формируют в условиях голодания так называемые цистоподобные рефрактерные клетки (ЦРК), описанные авторами как новые формы покоя. ЦРК характеризовались очень низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью к действию высоких температур, ультрафиолетового облучения, литических ферментов и некоторых биоцидных веществ (спиртов). Образование таких клеток происходило под действием внеклеточного аутоиндуктора анабиоза, названного исследователями фактором d_I (Дуда и др., 1982; Мулюкин и др., 1997).

Характерной особенностью жизнеспособного некультивируемого состояния является резистентность к физическим и химическим воздействиям, а также уменьшение клеточного размера. Это состояние характеризуется особой устойчивостью клеток к факторам внешней среды. Уменьшение клеточного размера иногда приводит к появлению ультрамикрочорм (фильтрующихся форм прокариот, ультрамикробактерий, наночорм бактерий). Феномен нанотрансформации обнаружен у некоторых бактерий, в том числе как ответная реакция на стрессовые воздействия *in vitro* (Дуда и др., 1982, 2007, 2012; Вайнштейн, Кудряшова, 2000; Panikov, 2005).

Таким образом, можно сказать, что бактерии могут осуществлять разнообразные типы стратегий переживания неблагоприятных условий, в частности низкие температуры и дефицит питательных веществ. Один из способов переживания – образование покоящихся форм с разной морфологией и степенью специализации. Другая стратегия состоит в переходе вегетативных клеток в жизнеспособные некультивируемые клетки или к появлению ультрамелких форм (фильтрующихся форм прокариот).

Поскольку в нашей работе значительное внимание было уделено изучению фильтрующихся форм прокариот (наноформ) в антарктических почвах, мы более подробно остановимся на процессах нанотрансформации бактерий в неблагоприятных условиях.

1.4. Нанотрансформация бактерий в неблагоприятных условиях

Как уже ранее было отмечено, одним из механизмов выживания микроорганизмов под воздействием стрессоров является переход в так называемые «некультивируемые, но жизнеспособные формы». Характерной особенностью этих форм является резистентность к физическим и химическим воздействиям и уменьшение клеточного размера (Головлев, 1998).

подавляющее большинство бактерий, изучаемых и используемых в микробиологии, имеет линейные размеры примерно 2–5 мкм и диаметр 0,6–1,0 мкм. Мелкие бактериальные формы, диаметром менее 0,2–0,3 мкм, исследованы значительно меньше. Известно также, что в почве бактерии имеют меньшие размеры, чем в чистых культурах (Звягинцев и др., 2005).

Термин «нанобактерии» впервые употребил Ричард Морита, однако широко использоваться он начал в работах финского микробиолога Олави Каяндера, обнаружившего такие клетки внутри песчинок при мочекаменной болезни и в работах американского геолога Роберта Фолка, описавшего подобные микроорганизмы в пробах осадочных пород. В настоящее время к

нанобактериям относят мелкие прокариотные организмы с линейными размерами менее 200 нм (по мнению некоторых авторов — менее 400 нм). В научной литературе помимо термина «нанобактерии» используют другие названия: ультрамикробактерии, наноформы, наннобактерии, карликовые клетки, фильтрующиеся клетки, *l*-формы и некоторые другие (Вае, Casida, 1973; Morita, 1988). В последнее время наиболее часто по отношению к подобным клеткам применяют термин фильтрующиеся формы прокариот (ФФП).

Среди клеток ФФП (фракцию которых получают с помощью фильтрации через мембранные фильтры с размерами пор 220 нм), можно обнаружить как «настоящих» ультрамикробактерий, так и покоящиеся клетки прокариот, которые уменьшились в размерах образуя покоящиеся формы, но способные при наступлении благоприятных условиях выходить из покоящегося состояния и восстанавливаются до обычных, свойственных им размеров (Дуда, 2012).

В основу современной концепции ультрамикробактерий (УМБ) положен таксономический диагностический принцип и учет принадлежности организмов у УМБ по следующим обязательным признакам: 1) ультрамелким размерам, составляющим по объему $<0,1 \text{ мкм}^3$ у большинства клеток в популяциях; 2) сохранению ультрамалых размеров клеток вне зависимости от ростовых условий и стадии развития культур; 3) малому размеру генома (от $\sim 3,2$ до $\sim 0,58 \text{ Mb}$). Верхняя граница объема, равная $0,1 \text{ мкм}^3$, не получила еще биологического объяснения и была выбрана по прецеденту описания первого достаточно полно охарактеризованного вида УМБ – *Sphingopyxis alaskensis* (Дуда и др., 2012).

Размеры ФФП приближаются к так называемому «запрещенному объему» клетки с диаметром 150 нм. Возникает вопрос: как может такая клетка вмещать всё необходимое для жизни? Известно, что биомолекулы имеют определённые физические размеры. Исходя из объёма клетки с диаметром 150 нм, легко подсчитать, что в ней может содержаться приблизительно 1200 молекул белка и осуществляться около 100 ферментативных реакций.

Минимальное число ферментов, нуклеиновых кислот и других компонентов, необходимых для самовоспроизведения теоретической «минимальной» клетки, составляет, по проведённой оценке, не менее 100. Это такое количество, которое необходимо для поддержания клеточной структуры и обеспечения клеточного метаболизма (Гусев, Минеева, 2003). Была выдвинута гипотеза, объясняющая существование клеток диаметром около 150 нм. Для объяснения особенностей ФФП предложена следующая теория:

1. ФФП не синтезируют многие аминокислоты и жирные кислоты, а используют уже готовые, в том числе, возможно, фосфорилированные.

2. У ФФП отсутствуют «энергоёмкие» системы активного транспорта, характерные для про- и эукариотических клеток. Транспорт вещества в клетку и из клетки осуществляется за счёт диффузии и броуновского движения; этому способствуют ультрамикроскопические размеры клетки, то есть выгодное соотношение поверхность/объём.

3. Концентрация растворённых веществ и осмотическое давление внутри клеток ФФП мало отличается от окружающей среды. Отсутствие затрат на поддержание гомеостаза позволяет ФФП «голодать» неограниченно долго (Kajander et al., 1988).

Происхождение ФФП остается спорным. По этому поводу было выдвинуто несколько гипотез:

1) они представляют собой самостоятельные таксономические группы бактерий, имеющих малые размеры («истинные карлики») (Bakken L. R., Olsen R. A., 1987);

2) они являются формами больших бактерий, уменьшившихся из-за недостатка питательных веществ («плеоморфные карлики»);

3) ФФП — нежизнеспособные формы клеток первых двух категорий (Panikov, 2005).

ФФП обнаруживают в различных природных средах: водных, гипертермофильных, внутри живых организмов, в том числе и человека, на поверхности горных пород и непосредственно в почве.

В работах, посвященных изучению бактерий, обитающих в вечной мерзлоте, говорится о малом размере клеток, зафиксированном при помощи электронной микроскопии (Дмитриев и др., 2001).

Также были исследованы микроорганизмы.... (см. ниже..)исследованы микроорганизмы, включенные в льды сердцевины ледника Гренландии возрастом 120000 лет. Авторам работы удалось выделить чистые культуры двух новых видов грамотрицательных УМБ, *Chryseobacterium greenlandense* и *Herminiimonas glaciei* (Miteva, Brenchley, 2005).

Ледниковый лед является перспективным объектом для выделения и изучения ультрамикробактерий, поскольку он представляет собой среду с низкими концентрациями питательных веществ и отрицательными температурами. Так, микробная популяция в глубине ледника Гренландии глубиной 3043 м была обильно представлена ультрамелкими клетками бактерий (<0,1 мкм³), которые проходили через фильтры 0,4 мкм, 0,2 мкм и даже 0,1 мкм. Интересно, что фильтрация повышала количество культивируемых клеток, относящихся к грамположительным бактериям с высоким содержанием G + C. Доля фильтруемых через 0,2 мкм клеток была выше в фильтрованных культурах после коротких инкубаций, но доля таких клеток уменьшилась через несколько месяцев (Miteva, Brenchley, 2005).

В нашей стране, выделение и изучение УМБ успешно проводятся в лаборатории структурно-функциональной адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН под руководством доктора биологических наук В.И. Дуды. В этой лаборатории выделены и описаны ФФП (наноформы) из вечномерзлых отложений, из нефтяных шламов (илов) со дна водоемов, симбионтов сине-зеленых водорослей, ризосферы растения *Pedilanthus tithymaloides* (Дуда и др., 2012). В ходе экспериментов нанобактерии рода *Kaistia* проявляли себя как

типичные эктопаразиты. Было показано, что свободноживущие нанобактерии могут быть паразитами как фототрофных, так и гетеротрофных бактерий (Сузина и др., 2008).

За последние 10 лет обнаружены и описаны виды УМБ, принадлежащие к грамотрицательным и грамположительным бактериям. Так была описана свободноживущая грамотрицательная морская олиготрофная бактерия *Pelagibacter ubique*, характеризующаяся малым размером генома, в последнем отсутствовали транспозоны, экстрахромосомальные элементы и некодирующие последовательности (Rappe et al., 2002, Giovannoni et al., 2005). Первые хорошо охарактеризованные УМБ с грамположительной организацией клеточной стенки, принадлежали к филуму *Actinobacteria*, семейству *Microbacteriaceae* (Hahn et al., 2003).

Из осадков Чарльстонской гавани была выделена анаэробная УМБ (штамм DF-1), способная к росту на полихлоринированных бифенилах и хорошо растущая в присутствии *Desulfovibrio* (May et al., 2008).

Исследования УМБ и архей в воде кислотных озер показали, что большинство полученных клонов генов 16S рРНК бактерий принадлежали представителям класса *Betaproteobacteria*, также обнаружены представители родов *Herbaspirillum*, *Herminiimonas*, *Curvibacter* и *Burkholderia*. Библиотека клонированных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК архей включала последовательности представителей *Euryarchaeota*, порядки *Methanobacteriales* и *Methanosarcinales* (Федотова, Белова, 2012).

Ультрамикрoформы прокариот были обнаружены в водах сфагнового болота водосбора Верхней Волги. Библиотека клонов генов 16S рРНК бактерий содержала нуклеотидные последовательности представителей классов *Beta-* и *Gamma**proteobacteria* (родов *Janthinobacterium* и *Pseudomonas* соответственно), а также филума *Bacteroidetes* (родов *Chryseobacterium* и *Epilithonimonas*) и существенно отличалась от таковой, характеризующей ультрамикрoформы

прокариот озерной воды. Пулы фильтрующихся архей болот и озер обнаруживали существенное сходство (Белова, Федотова, 2012).

Также изучены культивируемые фильтрующиеся (ультрамикроскопические) формы (ФФ) бактерий в дерново-подзолистой почве и корневой зоне растений люцерны. Численность ФФ колебалась в широких пределах в зависимости от физико-химических условий среды обитания. Динамика численности культивируемых ФФ в почве носила сезонный характер количество выявляемых бактерий увеличивалась летом и осенью и снижалась в зимне-весенний период. В ризосфере люцерны за время вегетации численность культивируемых ФФ и их количественная доля в общей массе бактерий возрастает. В ризоплане люцерны наблюдалась обратная тенденция (Ванькова и др., 2013).

В целом, культивируемые УМБ найдены в семи крупных филогенетических группах прокариот среди классов: *Alpha-*, *Beta-* и *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucocomicrobiae*, *Actinobacteria*, и “*Elusimicrobia*” (Дуда и др., 2012).

По оценкам разных авторов численность ФФП в разных почвах и сопряженных с почвой субстратах может достигать не менее половины от общей численности бактерий в образце, т.е. достигать величин порядка миллиарда в 1 г почвы (Лысак и др., 2010).

В исследованных экстремальных биотопах, грунтах вечной мерзлоты Восточной Сибири, доля наноформ бактерий колебалась от 29 до 34 % от общего числа обнаруженных бактерий (Дмитриев и др., 2001, 2004).

Из различных экстремальных природных биотопов (грунта вечной мерзлоты, нефтешлама, почв, озерного ила, мхов термальных болот) выделены свободноживущие ультрамелкие бактерии с объемом клеток от 0.02 до 1.3 мкм³, которые принадлежат к различным филогенетическим группам (*Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*) и родам (*Kaistia*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Leucobacter*, *Leifsonia* и *Agrococcus*) домена

Bacteria и являются свободноживущими мезофильными гетеротрофными аэробными бактериями (Suzina et al., 2015).

По оценке зарубежных исследователей, выполненных с помощью электронной микроскопии, доля клеток бактерий с размерами менее 0,3 мкм достигала 70% от общего числа клеток (Вае, Casida, 1973).

Использование сканирующего микроскопа с режимом температуры естественной среды обитания, выявило в вечномерзлых Арктических отложениях клетки размером 200-300 нм. В образцах криозема и грунта ($t = +5^{\circ}$), среди наноформ встречались делящиеся клетки, в то время как в нативных образцах мерзлых отложений ($t = -12^{\circ}$) клеток с признаками деления обнаружено не было, что может свидетельствовать об их покоящемся состоянии (Соина и др., 1992).

Изучение тонких срезов ФФП *in situ* в образцах мерзлых подпочвенных отложений показало, что в большинстве случаев в клетках нет признаков деления. По морфологии они могут быть отнесены к двум типам клеток. Преимущественно наблюдались клетки с грамотрицательным типом клеточной стенки, которые отличались наиболее мелкими размерами (диаметром 200 – 300 нм). Второй тип клеток может быть отнесен к грамположительным бактериям, которые характеризовались более крупными размерами – от 300 до 400 нм в диаметре и наличием утолщенной клеточной стенки (Соина и др., 2012).

Характерными признаками покоящихся клеток, полученных в экспериментальных условиях, является: утолщение клеточных покровов, наличие капсульных слоев, неоднородная электронная плотность цитоплазмы, компактизация нуклеоида (Соина и др., 2012).

Таким образом, изучение ФФП в антарктических почвах и почвоподобных телах представляет значительный интерес, так как здесь можно ожидать появления значительных количеств ФФП, вследствие процесса «нанотрансформации» в суровых климатических условиях Антарктиды.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили образцы почв, отобранные и описанные участниками 55-58-й Российских антарктических экспедиций (Мергеловым Н.С., Долгих А.В.) в оазисах Холмы Ларсеманн (станция “Прогресс”), Холмы Тала (станция “Молодежная”). Всего было проанализировано 13 профилей антарктических почв, 2 эндолитных почвоподобных тела, 13 поверхностных горизонтов островных субантарктических почв (в совокупности исследовано 57 образцов). Точки отбора образцов представлены на рис. 1.

Согласно полевому описанию и результатам химического анализа изученные почвы по международной классификации отнесены к *Aquic Haploturbels*, *Typic Haploturbels*, *Typic Haplorthels*, *Lithic Haplorthels* (Soil Survey Staff. Keys to Soil Taxonomy (11th edit.), 2010). Некоторые почвы не всегда удавалось корректно вписать в современные классификации почв. В настоящей работе объекты рассматриваются по группам первичных продуцентов основного пула органического вещества в ландшафтах оазисов и их локализации в почвенном профиле (Мергелов, Горячкин, 2010). Были выделены следующие группы объектов:

I. Почвы с гиполитными (от др. греч. ὑπό – «снизу, под», λίθος – «камень») органогенными горизонтами, в которых первичными продуцентами являются цианобактерии и зеленые водоросли. Органогенные горизонты формируются под покровом естественных «каменных мостовых», которые обеспечивают защиту от ветра, способствуют удержанию влаги и уменьшению интенсивности ультрафиолетового излучения (Chan et. al., 2012; Pointing, Belnap, 2012). Представлены во влажных долинах оазисов или в небольших ветровых «убежищах» при периодическом увлажнении талыми водами снежников;

II. Почвы с поверхностными (эпиздафическими) органогенными горизонтами – моховыми и лишайниковыми подстилками, под которыми возможно формирование торфянистых горизонтов. Встречаются во влажных долинах или в небольших ветровых «убежищах» при обильном увлажнении тальными водами снежников (Мергелов, 2014; Dolgikh et al, 2015);

III. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами в виде альго-бактериальных матов. Формируются в субаквальных условиях на берегах озер на богатых органическим веществом сапропелевых отложениях. В них активно развиваются глеевые процессы (Dolgikh et al, 2015; Mergelov et. al., 2015). Сочетания макрогоризонтов окисленного и редуцированного глея образуют профили, схожие с профилями глееземов, которые выделяют на других континентах;

IV. Почвы без макроскопических органогенных горизонтов. Это так называемые *Ahumic soils* (по Tedrow, Ugolini, 1966), которые российские исследователи иногда относят к почвоподобным телам. Функционирование организмов, осуществляющих первичную продукцию органического вещества, в таких образованиях невозможно или сильно заторможено из-за недостатка увлажнения. Однако они могут содержать органический углерод в небольших количествах;

V. Эндолитные почвоподобные тела (ЭПТ), формирующиеся на поверхности скальных пород

Описание некоторых свойств изученных почв представлены в табл. 1.

Образцы были отобраны по катене (рис. 2) в стерильных условиях и до начала исследования хранились в морозильной камере при температуре -18°C .

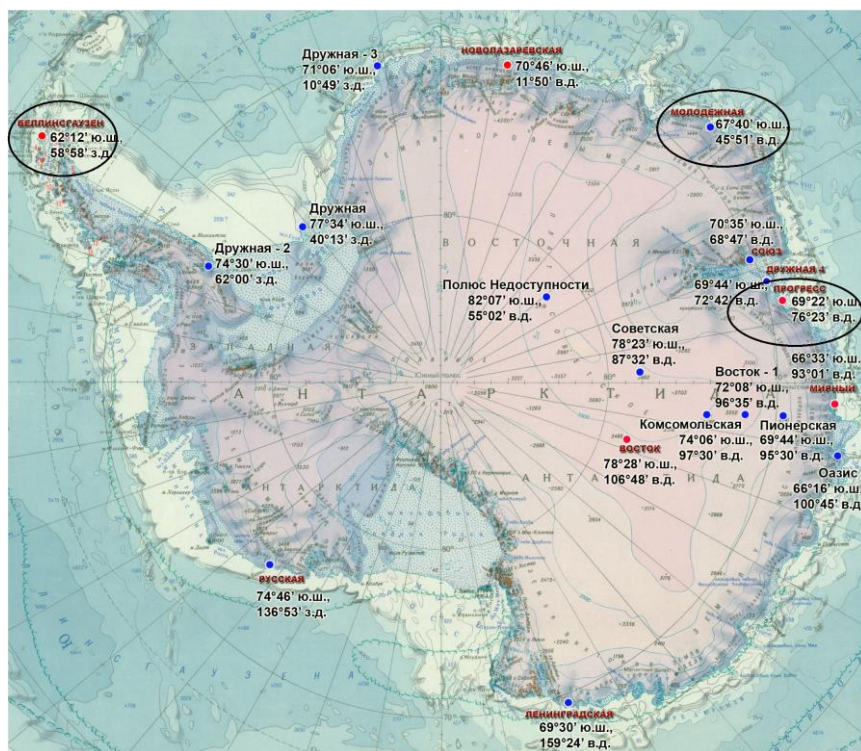
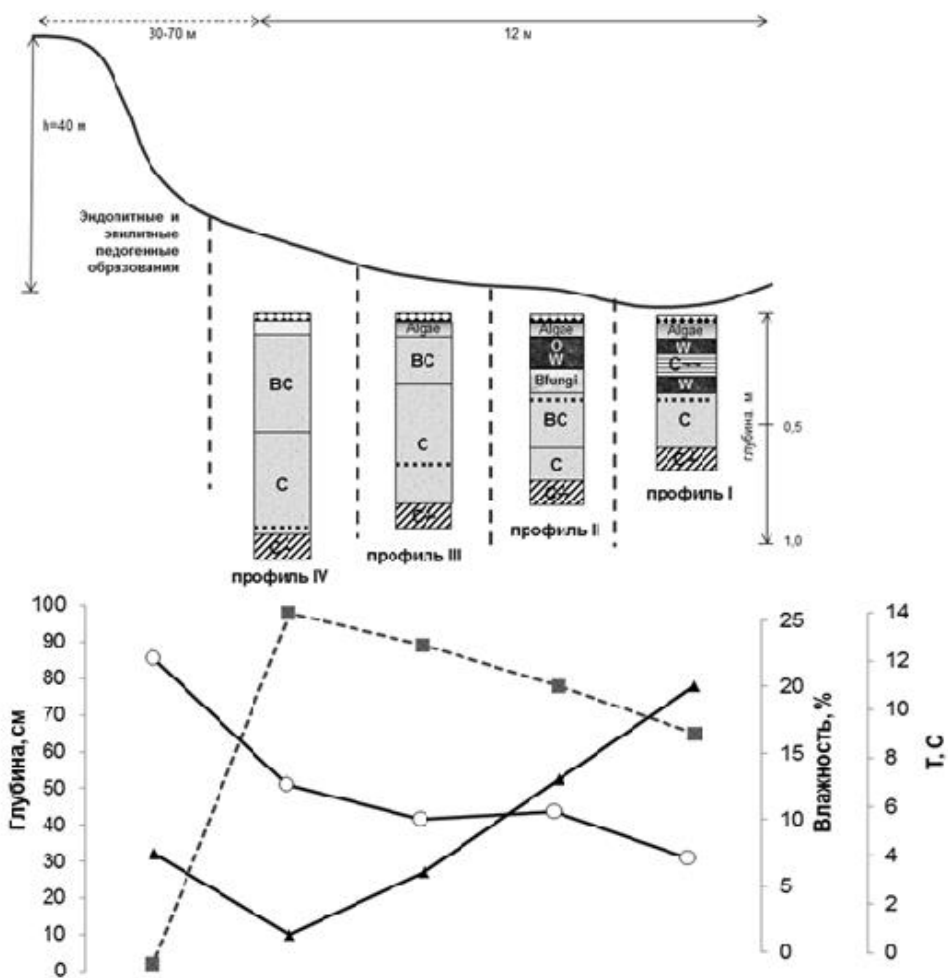


Рис. 1. Точки отбора образцов на карте Антарктиды (Выделены станции Прогресс и Молодежная, острова Галиндез и Кинг-Джордж)

Климатические условия из-за особенностей орографии оазиса не слишком суровы по сравнению с большинством районов континентальной Антарктики и не запрещают протекание химико-биологических трансформаций минеральных субстратов (Мергелов, Горячкин, 2010).

