

# МИКРООРГАНИЗМЫ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД КАК УНИКАЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ ЭВОЛЮЦИИ

## 1. МЕРЗЛЫЕ ПОРОДЫ КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Вряд ли можно назвать природный фактор, который бы оказывал столь драматическое влияние на живой мир, как низкие температуры. Влияние отрицательных температур на живое вещество проявляется в снижении активности и обмена веществ, возникновении повреждений, связанных с образованием кристаллов льда. Выделяется три низкотемпературных диапазона, характеризующиеся особенностями жизнедеятельности (Лозина-Лозинский, 1972): 1) при 0 – -20°C возможна клеточная активность; 2) при -20 - -80°C живые организмы могут находиться в анабиозе; 2) ниже -80°C возможна полная биоконсервация. Микроорганизмы отличаются наибольшей устойчивостью; многие из них легко переносят замораживание без видимых изменений свойств после размораживания (Psenner и Sattler, 1998). Именно это свойство используется для длительного хранения микроорганизмов. Известно, что при температурах ниже -20°C часть воды в тканях (свыше 10%) остается незамерзшей (Брушков и др., 1995). В случае медленного замораживания клеток их содержимое может сохраниться в жидком состоянии при температуре значительно более низкой, чем точка замерзания соответствующего раствора (явление переохлаждения).

Микроорганизмы встречаются везде, и без их участия не обходится ни выветривание горных пород, ни перенос материала, ни седиментация, ни диагенез осадков (Розанов, 1999, Андреева и др., 2004, Safatov и др., 2008). Следует отметить, однако, что живут микроорганизмы только при наличии воды в жидком состоянии. Описано более 100 минералов, образование которых может быть связано с деятельностью бактерий (Tazaki и др., 1997). Так как большая часть земной поверхности имеет температуру ниже 5°C, способность клеток к существованию при низких температурах имеет важное значение для их выживания (Morita, 1975). Первые свидетельства жизнеспособности микроорганизмов в мерзлоте появились в двадцатом столетии. Большинство исследований микроорганизмов проводилось в Арктических и Антарктических мерзлых породах, которые не оттаивали в течение многих тысяч лет. С.С.Абызов (Абызов и др., 1979) обнаружил во льду на Антарктической станции Восток бактерии, грибы, диатомеи и другие микроорганизмы. Цианобактерии были найдены глубоко в Антарктическом ледяном щите на глубине 3600 метров, их возраст соответствует возрасту льда на этой глубине и составляет около 500 тысяч лет. Рост выделенных штаммов происходит при широком диапазоне температуры от 4 до 50°C. Вопрос, насколько широко распространены микроорганизмы в мерзлых породах и каково их разнообразие, остается актуальным.

Многообразие микроорганизмов и их жизнедеятельность при низких температурах до сих пор мало изучены и представляются перспективной областью исследования. Действительно, накоплен значительный материал по способности некоторых микроорганизмов, бактерий и грибов, сохранять жизнеспособность длительное время, в течение десятилетий, и даже, возможно, тысячелетий при сравнительно высоких отрицательных температурах (-3°C - -5°C). По нашим представлениям, это предполагает существование механизма,

