



Microbial communities in Mont Blanc snowpack with Saharan dust deposition: focus on snow microbiota

Maria S. Chuvochina

► To cite this version:

Maria S. Chuvochina. Microbial communities in Mont Blanc snowpack with Saharan dust deposition: focus on snow microbiota. Biodiversity. Université de Grenoble, 2011. Russian. NNT: . tel-00641977

HAL Id: tel-00641977

<https://theses.hal.science/tel-00641977>

Submitted on 17 Nov 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement**

**Préparée dans le cadre d'une cotutelle avec le Petersburg
Nuclear Physics Institute Russian Academy of Sciences**

Arrêtés ministériels : 7 août 2006 et 6 janvier 2005

Présentée par

Maria S. CHUVOCHINA

Thèse dirigée par **Jean-Robert Petit** et
codirigée par **Sergey Bulat**

préparée au sein du **Laboratoire de Glaciologie et de Géophysique de
l'Environnement**
dans l'École Doctorale Terre, Univers, Environnement

Etude des communautés microbiennes dans les neiges du Mt Blanc en relation avec la poussière saharienne

Thèse soutenue publiquement le **20 octobre 2011**,
devant le jury composé de :

M. Sergey S. MEDVEDEV

Professeur, SPbSU, Saint-Petersburg, Russia (Président)

M. Evgeny E. ANDRONOV

HL, ARRIAM, LMMSB, Pushkin, Russia (Rapporteur)

Mme. Tatyana P. TOUROVA

LR, D.Sc., INMI RAS, Moscow, Russia (Rapporteur)

M. Philippe NORMAND

DR, CNRS, LEM, Lyon (Examineur)

M. Jean-Robert PETIT

DR2, CNRS, LGGE, Grenoble (Directeur de thèse)

M. Sergey A. BULAT

SR, PNPI RAS, LEG, Saint-Petersburg, Russia (Co-Directeur de thèse)



Etude des communautés microbiennes dans les neiges du Mt Blanc en relation avec la poussière saharienne

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer à l'aide des techniques de phylogénie moléculaire la diversité bactérienne non cultivable dans le manteau neigeux du Mont Blanc (MtBl) contenant de la poussière saharienne déposée au cours de quatre événements pendant la période de 2006 à 2009. Le but final est de découvrir les bactéries qui pourraient être impliquées dans l'établissement du microbiote neigeux.

La diversité bactérienne a été évaluée en utilisant deux méthodes : la digestion enzymatique d'ADN et ultérieurement le séquençage partiel de la région V3-V5 du gène et des séquences complètes d'ARNr 16S. Dans un but de comparaison, nous avons également étudié les échantillons suivants : des échantillons dits "propres" constitués par la neige MtBl ne contenant aucune poussière saharienne; du sable du Sahara collecté en Tunisie; de la poussière saharienne collectée à Grenoble (200 m d'altitude) et aussi de la neige récupérée au MtBl (4250 m d'altitude). Pour vérifier l'activité microbienne possible in situ, les deux types d'analyse, c'est à dire ADN et ARNr, ont été faits pour l'échantillon de neige dite "propre". Pour évaluer les capacités de survie/colonisation de phylotypes bactériens retrouvés dans les échantillons de neige associés à la poussière saharienne, nous avons analysé leur physiologie en examinant ce qui était connu des souches isolées de l'environnement en utilisant un seuil de similarité de séquence $\geq 98\%$. Pour l'interprétation des résultats, nous avons également utilisé les données sur la composition élémentaire et la distribution granulométrique des particules de poussière.

Tout cela nous a permis de construire 8 bibliothèques de clones (dont une basée sur l'ARNr) basés sur les séquences V3-V5 du gène 16S ARNr pour 5 échantillons de neige (4 avec de la poussière saharienne et un "propre"), un échantillon de poussière saharienne collectée à Grenoble et l'échantillon de sable du Sahara. En outre, 4 bibliothèques de clone ont été générées en utilisant les amplicons complets du gène 16S de l'ARNr obtenu à partir de 4 échantillons de la neige décrite ci-dessus (trois avec la poussière saharienne et un "propre").

Le contenu en espèces et en phylotypes dominants et leur attribution aux grandes divisions ont varié considérablement dans la neige alpine sur le glacier du Mont-Blanc associée à quatre dépôts de poussière saharienne sur 3 années. Les phylotypes dominants dévoilés appartiennent aux classes des Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Deinococcus-Thermus, Bacteroidetes et les Cyanobacteria. Cette variabilité a été détectée tant par séquençage partiel du gène 16S ARNr que par séquençage pleine longueur et semble être davantage causée par les conditions de transport de la poussière que par la charge bactérienne de la source de la poussière d'origine. Aussi la durée de conservation de la poussière dans la neige pourrait affecter la composition en espèces.

Treize phylotypes "neigeux" ont été reconnus comme candidats pour colonisation de la neige et formation du microbiota dans la neige à partir de la poussière saharienne et seulement deux dans l'échantillon de neige "propre". Deux phylotypes tant dominants que minoritaires de Cyanobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria et Firmicutes ont été révélés. Les données sur la physiologie des plus proche voisins des phylotypes "neigeux" reconnus suggèrent que les représentants des genres *Massilia* (Betaproteobacteria), *Tumebacillus* (Firmicutes), *Phormidium* et *Stigonema* (tous les deux Cyanobacteria) sont les candidats les plus pertinents pour la propagation dans la neige.

En analysant l'ARNr 16S de la neige dite "propre" (ne contenant aucune poussière saharienne) et comparant les données avec celles obtenues pour la bibliothèque de 16S ADN, nous avons montré que *Stigonema* était présent, et qu'il est connu que les cyanobactéries peuvent se propager dans la neige à la température sous zéro. Parmi tous les phylotypes identifiés, 10% ont été classés comme HA-phylotypes basés sur leur con-spécificité (similitude $\geq 98\%$) avec les représentants du microbiome humain (non-pathogènes) normaux. En outre, 11% de tous les phylotypes ont montré moins de 90% de similarité avec les taxons connus.

Le séquençage partiel (V3-V5) et complet des gènes codant l'ARNr 16S a permis de décrire la diversité microbienne plus complète et d'en obtenir une image plus détaillée.

**Бактериальное разнообразие снежного покрова ледника Монблан,
содержащего почвенную пыль пустыни Сахары, и роль отдельных филотипов в его
колонизации**

Резюме

Цель данной работы – изучение некультивируемого бактериального разнообразия снежного покрова ледника Монблан, содержащего почвенную пыль пустыни Сахары, на примере четырех событий переноса пыли на ледник за период 2006 – 2009 гг., с помощью методов молекулярно-филогенетического анализа.