Также были исследованы почвы субантарктических островов, отобранные на острове Галиндез (вблизи станции Академик Вернадский) и на острове Кинг-Джордж (вблизи станции Артцовски). Образцы были предоставлены Абакумовым Е. В. и представляли собой верхние горизонты петроземов, посторнитоселей и грунтов различного генезиса под моховым и водорослевыми сообществами (Vlasov, Abakumov et. al., 2005). Согласно международной классификации почвы островов субантарктиды относятся к Ornithosol и Leptosol (Soil Survey Staff. Keys to Soil Taxonomy (11th edit.), 2010) (табл. 2).

Образцы были отобраны в стерильных условиях и до начала исследования хранились в морозильной камере при температуре -18°C .



Условные обозначения:

- GP - каменная мостовая
- ☐ - щебнистая броня
- ☐ - песчаная подушка
- Algae - органо-минеральный водорослевой микрогоризонт в песчаной подушке
- W - органо-аккумулятивный гумусово-слаборазвитый горизонт
- O - моховая подстилка
- Bfungi - минеральный горизонт с активным развитием микромицетов
- C - аллювиальные слоистые отложения
- BC - переходный горизонт
- C - мелкоземисто-щебнистая порода
- ▨ - мерзлая мелкоземисто-щебнистая порода
- - уровень грунтовых вод

- ↗ - Влажность в верхних 10 см почвы
- ↘ - Глубина протаивания
- ↖ - T Дек.-Фев. на поверхности почвы

Рис. 2. Почвы межзопочной долины (Холмы Ларсеманн)

Таблица 1. Описание исследуемых почв (Холмы Ларсеманн и Тала)

Место отбора	№ разреза (образца)	Горизонт, глубина см	pH _{вод.}	C	N
				%	
I. Почвы с гиполитными органогенными горизонтами GP/Balgaе					
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины, микроложбина между криогенными полигонами	10-15L1	GP/Balgaе, 0-1	6.85	0.37	0.04
		B1, 1-3	6.30	0.22	0.04
		B2, 3-10	7.70	0.11	0.01
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины, микрозападина	10-06	GP/Balgaе, 0-2	6.95	0.12	0.02
		T/Ah, 2-4	5.25	8.74	0.48
		B, 4-10	5.55	0.26	0.03
		B, 10-20	6.85	0.17	-
Холмы Ларсеманн, ветровое «убежище» в наскальной ванне	M1	GP/Balgaе, 0-1	6.90	0.64	0.07
		B, 1-4	8.10	0.24	0.04
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины с криогенными полигонами	10-15P1	GP, 0-2	8.20	0.25	0.05
		B1, 2-10	7.15	0.14	0.03
		B2, 10-20	5.50	0.08	-
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины, мхи отсутствуют, присутствуют водоросли	M2	GP/Balgaе, 0-1	-	0.28	-
		B1, 1-10	7.55	0.24	0.03
		B2, 10-20	7.50	0.19	0.02
		B3, 20-30	6.90	0.12	-
		B4, 30-40	6.30	0.10	-
		B5, 40-50	6.25	0.10	-
Холмы Тала, склон влажной долины, представлен водорослевой и цианобактериальный покров	AD 58-48	GP algae, 0-1	-	-	-
		B, 4-7	-	-	-
		BC, 20-25	-	-	-
II. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами O (подстилки)					
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины	M3	O, 0-1	5.15	5.85	0.50
		B, 1-2	5.15	0.85	0.08
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины, моховой покров	10-20	Снежник над моховой подушкой, 5-0	-	-	-

		O, 0-1	-	-	-
		B2 fungi, 2-3	5.70	1.46	0.16
Холмы Тала, днище влажной долины, рядом с ручьем талых вод, моховой покров	AD 58-44	O, 0-2	5.50	6.21	0.74
		B1, 3-5	5.50	0.82	0.11
		B2, 7-10	6.10	0.44	0.06
III. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами Oalgae-bact (альго-бактериальные маты)					
Холмы Ларсеманн, берег озера, глеезем на сапропелевых отложениях	NSM 10-32	GP/ Oalgae-bact, 0-2	-	-	-
		B, 2-20	-	-	-
		B/Bg, 20-30	-	-	-
		Bgt, 30-50	-	-	-
		(Bg2) 50-60	-	-	-
Холмы Ларсеманн, днище влажной долины, выполненное элюво-делювием гранитоидов, полигональный микрорельеф	NSM 10-04	Balgae, 1-2 см	7.3	0.41	0.05
		B1, 2-10	7.6	0.17	0.03
		B2, 10-12	7.4	0.14	0.01
		B3, 50-70	6.3	0.10	-
IV. Почвы (почвоподобные тела) без макроскопических органогенных горизонтов					
Холмы Тала, высокий борт долины, увлажнение талыми водами отсутствует	AD 58-40	GP, 0-1	7.10	0.12	-
		B, 5-10	6.70	0.15	-
V. Эндолитные почвоподобные тела					
Холмы Ларсеманн, десквамационная плитка. На нижней поверхности присутствует скопление одноклеточных водорослей	10-45	W, 0-1	6.4	3.33	0.47
Холмы Ларсеманн, грубозернистый песок на поверхности массивно-кристаллических гранитоидов с живой биомассой одноклеточных водорослей, мхов, накипных лишайников	NSM 10-36	W, 0-1	5.9	5.9	0.34

«-» – не определяли

Таблица 2. Описание исследуемых почв (о-ва Галиндез и Кинг-Джордж)

Место отбора	№ Образца	pH _{вод.}	C	N
			%	
о. Галиндез, Ornithosol				
Марина-Пойнт, локалитет <i>Prasiola crispa</i> , вблизи гнездования <i>Pygoscelis adeliae</i>	G1	7.10	13.65	2.30
о. Галиндез, Leptosol				
Куртина <i>Sanionia</i> sp.	G2	6.10	6.70	1.20
Долина мертвого мха	G3	5.80	59.60	3.24
Почва- «амфибия» на литорали	G4	5.30	35.50	2.81
Крупнощебнистый грунт с небольшим количеством мелкозема	G5	7.05	41.90	2.40
Андезитовая скала с лишайниковым покровом	G6	6.01	5.33	0.40
Почва под моховым покровом <i>Polytrichum strictum</i>	G7	5.23	43.62	2.10
Скала с накипными лишайниками и мхом <i>Sanionia</i> sp.	G9	-	-	-
о. Кинг-Джордж (ст. Арцовски), Leptosol				
Щучковая тундра	A1	5.50	5.80	0.58
Щучковая тундра	A3	6.0	8.10	0.96
Пятно пучения	A4	4.60	1.30	0.37
Андезитовая скала с лишайниковым покровом (<i>Usnea antarctica</i>)	A5	-	-	-
Свежая незаросшая поверхность морена	A6	7.10	0.08	0.01

«-» – не определяли

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение показателей общей численности и биомассы бактерий

Определение показателей общей численности бактерий в исследуемых образцах проводили с помощью окрашивания препаратов почвенной суспензии красителем акридином оранжевым (АО) (Методы почвенной биохимии и микробиологии, 1991).

Учет численности бактериальных клеток проводили с использованием люминесцентного микроскопа «Axioscope 2+» (объектив x100, масляная иммерсия).

Этапы подготовки образцов:

1. Получение почвенной суспензии, для этого пробу почвы массой 1 г помещали в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды;
2. Почвенную суспензию обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-1 в течение 2 минут в режиме 0,44 А, 15 Гц;
3. Почвенную суспензию наносили микропипеткой на тщательно обезжиренные предметные стекла 0,01 мл на препарат, распределяли микробиологической петлей на площади 4 см²;
4. Препарат высушивали на воздухе и фиксировали над пламенем горелки.

Проводили окрашивание акридином оранжевым (1:10000 в течение 2-3 минут). Красителем акридином оранжевым окрашивали почвенную суспензию, фильтраты, полученные через бактериальные фильтры с размерами пор 0,2 мкм.

Для каждого варианта просматривалось 90 полей зрения.

Формула для расчета количества бактериальных клеток на 1 г почвы:

$N = S1 \cdot a \cdot n / V \cdot S2 \cdot C$, где

N- число клеток в г почвы;

S1- площадь препарата (мкм²);

a- количество клеток в одном поле зрения (среднее по всем препаратам);

n- показатель разведения почвенной суспензии (мл);

V- объем капли, наносимый на стекло (мл);

S2- площадь поля зрения микроскопа (мкм²);

C- аликвота (1 мл).

Расчеты бактериальной биомассы проводили, учитывая, что масса одной клетки объемом 0.1 мкм³ равна 2×10^{-14} г (Полянская, Звягинцев, 2003). Полагали, что углерод клеток микроорганизмов (мкг С/г почвы) составляет 50% ее сухой массы (Ball, Virginia, 2014, Bolter, 1995). Содержание микробной биомассы рассчитывали на грамм абсолютно сухой почвы.

2.2.2. Оценка потенциальной жизнеспособности прокариот

Для оценки потенциальной жизнеспособности прокариотных клеток в почве использовали окрашивание почвенной суспензии красителем LIVE\DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (Molecular Probes, USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Краситель состоит из комбинации флюорофоров: propidium iodide и SYTO9 (флюоресцеина изотиоцианат). Эта флуоресцентная система позволяет дифференцировать интактные клетки бактерий (зелёное свечение) и клетки с повреждёнными клеточными мембранами (красное свечение): SYTO 9 окрашивает ДНК всех клеток, в то время, как пропидиум йодид проникает только в клетки с повреждённой мембраной.

Этапы подготовки образцов:

1. Пробу почвы массой 1 г помещали в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды;
2. Полученную почвенную суспензию обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-1 в течение 2 минут в режиме 0,44 А, 15 Гц;
3. Далее 1 мл почвенной суспензии вносили в пробирку Эппендорфа, добавляли флюорофоры, смешанные в пропорции 1:1 и экспонировали в темноте в течение 15 мин.;
4. Полученную почвенную суспензию наносили микропипеткой на тщательно обезжиренные предметные стекла и просматривали под люминесцентным микроскопом «Axioscope2+» (объектив x100, масляная иммерсия).

2.2.3. Выделение фильтрующихся форм прокариот (ФФП) из почвы

ФФП выделяли из почвы с помощью фильтрации почвенной суспензии через ядерные мембранные фильтры (GP Millipore Express PLUS Membrane) с размерами пор 0,22 мкм (Лысак и др., 2010, 2014).

Подготовка почвенной суспензии и последующая фильтрация осуществлялись следующим образом:

1. Пробу почвы массой 1 г помещали в колбу со 50 мл стерильной водопроводной воды и обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-1 в течение 2 минут в режиме 0,44А, 15 Гц;
2. Полученную суспензию пропускали через ядерные мембранные фильтры (GP Millipore Express PLUS Membrane) с размерами пор 0,22 мкм при помощи вакуумной установки;
3. Далее полученный фильтрат центрифугировали (10000 об/мин) в течение 5 минут для осаждения клеток на дно микропробирки (пробирка Эппендорфа);

Численность и потенциальную жизнеспособность ФФП определяли с помощью окрашивания данной фракции акридином оранжевым и красителем L7012 LIVE\DEAD по вышеописанным методикам.

2.2.4. Электронно-микроскопические методы

Изучение ФФП с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ)

ФФП выделяли по методике, описанной выше (стр. 50).

1. Сконцентрированные центрифугированием фильтраты наносили на медные сеточки с формваровой подложкой.
2. После высыхания сеточки окрашивали в течение 1,5–2 мин 1% раствором молибденовокислого аммония $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$.
3. Окрашенные препараты просматривали с помощью просвечивающих электронных микроскопов JEM-1011 и JEM-100B фирмы JEOL, ускоряющее напряжение 80 кВ.

2.2.5. Метод FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

Разнообразие и численность отдельных филогенетических групп прокариотов оценивались с помощью метода FISH (fluorescence *in situ* hibridisation) (Манучарова, 2008). В ходе работы использованы зонды, специфичные для домена *Archaea* (ARCH915) и для филогенетических групп домена *Bacteria* таких как, *Alphaproteobacteria* (ALF1b), *Betaproteobacteria* (BET42a), *Gammaproteobacteria* (GAM42a), *Actinobacteria* (HGC69a), *Planctomycetes* (PLA886), *Acidobacteria* (ACIDO228).

Этапы подготовки образцов:

1. Пробу массой 2 г помещали в 50 мл стерильной водопроводной воды и обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-1 в течение 2 минут в режиме 0,44А, 15 Гц;

2. Разнообразие и численность бактерий отдельных филогенетических групп, в антарктических образцах оценивалась как в нефилтрованной суспензии, так в суспензии, полученной путем пропускания через бактериальные фильтры (GP Millipore Express PLUS Membrane) с размерами пор 0,22 мкм (для выделения ФФП по вышеописанной методике);

3. Для суспензии, пропущенной через фильтр, дальнейшего осаждения почвенных частиц в центрифуге не требовалось;

4. Для нефилтрованной почвенной суспензии проводилось отделение бактериальных клеток от крупных частичек почвы, это осуществляется путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 10 минут. Клетки из полученной суспензии осаждают (5 мин при 10000 об/мин) и далее работали с полученным осадком. Для фракции ФФП проводилось сгущение в 200 раз.

Метод FISH

1. Полученные после сгущения клетки ресуспензировали в смеси PBS-буфера и 4% параформальдегида (1:3) и осаждали центрифугированием в течение 5 минуты при 10000 оборотах/мин, супернатант сливался и клетки двукратно промывали PBS-буфером;

2. Клетки ресуспензировали в PBS и 100% этаноле (1:1).

Приготовленные таким образом образцы хранились при -20°C;

3. Суспензию фиксированного образца (1 мкл) наносили на прожелатиненные предметные стекла с окошками и распределяли наконечником пипетки;

4. Готовили буферы для гибридизации. Состав буферов зависит от зонда и приведен в таблице 3. Было использовано семь олигонуклеотидных зондов для выявления следующих филумов: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Archaea*.

Табл. 3. Состав буферов для гибридизации

Зонд	Форма́мид, %	Форма́мид, мкл	H ₂ O, мкл	5M NaCl, мкл	1M TRIS HCl, мкл	10% SDS, мкл
<i>Archaea</i> (ARCH915)	30	300	500	180	20	1
<i>Alphaproteobacteria</i> (ALFIb)	20	200	600	180	20	1
<i>Betaproteobacteria</i> (BET42a)	35	350	450	180	20	1
<i>Gammaaproteobacteria</i> (GAM42a)	35	350	450	180	20	1
<i>Actinobacteria</i> (HGC69a)	25	250	550	180	20	1
<i>Acidobacteria</i> (ACIDO228)	20	200	600	180	20	1
<i>Planctomycetes</i> (PLA886)	30	300	500	180	20	1

5. 850 мкл буфера наносили на фильтровальную бумагу, выстилающую 50 мл флакон. Флакон герметично закрывали и помещали в гибридизационную камеру, с температурой +46°C. Оставшиеся 150 мкл буфера, в эппендорфе помещали на водяную баню с температурой +49°C.

6. Предметные стекла промывали в градиенте этанола: 50% — 80% — 96%, по три минуты в каждой концентрации, подсушивали, помещали во флакон с фильтровальной бумагой и отправляли в гибридизационную камеру на 15-20 минут.

7. На прогретое стекло, на каждое окошко наносили 10 мкл оставшегося буфера и 1 мкл зонда (если зонд состоял из нескольких составляющих для разных групп (микс), то на одно окошко наносилось эквивалентное количество зонда: 1 зонд — 1 мкл).

Так как зонды хранились при температуре -20°C , работали с ними на аккумуляторе холода.

8. Стекла помещались обратно во флакон и в камеру на 1–2 часа.

9. Во флаконах на 50 мл готовили промывочные буферы. Состав промывочных буферов зависит от зонда и приведен в таблице 4.

Табл. 4. Состав промывочных буферов

Зонд	0,5 Na ЭДТА, мкл	5M NaCl, мкл	1M TRIS HCl, мкл	10% SDS, мкл
<i>Archaea</i> (ARCH915)	500	1,02	1	50
<i>Alphaproteobacteria</i> (ALFIb)	500	2,15	1	50
<i>Betaproteobacteria</i> (BET42a)	500	0,7	1	50
<i>Gammaproteobacteria</i> (GAM42a)	500	0,7	1	50
<i>Actinobacteria</i> (HGC69a)	500	1,49	1	50
<i>Acidobacteria</i> (ACIDO228)	500	2,15	1	50
<i>Planctomycetes</i> (PLA886)	500	1,02	1	50

Приготовленный буфер ставили в термостат на 46°C .

10. Стекла из гибридизационной камеры промывали от буфера с зондом с использованием теплого промывочного буфера. Стекла промывали аккуратно, чтобы не смешать образцы. На одно стекло шло 3–5 мл воды.

11. Стекла помещали во флаконы с промывочным буфером вертикально, инкубировали на водяной бане при 49°C около 20 минут для удаления избытка зонда.

12. Стекла ополаскивали дистиллированной водой, подсушивали на воздухе и окрашивали акридином оранжевым по обычной методике.

2.2.6. Оценка таксономического разнообразия методом посева

Посев почвенной суспензии производили обычным чашечным методом на глюкозо-пептонно-дрожжевую (ГПД) питательную среду с нистатином (Лысак и др., 2003).