предотвращающего накопление повреждений и старение. Целью настоящей работы является изучение разнообразия и особенностей жизнедеятельности микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых пород Якутии и Аляски.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Для исследования микроорганизмов в мерзлых породах были отобраны образцы из обнажений и подземных сооружений в нескольких районах. Одно из них расположено на левом берегу Алдана, в 325 километрах вверх по течению от его впадения в Лену, на Мамонтовой горе. Образцы были отобраны в 0.9-1 м глубже слоя сезонного оттаивания. Обнажение разрушается рекой (более метра в год), так что отложения, из которых отбирались образцы, находились, очевидно, в многолетнемерзлом состоянии. При этом происходит ежегодное весеннее смывание обрушений, предотвращающее завалы и смещения пород. Последние представляют собой тонкозернистые пески и алевролиты; их возраст соответствует среднему миоцену (Баранова и др., 1976). Похолодание началось здесь в конце плиоцена, около 3 - 3.5 миллионов лет тому назад. Температура в январе для того времени была оценена Н.Т.Бакулиной и В.Б.Спектором (2000) от -12 до -32°C, а в июле от +12 до +16°C. Отложения, по-видимому, не оттаивали в плейстоцене из-за холодного климата Якутии. Таким образом, возраст мерзлоты на Мамонтовой горе, вероятно, может достигать 3.5 миллионов лет. Кроме того, были отобраны образцы из повторно-жильных льдов ледяного комплекса в Якутии и на Аляске: в тоннеле Фокс и на золотом руднике вблизи Фербенкса, а также из стенок подземелья Института Мерзловедения им. П.И.Мельникова в Якутске.

### **2.1. Отбор образцов**

Пробы отбирались с максимально возможными для полевых условий предосторожностями. Использовались стерилизованные спиртом и обожженные в пламени металлические инструменты (буры, пинцеты, скальпели). Для того, чтобы провести поверхностную стерилизацию образцов, проба весом около 50 г помещалась в стакан с 96% раствором этанола на одну минуту, и затем в пламя горелки на примерно 2 сек и, наконец, в стерильную пробирку.

Отобранные породы хранились при температуре -5°C, что было близко к естественным условиям. Транспортировка проб осуществлялась в термоконтейнерах с хладагентами в мерзлом состоянии.

### **2.2. Рост на искусственных средах**

Образцы различного разведения в стерильных условиях добавлялись в чашки Петри, содержащие среды YPD, MRS и NA (Герхард, ). Образцы добавлялись также в жидкий мясо-пептонный бульон в анаэробных и аэробных условиях.

### **2.3. Получение и секвенирование ДНК**

Рибосомальная ДНК микробной культуры извлекалась с помощью Fast DNA kit for soil (BIO 101 Inc., Vista, CA), где применяется метод, основанный на разрушении клетки стеклянными шариками. Нуклеиновые кислоты осаждались из раствора с использованием раствора, состоящего из 0.1 части 3 М ацетата натрия (рН 5.2) и 2.5 частей этанола, инкубировались на льду, а затем центрифугировались в течение 30 минут на скорости 12,000 об./мин. Осажденные нуклеиновые кислоты растворялись затем в дистиллированной воде (свободной от RN-аз и DN-аз), и хранились при -20°C. Фрагменты 16S rRNA были амплифицированы ПЦР, проводимой с бактериальными праймерами (27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R; 5'-TGACTGACTGAGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). ПЦР проводилась в объеме 20-µl с помощью GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) следующим образом: 4 мин при 94°C, затем 30 циклов по 1 мин при 94°C, 1 мин при 50°C, и 1.5 мин при 72°C, затем 7 мин при 72°C. ПЦР ампликоны подвергались электрофорезу и очищению с помощью Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Очищенные ампликоны были клонированы с использованием pCR2.1 вектора, культуры E. coli, а также TA cloning kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Из суточной культуры ДНК плазмид, содержащая 16S rDNA, получена с помощью Mini prep spin kit (Quiagen, Crawley, UK). Очищенные ДНК плазмид секвенировали на ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer с помощью Big Dye Terminator cycle-sequencing kit (Applied Biosystems). Амплицированные продукты 27F-1492R были секвенированы в обоих направлениях с праймерами 27F, 357F (5'-CTACGGGAGGCAGCAG -3'), 520R (5'-ACCGCGGGGTGCTGGC-3'), 920F (5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3'), 1080R (5'-CCCAACATCTCACGAC-3') и 1492R как описано Mori et al. (1997). Длина последовательности составила 1488 bp. Полученная последовательность сравнивалась с другими, используя BLAST (Altschul et al., 1997). Филогенетическое дерево строилось по методу Saitou и Nei (1987), используя CLUSTAL W software package (Thompson et al., 1994).