Бактериальное разнообразие исследовали путем ПЦР амплификации V3-V5 варибельной области и полноразмерной последовательности гена 16S рРНК. Предварительный скрининг осуществляли методом риботипирования. В сравнение были также взяты образцы: снега Монблана, не содержащего пыль Сахары; песчаной почвы Сахары, собранной в Тунисе; пыли Сахары, осажденной в Гренобле (200 м над у.м.) и в дальнейшем собранной на леднике (4250 м над у.м.). Для образца снега без пыли Сахары дополнительно дополнительно изучали 16S рРНК транскрипты с праймерами на область V3-V5. Также оценивали вклад микроорганизмов пыли Сахары в формирование “снежной” микробиоты путем анализа физиологических характеристик и местообитания близкородственных бактерий ($\geq 98\%$ сходств а). При интерпретации результатов использовали данные об элементном составе пыли и распределении части пыли по размерам.

В результате для пяти образцов снега с пылью и образцов почвы и пыли Сахары было создано 8 клоновых библиотек типа “V3-V5” (одна на основе рРНК), а также 4 “полноразмерные” библиотеки для трех образцов снега с пылью Сахары и образца снега, не содержащего пыль Сахары.

Показано, что видовой состав и доминантные группы микроорганизмов, перенесенные с пылью Сахары на ледник Монблан в 2006, 2008 и 2009 гг., существенно различаются. Данный факт подтверждался путем анализа как “V3-V5” так и “полноразмерных” библиотек гена 16S рРНК. Выявленные доминантные филотипы принадлежат к шести филогенетическим разделам: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*. Возможной причиной различий пула микроорганизмов, приносимых с пылью из Северной Африки, по-видимому, является не столько источник происхождения пыли, сколько условия переноса пыли ветром из Северной Африки. Время нахождения пыли в снежном покрове, хотя и незначительное по длительности, также могло повлиять на распределение отдельных групп бактерий в общем микробном пуле.

Доминантные и минорные филотипы разделов *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*, обнаруженные в снеге с пылью и без пыли Сахары, могут выступать в качестве кандидатов на колонизацию снежного покрова альпийских ледников. Из них 13 филотипов были обнаружены в снеге с пылью Сахары и лишь 2 филотипа в снеге, не содержащим пыль Сахары. Исходя из физиолого-биохимических характеристик бактерий, близкородственных “холодолобным” филотипам, представители родов *Massilia* из *Betaproteobacteria*, *Tumebacillus* из *Firmicutes*, и цианобактерий *Phormidium* и *Stigonema* рассматриваются как наиболее достоверные находки бактерий, способных к размножению в снеге.

Анализ 16S рРНК, выделенной из снега, не содержащего пыль Сахары, предполагает наличие метаболической активности при отрицательной температуре филотипа, родственного цианобактерии рода *Stigonema*.

Среди выявленных филотипов 10% были родственны представителям нормальной микрофлоры человека, и 11% оказались новыми таксонами, показав отдаленное сходство ($\leq 90\%$) с известными таксонами.

Применение двух праймерных систем, амплифицирующих полноразмерный ген 16S рРНК и его V3-V5 область, позволило полнее охарактеризовать бактериальное разнообразие снежного покрова ледника Монблан.

Microbial communities in Mont Blanc snowpack with Saharan dust deposition: focus on snow microbiota

Abstract

The objective of this study is to assess the uncultured bacterial diversity in the snowpack of the Mont Blanc (MtBl) glacier containing Saharan dust deposited during four dust events during the period 2006 – 2009 by means of molecular phylogenetics. The final goal is to discover the bacteria that could be involved in the establishment of snow microbiota.

Bacterial diversity was evaluated using ribotyping and subsequent sequencing of partial (V3-V5) and full-length 16S rRNA genes. For comparison purpose we also studied following samples: “clean” MtBl snow containing no Saharan dust; Saharan sand collected in Tunisia; Saharan dust collected in Grenoble (200 m a.s.l.) and recovered later on MtBl (4250 m a.s.l.). In order to verify possible microbial activity in situ, both rDNA and rRNA approaches were implemented for the “clean” snow sample. To evaluate the survival/colonization abilities of bacterial phylotypes recovered in snow samples with Saharan dust, we analyzed their closest strain physiology as well as sources of environmental clones using a threshold of $\geq 98\%$ sequence similarity. For the result interpretation, we also used data on dust elemental composition and dust particles size distribution.

As a result 8 clone libraries (including rRNA-based one) were constructed using V3-V5 16S rRNA gene sequences for 5 snow samples (4 with Saharan dust and one “clean”), sample of Saharan dust collected in Grenoble and Saharan sand sample. Furthermore, 4 clone libraries were generated using full-length 16S rRNA gene amplicons obtained from 4 of the above snow samples (three with Saharan dust and one ‘clean’).

Species content and dominant phylotypes and their assigning to major divisions varied significantly in alpine snow on a Mont Blanc glacier associated with four depositions of Saharan dust over a 3-year. Dominant phylotypes revealed are belonged to *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Bacteroidetes* and *Cyanobacteria*. Such variability was detected by both partial and full-length 16S rRNA gene sequencing and seems to be caused more by conditions of dust transport than bacterial load from the original dust source. Also the preservation period of dust in snowpack could affect the species composition.

Thirteen icy phylotypes as candidates into snow microbiota establishing were recognized in snow containing Saharan dust and only two in “clean” snow sample. Of them, both dominant and minor phylotypes of *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* were revealed. Data on the closest strain physiology of recognized icy phylotypes suggests that representatives of genera *Massilia* (*Betaproteobacteria*), *Tumebacillus* (*Firmicutes*), *Phormidium* and *Stigonema* (both *Cyanobacteria*) are most relevant findings in terms of propagation in snow.

By analyzing 16S rRNA from the “clean” snow containing no Saharan dust and comparing the data with those obtained for 16S rDNA library, it has been shown that *Stigonema*-like cyanobacterium identified could be propagating in snow at subzero temperature.

Among all identified phylotypes, 10% were categorized as HA-phylotypes based on their con-specificity ($\geq 98\%$ similarity) with normal (non-pathogenic) human microbiome representatives. Furthermore, 11% out of all phylotypes showed less than 90% similarity with known taxa, thus, presenting novel taxa.

Sequencing of both partial (V3-V5) and full-length 16S rRNA genes permitted to describe microbial diversity more fully and get more detailed picture.