Таблица 5. Состав глюкозо-пептонно-дрожжевой питательной среды (рН = 7,0)

Глюкоза (сахароза)	1 г/л
Пептон	2 г/л
Дрожжевой экстракт	1 г/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Солодовый экстракт	1 г/л
Глицерин	10 мл/л
Агар	20 г/л
Карбонат кальция (CaCO ₃)	2 г/л

2.2.7. Изучение изменений общей численности прокариот и доли ФФП по ходу сукцессии при фиксированной влажности и разных температурах

Изучение изменений общей численности прокариот и доли ФФП по ходу сукцессии было проведено для двух образцов почв, отличающихся содержанием органического углерода и наличием разрастаний водорослей. Первый образец был отобран из минерального горизонта с низким содержанием Сорг. (0,14%) и характеризовался отсутствием признаков макробиоты (10-15P1 (гор. В1)), во втором образце было зафиксировано более высокое содержание Сорг. (0,41%) и отмечалось присутствие пленок водорослей (NSM10-04 (гор. V)).

Образцы почв массой 30 г помещались в стерильные чашки Петри (всего было взято 4 навески почв) и увлажнялись стерильной водопроводной водой до

20% (от абсолютно сухой почвы), далее почва тщательно перемешивалась. Закрытые чашки Петри с почвой для поддержания постоянной влажности были помещены в эксикаторы. Образцы инкубировали при двух температурах: при +5°C в холодильнике и при +20°C в термостате.

Отбор проб проводили на нулевые, 4, 7, 14, 30, 60, 160 сутки. Определяли показатели общей численности прокариот, численность и долю ФФП, производили посев почвенной суспензии на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду и определяли численность и таксономический состав гетеротрофного комплекса бактерий, исследуемых образцов антарктических почв.

2.2.8. Родовая и видовая идентификация бактерий сапротрофного комплекса

Идентификация бактерий сапротрофного комплекса проводилась на основании изучения культуральных, микроморфологических и некоторых физиолого-биохимических признаков по ключу для родовой идентификации почвенных бактерий (Лысак и др., 2003).

Видовой состав грамотрецательных бактерий был определен с помощью метода секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. Бактериальную ДНК экстрагировали с помощью Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific). Для амплификации фрагментов генов 16S рРНК были использованы праймеры: (5'-3' последовательность) 537R-GTATTACCGCGGCTGCTG, 1100R-AGGGTTGCGCTCGTTG (Lane, 1991). Использовали следующую программу для ПЦР: 95:4'- 95:1'- 55:1'-72:1'30''-72:5'; 30 циклов.

ПЦР продукты анализировали при помощи электрофоретического разделения в 0,8 –1% горизонтальных агарозных гелях, содержащих 1-2 мкг/мл бромистого этидия, в трисборатном буфере. (Maniatis et al.,1982)

Секвенирование ДНК проводили на секвенаторе AppliedBiosystems 3130xl Genetic Analyzer в Научно-производственной компании «Синтол» (Москва). Для секвенирования был использован праймер - 1100R.

Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью пакетов программ BLAST (Altschul et al., 1990). Идентификацию полученных результатов проводили, используя данные генбанка NCBI (ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.9. Определение потенциальной биологической активности почв

Определение потенциальной биологической активности почв (продуцирование CO₂, потенциальная скорость выделения метана, активности азотфиксации и денитрификации) проводили с помощью газохроматографических методов (Степанов, Лысак, 2002).

Определение потенциальной активности дыхания

Навеску почвы (1-5 г) помещали во флаконы объемом 15 мл. Добавляли глюкозу в концентрации 2.5 мг/г почвы. Затем флаконы закрывали резиновыми пробками, фиксировали зажимами, инкубировали в течение 24 часов при 28°C в термостате. Затем из газовой фазы каждого флакона шприцем отбирали пробы воздуха объемом 0.5мл (Степанов, Лысак, 2002).

Определение потенциальной скорости выделения метана

Навеску почвы (1-5 г) помещали во флаконы объемом 15 мл. Добавляли глюкозу в концентрации 2.5 мг/г почвы, увлажняли образцы до 20% от веса почвы. Затем флаконы закрывали резиновыми пробками, фиксировали зажимами. Анаэробные условия, необходимые для развития метаногенов создавали путем вытеснения воздуха аргоном. Инкубировали в течение 24 часов при 28°C в термостате. Об активности процесса судили по накоплению метана в газовой фазе (Степанов, Лысак, 2002).

Определение потенциальной активности денитрификации

Навеску почвы массой 5г помещали в стеклянные флаконы (15мл), затем добавляли растворы глюкозы в концентрации 2.5 мг/г почвы и нитратов (KNO₃)

0.4 мг/г, флаконы герметично закрывали. Анаэробные условия, необходимые для процесса денитрификации, создавали путем вытеснения воздуха аргоном. Флаконы тщательно встряхивали, переворачивали вверх дном и инкубировали при 28°C в течение 24 часов. Затем из газовой фазы каждого флакона шприцем отбирали пробы воздуха объемом 1мл (Степанов, Лысак, 2002).

Определение потенциальной активности азотфиксации с использованием ацетилена

Навеску почвы массой 5г помещали в стеклянные флаконы (15мл), затем добавляли раствор глюкозы в концентрации 2.5 мг/г почвы, флаконы закрывали резиновыми пробками, фиксировали зажимами. В газовую фазу вводили шприцем 0.5 мл ацетилена. Инкубацию проводили при 28°C в течение 24 часов. Пробы воздуха из газовой фазы каждого флакона отбирали шприцем объемом 1мл для анализа концентрации N₂O на газовом хроматографе (Степанов, Лысак, 2002).

Оценку активности продуцирования CO₂ проводили на газовом хроматографе Московского опытного завода "Хроматограф" – модель 3700/4, активность азотфиксации и денитрификации и метаногенеза на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором "Кристалл-2000".

Для выявления статистически достоверных различий средних значений численности подсчитывали доверительный интервал с уровнем вероятности 0.95. Статистический анализ полученных результатов проведен с помощью пакета STATISTICA 10 и Excel.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Определение общей численности, биомассы и потенциальной жизнеспособности прокариот

3.1.1. Определение общей численности прокариот

Общая численность бактерий в исследованных почвенных профилях вблизи станции «Прогресс» (оазис Ларсеманн) варьировала от 30 до 1460 млн. клеток в 1 г почвы (табл.6, рис.3). Максимальная общая численность бактерий зафиксирована в образце песчаной подушки под каменной мостовой (M1, горизонт В), обильно пронизанной мертвой и живой биомассой одноклеточных зеленых водорослей и цианобактерий. Минимальная численность бактерий отмечена в минеральных горизонтах, В₂ для профиля 10-06 и В₅ для профиля M2- 60 и 50 млн. клеток в 1 г почвы соответственно. Следует отметить, что для горизонтов без макропризнаков биоты, наблюдается низкая численность бактерий по сравнению с горизонтами, где визуально обнаруживался рост цианобактерий, водорослей и мхов.

Для разрезов с хорошо сформированными профилями (10-15L1 и 10-15P1), наблюдается постепенное уменьшение численности клеток бактерий вниз по профилю. В обоих разрезах максимумы приходятся на песчаные подушки каменных мостовых, что в случае почвы в микроложбине (10-15L1) совпадает с максимальным развитием зеленых водорослей и цианобактерий, наблюдаемым визуально.

Для разреза 10-06 также характерно значительное снижение численности бактерий по профилю: в горизонтах КМ+V и Т она была максимальной, в минеральных горизонтах резко снизилась.

Известно, что во многих почвах умеренных широт наблюдается постепенное уменьшение численности клеток вниз по профилю (Звягинцев и др., 1999, 2005). Как показали результаты нашего исследования, та же закономерность характерна и для примитивных антарктических почв с гиполитными органогенными горизонтами. В почвах с поверхностными

органогенными горизонтами и эндолитных почвоподобных телах она выявлена не была (табл.6, рис.3).

Так разрез МЗ, представленный всего двумя горизонтами, общей мощностью 2 см, характеризовался одинаковой численностью клеток в обоих горизонтах (280 млн. клеток в 1 г). В разрезе М2, мощность которого составляла 50 см, пик численности наблюдается в горизонте В₂ - 500 млн. клеток в 1г (10-20 см), а в вышележащем (КМ+V) и нижнем (В₅) горизонтах численность бактерий была почти на порядок ниже и составляла 60 и 50 млн. клеток, соответственно (табл.6).

Бликие закономерности были выявлены при изучении профильного распределения показателей общей численности бактерий в образцах, отобранных вблизи станции «Молодежная» (Холмы Тала). Максимальная численность бактерий была зарегистрирована в верхних органогенных горизонтах разрезов (моховая подстилка, обрастания водорослями) и составляла 230-730 млн. клеток в 1г (табл.7, рис.4), что сравнимо с показателями численности бактерий в образцах, отобранных на территории оазиса Ларсеманн (табл. 6). Наблюдалось также снижение общей численности бактерий вниз по профилю (разрезы AD 58-44 и AD 58-48), особенно четко эта закономерность выражена в разрезе AD 58-48, где происходило снижение численности бактерий более, чем в три раза. Иная закономерность выявлена в почве разреза AD 58-40 (почва без видимых признаков биоты). Численность бактерий в горизонтах GP и B, была примерно одинаковой и составляла 230-280 млн. клеток в 1 г (табл.7, рис.4).

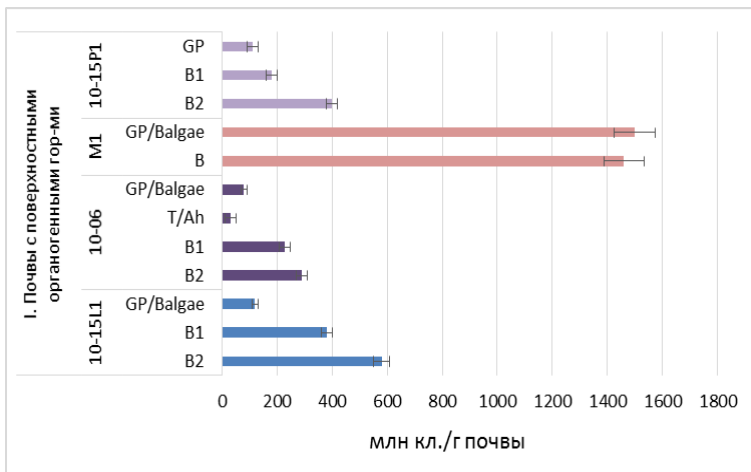
Таблица 6.

Общая численность прокариот, биомасса и доля прокариот в суммарной биомассе, численность и доля фильтрующихся форм прокариот (ФФП) (оазис Холмы Ларсеманн)

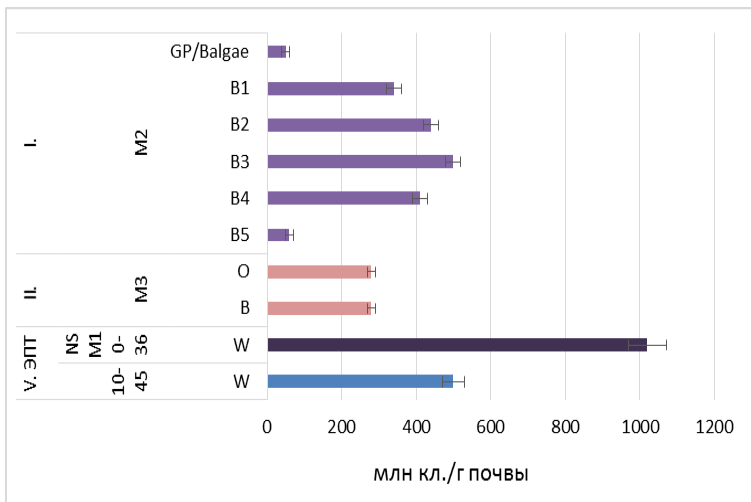
№ Разреза	Горизонт, глубина в см	Общая численность прокариот, млн. кл./г почвы	Биомасса прокариот, мкг С/г почвы	Доля прокариот в суммарной биомассе, %	ФФП	
					Численность, млн. кл/г почвы	Доля, %
I. Почвы с гиполитными органогенными горизонтами GP/Balgaе						
10-15L1	GP/Balgaе, 0-1	580±30	6.7±0.3	6.6	130±10	22
	B1, 1-3	380±20	4.4±0.2	3.6	300±20	79
	B2, 3-10	120±10	1.1±0.1	3.6	70±5	58
10-06	GP/Balgaе, 0-2	290±20	3.2±0.2	4.1	260±20	90
	T/Ah, 2-4	230±20	2.8±0.2	0.9	60±5	26
	B, 4-10	30±20	0.5±0.02	0.4	80±10	25
	B, 10-20	80±10	1.0±0.1	1.1	50±10	63
M1	GP/Balgaе, 0-1	1460±73	14.6±0.7	11.7	90±5	6
	B, 1-4	1500±75	15.4±0.7	9.9	70±4	5
10-15P1	GP, 0-2	400±20	4.1±0.2	4.4	170±10	43

	B1, 2-10	180±20	2.1±0.2	1.9	150±15	83
	B2, 10-20	110±10	1.2±0.1	1.7	70±7	64
M2	GP/Balgae, 0-1	60±10	0.5±0.1	-	50±10	83
	B1, 1-10	410±20	3.7±0.2	-	120±10	29
	B2, 10-20	500±20	4.5±0.2	-	80±10	16
	B3, 20-30	440±20	3.9±0.2	-	140±10	32
	B4, 30-40	340±20	3.1±0.2	-	90±10	26
	B5, 40-50	50±10	0.4±0.1	-	30±5	60
II. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами O						
M3	O, 0-1	280±10	3.4±0.1	1.8	50±10	18
	B, 1-2	280±10	3.2±0.01	2.7	170±20	61
V. Эндолитные почвоподобные тела (ЭПТ)						
10-45	W, 0-1	500±30	4.5±0.3	-	80±10	16
NSM10-36	0-1	1020±51	9.2±0.5	-	170±9	16

«-» – не определяли



А)



Б)

Рис.3. Общая численность прокариот (млн кл./г почвы) в оазисе Холмы Ларсеманн. А) Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами) Б) Профили почв группы I, II (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), V ЭПТ.

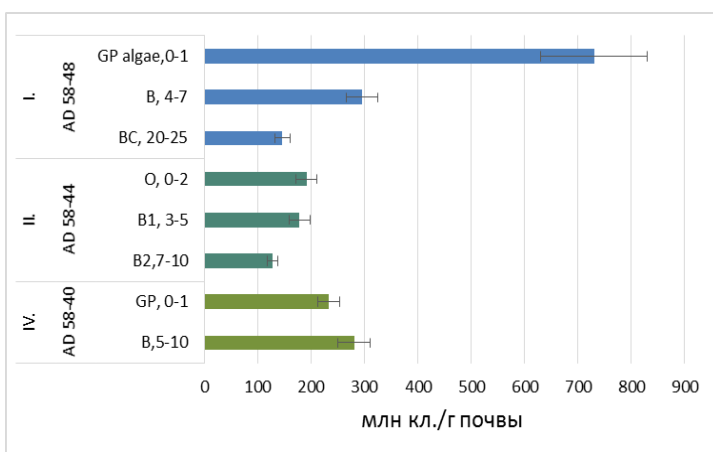


Рис.4. Общая численность прокариот (млн кл./г почвы) в оазисе Холмы Тала. Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами), II (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), IV (почвы без макрокопических органогенных горизонтов).

Таблица 7.

Общая численность прокариот, биомасса и доля прокариот в суммарной биомассе, численность и доля ФФП от общей численности прокариот, (оазис Холмы Тала)

№ Разре за	Горизонт, глубина в см	Общ. числен- ность прока- риот, млн. кл./г почвы	Био- масса про- кариот, мкг С/г почвы	Доля прокариот в суммарной биомассе, %	ФФП	
					Числен ность, млн. кл/г почвы	Доля в % от общ. числ. прокар иот
I. Почвы с гиполитными органогенными горизонтами GP/Balgae						
AD 58-48	GP algae, 0-1	730±100	6.6±0.9	-	59±10	8
	B, 4-7	295±30	2.6±0.3	-	29±5	10
	BC, 20-25	146±15	1.3±0.1	-	24±5	16
II. Почвы с поверхностными органогенными горизонтами O (подстилки)						
AD 58-44	O, 0-2	191±20	1.9±0.21	1.3	25±5	13
	B1, 3-5	178±20	1.8±0.20	1.1	28±5	16
	B2, 7-10	127±10	1.2±0.10	0.6	21±5	17
IV. Почвы (почвоподобные тела) без макроскопических органогенных горизонтов						
AD 58-40	GP, 0-1	233±20	2.3±0.24	3.7	25±3	10
	B, 5-10	280±30	2.8±0.30	4.2	35±5	13

«-» – не определяли

Было проведено сравнение прокариотных комплексов антарктических почв оазисов Холмы Ларсеманн и Холмы Тала и почв субантарктических островов (о. Галиндез и о. Кинг-Джордж), формирующихся в более мягком климате по сравнению с почвами континентальной Восточной Антарктики.

Показатели общей численности бактерий в образцах этих почв варьировали от 223 до 3950 млн. клеток в 1г почвы, что выше, чем в примитивных почвах Восточной Антарктиды почти на порядок (табл. 8). Максимальная численность бактерий зафиксирована в верхнем горизонте почвы, которая формируется под воздействием привноса органического вещества из мест массового скопления птиц (G1) (табл.8).

Следует отметить, что, в целом, показатели общей численности бактерий в исследованных почвах Восточной Антарктики (Холмы Ларсеманн и Холмы Тала) были значительно ниже (на 1-2 порядка), чем обычно регистрируются в почвах умеренных широт (Головченко и др. 1992, 2007, Фомичева и др. 2006). При этом выше показатели численности были в органогенных горизонтах (обрастания водорослями, моховая подстилка, горизонт с торфянистыми включениями), а также в почвенных горизонтах, формирующихся под каменной мостовой, которая, видимо, создает для бактерий своеобразный «тепличный эффект» (Мергелов и др., 2010).

Таблица 8.

Общая численность и биомасса прокариот, доля прокариот в суммарной биомассе, численность и доля ФФП от общей численности прокариот (о. Галиндез, о. Кинг-Джордж)

№ образца	Общая численность прокариот, млн. кл./г почвы	Биомасса прокариот, мкг С/г почвы	Доля прокариот в суммарной биомассе, %	ФФП	
				Численность, млн. кл/г почвы	Доля от общей численности прокариот %
о. Галиндез, Ornithosol					
G1	3950±806	35.5±7.3	-	134±25	3.4
о. Галиндез, Leptosol					
G2	597±178	5.4±1.6	1.8	60±4	10.2
G3	495±198	4.5±1.8	1.7	40±17	8.2
G4	320±188	2.9±1.7	1.9	7±1	2.2
G5	223±93	2.0±0.8	1.7	13±4	6.0
G6	324±130	2.9±1.2	1.6	2±0,8	0.6
G7	747±261	6.7±2.4	0.8	13±4	1.7
G9	946±283	8.5±2.5	2.0	16±5	1.7
о. Кинг-Джордж, Leptosol					
A1	548±220	4.9±1.9	-	74±30	13.5
A3	923±420	8.3±3.8	-	66±25	7.2
A4	1103±460	9.9±4.1	-	30±12	2.7
A5	455±190	4.1±1.7	-	40±16	8.8
о. Кинг-Джордж, свежая не заросшая морена					
A6	1411±470	12.7±4.2	-	117±48	8.3

«-» – не определяли

3.1.2. Распределение биомассы прокариот по профилям исследованных почв

В образцах оазиса Холмы Ларсеманн величина бактериальной биомассы варьировала от 0.5 до 15.4 мкг С/г почвы. Она максимальна в верхних органогенных горизонтах, покрытых мхами и альго-бактериальными матами, а минимальна - в подповерхностных горизонтах (3 - 15 и 1 - 2 мкг С/г соответственно) (табл.6).