Нуклеотидная последовательность 16S rRNA была депонирована в DDBJ/EMBL/GeneBank под номером AB178889, идентификационный номер 20040510203204.24251.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИЗУЧЕНИЯ РОСТА И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МЕРЗЛЫХ ПОРОД**

Главными техническими проблемами палеомикробиологии являются достоверность датирования образцов и отсутствие контаминации «современными» микроорганизмами. В нашем случае второй проблеме было отведено существенное внимание, что позволило в дальнейшем достоверно интерпретировать полученные результаты.

В мерзлых миоценовых отложениях на Мамонтовой горе было обнаружена культивируемая бактерия, способная к аэробному и анаэробному росту в средах YPD, MRS и NA; оптимальная температура роста +37°C. Микроорганизм является психротолерантным, т.к. способен к метаболической активности при -5°C. Бацилла представляет собой сравнительно большую (1-1.5 x 3-6 микрон) палочку, которая в культуре соединяется в цепи, и способна образовывать споры круглой формы. Она неподвижна и обладает гемолитической активностью. При температуре -5°C бацилла медленно (признаки роста обнаружива-

лись через 2-3 месяца) росла как в замороженной, так и в переохлажденной среде. Микроорганизм принадлежит роду *Bacillus*, но является новым видом. Наибольшее видовое подобие выделенной бациллы отмечено с *Bacillus simplex*, *B. macroides*, гомология с 16S rRNA которых составляет 96-97%.

Рост бацилл при низких температурах наблюдался ранее (Ashcroft, 2000); известно, например, что *Bacillus anthracis* легко переносит замораживание (Luyet и Gehenio, 1940). Однако, оптимальная температура роста найденной бациллы довольно высока. Несмотря на то, что она оказалась способной на искусственной среде расти и ниже нуля, видимых колоний на мерзлых образцах при этом не наблюдалось. Споры бацилл известны как наиболее резистентные (Nicholson и др., 2000); так, *B. thuringiensis* and *B. macroides* были найдены в янтаре с абсолютным возрастом 120 миллионов лет (Greenblatt и др., 1999). Поэтому находка живой бациллы в древней мерзлоте Мамонтовой горы в целом не удивительна. Представляет, однако, интерес, что и в описанном случае наибольшее подобие отмечено с видом *B. macroides*. Насколько активна ее жизнь в мерзлоте, однако, неясно; это относится и к микроорганизмам, выделенным из льдов Центральной Якутии и Аляски.

Из повторно-жильных льдов Якутии и Аляски возрастом около 25 - 40 тысяч лет по описанной выше методике было выделено несколько видов микроорганизмов. Большинство из выделенных бактерий грам-положительны и близки к *Arthrobacter* and *Micrococcus* spp., а грибы - к *Geomyces* sp. Многие изоляты оказались способны к росту при  $-5^{\circ}\text{C}$ , но не росли при  $+30^{\circ}\text{C}$ , т.е. являлись облигатными психрофилами. Интересно, что ДНК метаногенов нескольких групп была также обнаружена и идентифицирована в аллювиальных мерзлых отложениях Якутии. Их исследование не закончено и пока не ясно, имеем ли мы дело с живыми метаногенами. Однако инкубация этих многолетнемерзлых отложений принесла положительные результаты: наблюдалась эмиссия метана при  $-5^{\circ}\text{C}$ . Исследования метаногенов представляются перспективными; последние могут оказаться ответственными за большое содержание метана в многолетнемерзлых отложениях.