TABLE OF CONTENT

BASIC NOTATIONS AND ABBREVIATION.....	7
INTRODUCTION.....	9
1 GENERAL INTRODUCTION.....	17
1.1 Microorganism in cryobiosphere: facts and hypothesis.....	19
1.2 Snow: extreme habitats for microbial life.....	22
1.3 Microbial diversity in glacier snow.....	25
1.3.1 Microbial life in glacier snow: impact of physical and chemical factors.....	25
1.3.2 Microbial diversity in polar glacier snow.....	27
1.3.3 Microbial diversity in mountain glacier snow.....	32
1.4 Global dispersal of microorganisms: role of desert dust.....	35
1.4.1 The origin of dust storm: monitoring and identification.....	35
1.4.2 Back-trajectory analysis.....	37
1.4.3 Minerology and elemental composition of desert dust.....	38
1.4.4 Mass size distribution.....	39
1.4.5 Impact of dust on ecosystem.....	41
1.4.6 Diversity of bacteria transported by Saharan dust.....	43
1.4.7 Diversity of bacteria transported by desert dust from other arid regions.....	45
1.4.8 Microbial colonization.....	47
1.4.9 Negative impact of dust transport on human and ecosystem health.....	49
1.5 Diversity of bacteria in Saharan soil.....	50
1.6 Statistical analyses to assess microbial diversity.....	52
2 MATERIALS AND METHODS.....	56
2.1 Sampling.....	59
2.2 Objects of the study.....	62
2.3 Sample treatments.....	62
2.4 Molecular-biological means.....	62
2.4.1 DNA extraction.....	62
2.4.2 RNA extraction.....	63
2.4.3 16S rRNA gene amplification.....	63
2.4.3.1 PCR (V3-V5 region of 16S rRNA gene).....	63
2.4.3.2 PCR (full-length of 16S rRNA gene).....	64
2.4.3.3 RT-PCR.....	64
2.4.3.4 PCR to detect presence and size of insert.....	64

2.4.4 Molecular cloning	65
2.4.5 Cell lysis	66
2.4.6 Amplified rDNA restriction analysis.....	66
2.4.7 Sequencing	67
2.5 Bioinformatical means.....	67
2.5.1 Nucleotide sequence analyses.....	67
2.5.2 Statistical analyses	68
2.5.2.1 Rarefaction analysis.....	68
2.5.2.2 Diversity indices	68
2.5.2.3 LIBSHUFF analysis	69
2.6 Identification of dust source areas	69
3 RESULTS AND DISCUSSION	70
3.1 Identification of dust source.....	73
3.2 Molecular-phylogenetic analysis of bacterial diversity	74
3.2.1 Diversity of bacteria in snow containing and non-containing Saharan dust: V3-V5 and full-length 16S rRNA gene clone libraries	75
3.2.1.1 Sample of snow containing Saharan dust from the June 2006 event.	79
3.2.1.2 Sample of snow containing Saharan dust from the May 2008 event.	83
3.2.1.3 Sample of snow containing Saharan dust from the May 2009 event.	85
3.2.1.4 Sample of snow containing no Saharan dust.....	86
3.2.2 Study of complementary samples by example of V3-V5 gene clone libraries.....	88
3.2.2.1 Sample of snow containing Saharan dust from the June 2008 event.	89
3.2.2.2 Sample of snow containing no Saharan dust (RNA study).....	91
3.2.2.3 Sample of Saharan dust collected in Grenoble	92
3.2.2.4 Sample of Saharan sand	93
3.3 Comparative study of microbial diversity in studied samples	95
3.3.1 Snow containing and non-containing Saharan dust: data from partial and full-length sequencing	95
3.3.2 Comparative study of all studied samples by example of V3-V5 gene clone libraries.....	101
3.3.3 Comparative study of bacterial diversity in snow: DNA vs. RNA.....	108
3.4 Snow-colonizing bacterial phylotypes.....	109
CONCLUSION AND PERSPECTIVES.....	119
REFERENCES	125
ANNEXES.....	159
AKNOWLEDGMENTS.....	174

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ

ЛГГОС (Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement) – Лаборатория гляциологии и геофизики окружающей среды (Университет Дж. Фурье, Франция)

ОЭМ (Microbial Ecology) – Отдел экологии микроорганизмов (Университет Лион 1, Франция)

БСР (Station Biologique de Roscoff) – Биологическая станция Роскофф (Франция)

ЛАС (Laboratoire Inter-universitaire des Systèmes Atmosphériques) – Лаборатория атмосферных систем (Институт П.-С. Лапласа, Франция)

SDm – Saharan dust on Mont Blanc (пыль Сахары на Монблане)

Dm – Dust on Mont Blanc (пыль “локального” происхождения на Монблане)

ПДРФ – полиформизм длин рестриктных фрагментов

ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель-электрофорез

НК – нуклеиновая кислота

УФ – ультрафиолетовое излучение

НФБ – некультивируемые формы бактерий

ПЦР – полимерзая цепная реакция

н.п. – нуклеотидных пар

БК – библиотека контаминантов, состоящая из нескольких баз данных контаминантов (холостая экстракция геномной ДНК, негативная ПЦР и пр.), созданная в ходе ранних исследований [Bulat et al., 2004] и постоянно пополняемая (в том числе в настоящем исследовании)

НА-филотипы (от “human associated”) – филотипы, показывающие $\geq 98\%$ сходства по нуклеотидной последовательности с микроорганизмами, входящими в состав микрофлоры человека

Филотип – группа клонов, сходных более чем на 98% по нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК и показывающих идентичный список наиболее родственных последовательностей из базы данных GenBank с использованием алгоритма BLAST

Доминантный филотип – филотип, представленный тремя и более клонами в библиотеке клонов

Покрытие клоновой библиотеки – показатель в %, рассчитываемый согласно формуле Гуд и показывающий уровень репрезентативности данной библиотеки

Неидентифицированные флотипы – флотипы, показывающие 90% и менее сходства по нуклеотидной последовательности с известными (опубликованными) таксонами

Ледник Монблан – один из ледников, а именно, Коль дю Дом (Col du Dome, 4250м над у.м.), входящий в систему ледников горного массива Монблан, Французские Альпы

Перенос пыли (или пыльная/песчаная буря) – процесс, в результате которого происходит перенос умеренным и сильным ветром большого количества пыли или песка, сопровождающийся значительным ухудшением видимости

Осаждение пыли – процесс оседания пылевых частиц на какую-либо поверхность в ходе мокрого (с осадками) или сухого осаждения (прямое осаждение)

Нахождение пыли – процесс нахождения пыли в снежном покрове от момента ее оседания на поверхность ледника и до извлечения в качестве образца

INTRODUCTION

Nowadays, frontiers for microbial life are continued to extend as a result of numerous molecular ecology studies of microbial communities and proceeding elaboration of techniques to detect life. High mountain and polar glacier snow fields, originally seen as sterile and harsh environments, have been recognized as highly diverse microbial community habitats (Sattler et al., 2008). Biological activity associated with algal-bacterial associations growing on snow and ice substantially lowers the albedo of the glacier surface (Thomas & Duval, 1995). Mountain snow bacterial loads have been reported to range from 0.02×10^3 cells/ml (Zhang et al., 2010a) to c. 4×10^5 cells/ml (Alfreider et al., 1996; Sattler et al., 2001; Segawa et al., 2005). Nevertheless, few studies have described the bacterial diversity in mountain glacial snowpack (Segawa et al., 2005; Liu et al., 2009; Gonzalez-Toril et al., 2009; Hervas & Casamayor, 2009; Zhang et al., 2010b). These studies demonstrated the correlation between the bacterial abundance, just as diversity, and concentration of mineral particles in snow.