Аналогичные закономерности выявлены при изучении образцов, отобранных на территории Холмов Тала. Биомасса бактерий в этих образцах составляла от 1.2 до 2.8 мкг С/г почвы (табл.7), что, в целом, меньше, чем в оазисе Холмы Ларсеманн. Снижение биомассы бактерий вниз по профилю было незначительным.

Доля бактерий в общей микробной биомассе (сумма прокариотной биомассы и биомассы микромицетов, данные по биомассе микромицетов были любезно предоставлены аспирантом кафедры биологии почв Никитиным Д.А.) исследованных почв варьировала от 0.4 до 11.7% (табл. 6, 7). В большинстве почв наблюдали снижение содержания бактериальной биомассы вниз по профилю.

Развитие альго-бактериальных матов на поверхности почвы оказывало существенное влияние на величину бактериальной биомассы (рис. 5). Меньшая биомасса бактерий в почвах оазиса Холмы Тала по сравнению с Холмами Ларсеманн связана с отсутствием растительности или слабым развитием мохового покрова на поверхности почв. Следует отметить, что в некоторых верхних горизонтах (разрез М1 и 10-15L1 оазиса Холмы Ларсеманн) доля бактерий в составе микробной биомассы была относительно велика - 11.7 и 6.6%, что больше, чем обычно регистрируется в почвах умеренных широт, что свидетельствует о значительном вкладе прокариот в процессы формирования исследованных почв.

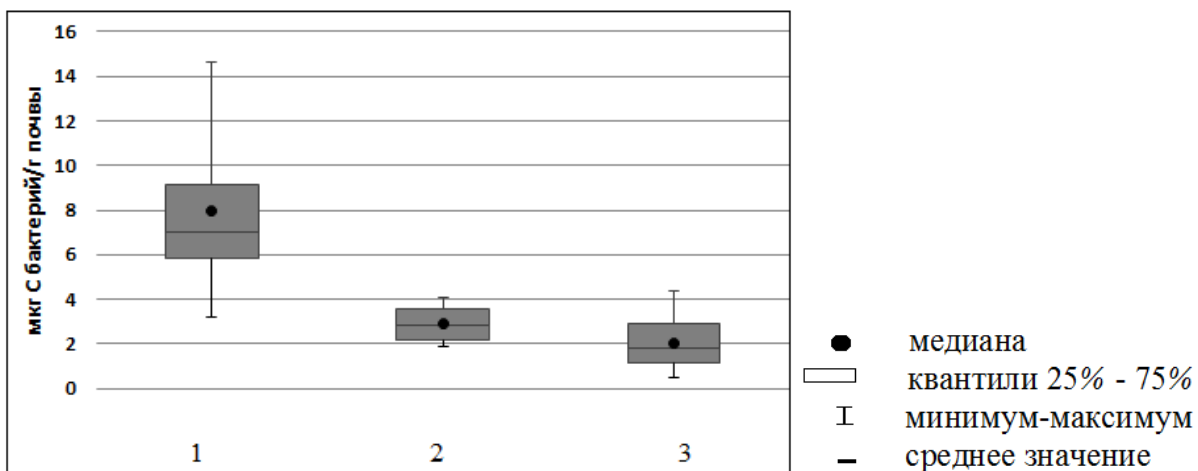


Рис.5. Влияние цианобактерий и водорослей на биомассу бактерий. 1 – гиполитные органогенные горизонты с цианобактериями и зелеными водорослями; 2 – верхние горизонты почв без разрастаний цианобактерий и водорослей; 3 – минеральные горизонты

3.1.3. Определение потенциальной жизнеспособности прокариотных клеток

Изучение потенциальной жизнеспособности прокариотных клеток в исследованных образцах антарктических почв было проведено при помощи красителя **L7012** (LIVE/DEAD). Этот краситель позволяет дифференцировать клетки с неповрежденной мембраной (потенциально жизнеспособные, окрашиваются в зеленый цвет) от клеток с поврежденной мембраной (окрашиваются в красный цвет) при наблюдении в микроскоп с УФ-источником света.

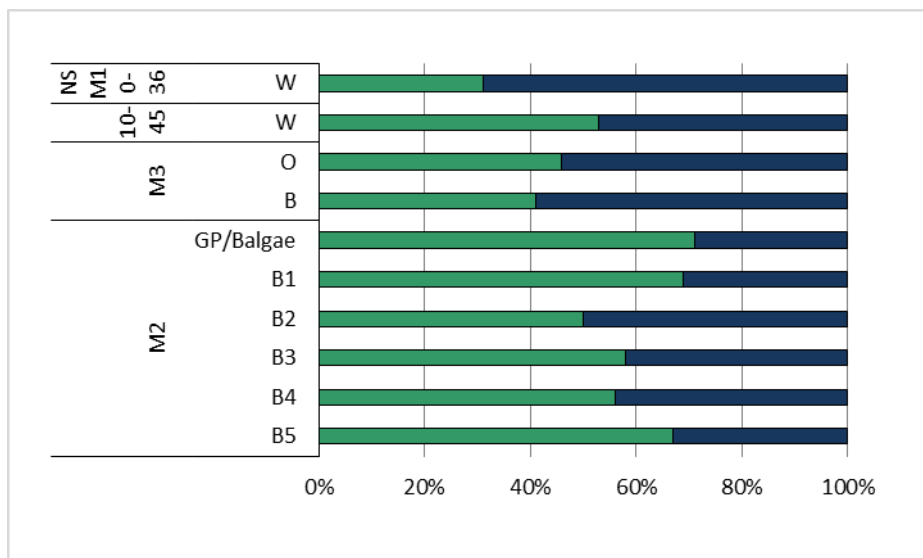
При помощи красителя **L7012** были проанализированы образцы почв, отобранные на территории оазиса Холмы Ларсеманн (всего исследовано 22 образца). Общая численность бактерий во всех изученных образцах варьировала в пределах от 60 до 1930 млн. клеток в 1 г почвы, что коррелирует с данными полученным при окрашивании почвенной суспензии красителем акридином оранжевым. Максимальная численность бактерий отмечена в верхних горизонтах, минимальная в нижних горизонтах.

Обращает на себя внимание высокая доля жизнеспособных клеток в исследованных образцах почв (выше 60 % в 11 из 22 исследованных образцов) (рис.6). Полученные показатели близки к ранее полученным данным о содержании потенциально жизнеспособных клеток бактерий в некоторых зональных почвах (Лысак и др., 2010).

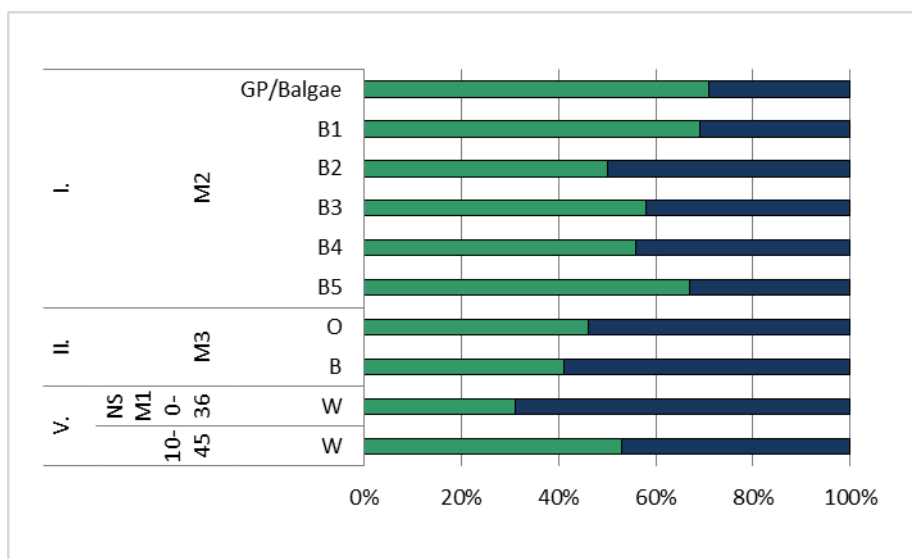
Сравнение показателей общей численности бактерий (окраска акридином оранжевым) с долей жизнеспособных форм (окраска красителем **L7012**) показало, что максимальная доля клеток с неповрежденной мембраной обнаруживается в разрезе 10-15P1 в горизонте B2 (93%), хотя общая численность в данном образце сравнительно не высока (110 млн. клеток на 1 г). В образцах с высокими показателями общей численности, доли жизнеспособных клеток варьировали от 40 до 65%.

Практически во всех исследованных почвах, отмечается снижение количества жизнеспособных клеток вниз по профилю. Исключением является

разрез 10-15P1, в верхнем горизонте которого (каменная мостовая) лишь 47 % клеток с неповрежденной мембраной, однако в нижележащем горизонте (B2) их доля составляет 93% (рис.6), что может быть связано защитной ролью «каменной мостовой».



А)



Б)

■ Доля жизнеспособных клеток ■ Доля клеток с поврежденной мембраной

Рис.6. Доля потенциально жизнеспособных клеток (оазис Холмы Ларсеманн)
 А) Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами) Б) Профили почв групп I, II (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), V ЭПТ.

3.2. Определение общей численности, жизнеспособности и морфологии фильтрующихся форм прокариот (ФФП)

3.2.1. Определение общей численности и жизнеспособности ФФП

Одной из форм переживания бактерий в экстремальных природных условиях многие исследователи считают мелкие формы бактерий (фильтрующиеся формы бактерий, «карликовые» клетки», нанобактерии, наноформы бактерий), размеры которых, как правило, не превышают 200 нм. Подобные клетки выявляются прямыми микроскопическими методами и, по мнению ряда авторов, представляют собой особые покоящиеся формы, предназначенные для сохранения жизнеспособности бактерий при наступлении неблагоприятных условий (Дуда и др., 2012, Кряжевских и др., 2012, Panikov, 2005, Velimirov, 2001).

Во всех исследованных образцах антарктических почв были обнаружены мелкие формы бактерий, проходящие через мембранные ядерные фильтры с размером пор 0,22 мкм. В образцах почв из оазиса Холмы Ларсеманн численность ФФП варьировала от 21 до 300 млн. в 1 г почвы. Доля таких бактерий была достаточно высока во всех исследованных образцах и составляла в среднем от 10 до 90% от общего числа клеток бактерий (табл.6, рис.7), то есть была значительно больше, чем в ранее исследованных образцах зональных почв, где она не превышала 5-7% (Лысак и др., 2010). Максимальная доля ФФП зафиксирована в образце, в котором отмечалась высокая численность ФФП - каменная мостовая с разрастаниями одноклеточных зеленых водорослей и цианобактерий (разрез 10-06), меньше она была в образцах почв из минеральных горизонтов.

В образцах почв из оазиса Холмы Тала численность ФФП варьировала от 21 до 59 млн. в 1 г почвы (табл. 7), что несколько ниже, чем в почвах оазиса Холмы Ларсеманн, возможно это связано с более благоприятными для бактерий гидротермическими условиями в оазисе Холмы Тала, по сравнению с оазисом Ларсеманн. Доля ФФП составляла от 8 до 17% от общего числа клеток

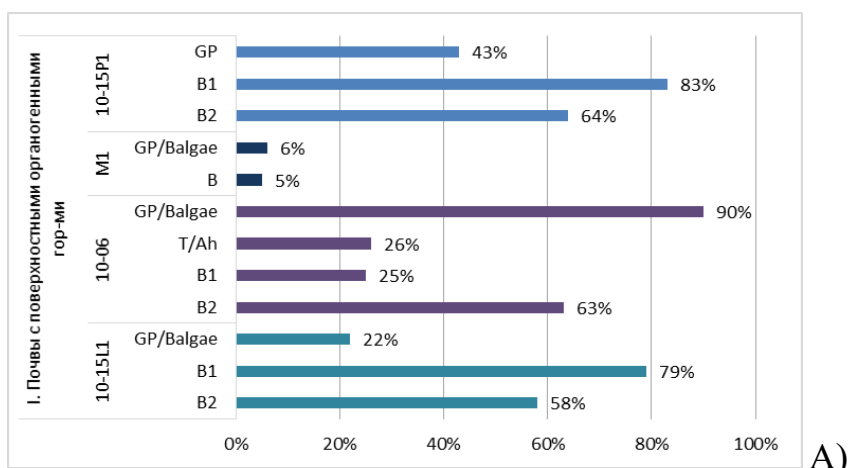
бактерий (табл.7, рис.8), что также больше, чем в ранее исследованных образцах зональных почв. Наблюдалось увеличение доли ФФП вниз по профилю, во всех исследованных почвах из оазиса Холмы Тала.

Доля ФФП в образцах субантарктических почв (о. Галиндез) колебалась от 0,6 до 13,5 % от общего числа клеток (табл.8), что ниже, чем в антарктических почвах. Максимальная общая численность бактерий и доля ФФП отмечались для почв, относящихся к петроземам.

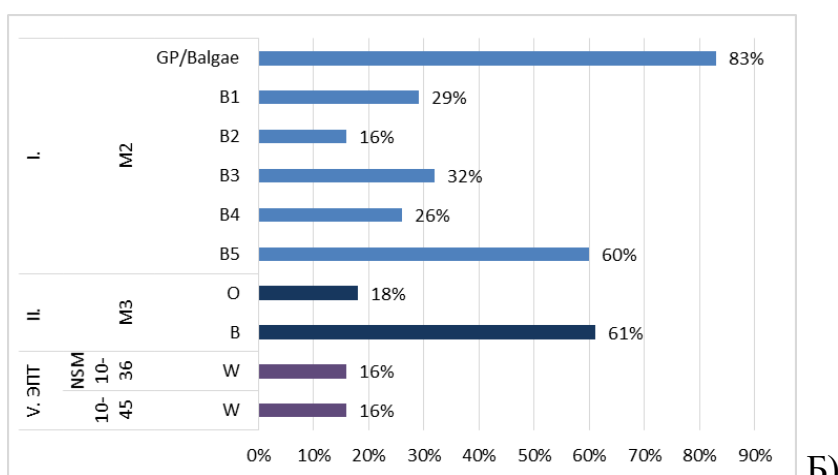
В целом, большая доля ФФП была в образцах почв, отобранных на территории оазиса Ларсеманн, меньше - в образцах, отобранных на территориях Холмов Тала и островов Субантарктиды. Не исключено, что это связано с более благоприятными для бактерий гидротермическими условиями в оазисе Холмы Тала, по сравнению с оазисом Ларсеманн.

Окраска клеток ФФП **L7012** выявила их высокую жизнеспособность, доля потенциально жизнеспособных клеток среди ФФП (наноформ бактерий) составляла от 95 до 98 %. Следует отметить, что эти результаты согласуются с ранее полученными данными о высокой потенциальной жизнеспособности клеток наноформ бактерий в зональных почвах России (Лысак и др., 2010).

Полученные данные о высокой потенциальной жизнеспособности мелких клеток прокариот (ФФП), позволяют предположить, что именно они могут быть в исследованных почвах тем пулом клеток бактерий, который позволяет им сохраняться в неблагоприятных условиях внешней среды (низкие температуры, постоянное замораживание-оттаивание, недостаток органических субстратов и т.п.). Этот факт также свидетельствует о высоком уровне адаптивных возможностей бактерий к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, складывающихся в условиях Антарктиды.



А)



Б)

Рис.7. Доля (%) фильтрующихся форм прокариот (ФФП) в оазисе Холмы Ларсеманн. А) Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами) Б) Профили почв групп I, II (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), V ЭПТ.

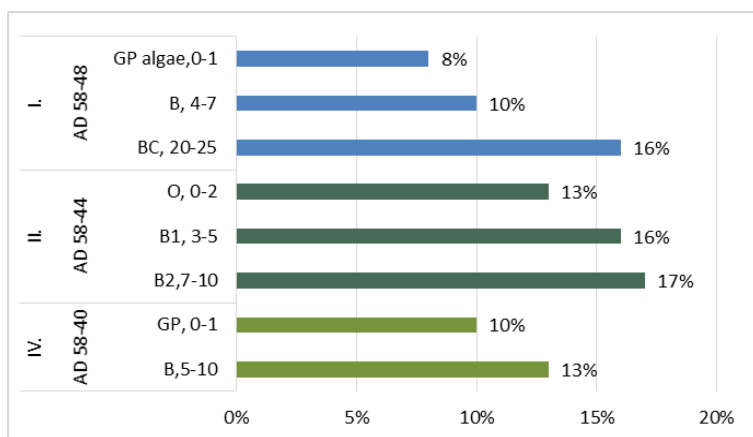


Рис.8. Доля (%) ФФП в оазисе Холмы Тала. Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами), II Почвы с поверхностными органогенными горизонтами, IV Почвы без макроскопических органогенных горизонтов.

3.2.2. Морфология ФФП, изученная при помощи просвечивающей электронной микроскопии

Морфология клеток ФФП, полученных методом фильтрации из образцов почв Восточной Антарктиды, была изучена в просвечивающем электронном микроскопе. Клетки ФФП имели разнообразную форму, причем диаметр их не превышал 200 нм, что позволяет отнести исследуемые объекты к наноформам бактерий (Дуда и др., 2012). Для исследования были отобраны три образца почв (10-15L1 (B1), 10-06 (GP), 10-15P1 (B1)), где численность и доля ФФП была максимальна.

Выявлено значительное морфологическое разнообразие клеток: помимо кокковидных и овальных клеток, наблюдались палочки разного диаметра и длины (рис.9,10). Некоторые клетки имели форму перекрученных спиралей, напоминающие по форме клетки микоплазм. Кокковидные клетки часто присутствуют в виде конгломератов, в то время как овальные и палочковидные клетки на препаратах, как правило, наблюдались в виде одиночных клеток. Клетки, присутствующие в виде конгломератов, часто имели почки (рис.9,10), что позволяет предположить их активное жизнеспособное состояние.

На рисунках хорошо видны утолщенные внешние покровы клеток, которые сходны с капсулярными слоями, характерными для бактерий, наблюдаемыми *in situ* в почве и подпочвенных слоях (Соина и др., 2012).

Почкование и деление клеток, наблюдаемые на препаратах, позволяют сделать вывод о жизнеспособности и активности наблюдаемых нами мелких форм бактерий в исследованных почвах.