В подземелье Института Мерзлотоведения им. П.А.Мельникова, на глубине около 7 метров на стенах найден белый грибной мицелий. Похожий мицелий наблюдается и на стенках тоннеля Фокс на Аляске. Идентификация выделенного вида (штамм PF) была основана на его морфологических характеристиках и анализе последовательности нуклеотидов, амплифицированной 18S rRNA. Данный гриб близок к *Penicillium echinulatum* и, возможно, представляет собой новый вид. Образцы из мерзлых отложений были подготовлены вместе с образцами штаммов *P. echinulatum*, полученных из банка культур, и инкубированы при температурах  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$  и  $-5^{\circ}\text{C}$ . Характеристики прорастания спор и роста штамма PF из мерзлых отложений и штаммов IFO 7760 and IFO 7753 *P. echinulatum* при более низких температурах оказались различными: штамм PF сравнительно быстро рос при  $-5^{\circ}\text{C}$ . Интересно, что при  $-5^{\circ}\text{C}$  выделенный штамм рос в чашках Петри – как в тех, где произошла кристаллизация среды, так и в переохлажденной среде (картофельном агаре). При этом на кристаллизованной среде он рос быстрее.

Выделенный штамм *Penicillium echinulatum* в подземелье Института Мерзлотоведения им. П.И.Мельникова в Якутске, несмотря на его адаптацию к холоду и условиям питания, вполне может быть современным, занесенным с

поверхности. Кроме того, этот гриб растет только в аэробных условиях. Поэтому и его способность к росту внутри древней мерзлоты сомнительна.

#### 4. ПРОБЛЕМА РОСТА И ВЫЖИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В МЕРЗЛЫХ ПОРОДАХ

Ниже представлена подборка выдержек из публикаций, описывающих факты активности микроорганизмов при низких температурах, и короткие комментарии к ним.

Медленный рост *Bacillus* sp. T3A при  $-2^{\circ}\text{C}$  в течение 25 дней и при  $-4.5^{\circ}\text{C}$  в течение 40 дней наблюдался Stokes (Low Temperature..., 1968). Значительное число *Bacillus* sp. известно способностью переносить замораживание; так, никаких изменений не наблюдалось у *B. anthracis* после погружения в жидкий воздух в течение 15 часов (Luyet & Gehenio, 1940). Водный потенциал может быть определен с помощью уравнения Вант-Гоффа или из уравнения Клапейрона-Клазиуса (Fowler и. Krantz, 1994). При температуре  $-5^{\circ}\text{C}$  он составляет около  $-6.1$  МПа. Надежные свидетельства сохранности бактериальных спор, однако, имеются в отношении периода времени около 105 лет (Puskerpeleit и др., 1992). Бацилла либо способна долго сохраняться, либо медленно воспроизводится. Вопрос о ее воспроизводстве, однако, остается открытым.

Как известно, большинство микроорганизмов не размножается при температурах ниже  $0^{\circ}\text{C}$ , хотя, как это было установлено впервые еще в 1887 году Фостером, имеются бактерии, способные к росту при отрицательных температурах. Метаболизм бактерий в вечной мерзлоте был отмечен при температурах около  $-20^{\circ}\text{C}$  (Friedmann, 1994). Бактериальное сообщество было найдено в Антарктической вечной мерзлоте (Hubbard и другие, 1968). Имеются некоторые другие факты относительно роста бактерий ниже  $0^{\circ}\text{C}$  (Flanagan, Veum, 1974; Bunt и др., 1970; Kalinina, Holt и McGrath, 1994; Clein и Schimel, 1995). Ферменты активны в почвах при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Некоторые дрожжи растут при температурах ниже  $0^{\circ}\text{C}$ . Вода внутри клеток не замерзает иногда и при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , это было, например, установлено для *Mytilus edulis* и *Littorina rudis* (Kanwisher, 1955).

Считается, что в клетках микроорганизмов имеется ряд органических криопротекторов. Это позволяет им жить в течении нескольких лет в переохлажденном состоянии (DeVries, 1982).