The Sahara is known to be the largest source of dust (Moulin et al., 1997), which can be transported as far as the Caribbean (Griffin et al., 2001, 2003). Furthermore, the Saharan dust deposition at Mont Blanc glacier (French Alps) was shown to dominate other dust sources (De Angelis & Guidichet, 1991). Some of the airborne bacteria associated with Saharan dust are capable to develop in cold alpine lakes and appear to be an important source of neustonic bacteria (Reche et al., 2009; Hervas & Casamayor, 2009). Being deposited on a glacier surface, the dust may act as both a transporting vehicle and a source of nutrients and energy for microorganisms. Therefore, the snow microbiota of mountain glaciers is assumed to be formed mostly by microorganisms carried by dust transport.

Alpine snow and the Saharan desert are both featured by extreme conditions. Studies dealing with microbial diversity in such environments address the basic question of adaptation and evolution of life in cold/hot terrestrial habitats. Also, motivations to document the biodiversity in both alpine snow and desert are strong due to the potential application of extremophiles and their products in a broad range of industrial, agricultural and medical processes.

The main goal of this thesis is to assess the uncultured bacterial diversity in the snowpack of the Mont Blanc (MtBl) glacier containing Saharan dust deposited during four dust events over the period 2006–2009, by means of molecular phylogenetics (PCR, ribotyping and bacterial 16S rRNA gene sequencing). This goal was pursued via the following tasks:

1. A study of the bacterial diversity in MtBl snow samples containing Saharan dust differing in dust deposition time and preservation period (by the example of 4 Saharan dust events).

2. A study of the bacterial diversity in MtBl snow containing no Saharan dust, involving both DNA and RNA approaches (a control vs. Saharan dust).
3. A comparative study of the bacterial diversity associated with the Saharan dust depositions of the same dust event collected at low and high altitudes (a control vs. Saharan dust deposited on the glacier).
4. An assessment of the bacterial communities inhabiting the Saharan sand collected in Tunisia, as a proxy for the one of the probable regions of dust uplift (a control vs. dust transport from the Sahara to Alps).
5. A comparative study of the bacterial diversity among the following samples: snow containing Saharan dust, snow containing no Saharan dust, Saharan dust deposited in Grenoble and Saharan sand.
6. An evaluation of the contribution of the airborne bacteria associated with Saharan dust to the formation of snow microbiota under conditions of the MtBl glacier.
7. An evaluation of the efficiency of the two different PCR primers, used to generate V3-V5 partial against nearly full-length 16S rRNA gene sequences, to estimate the bacterial richness, diversity and composition.

This manuscript presents a result obtained during my Ph.D. study in the frame of the Franco-Russian program GDRE “Vostok” as a “co-tutelle” project between Université Joseph Fourier (UJF, Grenoble, France) and Petersburg Nuclear Physics Institute of Russian Academy of Sciences (PNPI RAS, Gatchina, Russia). According to the agreement of “co-tutelle”, the abstract of this thesis is written in Russian, French and English. The summary of each chapter including Introduction, Conclusion and Acknowledgments are written in Russian and English.

Chapter 1 or the “General Introduction” outlines the scientific background of this research. It presents the state-of-the-art of the knowledge on bacterial diversity in mountain and polar glacier snowpacks, bacteria associated with Saharan dust and statistics applied in molecular microbial ecology. Chapter 1 is aimed to explain why it is important to study such a subject as bacteria in mountain snow.

The main techniques and approaches used in this study are described in Chapter 2: “Materials and Methods”. Briefly, it consist of the parts dedicated to the sampling, sample treatments, molecular-biological means, bioinformatical means and identification of the dust origin based on back-trajectory simulations.

Chapter 3 (“Results and Discussion”) presents the main results of my Ph.D. study and their discussion. This chapter contains 4 parts. It begins with a data on possible origin of Saharan dust in the MtBl snow (part 3.1). The second part (3.2) is divided in two sub-parts. First of them (3.2.1) describes the data on bacterial diversity in snow containing Saharan dust and in “clean” snow that

were obtained by V3-V5 and full-length 16S rRNA gene sequencing. In part 3.2.2, bacterial diversity in the complementary studied samples (snow containing Saharan dust of the June 2008 event, Saharan dust collected in Grenoble and Saharan sand) is described based on data derived from the V3-V5 clone libraries. It also includes the RNA data obtained for snow containing no Saharan dust. The results of comparative analysis of bacterial diversity in snow samples containing dust of different sources (Saharan vs. non Saharan), as data derived from the V3-V5 and full-length clone libraries, are presented in the part 3.3.1. Part 3.3.2 further explores the bacterial diversity in snow samples in comparison with the complementary studied samples. This based on data derived only from the V3-V5 clone libraries. In part 3.3.3, we compared the DNA and RNA-based clone libraries derived from the snow sample containing no Saharan dust. Finally, the last part of Chapter 3 (3.4) focuses on the survival/colonization abilities of bacterial phylotypes that have been identified in the dusty snow samples. This issue was evaluated through comprehensive consideration of the closest relatives of these phylotypes in GenBank based on two criteria: strain physiology and closest relative source.

The general conclusion and perspectives of this thesis are presented at the end of the manuscript following by the short list of the main conclusions, References, Annexes and Acknowledgments.

Актуальность проблемы

В настоящее время в результате молекулярно-экологических исследований микробных сообществ представления о границах жизни продолжают расширяться [Нетрусов и др., 2004]. Ранее считавшийся практически стерильным снежный покров высокогорных и полярных ледников (в основном на окраинах) оказался пригодным для жизни целого ряда микроорганизмов [Sattler et al., 2008]. Развитие сообществ водорослей и бактерий в снежном покрове может приводить к существенному снижению альбедо поверхности ледников [например, Thomas & Duval, 1995; Takeuchi et al., 2001]. Общая численность микроорганизмов снежного покрова высокогорья варьирует от $0,02 \times 10^3$ кл/мл [Zhang et al., 2010a] до 4×10^5 кл/мл [Alfreider et al., 1996; Sattler et al., 2001; Segawa et al., 2005]. Однако изучению микробного разнообразия поверхностного снега высокогорных ледников посвящены единичные работы [Segawa et al., 2005; Liu et al., 2009a; Gonzalez-Toril et al., 2009; Zhang et al., 2010b]. В них показана корреляция, как численности, так и разнообразия прокариот с концентрацией пыли, осаждаемой на ледник.

Известно, что крупнейшим источником почвенной пыли в атмосфере является пустыня Сахара [Moulin et al., 1997]. Поднятие больших масс пыли способствует переносу микробиоты на значительные расстояния, приводя также к распространению микроорганизмов, патогенных по отношению к растениям, животным и человеку [Kellogg & Griffin, 2006]. Показано, что доля условно-патогенных для человека микроорганизмов в пыли может составлять от 10 до 27% [Griffin et al., 2001; Kellogg et al., 2004]. Массовая гибель кораллов в Карибском море по причине аспергиллёза связана с присутствием возбудителя *Aspergillus sydowii* в пыли, переносимой из Северной Африки [Weir-Brush et al., 2004]. Кроме того, с пылью переносятся пыльца растений, эндотоксины, микотоксины и токсичные металлы. Воздействие пыли Сахары на различные экосистемы может распространяться вплоть до Северной Европы [Franzen et al., 1994], Амазонии [Swap et al., 1992] и Карибского моря [Griffin et al., 2001, 2003].