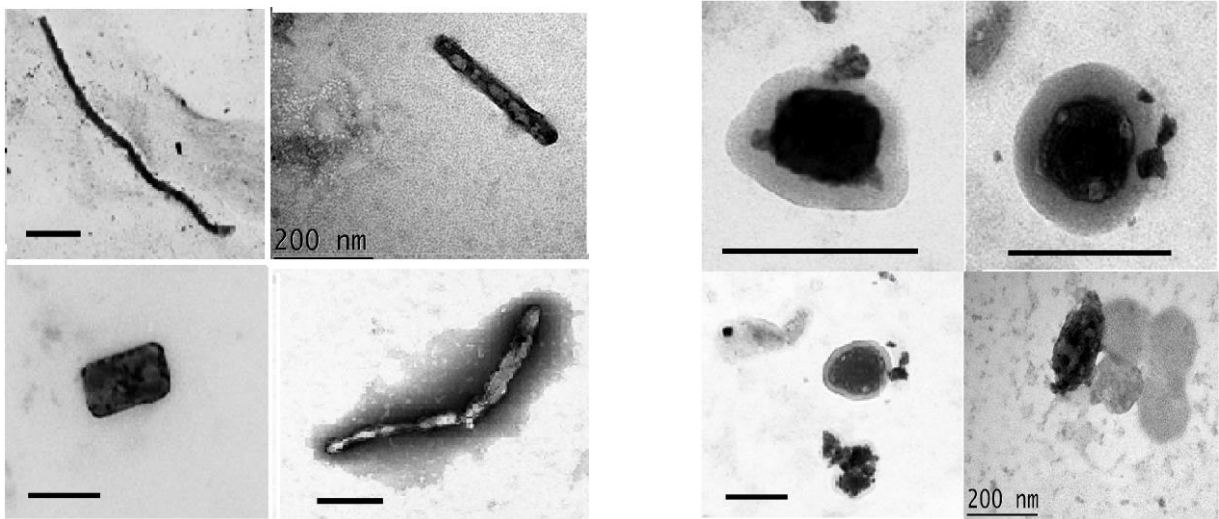


Рис.9. ФФП в просвечивающем электронном микроскопе. Размер масштабной метки 200 нм

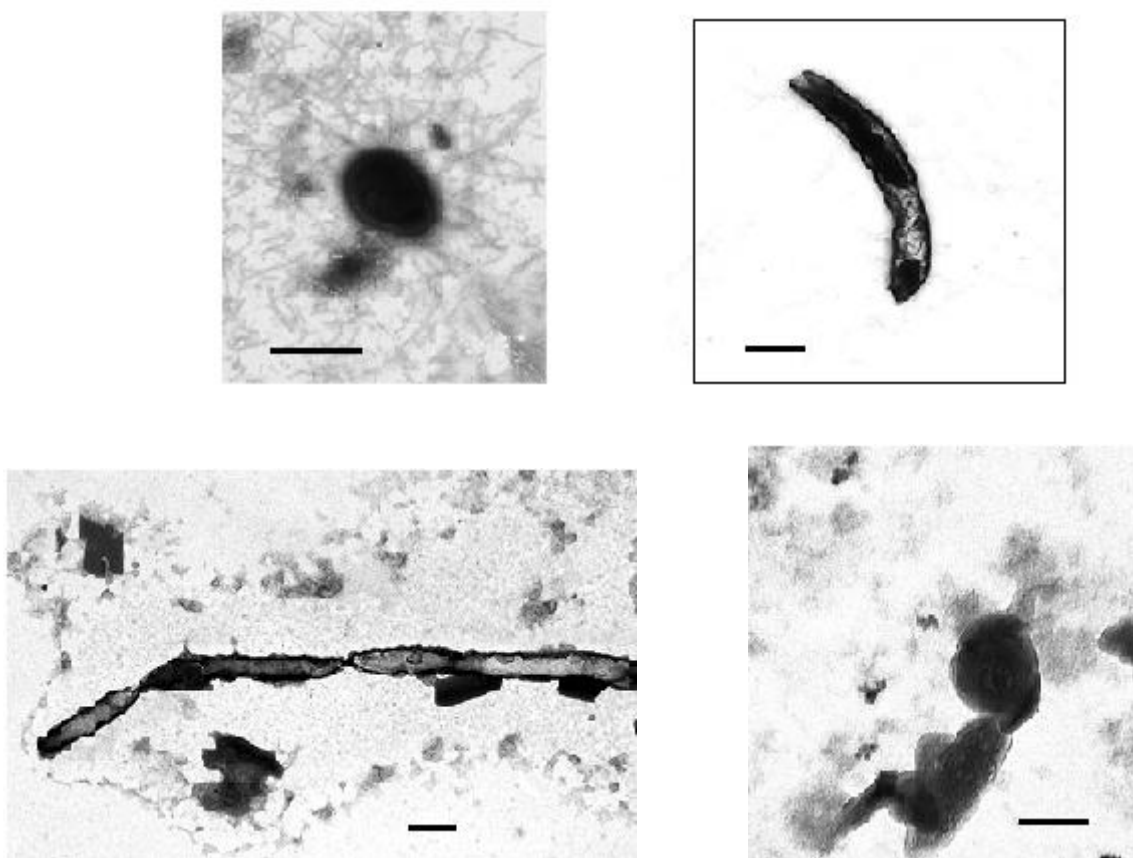


Рис.10. ФФП в просвечивающем электронном микроскопе. Размер масштабной метки 200 нм

3.3. Изменения прокариотного комплекса по ходу сукцессии при фиксированной влажности и двух разных температурах (+5°C и +20°C)

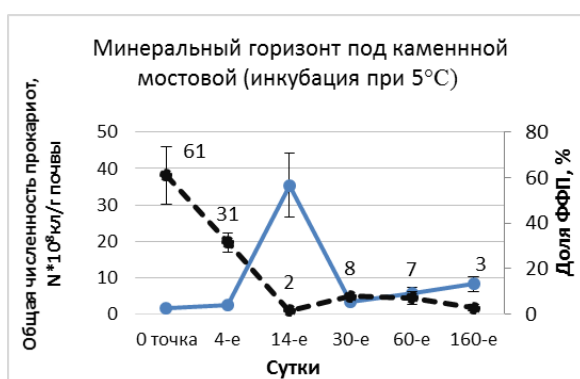
Изучены изменения показателей общей численности прокариот, доли ФФП по ходу сукцессии инициированной увлажнением в двух образцах почвы, отличающихся содержанием органического углерода и наличием разрастаний водорослей в горизонте. Первый образец (I) - горизонт В1 с низким содержанием С орг. (0.14%) из профиля почвы с гиполитными горизонтами (разрез 10-15 P1), второй (II) – горизонт V с более высоким содержанием С орг. (0, 41%) за счет присутствия пленок водорослей (разрез NSM 10-04). Образцы инкубировали при двух температурах (+5°C и +20°C) и постоянной влажности (20%).

3.3.1. Изменения общей численности бактерий и численности ФФП по ходу сукцессии

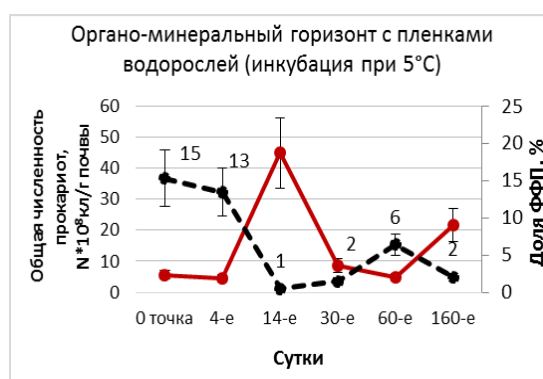
Максимальные показатели общей численности прокариот для обоих образцов были отмечены на 14 сутки и достигали значений 2,74 млрд. кл./г почвы для минерального горизонта (рис.11А) и 5,62 млрд. кл./г почвы для образца с пленками водорослей (рис.11Б) соответственно. Минимальные показатели общей численности прокариот наблюдались в начальной (нулевой) точке сукцессии. К 30-м суткам и до конца опыта (60-е и 160-е сутки) показатели общей численности постепенно снижались и достигала значений, отмеченных в начальной точке сукцессии (рис.11). Для образца с пленками водорослей, на 160-е сутки наблюдалось небольшое увеличение общей численности (рис.11Б). Следует отметить, что для образца с более низким содержанием С орг. и более низкой начальной численностью прокариот наблюдался больший отклик на увлажнение и культивирование при положительных температурах, общая численность для данного образца на 14 сутки увеличилась почти в 20 раз, тогда как для образца с пленками водорослей в 10 раз.

Максимальная доля ФФП отмечалась в начальной точке сукцессии и постепенно уменьшалась по ходу сукцессии, минимальные значения были отмечены на 14 сутки, на этой стадии сукцессии общая численность клеток обычного размера достигала максимума.

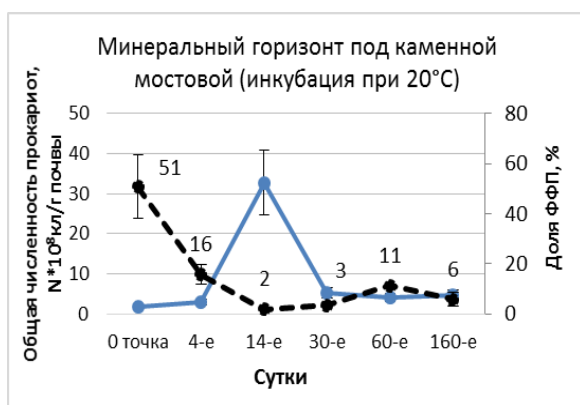
Таким образом, можно предположить, что клетки ФФП представляют собой фракцию покоящихся клеток прокариот, которые при наступлении благоприятных условий переходят в активное состояние.



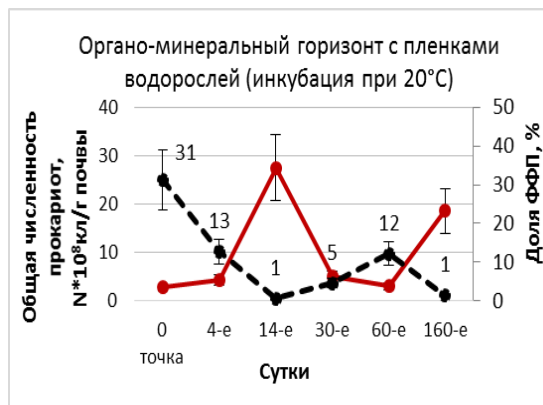
А.1



Б.1



А.2



Б.2

—●— Общая численность прокариот -●- Доля ФФП —●— Общая численность бактерий

Рис.11. Динамика общей численности прокариот и доли ФФП по ходу сукцессии

А) образец (I) - горизонт В1 с низким содержанием С орг. (0.14%);

Б) образец (II) – горизонт V с более высоким содержанием С орг. (0, 41%).

Вариант 1 – температура инкубации + 5°C; Вариант 2 – температура инкубации + 20°C

3.3.2. Изменения численности и структуры сапротрофного бактериального комплекса по ходу сукцессии

Максимальная численность сапротрофных бактерий в образце минерального горизонта (I) на 7 и 14 сутки при обоих режимах инкубации и составила 54,8 и 16,4 млн. КОЕ/г почвы, соответственно. Следует отметить, что для этого образца температура инкубации почвы не влияла на численность сапротрофных бактерий. На всех стадиях сукцессии доминировал род *Arthrobacter* (табл.9).

Для образца почвы из органо-минерального горизонта с пленками водорослей отмечалось низкая численность сапротрофных бактерий в начальной стадии сукцессии и некоторое увеличение этого показателя по ходу сукцессии. Более существенное увеличение численности сапротрофных бактерий отмечено при инкубации почвы при +20°C. На начальных этапах сукцессии в образце доминировали грамотрицательные бактерии, на поздних стадиях доминировали представители рода *Arthrobacter*. Большинство выросших на среде ГПД колоний грамотрицательных бактерий, были бинарными (табл.10).

Длительная инкубация почвы при постоянных уровнях влажности и температуры позволила выделить разнообразные представителей разных родов грамотрицательных бактерий, которые были идентифицированы до вида с помощью метода секвенирования последовательностей гена 16S рРНК и отнесены к филуму протеобактерий (табл.11).

Таким образом, иницирование микробной сукцессии увлажнением в образцах антарктических почв позволило определить, как изменение показателей общей численности прокариот, так и охарактеризовать изменения состава сапротрофного бактериального комплекса. Выявлена стадия сукцессии, когда численность бактерий достигает максимума (14 сутки) и выделить чистые культуры значительное число видов грамотрицательных бактерий, в основном протеобактерий. Следует отметить, что из образцов почв, проанализированных

сразу после размораживания методом посева, выделялись в основном грамположительные бактерии.

В целом, характер сукцессии близок к изменениям (динамике) прокариотного сообщества при инициации сукцессии в почвах умеренной зоны (Polyanskaya, Zvyagintsev, 1995).

Структура сапротрофного бактериального комплекса в образце (I)

Стадия сукцессии	Температура инкубации	Доминанты	Группа среднего обилия	Минорные компоненты
0 сутки	5°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Caulobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>
	20°C	<i>Caulobacter</i> <i>Arthrobacter.</i>	<i>Beijerinckia.</i> <i>Rhodococcus</i>	<i>Cellulomonas</i> <i>Cytophaga</i> <i>Micrococcus</i>
14 сутки	5°C	<i>Arthrobacter</i>	<i>Cytophaga</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Bacillus</i> <i>Caulobacter</i> <i>Streptomyces</i>
	20°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Micrococcus</i> <i>Мухосoccus</i> <i>Polyangium</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Мухосoccus</i> <i>Streptomycetes</i>
60 сутки	5°C	<i>Arthrobacter</i>	<i>Cytophaga</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Bacillus</i> <i>Sphingomonas</i>
	20°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Bacillus</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Мухосoccus sp.</i> <i>Polyangium sp.</i>	<i>Cellulomonas</i> <i>Cytophaga</i> <i>Ralstonia</i> <i>Rhodococcus</i>

Структура сапротрофного бактериального комплекса в образце (II)

Стадия сукцессии	Температура инкубации	Доминанты	Группа среднего обилия	Минорные компоненты
0-сутки	5°C	<i>Cytophaga</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Bosea</i> <i>Мухосoccus</i>	-	-
	20°C	<i>Cytophaga</i> <i>Bacillus</i> <i>Мухосoccus</i>	-	-
14 сутки	5°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Ralstonia</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Polyangium</i>	<i>Caulobacter</i> <i>Мухосoccus</i> <i>Spirillum</i> <i>Proteobacteria</i>
	20°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Cytophaga</i>	<i>Variovorax</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Mucilaginibacter</i> <i>Мухосoccus</i>	<i>Delftia</i>
60 сутки	5°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Polyangium</i>	<i>Cytophaga</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Beijerinckia</i>
	20°C	<i>Arthrobacter</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Мухосoccus</i>	<i>Arthrobacter</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Cytophaga</i> <i>Ralstonia</i>	<i>Polyangium</i>

«-» - не обнаружено

Таблица 11.

Штаммы культивируемых грамотрицательных бактерий, идентифицированные с использованием метода секвенирования последовательностей гена 16S рРНК

Alphaproteobacteria	Betaproteobacteria	Gammaproteobacteria
<i>Sphingopyxis bauzanensis</i>	<i>Ralstonia sp.</i> (3 штамма)	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
<i>Bosea thiooxidans</i> (3 штамма)	<i>Ralstonia picketti</i> (2 штамма)	<i>Pseudomonas sp.</i> (2 штамма)
<i>Sphingomonas sp.</i> (8 штаммов)	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>
<i>Bosea sp.</i>	<i>Variovorax sp.</i> (2 штамма)	<i>Acinetobacter sp.</i>
<i>Brevundimonas sp.</i>		

3.4. Исследования разнообразия прокариот на уровне филумов при помощи метода FISH

Метод *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными пробками (FISH) совмещает возможности идентификации, визуализации, а также определения численности метаболически активных клеток отдельных филогенетических групп архей и бактерий (Манучарова, 2008; Amann, Ludwig, 2000).

Изучение разнообразия прокариот среди бактерий обычного размера и ФФП на уровне филумов было проведено в двух профилях антарктических почв с гиполитными органогенными горизонтами (10-15L1) и (10-06), а также в образце эндолитного почвоподобного тела (ЭПТ) (10-45). Бактериальное сообщество ЭПТ соответствовало началу первичного почвообразовательного процесса, а образцы из почв с гиполитными органогенными горизонтами соответствовали более развитой стадии процесса почвообразования.

В результате проведенного филогенетического анализа во всех исследованных образцах были выявлены представители доменов *Bacteria* и *Archaea*. Численность метаболически активных клеток прокариот в ЭПТ(10-45) составило 42.1 млн. кл. /г и 3.0 млн. кл. /г почвы для клеток обычного размера и ФФП соответственно (рис.12).

В разрезе 10-15L1 численность метаболически активных клеток прокариот значительно варьировала по профилю: 10.35 млн. кл. /г в горизонте GP), 182.8 млн. кл. /г в горизонте B1 и 10.6 млн. кл. /г и в горизонте B2 (рис.12А). В разрезе 10-06, численность метаболически активных клеток также значительно варьировала по профилю (рис.12А).

Численность метаболически активных клеток ФФП также была подвержена значительным колебаниям. В профиле разреза 10-15L1 этот показатель составлял от 1.0 до 2.3 млн. кл. /г почвы, а в разрезе 10-06 от 1.1 до 4.5 млн. кл. /г почвы (рис.12Б).

Следует отметить, что по сравнению с показателями численности бактерий, полученными с помощью метода окраски почвенной суспензии

акридином оранжевым, численность метаболически активных клеток (метод FISH) ниже на порядок и даже более, особенно в случае фракции ФФП, что позволяет предположить, что значительная часть клеток в почве находится в жизнеспособном некультивируемом состоянии.

Во всех образцах почвы, проанализированных методом FISH, доминировали представители домена *Bacteria* (74,4% и более), ниже было содержание представителей домена *Archaea* (не более 22%). Максимальная доля архей (22%), зафиксирована в горизонте с примесью торфяного материала (разрез 10-06) (рис.16), что может быть связано с присутствием в этом горизонте значительного количества метаногенов (филум *Euryarchaeota*), что отмечалось ранее рядом авторов (Dedysh et al., 2007; Pankratov et al., 2011; Лысак и др., 2014). Для клеток ФФП максимальная доля архей (26%), зафиксирована в горизонте В1 разреза 10-06 (рис.17), который находится непосредственно под горизонтом с примесью торфяного материала. Более низкая доля домена *Archaea* обнаружена в верхних (поверхностных) горизонтах (рис.13-17).

Среди домена *Bacteria*, при помощи специфичных зондов выявлены представители филумов *Proteobacteria* (альфа-, бета- и гамма- протеобактерии), *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*. В большинстве исследованных образцов содержание протеобактерий составило более половины от числа идентифицированных клеток бактерий, ниже было содержание филумов *Actinobacteria* (8–28%), *Planctomycetes* (8–24%) и *Acidobacteria* (1–8%). Среди филума *Proteobacteria* содержание представителей отдельных классов была различна, доля альфапротеобактерий варьировала от 11 до 28%, бетапротеобактерий – от 7 до 28%, гаммапротеобактерий – от 4 до 38% (рис 13-17).

Содержание отдельных филогенетических групп в исследованных почвах представлено на рисунках 13-17. Обращает на себя внимание, что соотношение отдельных таксонов в разных горизонтах изученных разрезов различалось

незначительно. В разрезе 10-15L1 (рис.14,15) распределение альфа- и бетапротеобактерий по горизонтам имеют сходную динамику, максимальная доля зафиксирована в верхнем горизонте (28%), вниз по профилю относительная доля альфапротеобактерий и бетапротеобактерий снижается до 19%, но повышается доля гаммапротеобактерий (от 12 до 38%). Максимальная доля актинобактерий и планктомицетов (28 и 24%, соответственно) зафиксирована в горизонте В1. (рис.14,15).

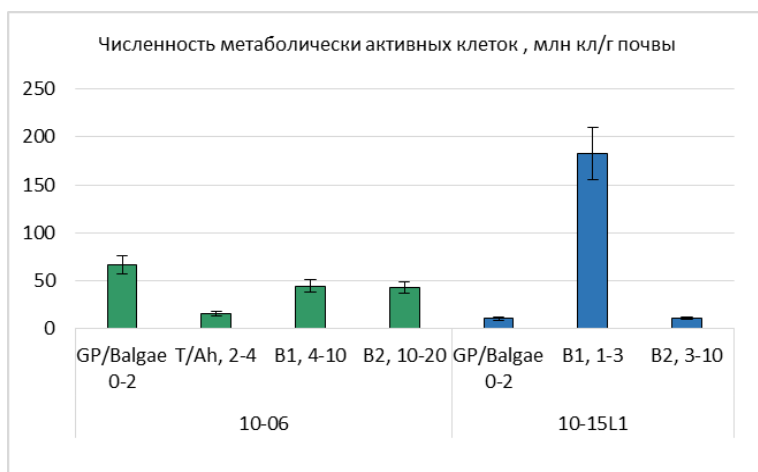
В основных генетических горизонтах почвы с торфянистым горизонтом (разрез 10-06) наблюдались иные закономерности. Вниз по профилю доля протеобактерий снижалась от 58 до 44%. Доля альфапротеобактерий и гаммапротеобактерий снижалась вниз по профилю, тогда как доля бетапротеобактерий и планктомицетов постепенно увеличивалась. Доля актинобактерий увеличивалась вниз по профилю, но максимальное значение было зафиксировано в торфянистом горизонте (22%) (рис.16,17).