Не отрицая вероятности развития микроорганизмов в мерзлых породах, следует признать, что их рост, очевидно, затруднен. Промерзание почвы и кристаллизация воды, затруднение обмена веществом резко уменьшает способность к микробному росту. Поры замерзающей породы насыщаются на 85-90 % и более льдом, таким образом, микроорганизмы в вечной мерзлоте оказываются изолированными среди минеральных частиц и льда, лишены способности движения - пространство, которое занимают бактерии, возможно, лишь немного больше их собственного размера. Незамерзшая вода в мерзлых породах при отрицательных температурах - необходимый элемент их структуры. Однако проникновение микроорганизмов в мерзлые породы по прослоям незамерзшей воды весьма маловероятно, потому что эти проводящие пути не имеют соответствующего размера. Лишь в значительно засоленных породах это, по-

видимому, возможно. Толщина прослоев незамерзшей воды при температурах -3 и -4°C составляет приблизительно 0.01 - 0.1 микрон, то есть, как правило, меньше, чем размеры микроорганизмов, которые составляют около 0.3 - 1.4 микрон и более. Таким образом, можно предположить, что во многих случаях микроорганизмы, находящиеся в многолетнемерзлых породах, представляют собой реликтовые, ископаемые организмы.

Имеется мнение, основанное на экспериментах, что в организме в состоянии анабиоза не происходит никаких химических и биологических реакций (Hinton, 1968). С другой стороны, на клеточные структуры воздействуют температурные изменения, радиация, давление, свободные радикалы. Тепловое движение атомов и молекул также является разрушающим фактором, потому что температура далека от абсолютного нуля. Цитоплазма клетки полностью не замерзает, очень вероятно, она не замерзает вообще, из-за температуры: значения -2° - -5°C недостаточно низки. Поэтому трудно предположить, что организм в анабиозе находится в состоянии термодинамического равновесия, которое в природных условиях недостижимо.

В данном случае нас интересуют механизмы, обеспечивающие возможность выживания.

Молекулярные основы тепловой стабильности биологических материалов представляют собой нерешенную проблему (Baker и Agard, 1994; Jaenicke и др., 1996; Levy и Miller, 1998). В целом, стабильность белка определяется величиной свободной энергии,  $G$ , для реакции "свернутая - развернутая структура" при физиологических условиях. Большинство белков характеризуются значением  $G = 5 - 15$  ккал/моль. В терминах термодинамики, доля разрушенных областей структуры, отнесенная к доле упорядоченных областей ( $k$ ) представляется следующей:

$$k = e^{-\frac{G}{RT}}$$

где  $G$  - свободная энергии перехода от упорядоченной области к случайной, ккал/моль;  $T$  - температура, °К;  $R$  - газовая константа, ~0,001989, ккал/моль\*°К. Подобное выражение может быть использовано для приблизительной оценки времени существования органических молекул. При этом оказывается, что для условия  $G = 30$  ккал/моль время существования молекулярных связей составляет около 300 лет. Для периода температурных колебаний молекул  $10^{-8} - 10^{-9}$  секунды и  $G = 20$  ккал/моль время существования молекулярных связей - менее года. Максимальное же известное значение энергии активации - приблизительно 45 ккал/моль; обычно - намного меньше (Александров, 1975). Приведенные оценки очень приблизительны, но и они показывают, насколько нестабильны белки и ДНК. Интерпретация экспериментальных данных по тепловой стабильности ДНК также показывает, что из-за неустойчивости цитозина (Levy и Miller, 1998) максимальная продолжительность жизни цепи ДНК, очевидно, составляет несколько сот лет. Интересны в этом смысле наши данные по времени жизни наиболее устойчивого среди вирусов вируса натуральной оспы. Показано, что оно совпадает с приведенными расчетными данными и составляет несколько сотен лет (Repin и др, 2002). Но вирус лишен

возможности быть активным в замороженном состоянии и может быть представлен как комплекс органических молекул. В отличие от вирусов бактерии - живые объекты. Они способны к метаболической активности и без наличия питательных веществ в среде ( Гусев и др.), и при низких температурах (например, Репин и др ). Причем преобразования касаются наследственных носителей, таких как ДНК и, возможно, РНК. Эволюционно значимые преобразования отмечены для неделящихся культур. Особый интерес, конечно, представляют микроорганизмы, сохраняющиеся в природных условиях при низких температурах протяженные временные периоды (Репин и др., 2007; Greenblatt и др., 1999). Прослеживается возможность комбинаторных преобразований, предсказанных ранее (Заварзин, ). Нельзя не отметить в этом аспекте о существовании таких биокатализаторов, как рибозимы, активность которых связывают с происхождением жизни на Земле, миром РНК (Власов и др). В нашем же случае важно, что эти рибозимы стабильны и активны при температуре ниже 0°C.