Органические компоненты пыли, а также железо и фосфор, могут служить источниками питательных веществ и энергии для микробных, в том числе гетеротрофных, сообществ [Herut et al., 2005; Pulido-Villena et al., 2008a]. Тридцатилетние аналитические исследования ледникового керна Монблана (Французские Альпы) показали, что повышенное содержание кальция во льду связано с регулярным переносом почвенной пыли из Северной Африки [De Angelis & Gaudichet, 1991]. Некоторые виды бактерий, перенесенные с пылью Сахары, способны развиваться в условиях холодных олиготрофных

альпийских озер и принимать участие в формировании популяции бактериоценоза [Reche et al., 2009; Hervás & Casamayor, 2009]. Осаждение пыли на горные ледники может вносить вклад в формирование микрофлоры снежного покрова за счет ее переноса с пылью. Снежный покров высокогорных ледников, как и пустыня Сахара, являются экстремальными для жизни экосистемами, микробное разнообразие которых представляет интерес, как с точки зрения фундаментальных проблем адаптации (эволюции) микрофлоры к холодным и горячим условиям существования, так и для практического применения. Поэтому, в связи с важностью роли пыли в экосистеме альпийских высокогорных ледников, формирование микрофлоры снежного покрова высокогорных ледников под влиянием пыли пустыни Сахары, остается малоизученным и представляется весьма актуальным.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было, с помощью методов молекулярно-филогенетического анализа (ПЦР, риботипирование и секвенирование бактериальных генов 16S рРНК), провести изучение микробного разнообразия снежного покрова ледника Монблан, содержащего почвенную пыль пустыни Сахары, на примере четырех событий переноса пыли на ледник.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучение бактериального разнообразия в образцах снежного покрова ледника Монблан, содержащих почвенную пыль Сахары разного времени переноса и нахождения в снежном покрове (4 события переноса пыли).
2. Изучение бактериального разнообразия в снежном покрове ледника Монблан, не содержащем пыль Сахары (дополнительно методами выделения и изучения рРНК) (контроль на почвенную пыль Сахары).
3. Сравнительное изучение бактериального разнообразия в образцах почвенной пыли Сахары после осаждения ее на разных высотах (снег высокогорного ледника и осаждение пыли в городе; одно и то же событие переноса пыли) (контроль на почвенную пыль Сахары, занесенную на ледник).
4. Изучение бактериального разнообразия в образце песчаной пустынной почвы Сахары, отобранной в одном из возможных регионов-источников пыли (контроль на перенос почвенной пыли Сахары из пустыни на ледник в Альпах).
5. Сравнение бактериального разнообразия образцов: снежного покрова ледника, содержащего и не содержащего почвенную пыль Сахары; пыли Сахары, собранной в Гренобле; песчаной почвы Сахары.

6. Оценка вклада микрофлоры, перенесенной с пылью пустыни Сахара, в формирование микрофлоры снежного покрова в условиях ледника Монблан.

7. Оценка эффективности праймерных систем, амплифицирующих в ПЦР разные области гена 16S рРНК (V3-V5 и полноразмерный ген), в изучении микробного разнообразия.

Научная новизна

Впервые методом секвенирования бактериальных генов 16S рРНК (полноразмерного гена и его V3-V5 области) показано различие состава микроорганизмов (как на уровне видов, так и разделов) снежного покрова ледника Монблан, содержащего пыль Сахары от событий переноса в 2006, 2008 (2 события) и 2009 гг. как между событиями, так и в сравнении со снегом, не содержащем пыль Сахары.

Впервые на основании сходства по нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК выявленных в работе филотипов с известными бактериями идентифицированы “холодолобивые” бактерии – кандидаты в формирование микрофлоры снежного покрова горных ледников.

Впервые путем анализа суммарной 16S рРНК, выделенной из снежного покрова ледника Монблан, не содержащего пыль Сахары, получены косвенные свидетельства метаболической активности при отрицательной температуре цианобактерии рода *Stigonema*.

Полученные в работе последовательности генов 16S рРНК депонированы в международную базу данных NCBI под номерами HM104591–HM104622, HQ396527–HQ396619, HQ402563–HQ402566, JF832298–JF832350.

Практическая значимость

Результаты настоящего исследования вносят вклад в представление о формировании микробных сообществ в снежном покрове высокогорных ледников в присутствии пыли Сахары. Привносит ли каждое событие переноса пыли одни и те же (повторяющиеся) филотипы или всякий раз новую микрофлору? Иными словами, существует ли единое ядро из общих филотипов в снежном покрове, содержащем пыль пустыни Сахара?

Кроме того, результаты сравнительного анализа микробного разнообразия снежного покрова при наличии или отсутствии пыли Сахары, важны для понимания того, насколько именно пыль Сахары влияет на формирование микробных сообществ снежного покрова ледников.

В фундаментальном плане изучение микробного разнообразия снежного покрова высокогорных ледников позволяет очертить лимитирующие жизнь границы и факторы, среди которых – доступность воды при отрицательной температуре. С практической точки

зрения данное исследование позволяет выявить новые холодолюбивые экстремофилы, представляющих интерес для биотехнологии. Обнаруженные неидентифицированные микроорганизмы представляют новые неизвестные виды прокариот (“microbiota incognita”), расширяя наши представления о микробном разнообразии. Наконец, результаты данной работы закладывают основу для последующих сравнительных исследований микроорганизмов снежного покрова ледников высокогорья, а также почвы пустыни Сахара.

Апробация работы

Основные материалы работы были представлены на международных и российских конференциях и симпозиумах: 13-ой и 14-ой Пущинских конференциях молодых ученых “Биология-наука 21-го века” (Пущино, 2009, 2010); SCAR/IASC IPY Open Science Conference “Polar Research - Arctic and Antarctic Perspectives in the International Polar Year”(Санкт-Петербург, 2008); Interdisciplinary Congress “Interactions between the physico-chemical processes and microbiological processes in the environment” (Aubière, France, 2008); ежегодной конференции молодых ученых ОМРБ ПИЯФ им. Б.П.Константинова РАН (Гатчина, 2009, 2011); European Geosciences Union General Assembly (Vienna, Austria, 2009, 2010); Российско-французском семинаре по проблемам изучения ледяных кернов, палеоклимата и подледникового озера Восток (Антарктида) (Grenoble, Brest, Lyon, France; Санкт-Петербург, 2008, 2009, 2010); Гляциологическом симпозиуме “Лёд и снег в климатической системе” (Казань, 2010); VI Молодежной школе-конференции с международным участием “Актуальные аспекты современной микробиологии” (Москва, 2010).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и 7 тезисов.