Максимальное содержание ацидобактерий, типичных обитателей сфагновых болот (Dedysh, 2011) выявлено в горизонте с примесью торфянистого материала (8%), где кислотности среды ниже, чем в выше- и нижележащих горизонтах (рН 5.2–5.5).

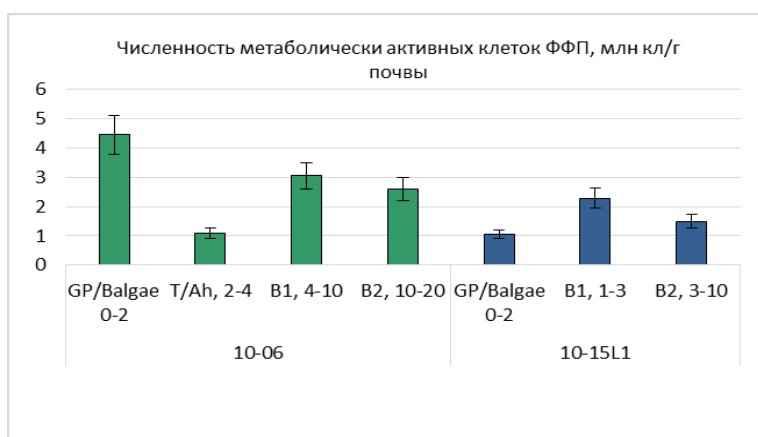
Сопоставление данных о жизнеспособности клеток бактерий (50–72%) с высоким содержанием ФФП в исследованных почвах, позволяет предположить, что значительная часть прокариот представляет собой мелкие жизнеспособные клетки с низкой метаболической активностью, т. е. своеобразные покоящиеся формы.

С помощью метода FISH среди бактерий обычного размера и среди наноформ обнаруживались одни и те же филогенетические группы, причем для обеих фракций клеток соотношение отдельных таксонов и их варибельность по профилям исследованных почв схожи друг с другом, что подтверждает предположение о нанотрансформации бактерий в условиях воздействия неблагоприятных факторов среды.

Сравнение полученных нами данных по изучению филогенетического разнообразия прокариотных комплексов с результатами, полученными другими исследователями (Панкратов и др., 2005; Dedysh, 2011, Манучарова и др., 2011) свидетельствует о том, что в исследованных почвах присутствуют основные филогенетические группы, обычно обнаруживаемые в почвах природных зон умеренного пояса.



а)



б)

Рис.12. Численность метаболически активных клеток прокариот обычного размера (а) и ФФП (б) в млн кл./г почвы (метод FISH)

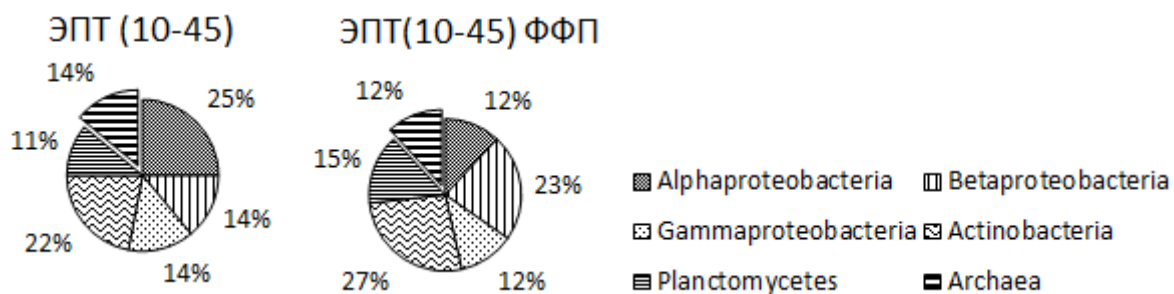


Рис.13. Доля прокариот (%) отдельных филогенетических групп в эндолитном почвоподобном теле (образец 10-45), (метод FISH)

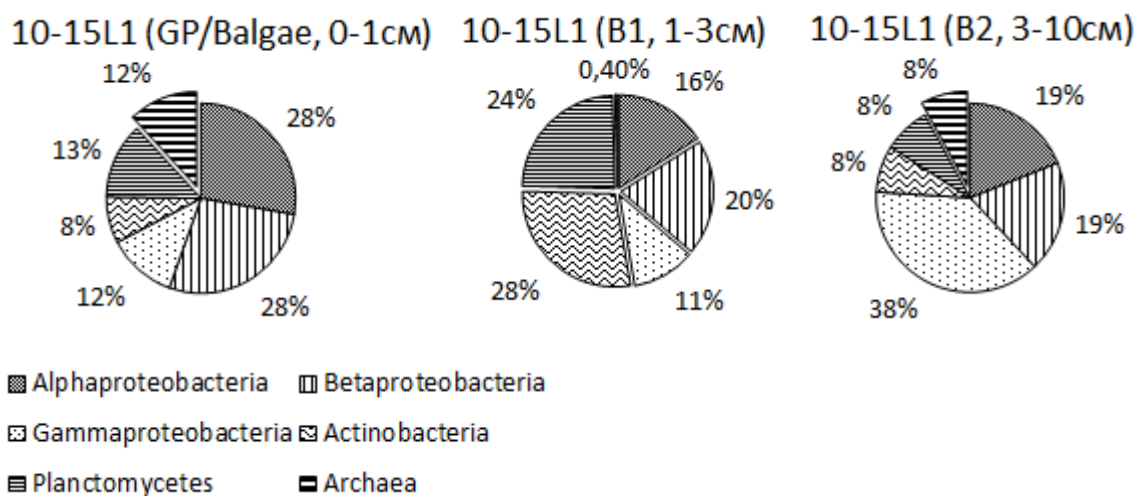


Рис.14. Доля прокариот (%) отдельных филогенетических групп в разрезе 10-15L1, (метод FISH), клетки обычного размера

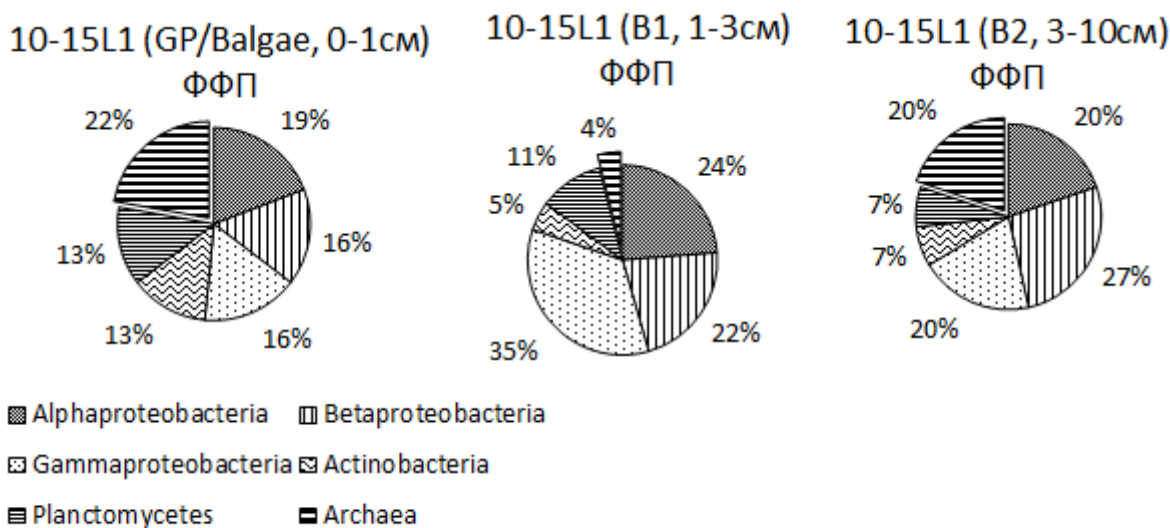


Рис.15. Доля прокариот (%) отдельных филогенетических групп в разрезе 10-15L1, (метод FISH), ФФП

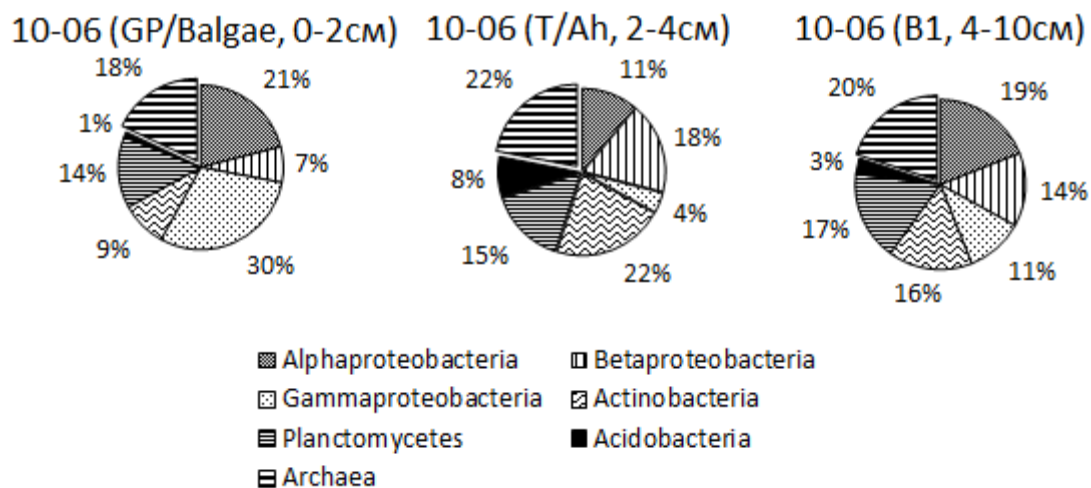


Рис.16. Доля прокариот (%) отдельных филогенетических групп в разрезе 10-06, (метод FISH), клетки обычного размера

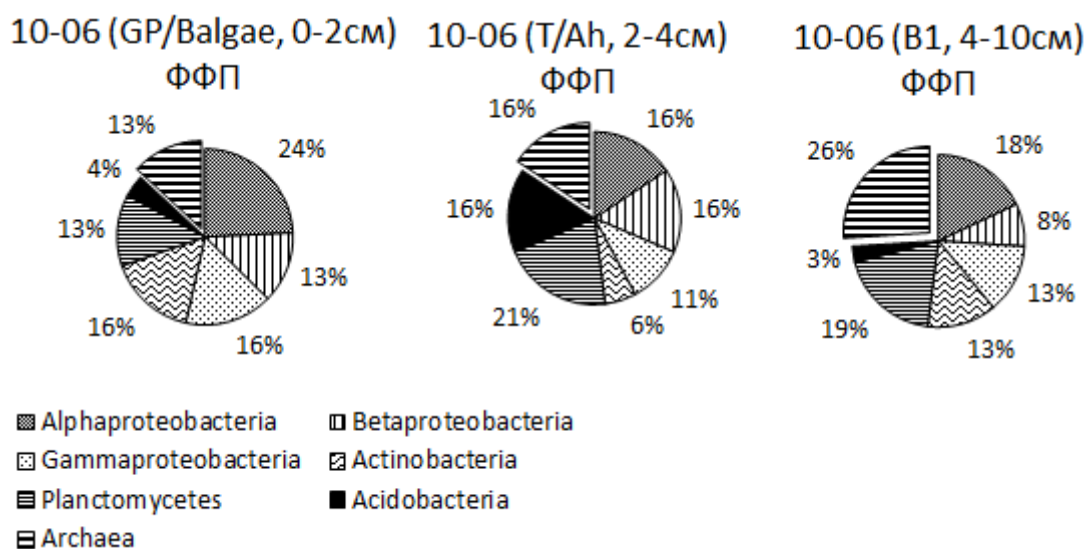


Рис.17. Доля прокариот (%) отдельных филогенетических групп в разрезе 10-06, (метод FISH), ФФП

3.5. Потенциальная биологическая активность антарктических почв

Поскольку до сих пор вопрос об участии микробиоты в процессах трансформации углерода и азота в антарктических почвах остается мало изученным, нами проведена оценка показателей биологической активности микробных сообществ (продуцирование метана, интенсивность азотфиксации и денитрификации, продуцирование CO_2) в образцах оазиса Холмы Ларсеманн.

Потенциальное продуцирование метана (CH_4) (метаногенез) не превышала 7,2 нг/г в сут. (рис.18), что значительно ниже, чем подобные показатели для почв умеренной зоны. Максимальные показатели зафиксированы в торфяном горизонте почвы с гиполитным органогенным горизонтом (разрез 10-06), где ранее с помощью метода FISH, было обнаружено значительное содержание домена *Archaea* – 22% (рис.16,17).

Интенсивность азотфиксации в изученных образцах низка (от 0.08 до 55.85 нг C_2H_4 /г в сут.) (рис.19). Максимальной величины азотфиксация достигала в горизонте B_1 (разрез 10-15L1) с высоким содержанием бактериальной биомассы – 4.4 ± 0.21 мкг С/г почвы (табл.6). Максимальной величины азотфиксирующая активность достигала в тех горизонтах, где была зафиксирована высокая доля жизнеспособных клеток - около 70%, а также в горизонтах, находящихся непосредственно под каменной мостовой.

Интенсивность денитрификации (эмиссия N_2O) варьировала от 0.09 до 19.28 мкг $\text{N-N}_2\text{O}$ /г в сут. (рис.20). Ее максимальное значение зарегистрировано в оторфованном горизонте (Т/Аh) разреза 10-06. Несколько меньшие, но также высокие показатели денитрификации (12.94 и 13.87 мкг $\text{N-N}_2\text{O}$ /г в сут.) отмечены для поверхностных гиполитных альго-бактериальных горизонтов «каменных мостовых» (рис.20).

Продуцирование углекислого газа в разных почвах варьировало от 0.47 до 2.34 мкг С- CO_2 /г в сут. (рис.21). Интенсивность процесса снижалась вниз по профилю. Максимальные показатели зафиксированы в верхних горизонтах «каменных мостовых» с гиполитными альго-бактериальными сообществами,

минимальные – в нижних минеральных горизонтах почв этой группы. Исключение составили разрезы 10-15P1 и M3. В первом из них продуцирование углекислого газа максимально в подповерхностном горизонте, во втором – примерно одинаково по всему профилю. В разрезах 10-15L1, 10-06 и M3 наибольшему содержанию микробной биомассы соответствует более высокий уровень продуцирования углекислого газа.

Таким образом, показатели биологической активности, определенные газохроматографическими методами, были значительно ниже, чем обычно регистрируется в почвах умеренной зоны (Степанов, 2011). Максимальные значения интенсивности процессов эмиссии CO_2 , N_2O были зафиксированы в верхних горизонтах, где обнаруживалось обильное разрастание водорослевых корочек, а также в горизонтах, более насыщенных влагой и обогащенных органическими веществами, где ранее была отмечена высокая численность и доля жизнеспособных клеток эу- и прокариот.

Полученные результаты позволяют предположить, что микробные сообщества примитивных почв Антарктиды могут в теплые периоды года вносить определенный вклад в формирование «пула» парниковых газов атмосферы, который может усилиться в связи с наметившимся в последнее время «потеплением климата» и таянием льдов на побережье Антарктиды.

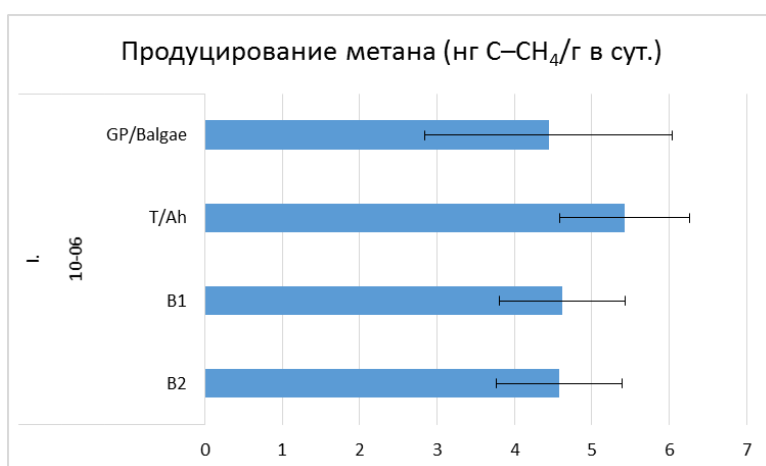


Рис.18. Продуцирование метана (нмоль C-CH₄/ г в сут.) в разрезе 10-06 (почва с гиполитным органогенным горизонтом (I группа))

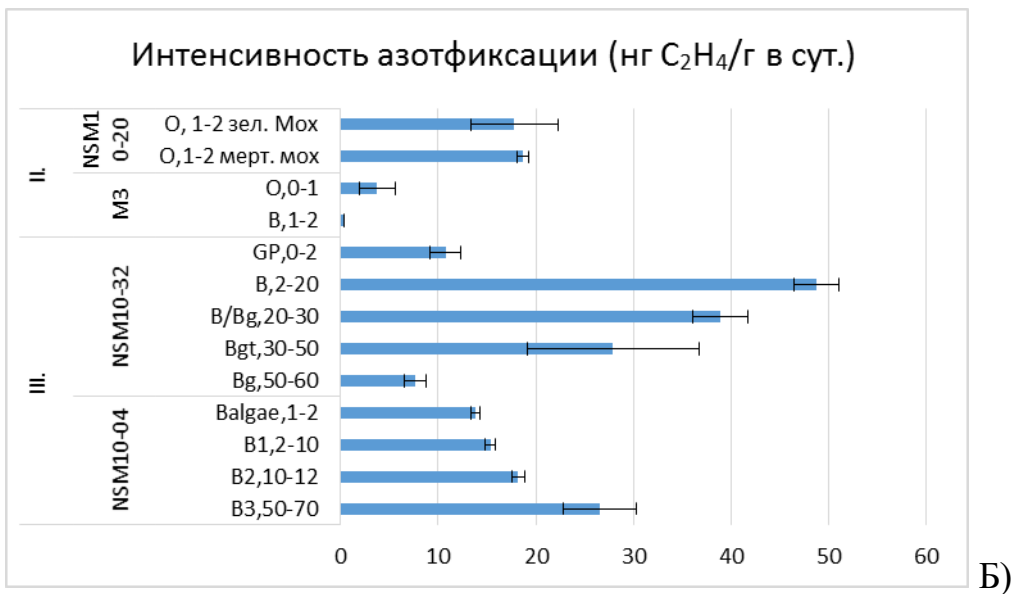
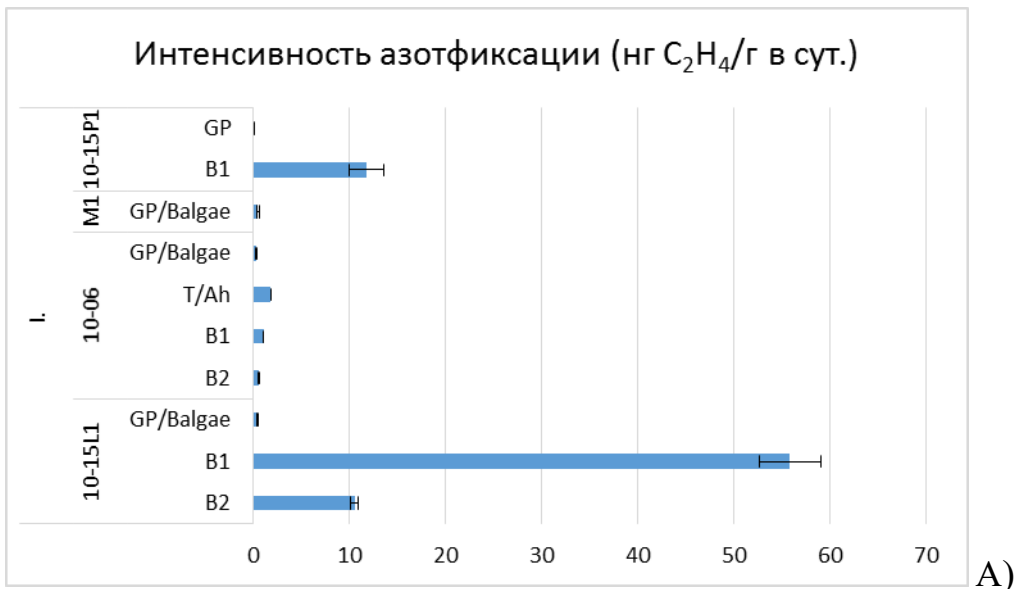