Таким образом, изучая микроорганизмы, выделенные из многолетне-мерзлотных пород, нам предстоит разрешить загадку, как они выживают в тысячелетней мерзлоте. Эти микроорганизмы представляют собой уникальное явление и должны иметь особые механизмы репарации структур клетки, склонных к разрушению из-за огромной продолжительности их существования. В этом случае они должны иметь структурные и биохимические особенности, которые их отличают от существующих микроорганизмов.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Имеются очевидные свидетельства о том, что ряд живых микроорганизмов в мерзлых породах являются жизнеспособными. В настоящей работе приводятся примеры таких микроорганизмов, выделенных из мерзлых отложений Якутии и Аляски. Очевидно, мерзлые породы являются благоприятной средой для их сохранения. Длительное (до сотен, а может быть и более миллионов лет) существование живых микроорганизмов трудно объяснить замедлением жизнедеятельности при анабиозе; оно, возможно, требует изучения репарационных механизмов, поддерживающих функционирование клеточных структур. Несмотря на то, что целенаправленные исследования мерзлых пород продолжается уже более 100 лет, микроорганизмы в них изучены слабо. Поэтому геокриология оказалась не вполне готова к объяснению фактов, появившихся в последнее время – таких, например, как значительное содержание биогенного газа в мерзлых породах, или к решению экологических проблем в криолитозоне. Исследование древних микроорганизмов в мерзлоте имеет большое теоретическое и практическое значение, и, несомненно, приблизит к решению ряда фундаментальных проблем.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Абызов С.С., Бобин Н.Е., Кудряшов Б.Б.,** 1979. Микробиологические исследования ледника в Центральной Антарктиде. Известия АН СССР, серия биология, 6, с. 828-836.
- Александров В.Я.** 1975. Клетки, макромолекулы и температура. Ленинград, Изд-во Наука.