Место проведения работы и сотрудничество

Молекулярно-биологическая часть работы выполнена в лаборатории генетики эукариот Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Гатчина (зав., д.б.н. В.Г. Королев), а также в лаборатории адаптации и патогенеза микроорганизмов (зав. M.F. Cesbron Delauw, Университет Дж. Фурье, Франция) под руководством к.б.н. С.А. Булата. Процедуры подготовки пробоотбора и последующей обработки образцов снега (плавление, концентрирование и пр.) проводили в сертифицированных по чистоте помещениях (класса 10000 с ламинаром класса 100) Лаборатории гляциологии и геофизики окружающей среды (Университет Дж. Фурье, Франция).

Образцы поверхностного снега собраны согласно предоставленным инструкциям со всеми предосторожностями против возможной контаминации сотрудниками ЛГГОС: М. Debret, E. Le Meur, B. Jourdain, D. Six и С. Vincent. Образец песчаной пустынной почвы Сахары предоставлен сотрудником университета Лион 1, Отдела экологии микроорганизмов (ОЭМ, Франция) Р. Normand. Образец пыли пустыни Сахара, осажденной в г. Гренобль, собран и предоставлен С.А. Булатом и J.R. Petit (ЛГГОС, Франция).

Бактериальные клеточные концентрации определены методом проточной цитофлуориметрии D. Marie на биологической станции в Роскоффе, БСР, (Франция) как описано ранее [Alekhina et al., 2007].

Культивирование микроорганизмов из образцов почвенной пыли Сахары, извлеченной из снежного покрова, выполнено Р. Fournier (ОЭМ, Франция).

Определение минералогического состава образцов почвенной пыли и песчанной почвы пустыни проведено методом рентгеновской флуоресценции сотрудниками лаборатории атмосферных систем (ЛАС, Франция) Р. Formenti и S. Chevaillier. Подсчет частиц пыли и определение их объемного распределения по размерам в исследуемых образцах проведено методом регистрации электрических импульсов на счетчике Coulter J.R. Petit (ЛГГОС, Франция). Моделирование процесса переноса пыли Сахары воздушными массами с помощью метода обратных траекторий выполнено автором при содействии Н. Galee и S. Preunkert (ЛГГОС, Франция).

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта ANR-07-Blan-0223-Lac Vostok.

SUMMARY OF THE CHAPTER 1: GENERAL INTRODUCTION

By definition the cryosphere is one of the Earth's spheres distinguished by the presence of water in the solid or super-cooled state (Miteva, 2008). Life in such conditions always seemed to be a paradox, but apparently frontiers for microbial life are extended with proceeding elaboration of techniques to detect life (Sattler et al., 2008). A diverse range of microbes have been discovered in cold environments and include representatives of the *Bacteria*, *Eucarya* and *Archaea*. In part 1.1, cryosphere is presented as one of the habitable ecosystems of Earth's biosphere – cryobiosphere.

Large areas in polar and alpine regions are seasonally or perennially covered in snow, and may therefore appear abiotic at first glance (Stibal et al., 2006). The physical properties of the snow that make it suitable for life are summarized in part 1.2.

Well-developed microbial assemblages have been found in various snow environments around the world. In part 1.3, microbial diversity found in polar and mountain snowpacks is presented in connection with dust and water availability. It is assumed that if liquid water and debris are present on a glacier surface, active microbial metabolism can be expected (Stibal et al., 2006). For example, in snow of inland East Antarctica (near Vostok station) where is only 15 ppb of mineral dust observed and mean annual temperature is $-55,4^{\circ}\text{C}$ (hence, no water available), the cells concentrations close to zero cell counts (0.02 cells/ml; Bulat et al., 2009). In comparison, bacterial concentrations in mountain snow have been reported to range from 0.02×10^3 cells/ml (Zhang et al., 2010a) to c. 4×10^5 cells/ml (Alfreider et al., 1996; Segawa et al., 2005). Cell concentrations were shown to positively correlate with the density of mineral particles in snow (Segawa et al., 2005). The link between aeolian dust deposition and microbial community structures has been shown also in terrestrial glacier ice. Some authors suggested that the microbiological records preserved in ice core are useful marker for reconstruction of past climatic and environmental changes.

Part 1.4 discusses mainly the role of Saharan dust in global dispersion of bacteria. The Sahara is the most important natural source of dust that can be transported across the Mediterranean towards the Alpine region several times a year (Sodemmann et al., 2006; Fig. 1). Identification of source areas for specific long-range transport events can be made using back-trajectory analysis, the mineral content of dust (See Annex 1 for the examples) or particle size distribution (Fig. 2). In addition to serving as a source of nutrients for aquatic and terrestrial microorganisms and plant life, dust storms can also deposit soil-associated pollutants (chemicals, metals, etc.) and microbes to downwind ecosystems. The role of dust in ecosystem is summarized in Fig. 3. Many species of bacteria associated with Saharan dust events are pathogenic to humans, animals and plants (See Annex 2 for the examples). A few studies have been conducted on the effect of dust-borne bacteria

inputs on autochthonous community structure and its ecological consequences (See Hervás & Casamayor, 2009; Reche et al., 2009; Lekunberri et al., 2010; Perfumo & Marchant, 2010). Overall, the dust events create an atmospheric bridge between distant geographical regions and therefore have a role in expanding the biogeographical pattern of some organisms.

In order to elucidate the dynamics of dust-borne microorganisms, an understanding of the soil microbial community structure and its geographical variability as well as its abundance in the dust source region is essential (part 1.5). Bacterial diversity of the Saharan desert soil is still poorly described in the literature.

Part 1.6 focuses on a key component of many current ecological studies that is the documentation and comparison of biodiversity patterns in the environment. Ecologists studying the diversity of macroorganisms have developed a range of diversity indices and statistics to document and analyze environmental diversity patterns (Hughes & Bohannan, 2004). The most frequently occurring indices in the scientific reports of microbial diversity are Chao 1 and Shannon-Weaver, yet both have some limitations. Since the molecular cloning and sequencing are commonly used to describe the diversity in natural microbial communities, it is important to know whether the sampling effort was sufficient to estimate diversity. This can be addressed by the Good coverage estimation and rarefaction analysis. To compare further the community composition among different samples the LIBSHUFF analysis can be used. Intensive surveys of microbial diversity in the past decade are strongly demanded researchers to include the ecological statistic calculations.

Based on above knowledge, we studied the bacterial diversity in the snowpack of the Mont Blanc glacier containing Saharan dust deposited during four dust events over the period 2006 – 2009. In addition, our study included the following samples: the MtBl “clean” snowpack containing no Saharan dust, Saharan dust collected in Grenoble (a city in vicinity of MtBl) and Saharan sand collected in Tunisia. We also investigated the possible microbial activity *in situ* using both rDNA and rRNA approaches for the “clean” MtBl snowpack.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микроорганизмы в криобиосфере – факты и гипотезы

Согласно определению, данному в Гляциологическом словаре 1984, *криосфера* представляет собой оболочку Земли неправильной формы в области взаимодействия атмосферы, гидросферы и литосферы, отличающаяся отрицательной или нулевой температурой и наличием воды в твердой фазе или переохлажденном состоянии. Границы криосферы уходят в глубь Антарктического ледового щита на 3 – 4 км и поднимаются вверх в атмосферу до высоты 100 км, где регулярно образуются серебристые облака [Котляков, 1994]. Характерным признаком криосферы является лед. Ледяные образования включают систему ледяных облаков, снежный покров, сезонномерзлые почвы и горные породы, сезонный и многолетний ледяной покров водоемов, наледи, горные ледники и ледниковые покровы, подземные льды [Котляков, 1994]. Подсчитано, что в современную эпоху общие запасы льдов на Земле составляют более 30 млн. км³, т.е. почти две трети пресных вод на планете [Котляков, 1986].