Рис.19. Интенсивность азотфиксации (нг C_2H_4 /г в сут.) А) Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами); Б) Профили почв II группы (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), III группы (почвы с поверхностными органогенными горизонтами) представленные альго-бактериальными матами

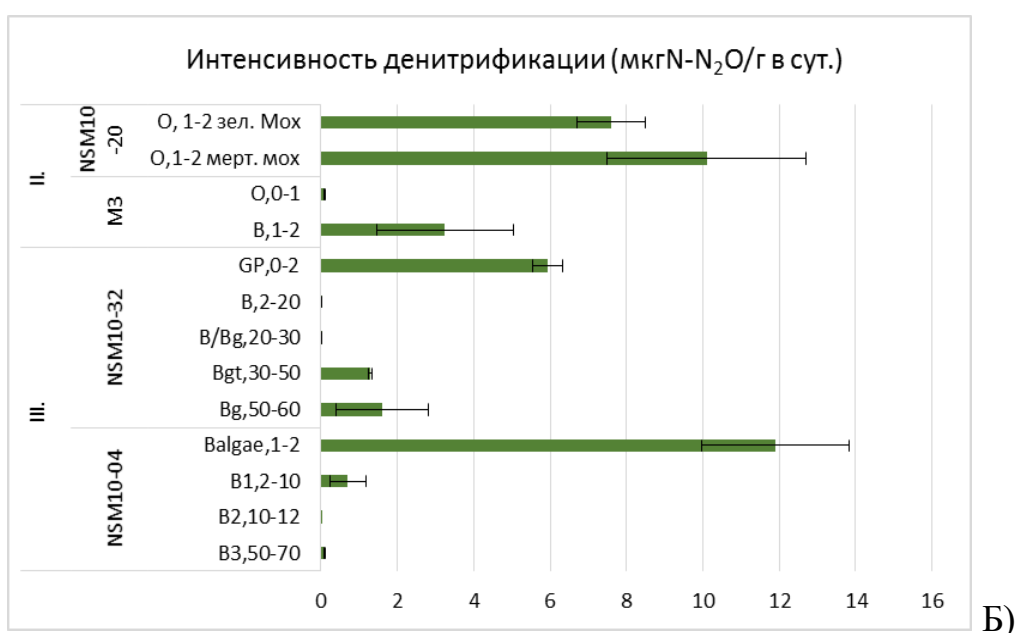
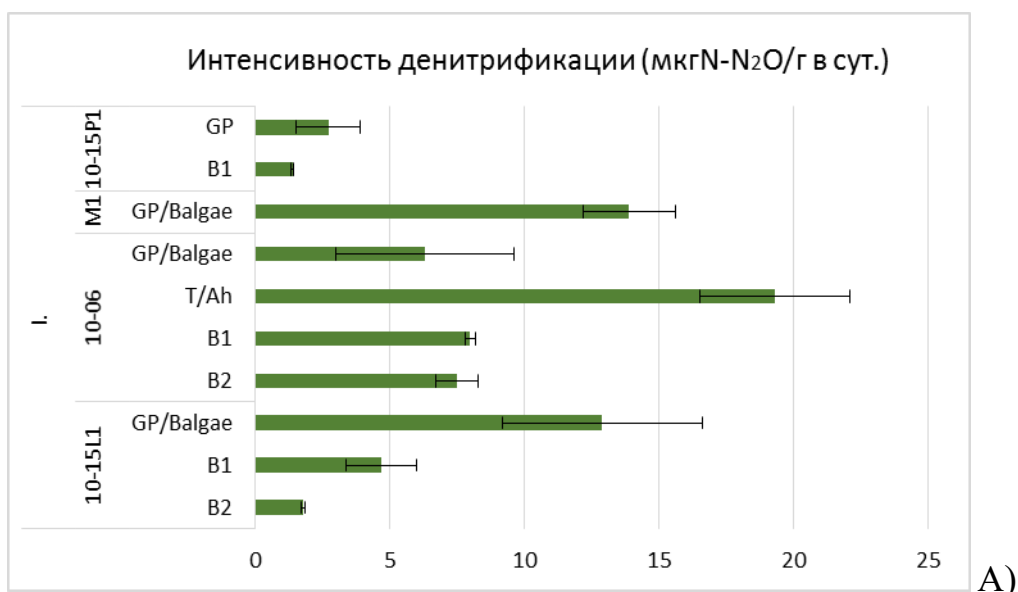


Рис.20. Интенсивность денитрификации (мкг N-N₂O/г в сут.). А) Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами); Б) Профили почв II группы (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), III группы (почвы с поверхностными органогенными горизонтами представленные альго-бактериальными матами)

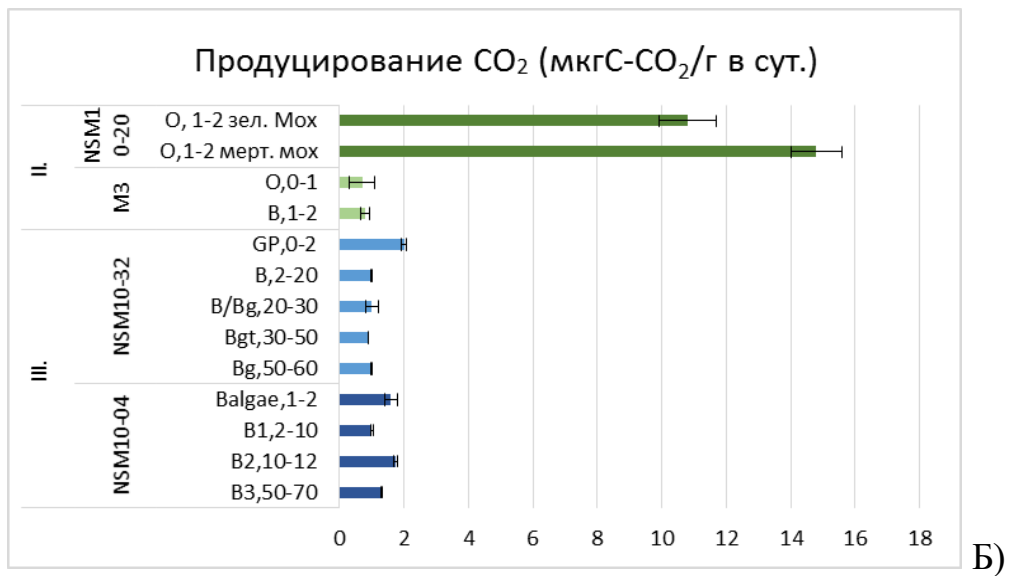
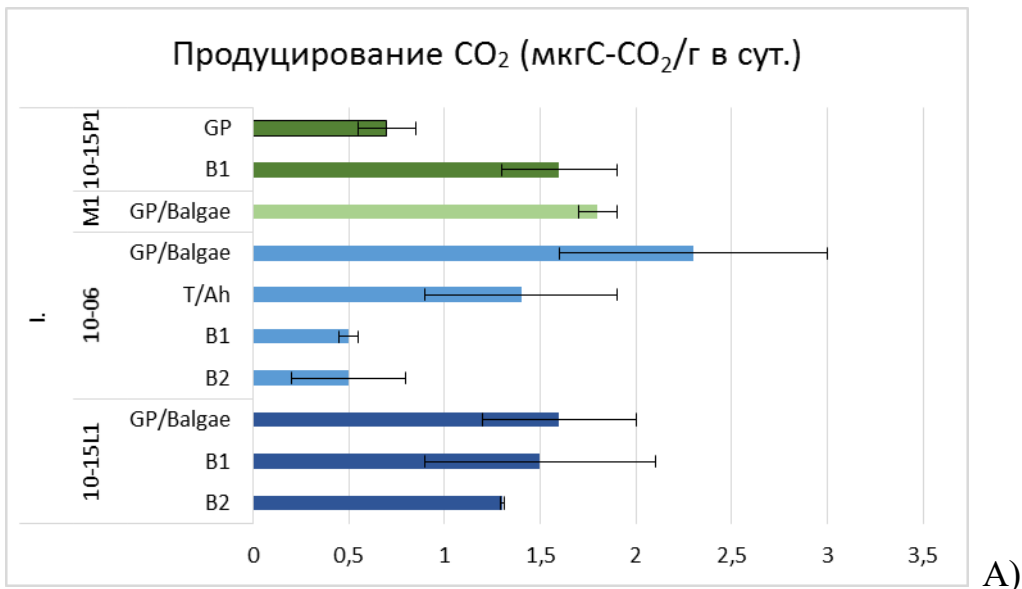


Рис.21. Продуцирование CO₂ (мкг С-CO₂/г в сут.). А) Профили почв I группы (почвы с гиполитными органогенными горизонтами); Б) Профили почв II группы (почвы с поверхностными органогенными горизонтами), III группы (почвы с поверхностными органогенными горизонтами представленные альго-бактериальными матами)

Заключение

Проведенное комплексное исследование почв Восточной Антарктики с гиполитными и поверхностными органогенными горизонтами, а также эндолитных почвоподобных тел позволило выявить некоторые особенности прокариотных комплексов, формирующихся в этих почвах. Исследованные почвы характеризовались невысокими показателями общей численности бактерий, как правило, не выше сотен млн. клеток в 1 г почвы. Выявленное высокое содержание жизнеспособных клеток (60% и выше), свидетельствует о высокой устойчивости бактерий к воздействию низких температур, а также смене режиму размораживания-оттаивания и высыхания почвы.

В почвах со сформировавшимся профилем было четко выражено уменьшение численности бактерий вниз по профилю. Выше численность бактерий была в органогенных горизонтах – каменная мостовая, обильно покрытая обрастаниями водорослей и мхов, а также в горизонте, формирующемся непосредственно под каменной мостовой, которая создает для бактерий своеобразный «тепличный эффект».

Особенностью прокариотных комплексов исследованных почв было присутствие значительных количеств фильтрующихся форм прокариот во всех исследованных образцах почв и почвоподобных тел. Численность их достигала сотен млн. клеток в 1 г почвы, а содержание в разных горизонтах исследованных почв колебалось от 15 до 90% от общей численности бактерий и было выше в образцах, отобранных из каменных мостовых и горизонтов В1, то есть местообитаний наиболее сильно подверженных воздействию низких температур, а также смене режиму размораживания-оттаивания. Эти результаты согласуются с данными о высокие доли клеток бактерий мелкого размера в вечномерзлых почвах, полученных методом дифференциального центрифугирования (Соина и др., 2012).

Полученные данные о значительной численности и содержании фильтрующихся форм бактерий в исследованных почвах, высокой

потенциальной жизнеспособности, морфологическом и филогенетическим разнообразии, позволяют предположить, что именно они могут быть в исследованных почвах тем пулом клеток, который позволяет бактериям сохраняться в неблагоприятных условиях внешней среды: низкие температуры, постоянное замораживание-оттаивание, недостаток органических субстратов, высыхание почвы и т.п. Этот факт свидетельствует также о высоком уровне адаптивных возможностей бактерий к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, складывающихся в условиях Антарктиды.

Выводы:

1. Впервые показано, что численность бактерий в исследованных почвах Восточной Антарктики была значительно (на 1 - 2 порядка) ниже, чем в почвах умеренного пояса и не превышала 10^8 клеток в 1 г. Показатели численности значительно варьируют по профилю: максимальные показатели зарегистрированы в верхних органогенных горизонтах, минимальные – в нижних минеральных горизонтах почв.

2. Впервые показано, что значительная часть бактерий в исследованных почвах Антарктики фильтрующимися формами прокариот, численность которых достигает 300 млн. клеток в 1 г почвы, а содержание достигает 50%. При помощи ПЭМ выявлено значительное морфологическое разнообразие ФФП.

3. Изучение таксономического разнообразия прокариотных комплексов исследованных почв на уровне филумов выявило преобладание домена *Bacteria* над доменом *Archaea*. Среди домена *Bacteria* доминирует филум *Proteobacteria*, ниже доля филумов *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*. ФФП были представлены теми же филумами.

4. По ходу сукцессии, инициированной увлажнением, минимальные показатели общей численности прокариот зарегистрированы в начальной (нулевой) точке, а максимальные показатели – на 14 сутки, далее (до 60 суток) происходило их плавное снижение. Максимальное содержание ФФП отмечено в начальной точке сукцессии, далее происходило снижение этого показателя, что сопровождалось увеличением содержания клеток более крупного размера.

5. Показатели потенциальной активности азотфиксации, денитрификации и продуцирования углекислого газа и метаногенеза в исследованных примитивных почвах Антарктики были ниже, чем в почвах умеренного пояса. Максимальных значений эти показатели достигали в верхних горизонтах с высокой численностью бактерий и обильным разрастанием водорослевых корочек.

Список литературы

1. Абакумов Е.В. Почвы Западной Антарктики. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. 112 с.
2. Абызов С.С., Липенков В.Я., Бобин Н.Е., Кудряшов Б.Б. Микрофлора ледника Центральной Антарктиды и методы контроля стерильного отбора ледяного керна для микробиологических анализов // Изд. АН СССР. Серия биологическая. 1982. №4. С. 537-548.
3. Абызов С.С. Мицкевич И.Н. О количестве клеток микроорганизмов в глубоких горизонтах ледника Центральной Антарктиды. // Микробиология. 1993. Т.62. № 1. С. 181-188.
4. Беккер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1981. Т. 247. 240 с.
5. Белова С.Э., Федотова А.В., Дедыш С.Н. Ультрамикрoформы прокариот в сфагновом болоте водосбора Верхней Волги. // Микробиология. 2012. № 5. С. 665-671.
6. Вайнштейн М.Б., Кудряшова Е.Б. О нанобактериях. // Микробиология. 2000. Т. 69. №2. С. 163-179.
7. Ванькова А.А., Иванов П.И., Емцев В.Т. Фильтрующиеся формы почвенных бактерий // Почвоведение. 2013. №. 3. С. 335-342.
8. Власов Д.Ю., Горбунов Г.А., Крыленков В.А., и др. Микромицеты из районов расположения антарктических полярных станций (Западная Антарктида) // Микология и фитопатология. 2006. Т.40. № 3. С. 202-211.
9. Глазовская М.А. Биогеохимическое выветривание вулканических пород андезитового состава в субантарктических перигляциальных условиях // Известия РАН. Сер. географическая. 2002. №3. С. 39-48.
10. Глазовская М. А. Выветривание и первичное почвообразование в Антарктиде // Научные Доклады Высшей Школы, Геолого-Географические науки. 1958. Т. 1. С. 63-76.

11. Головлев Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий. // Микробиология. 1998. Т. 67. №6. С. 726-733.
12. Головченко А.В., Добровольская Т.Г., Инишева Л.И. Структура и запасы микробной биомассы в олиготрофных торфяниках южно-таежной тайги Западной Сибири // Почвоведение. 1992. №. 12. С. 1468-1473.
13. Головченко А.В., Тихонова Е.Ю., Звягинцев Д.Г. Численность, биомасса, структура и активность микробных комплексов низинных и верховых торфяников // Микробиология. 2007. Т. 76. №. 5. С. 711-719.
14. Горячкин С.В. Структура, генезис и экология почвенного покрова бореально-арктических областей ЕТР: Автореф. дис. д-ра геогр. наук. М., ИГРАН. 2006.
15. Горячкин С.В., Гиличинский Д.А., Абакумов Е.В., и др. Почвы Антарктиды: разнообразие, география, генезис (по исследованию районов Российских станций) // Разнообразие мерзлотных и сезонно-промерзающих почв и их роль в экосистемах. Мат-лы V межд. конф. по криопедологии Улан-Удэ, Бурятия, Российская Федерация, 14-20 сентября 2009. Москва-Улан-Удэ, 2009. С. 32.
16. Горячкин С.В. Почвенный покров Севера (структура, генезис, экология, эволюция). М.: ГЕОС. 2010. 414 с.
17. Горячкин С.В. Почвенно-ландшафтные исследования в Антарктиде: результаты, проблемы и перспективы. // Материалы I Международной научно-практической конференции «Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций». Минск. Изд-во «Экоперспектива». 2014. С.57-61.
18. Горячкин С.В. и др. Почвы Антарктиды: первые итоги, проблемы и перспективы исследований // Геохимия ландшафтов и география почв (к 100-летию МА Глазовской). М. 2012. С. 361-388.
19. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Издат. центр «Академия». 2003. 464 с.

20. Демкина Е.В., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Arthrobacter globiformis* в автолизирующихся суспензиях // Микробиология. 2000. Т. 69. №. 3. С. 383-388.
21. Дмитриев В.В., Сузина Н.Е., Русакова Т.Г. и др. Ультраструктурные особенности природных форм микроорганизмов, изолированных из грунтов вечной мерзлоты Восточной Сибири методом низкотемпературного фракционирования. // Доклады Академии Наук. 2001. №6. С. 846-849.
22. Дмитриев В.В., Сузина Н.Е., Барина Е.С., и др. Электронно-микроскопическое изучение ультраструктуры микробных клеток *in situ* в экстремальных биотопах. // Микробиология. 2004. Т. 73. №6. С. 832-840.
23. Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Поздняков А.И. Вертикальная организация бактериальных сообществ в торфяных почвах реки Яхромы // Известия РАН. Сер. Биологическая. 2007. №5. С. 629-635.
24. Долгих А.В., Мергелов Н.С., Лупачев А.В., Горячкин С.В. Разнообразие почв и почвоподобных тел в оазисе Холмы Тала (Восточная Антарктида) // Материалы I Международной научно-практической конференции «Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций». Минск. Изд-во «Экоперспектива». 2014. С. 78-82.
25. Дуда В.И., Пронин С.В., Эль-Регистан Г.И. и др. Образование покоящихся рефрактильных клеток у *Bacillus cereus* под влиянием ауторегуляторного фактора // Микробиология. 1982. Т. 51. №. 1. С. 77-81.
26. Дуда В.И., Сузина Н.Е., Акимов В.И., и др. Особенности ультраструктурной организации и цикла развития почвенных ультрамикробактерий, относящихся к классу *Alphaproteobacteria* // Микробиология. 2007. Т. 76. №5. С. 652–661.

27. Дуда В.И., Сузина Н.Е., Поливцева В.Н., Боронин А.М. Ультрамикробактерии: становление концепции и вклад ультрамикробактерий в биологию. // Микробиология. 2012. Т. 81. №4. С. 415-427.
28. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Бабьева И.П., и др. Структурно-функциональная организация микробных сообществ. Глава в монографии «Экология на рубеже XXI века (наземные экосистемы)». М.: Научный мир. 1999. С. 147-180.
29. Звягинцев Д.Г., и др. Роль микроорганизмов в биогеоценологических реакциях почв // Почвоведение. 1992. №6. С. 63–77.
30. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: Изд-во Московского университета. 2005. 445 с.
31. Калакуцкий Л.В., Сидякина Т.М. Анабиоз и консервация микроорганизмов // Криобиология. 1988. №. 4. С. 3-9.
32. Колесов С.Г. Анабиоз патогенных микроорганизмов. М.: Сельхозгиз. – 1959.
33. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии. Л.: Наука. 1972. 288 с.
34. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС Пресс. 2003. 120 с.
35. Лысак Л.В., Лапыгина Е.В., Конова И.А., Звягинцев Д.Г. Численность и таксономический состав наночастиц бактерий в некоторых почвах России // Почвоведение. 2010. № 7. С. 1–6.
36. Лысак Л.В., Лапыгина Е.В., Конова И.А., Кадулин М.С. Численность, жизнеспособность и разнообразие фильтрующихся форм прокариот в сфагновом верховом торфянике // Известия РАН. 2014. №. 3. С. 241-245.
37. Манучарова Н.А. Идентификация метаболически активных клеток прокариот в почвах с применением молекулярно-биологического

флюоресцентно-микроскопического метода анализа fluorescence in situ hybridization (FISH). М.: Издательство МГУ. 2008. 24 с.

38. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Звягинцев Д.Г., Менько Е.В. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т. 80. №. 2. С. 219-229.

39. Марков К.К., Бардин В.И., Лебедев В.Л., и др. География Антарктиды. М.: Мысль. 1968. 440 с.

40. Мергелов Н.С., Горячкин С.В. Почвы и почвоподобные тела Антарктиды (оазис «Холмы Ларсеманна») / Генезис, география, классификация почв и оценка почвенных ресурсов. Мат-лы научн. конф., посвященной 150-летию со дня рождения Н.М.Сибирцева. VIII Сибирцевские чтения. Архангельск. 2010. С. 38-42.

41. Мергелов Н.С., Горячкин С.В., Шоркунов И.Г., Зазовская Э.П., Черкинский А.Е. Эндолитное почвообразование и скальный "загар" на массивно-кристаллических породах в Восточной Антарктике // Почвоведение. 2012. № 10. С. 1-18.

42. Мергелов Н.С. Почвы влажных долин в оазисах Ларсеманн и Вестфолль (Земля принцессы Елизаветы, Восточная Антарктида) // Почвоведение. 2014. № 9. С. 1027-1045.

43. Методы почвенной биохимии и микробиологии. Ред. Звягинцев Д.Г. М.: Изд-во Моск. Ун-та. 1991. 304 с.

44. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., и др. Образование покоящихся форм в автолизирующихся суспензиях микроорганизмов. // Микробиология. 1997. Т. 66. №1. С. 42-49.

45. Никитин Д.И. Применение электронной микроскопии для изучения почвенных суспензий // Почвоведение. 1964. № 6. С. 86-91.

46. Озерская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., и др. Структура комплексов микромицетов в многолетнемерзлых грунтах и криопегах Арктики. //Микробиология. 2008. Т. 77. №. 4. С. 482-489.

47. Панкратов Т.А., Белова С.Э., Дедыш С.Н. Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов в сфагновых болотах с использованием метода FISH // Микробиология. 2005. Т.74. № 6. С. 722-728.
48. Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // Почвоведение. 2003. № 6. С. 706-714.
49. Соина В.С., Воробьева Е.А., Мешкова Н.В. Ультраструктура и выживаемость клеток микроорганизмов после длительной криоконсервации в вечной мерзлоте // Криогенные почвы. 1992. С. 217.
50. Соина В.С., Демкина Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Роль клеточной дифференциации для сохранения жизнеспособных бактерий в условиях вечной мерзлоты // Консервация и трансформация веществ и энергии в криосфере Земли. Пушино. 2001. С.38.
51. Соина В.С., Лысак Л.В., Конова И.А., и др. Электронно-микроскопическое исследование ультрамикробактерий в почвах и подпочвенных отложениях. // Почвоведение. 2012. №11. С. 1188-1199.
52. Степанов А.Л. Микробная трансформация парниковых газов в почвах. М.: ГЕОС. 2011. С. 192.
53. Степанов А.Л., Лысак Л.В. Методы газовой хроматографии в почвенной микробиологии // М.: МАКС Пресс. 2002. 151 с.
54. Сузина Н.Е. и др. Электронно-микроскопическое и флуоресцентно-микроскопическое изучение эктопаразита ультрамикробактерии рода *Kaistia*, штаммов NF1 и NF3 // Микробиология. 2008. Т. 77. №. 1. С. 55-62.
55. Таширев А.Б. Комплексные исследования структуры и функций антарктических наземных микробных ценозов // Украинский антарктический журнал. 2009. №8. С. 328-342.

56. Федотова А.В., Белова И.С., Куличевская И.С., Дедыш С.Н. Молекулярная идентификация фильтрующихся форм бактерий и архей в воде кислотных озер Севера России. // Микробиология. 2012. №3. С. 306-313.
57. Фомичева О.А. и др. Численность и биомасса почвенных микроорганизмов в коренных старовозрастных северо-таежных еловых лесах // Почвоведение. 2006. №. 12. С. 1469-1478.
58. Эль-Регистан Г.И. и др. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. №. 4. С. 446-456.
59. Aliyu H., De Maayer P., Cowan D. The genome of the Antarctic polyextremophile *Nesterenkonia* sp. AN1 reveals adaptive strategies for survival under multiple stress conditions // FEMS microbiology ecology. 2016. Т. 92. №. 4. P. fiw032.
60. Amann R.I., Ludwig W. Schleifer K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P.143-169.
61. Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool // Journal of molecular biology. 1990. Т. 215. №. 3. P. 403-410.
62. Bae H.C., Casida L.E. Responses of indigenous microorganisms to soil incubation as viewed by transmission electron microscopy of cell thin sections // J. Bacteriol. 1973. V. 113. P. 1462–1473.
63. Bakken L.R., Olsen R.A. The relationship between cell size and viability of soil bacteria // Microbial Ecology. 1987. Т. 13. №. 2. P. 103-114.
64. Ball B.A., Virginia R.A. Microbial biomass and respiration responses to nitrogen fertilization in a polar desert // Polar Biology 2014. V. 37. № 4. P. 573–585.
65. Barrett J.E. et al. Terrestrial ecosystem processes of Victoria land, Antarctica // Soil Biology and Biochemistry. 2006. Т. 38. №. 10. P. 3019-3034.
66. Bej A.K., Mojib N. Cold adaptation in Antarctic biodegradative microorganisms // Polar Microbiology: The ecology, biodiversity and bioremediation

potential of microorganisms in extremely cold environments. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton. 2009. P.157-177.

67. Beyer L., Boelter M. Geocology of Antarctic ice-free coastal landscapes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2002. 427 p.

68. Blanco Y. et. al. Prokaryotic communities and operating metabolisms in the surface and the permafrost of Deception Island (Antarctica) // Environmental microbiology. 2012. T. 14. №. 9. P. 2495-2510.

69. Bockheim J.G. Antarctic soil properties and soilsapes // Antarctic Terrestrial Microbiology. Springer Berlin Heidelberg. 2014. P. 293-315.

70. Bolter M. Distribution of bacterial numbers and biomass in soils and on plants from King George Island (Arctowski Station, Maritime Antarctica) // Polar Biology. 1995. V. 15. № 2. P. 115-124.

71. Boyd W.L., Staley J. T., Boyd J. W. Ecology of soil microorganism of Antarctica // Antarctic Research Series. 1966. № 8. P.125-159.

72. Campbell I.B. and Claridge G.G.C. Antarctica: soils, weathering processes and environment Elsevier Science Publishers, Amsterdam & New York, 1987. 406 p.

73. Cameron R.E., Hanson R.B., Lacy G.N. and Morelli F.A. Soil microbial and ecological investigations in the Antarctic interior // Antarctic J. of the United States. 1970. V. 5. P. 87-88.

74. Cameron R.E. Microbial and ecologic investigation in Victoria Valley, southern Victoria Land // Antarctica Research Series. 1972. №20. P. 195-260.

75. Cary S.C., McDonald I.R., Barrett J.E., Cowan D.A. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils // Nature Reviews Microbiology. 2010. T. 8. №. 2. P. 129-138.

76. Chan Y., et. al. Hypolithic microbial communities: between a rock and a hard place // Environmental Microbiology. 2012. V.14. № 9. P. 2272-2282.

77. Chattopadhyay M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature //Journal of biosciences. 2006. T. 31. №. 1. P. 157-165.

78. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., et al. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine // *World Journal of Microbiology and biotechnology*. 1996. T. 12. №. 1. P. 28-31.
79. Dolev M.B., Bernheim R., Guo S., Davies P. L., Braslavsky I. Putting life on ice: bacteria that bind to frozen water // *Journal of The Royal Society Interface*. 2016. T. 13. №. 121. P. 20160210.
80. Dolgikh A.V., Mergelov N.S., Abramov A.A., Lupachev A.V., Goryachkin S.V. Soils of Enderby Land // *The Soils of Antarctica*. Springer International Publishing. 2015. P. 45-63.
81. Ehrlich H.L. How microbes influence mineral growth and dissolution // *Chemical Geology*. 1996. V. 132. P. 5-9.
82. Ferrari B.C. et al. Geological connectivity drives microbial community structure and connectivity in polar, terrestrial ecosystems // *Environmental microbiology*. 2016. T. 18 P. 1834-1849.
83. Friedmann E.I. Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert // *Science*. 1982. V. 215. P. 1045-1253.
84. Friedmann E.I., Weed R. Microbial trace-fossil formation, biogenous, and abiotic weathering in the Antarctic cold desert. *Science*. 1987. V. 236. P. 703-705.
85. Folk R.L. Bacteria and nannobacteria revealed in hardgrounds, calcite, antive sulfur, sulfide materials, and travertines // *Geological Society of America Annual Meeting, Program Abstracts*. 1992. P. 104.
86. Fountain A.G., Hoffman M., Levy J.S. et al. The Hydrology of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica, an Energy-Dominated System // *11th International Symposium on Antarctic Earth Sciences. Abstracts*. Edinburgh 10-15 July 2011. P. 119.
87. Gilbert J.A., Hill P.J., Dodd C.E., Laybourn-Parry J. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria // *Microbiology*. 2004. T. 150. №. 1. P. 171-180.

88. Gilichinsky D., Abakumov E., Abramov A. et al. Soils of Mid and Low Antarctic: diversity, geography, temperature regime // Eds.: Gilkes R.J., Prakongkep N. Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science; Soil Solutions for a Changing World; ISBN 978-0-646-53783-2; Published on DVD; <http://www.iuss.org>; Symposium WG 1.4.; Cold soils in a changing world ; 2010 Aug 1-6. Brisbane, Australia: IUSS; 2010, P. 32-35.
89. Gilichinsky D.A., Wilson G.S., Friedmann E.I. et al. Microbial population in Antarctic permafrost: Biodiversity, State, Age, and Implication // *Astrobiology*. 2007. V. 7. P. 275-311.
90. Giovannoni S.J. et al. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11 // *Nature*. 2005. T. 438. №. 7064. P. 82-85.
91. Hahn M. W. et al. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. T. 69. №. 3. P. 1442-1451.
92. Hogg I.D. et al. Biotic interactions in Antarctic terrestrial ecosystems: are they a factor? // *Soil Biology and Biochemistry*. 2006. T. 38. №. 10. P. 3035-3040.
93. Hultman J. et. al. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes // *Nature*. 2015. T. 521. №. 7551. P. 208-212.
94. Jaejoon J. et. al. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils // *Research in microbiology*. 2011. T. 162. №. 10. P. 1018-1026.
95. Jensen H. I. Report on the petrology of the alkaline rocks of Mount Erebus, Antarctica // *British Antarctic Expedition 1907-9: Rept. Sci. Inv. Geology*. 1916. V. 2. P. 93-128.
96. Kajander E.O., Ciftcioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 63. P. 1382-1388.

97. Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. Dormant non-sporulating bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 1993. V. 104. P. 271 – 286.
98. Kawahara H. et al. Production of two types of ice crystal-controlling proteins in Antarctic bacterium // Journal of bioscience and bioengineering. 2004. T. 98. №. 3. P. 220-223.
99. Kim M. et. al. Highly heterogeneous soil bacterial communities around Terra Nova Bay of northern Victoria Land, Antarctica // PloS one. 2015. T. 10. №. 3. P. e0119966.
100. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing / Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 1991. P. 125-175.
101. Lee C.K., Barbier B.A., Bottos E.M., McDonald I.R., Cary S. C. The inter-valley soil comparative survey: the ecology of Dry Valley edaphic microbial communities // The ISME journal. 2012. T. 6. №. 5. P. 1046-1057.
102. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits. LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (L 7012) instruction manual with appendix. Molecular Probes, 2004.
103. Lopatina A., Krylenkov V., Severinov K. Activity and bacterial diversity of snow around Russian Antarctic stations // Research in microbiology. 2013. T. 164. №. 9. P. 949-958.
104. Makhalaryane T.P., Van Goethem M.W., Cowan D.A. Microbial diversity and functional capacity in polar soils // Current opinion in biotechnology. 2016. T. 38. P. 159-166.
105. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbor laboratory. 1982. T. 545. 2230 p.
106. Martinez A. et. al. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms // Extremophiles. 2016. T. 20. №. 5. P. 759-769.

107. May H.D., Miller G.S., Kjellerup B.V., Sowers K.R. Dehalorespiration with polychlorinated biphenyls by an anaerobic ultramicrobacterium // *Applied and environmental microbiology*. 2008. T. 74. №. 7. P. 2089-2094.
108. Mergelov N.S., Konyushkov D.E., Lupachev A.V., Goryachkin S.V. *Soils of MacRobertson Land // The Soils of Antarctica*. Springer International Publishing. 2015. P. 65-86.
109. Miteva V.I., Brenchley J.E. Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. T. 71. №. 12. P. 7806-7818.
110. Mojib N., Bej A. K., Hoover R. Diversity and cold adaptation of microorganisms isolated from the Schirmacher Oasis, Antarctica // *Optical Engineering+ Applications*. – International Society for Optics and Photonics. 2008. P. 70970K-70970K-11.
111. Morita R.I. Bioavailability of energy and starvation survival in nature // *Can. J. Microbiol.* 1988. V. 34. P. 436–441.
112. Panikov N. Contribution of nanosized bacteria to the total biomass and activity of a soil microbial community // *Advances in Applied Microbiology*. 2005. V. 57. P. 245–296.
113. Pankratov T.A., Ivanova A.O., Dedysh S.N., Liesack W. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat // *Environmental Microbiology*. 2011. T. 13. №. 7. C. 1800-1814.
114. Pointing S.B., Belnap J. Microbial colonization and controls in dryland systems // *Nature Reviews Microbiology*. 2012. V.10. № 8. P. 551-562.
115. Polyanskaya L.M., Zvyagintsev D.G. *Microbial succession in soil* // Harwood Academic Publishers GmbH USA, ISBN 643-7500, 1995. 67 p.
116. Ramsay A.J. Bacterial biomass in Ornitogenic soils of Antarctica // *Journal of Polar Biology*. 1983. V.1. P.221-225.

117. Rappé M. S., Connon S. A., Vergin K. L., Giovannoni S. J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade // *Nature*. 2002. T. 418. № 6898. P. 630-633.
118. Raymond J.A., Fritsen C., Shen K. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. P. 214-221.
119. Robert M., Berthelin J. Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering // *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes* (SSS American Publication). 1986. № 17. P. 453-495.
120. Rutz B.A., Kieft T.L. Phylogenetic characterization of dwarf archaea and bacteria from a semiarid soil // *Soil Biol. Biochem.* 2004. V. 36. P.825–833.
121. Selbmann L., Grube M., Onofri S., Isola D., Zucconi L. Antarctic epilithic lichens as niches for black meristematic fungi // *Biology*. 2013. T. 2. № 2. P. 784-797.
122. Shanhun F.L., et al. Abiotic processes dominate CO₂ fluxes in Antarctic soils // *Soil Biology and Biochemistry*. 2012. T. 53. P. 99-111.
123. Shivaji S. et al. Bacterial diversity of a soil sample from Schirmacher Oasis, Antarctica // *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France).2004. V. 50. №. 5. P. 525.
124. Shivaji S., Prakash J.S.S. How do bacteria sense and respond to low temperature? // *Archives of microbiology*. 2010. T. 192. №. 2. P. 85-95.
125. Soil Survey Staff. 2010. *Keys to Soil Taxonomy* (11th edit.). U.S. Dep. Agric., Natural Resources Conserv. Serv., Washington, D.C.
126. Soina V.S., Vorobiova E.A. Preservation of microbial cell structure in permafrost // *Viable Microorganisms in Permafrost*. Pushchino. 1994. P. 37–47.
127. Soina V.S., Vorobiova E.A., Zvyagintsev D.G., Gilichinsky D.A. Preservation of cell structure in permafrost: a model for exobiology // *Adv. Space Res.*1995. V. 15. N3. P. 237–242.
128. Straka R.P., Stokes J.L. Psychrophilic bacteria from Antarctica // *Journal of bacteriology*. 1960. T. 80. №. 5. P. 622.

129. Suzina N.E. et al. Comparative characteristics of free-living ultramicroscopical bacteria obtained from natural biotopes // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015. T. 51. №. 2. P. 159-168.
130. Targulian V., Mergelov N., Gilichinsky D., et al. Dokuchaev's soil paradigm and extraterrestrial "soils" / (Gilkes R, Prakongkep N, eds.) / *Proceedings, 19th World Congress of Soil Science; Soil Solutions for a Changing World, 2010. Published on DVD; Division Symposium 1.1. Brisbane, Australia: IUSS. P. 1-4.*
131. Tedrow J.C.F., Ugolini F.C. Antarctic soils // *Eds.: Tedrow, J.C.F. Antarctic Soils and Soil Forming Processes. Antarct. Res. Ser. Am. Geophys. Union, Washington, DC, 1966. V. 8. P. 161–177.*
132. Thomazini A., et. al. Geospatial variability of soil CO₂ – C exchange in the main terrestrial ecosystems of Keller Peninsula, Maritime Antarctica // *Science of the Total Environment*. 2016. T. 562. P.802-811.
133. Van Goethem M.W., Makhalanyane T.P., Valverde A., Cary S.C., Cowan D.A. Characterization of bacterial communities in lithobionts and soil niches from Victoria Valley, Antarctica // *FEMS microbiology ecology*. 2016. T. 92. №. 4. P. fiw051.
134. Vlasov D.Y., Abakumov E.V., et al. Lithosols of King George Island, Western Antarctica // *EURASIAN SOIL SCIENCE C/C OF POCHVOVEDENIE*. 2005. T. 38. №. 7. C. 681.
135. Vorobyova E., Soina,V., Gorlenko M., et al. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. // *FEMS Microbiol*. 1997. Rev. 20, P. 277-290.
136. Vorobyova, E.A., Minkovsky, N., Mamukelashvili, A. et al. Microorganisms and biomarkers in permafrost, In *Permafrost Response on Economic Development, Environmental Security and Natural Resources.*, edited by R.Paepe and V.Melnikov, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 2001. P. 527-541.
137. Vishniac H.S. The microbiology of Antarctic soils. // In: E.J. Friedmann (ed) *Antarctic Microbiology*, Wiley-Liss, Inc.1993, P. 297.

138. Zeng X, Xiao X, Wang F. Response of bacteria in the deep-sea sediments and the Antarctic soils to carbohydrates: effects on ectoenzyme activity and bacterial community // *J. Environ. Sci. (China)*. 2010. V. 22(11). P. 1779.
139. Wang N. F. et al. Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing // *Frontiers in microbiology*. 2015. T. 6. P. 01188.
140. Wierzchos J., Sancho L.G., Ascaso C. Biomineralization of endolithic microbes in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica: implications for microbial fossil formation and their detection // *Environmental Microbiology*. 2005. T. 7. №. 4. P. 566-575.
141. Yergeau E., Kang S., He Z., Zhou J., Kowalchuk G. A. Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect // *The ISME journal*. 2007. T. 1. №. 2. P. 163-179.