- Бакулина Н.Т., Спектор В.Б.** 2000. Реконструкция климатических параметров неогена Якутии по палинологическим данным. В кн.: Климат и мерзлота. Г.Н. Максимов и А.Н.Федоров (ред.). Институт мерзлотоведения, Якутск. С. 21 - 32.
- Баранова Ю.П., Ильинская И.А., Никитин В.П., Пнева Г.Н., Фрадкина А.Ф., Шварева Н.Я.** Миоцен Мамонтовой горы. Труды ГИН СО АН СССР. Наука. Москва. 1976. 284 с.
- Брушков А.В., Власов А.Н., Мерзляков В.П., Талонов А.В.** Влияние локальных фазовых переходов на деформируемость пластично-мёрзлых грунтов. Ж-л «Геоэкология. Инженерная геология, гидрогеология, геокриология», 1995. № 5. С.71-77.
- Лозина-Лозинский Л.К.** Очерки по криобиологии. Л., Наука, 1972. 288с.
- Розанов А.Ю.** Ископаемые бактерии и новый взгляд на процесс седиментации. Соросовский образовательный журн. 1999. № 10. С. 63-68.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Ashcroft F.** 2000. *Life at the Extremes.* HarperCollins. 326p.
- Baker D., Agard D.,** 1994. Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry*, 33, 750509.
- Bunt J.S., Lee C.C.,** 1970. Seasonal primary production in Antarctic sea ice at McMurdo Sound in 1967, *J. Mar. Res.*, 28: 304-320.
- Clein J.S., Schimel J.P.,** 1995. Microbial activity of tundra and taiga soils at sub-zero temperatures. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1231-1234.
- DeVries A.L.,** 1982. Biological antifreeze in coldwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 627-640.
- Flanagan P.W., Veum A.K.,** 1974. Relationships between respiration, weight loss, temperature and moisture in organic residues on tundra. In: *Soil Organisms and Decomposition in Tundra* (Eds A.J.Holding, O.M.Heal, S.F.Maclean, Jr. and P.W.Flanagan), pp. 249-277, Swedish IBP Committee, Stockholm.
- Forster J.,** 1887. Ueber einige Eigenschaften Leuchtender Bakterien, *Cent, Bacteriol. Parasitenk.*, 2:337-340.
- Fowler A.C, Krantz W.B.** 1994. A generalized secondary frost heave model, *SIAM J. Appl. Math.*, 54(6), 1650–1675.
- Friedmann E.I.** 1994. Permafrost as microbial habitat. In *Viable Microorganisms in Permafrost.* Russian Academy of Sciences: Pushchino, Russia; 21-26.
- Greenblatt C.L, Davis A., Clement B.G., Kitts C.L., Cox T., Cano R.J.** 1999. Diversity of Microorganisms isolated from amber. *Microbial Ecology* 38: 58-68.
- Hinton H.E.,** 1968. Reversible suspension of metabolism and the origin of life. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, vol. 171, pp. 43-56.
- Hubbard J.S., Cameron R.E., Miller A.V.,** 1968. Soil studies – desert microflora. XV. Analysis of Antarctic dry valley soils by cultural and radiorespirometric methods, *Space Prog. Summary No. 37-52*, 3, pp. 172-175.
- Jaenicke R.,** 1996. Stability and Folding of Ultrastable Proteins: Eye Lens Crystallins and Enzymes from Thermophiles. *FASEB J.*, 10, 84-92
- Kalinina L.V., J.G. Holt and J.J. McGrath.** 1994. Identity of bacterial from Siberian permafrost soils. In *IUMS Congresses '94; 7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division; 7th International Congress of Mycology Division*, Prague, Czech Republic, July 3-8, 1994.
- Kanwisher J.,** 1955. Freezing in intertidal animals. *Biol. Bull.*, 109: 56-63.
- Levy M., Miller S.L.,** 1998. The stability of the RNA bases: Implications for the origin of life. *Biochemistry* 95 (14): 7933-7938



- Low temperature biology of foodstuffs.** 1968. In The proceedings of a NATO Advanced Study Institute held at the University of Strathclyde, Hawthorn J, Rolfe EJ (ed.). Pergamon: Oxford; 458 p.
- Luyet B.J., Gehenio P.M.** 1940. Life and death at low temperatures. *Biodynamica*: Normany, Missouri; 99 p.
- Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y., Inoue N., Shimamo H.** 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int.J.Syst. Bacteriol.* 47:54-57.
- Morita R.Y.** 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: 144-167
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P.** 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:548-572.
- Psenner R., Sattler B.** 1998. Life at the freezing point. *Science* 280:2073-2074
- Puskeppeleit M., Quintern L.E., Naggar S., Schott J.U., Eschweiler U., Horneck G., Bücker H.** 1992. Long-term dosimetry of solar UV radiation in Antarctica with spores of *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2355-2359
- Saitou N., Nei M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol.*, 4, 406-425.
- Tazaki K., Aoki A., Asada R.** A new world in the science of biomineralization - environmental biomineralization in microbial mats in Japan. *Sci. Reports Kanazawa Univ.* 1997. V. 42. N 1-2. P. 1-64.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.

#### **БЛАГОДАРНОСТИ АВТОРОВ**

Мы благодарны академику В.В.Власову (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) и проф. П.Вильямсу (Scott Polar Research Institute, Cambridge, UK) за поддержку настоящей работы и дискуссии, а также зав. лабораторией к.г.н. А.Н.Федорову и к.г.н. П.А.Константинову из Института Мерзлотоведения в Якутске за помощь в полевых исследованиях.