Возможность жизни в таких условиях всегда казалась парадоксальной, но с появлением и усовершенствованием методов молекулярной биологии, представления о границах жизни значительно расширились [Sattler et al., 2008; Нетрусов и др., 2004]. Разнообразные микроорганизмы, представляющие основные домены жизни: *Bacteria*, *Eucarya* и *Archaea* – были обнаружены в холодных местообитаниях [см. обзоры Cavicchioli et al., 2002; Priscu & Christner, 2004; Tindall, 2004; Steven et al., 2006; Miteva, 2008]. Большинство из них относятся к психрофильным или психротолерантным (иначе психротрофным) организмам. Первые растут при температурах ниже 20 °C (оптимум ниже 15 °C), тогда как вторые, также растущие при 0 °C, имеют более высокие значения оптимальной температуры роста (25 – 30 °C) [Нетрусов и др., 2004]. Культивирование психрофильных микроорганизмов весьма трудная задача, так как большая часть развивается крайне медленно. Кроме того, клетка может находиться в поврежденном или состоянии покоя, или просто не расти на используемой среде [Miteva, 2008]. Однако на сегодняшний день известно достаточно много успешных примеров выделения в культуры микроорганизмов из различных холодных местообитаний, принадлежащих в основном к спорообразующим и неспорообразующим грамположительным бактериям, *Proteobacteria* и *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides* [см. например, Christner, 2002; Junge et al., 2002; Zhang et al., 2002; Miteva et al., 2004; Foght et al., 2004; Xiang et al., 2005]. Как правило, выделенные бактерии относятся к родам *Arthrobacter*, *Frigoribacterium*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*,

Acinetobacter, *Janthinobacterium*, *Chryseobacterium* [Miteva, 2008]. Возможность культивирования микроорганизмов позволила в первую очередь изучить и понять механизмы их адаптации к жизнедеятельности при отрицательных температурах. Показано, что приспособления к пониженной температуре у микроорганизмов проявляются в виде: увеличения доли ненасыщенных жирных кислот в составе цитоплазматических мембран; более низких температурных оптимумов активности ферментов; экспрессии белков холодового шока; накопления антифризовых белков и криопротекторов, например, трегалозы и экзополисахаридов; синтеза каротиноидов; мультипликации генов оксидоредуктазных ферментов [см. обзоры: Deming, 2002; Georlette et al., 2004; Morgan-Kiss et al., 2006; D'Amico et al., 2006; Feller, 2007; Bakermans, 2008; Shivaji & Prakash, 2010]. Длительное сохранение микроорганизмов в состоянии покоя (дормантном состоянии) было открыто во льду Антарктиды и в вечной мерзлоте [Абызов и др., 1979; Soina & Vorobyova, 1996; Vorobyova et al., 1996]. По мнению [Price & Sowers, 2004] когда клетка входит в состояние покоя, ее метаболизм полностью переключается на процессы репарации молекулярных повреждений генома и, по сути, организм становится “бессмертным” [Price, 2009].

Достаточно давно известно, что культивированию поддается только около 0,1% (на сегодняшний день 1 – 2% [Gewin, 2006]) всего микробного разнообразия и большая часть находится в состоянии “некультивируемой формы бактерий” (НФБ) [Amann et al., 1995; Colwell et al., 1985]. Следовательно, состав микробных сообществ не может быть достоверно описан без применения независимых от культивирования методов, таких как современные методы рибосомной ДНК филогенетики, FISH-технологии, ДНК гибридизации с функциональными зондами, ДНК-фингерпринтинга, ПЦР в реальном времени и метагеномики. В изучении микроорганизмов, населяющих криосферу, молекулярные методы внесли, несомненно, огромный вклад. Во-первых, благодаря молекулярным методам, а точнее молекулярному клонированию, стала возможной работа с образцами, характеризующимися малой биомассой. Так, например, в озерном льде подледникового озера Восток в Антарктиде на глубине 3607 м была обнаружена ДНК термофильной бактерии *Hydrogenophilus thermoluteolus*, при этом подсчитано, что количество клеток во льду составляет не более 19 кл/мл [Булат и др., 2009]. Во-вторых, изучение микробного разнообразия методами молекулярной филогенетики в разных географических зонах подтвердило и расширило представления о космополитном распространении отдельных филогенетических линий [Нетрусов и др., 2004]. Например, представители рода *Massilia* были обнаружены в осадочных породах арктических ледников, красном снеге Антарктиды и тропосферных облаках [Reddy et al., 2009; Cheng & Foght, 2007; Amato et al., 2007a; Fujii et

al., 2010]. И, наконец, расширение представлений о микробном разнообразии холодных местообитаний путем использования молекулярных методов также вносит вклад в понимание функционирования этих экосистем. Недавно с использованием технологии пиросеквенирования на примере изучения филогенетического разнообразия микроорганизмов во льду горного ледника Северный Шнефернер (Германия) показано, что метаболический потенциал данной экосистемы включает автотрофию, аэробный и анаэробный способы дыхания и психрофильный образ жизни [Simon et al., 2009]. Однако, не стоит забывать, что молекулярно-биологические методы не лишены известных ограничений и только комплексные исследования, совмещающие в себе традиционный и современный подходы, наиболее полно и достоверно могут отобразить разнообразие прокариот в природных сообществах.

Рассмотренная нами литература свидетельствует о том, что криосфера – это не только важная составляющая глобальной климатической системы, но также одна из обитаемых составляющих биосферы Земли, которую все чаще называют “криобиосферой”. Изучение микробного разнообразия в условиях отрицательных температур вносит вклад в понимание механизмов адаптации клетки к холоду, временных пределов сохранения жизни и определения границ ее функционирования, в том числе и на других планетах. Ледяные образования земной криосферы служат аналогами криогенных систем Марса и спутника Юпитера – Европы, которые рассматриваются как объекты нашей Солнечной системы, где могла, или может существовать жизнь [Baker, 2001; Chyba & Phillips, 2002]. Открытие присутствия воды на Луне в 2009 г. [Lucey, 2009] делает все более близкими по времени перспективы изучения образцов льда внеземного происхождения. В более практическом отношении подобные исследования способствуют поиску новых биологически активных соединений для биотехнологии, самыми востребованными из которых являются ферменты активные при отрицательных температурах [Deming, 2002]. Использование таких ферментов в промышленности значительно снижает себестоимость процессов, требующих в норме дополнительного подогрева (подробнее об областях применения холодоустойчивых ферментов см. Cavicchioli et al., 2002). В условиях глобального изменения климата на планете необходимо понимать экологические последствия влияния этого процесса на разнообразие и функционирование микробных сообществ [Clarke et al., 2007]. По мнению Rogers с соавторами [2004] таяние ледников может привести к освобождению древних патогенных микроорганизмов и обмену их генетической информацией с современными видами.

1.2 Снежный покров: одна из экстремальных ниш микробной жизни

Снежный покров – самый распространенный вид природного льда, покрывающий ежегодно от 100 до 126 млн. км² территории Земли, включая сушу и морской лед [Котляков, 1986; Гляциологический словарь, 1984]. Источником снежного покрова служат твердые атмосферные осадки в виде ледяных кристаллов (снежинок), выпадающих из многих видов облаков и сохраняющиеся на земной поверхности при отрицательных температурах воздуха [Гляциологический словарь, 1984]. Формирование снежных осадков в атмосфере зависит главным образом от температуры окружающей среды и наличия переохлажденной воды. При температуре около -5 °С ядра кристаллизации (аэрозольные частицы размером 0,1 – 1 мкм), присутствующие в атмосфере, формируют в процессе льдообразования мельчайшие кристаллы льда. Такой тип кристаллизации называют гетерогенным, в отличие от гомогенной или спонтанной кристаллизации, происходящей при температуре ниже -40 °С в отсутствии ядер кристаллизации [Снег. Справочник, 1986]. В атмосфере льдообразование обычно происходит с участием ядер кристаллизации (“ice nuclei”), источниками которых могут быть частицы почв, минеральной пыли, пыльца, споры растений, вулканический пепел, микроскопические грибы и бактерии [Kuhn, 2001; Morris et al., 2004]. Одним из самых известных организмов, обладающих активностью ядер кристаллизации, является фитопатогенная бактерия *Pseudomonas syringae* [Morris et al., 2004]. Недавно в работе [Pratt et al., 2009] были получены непосредственные доказательства участия частиц биологического происхождения в процессе льдообразования путем измерения ядер-кристаллизирующей активности *in situ* в реальном времени с помощью масс-спектрометра, установленного на борту воздушного судна. Кроме того авторами показано, что вклад частиц минеральной пыли в составе ядер кристаллизации представляет 50%, а частиц биологического происхождения – 33% [Pratt et al., 2009].

Процесс выпадения снега в дальнейшем сопровождается изменениями его свойств (толщины, плотности, температуры, твердости и т.д.) в пространстве и времени. В результате снежный покров приобретает слоистое строение, оседает, уплотняется, и в нем происходят процессы сублимационной перекристаллизации – превращения снежинок в бесформенные зерна разной величины [Гляциологический словарь, 1984]. Проводя аналогию с почвой, снежный покров можно рассматривать как каркас, состоящий из твердых частиц и окружающих пустот или пор разного размера, которые могут быть заполнены воздухом или жидкой водой. На поверхности горных ледников в условиях повышенного снегонакопления и длительного залегания снежного покрова, наличие взаимодействующих пор отмечается до глубины 10 – 15 м, до границы превращения снега в фирн [Богородский и Гаврило, 1980].

Выпадение снега способствует удалению различного диспергированного материала из атмосферы, включая аэрозоли и неорганические ионы, включая молекулы газов разного изотопного состава [Снег. Справочник, 1986]. Концентрация аэрозолей в снежном покрове варьирует от 0,1 мд. по весу в центральной Антарктиде до 0,037% по весу в снежном покрове горных ледников вследствие периодического осаждения большого количества почвенной пыли [Domine et al., 2008; Painter et al., 2007]. Концентрация примесей в снеге зависит главным образом от интенсивности их выпадения, скорости аккумуляции снега, климатических условий, химии атмосферы, проницаемости и структуры поверхности снежного покрова [Гляциологический словарь, 1984; Domine et al., 2008]. Таким образом, снежный покров представляет собой не только важный гидрологический резервуар, но и резервуар питательных веществ (основные из которых SO_4^{2-} , NH_4^+ , NO_3^- , Ca^{2+} , Cl^- и Na^+) в виде газов, органических веществ, минеральной пыли, частиц морской соли и частиц биологического происхождения [Kuhn, 2001; Daly & Wania, 2004]. С началом индустриальной эпохи человечества снежный покров горных ледников является важным индикатором экологического состояния регионов [Preunkert et al., 2001a]. Благодаря действию различных физических факторов (скорости ветра, метаморфизма снежного покрова, характера осаждения) распределение питательных веществ в толще снежного покрова оказывается неоднородным [Hodson et al., 2008; Kuhn, 2001]. В основном снежный покров обогащается примесями в ходе их вымывания снегом из атмосферы. Однако, этот процесс может также происходить в результате выноса частиц снегом или дождем, их столкновения с объектами, возвышающимися над поверхностью земли или в ходе седиментации (только при размере частиц более 10 – 20 мкм) [Снег. Справочник, 1986]. Химические примеси обеспечивают существование на поверхности кристаллов снега пленки жидкого рассола, в котором концентрируются ионы веществ, выталкиваемые туда в процессе замерзания воды. Таяние снега начинается уже при температуре ниже 0 °C в присутствии небольшого количества солей и достаточного уровня солнечной радиации [Гляциологический словарь, 1984; Kuhn, 1987]. Смена циклов таяния и замерзания в снежной толще приводит к перераспределению веществ по вертикальному профилю – происходит обогащение нижних слоев снежного покрова [Гляциологический словарь, 1984; Kuhn, 2001]. Со временем подобные физические процессы, а также фотохимические реакции, диффузия газов, гидролиз, а также биологическая активность способствуют химической трансформации состава снега. Известно, что степень ультрафиолетового излучения значительно возрастает с поднятием над уровнем моря: выше 3000 м уровень УФ излучения может быть на 30% выше по сравнению с уровнем моря [Blumthaler et al., 1992]. Проникновение видимой и ультрафиолетовой части спектра, способных вызывать

фотохимические реакции в снежном покрове отмечается, как правило, до глубины 20 см для большинства климатических зон и до 8 см в горах [Domine et al., 2008; Simpson et al., 2000]. В результате преобразования прямого излучения в рассеянное в верхних слоях снежного покрова, уровень проникающей радиации оказывается достаточно высоким, чтобы вызвать нарушения ДНК и клеточных мембран, ингибирование фотосинтеза и образование активных форм кислорода [Grannas et al., 2007; Gorton et al., 2001; Gorton & Vogelmann, 2003]. Однако, присутствие гетерогенного материала, а также воздушных пузырьков на поверхности и в толще снега, могут значительно снижать уровень радиации [Cockell et al., 2003]. Подобный эффект в широких масштабах может быть обусловлен выпадением на снежный покров горных ледников почвенной пыли, переносимой из аридных регионов. Как было отмечено выше, это также приводит к значительному увеличению концентрации примесей, а, следовательно, к обогащению химического состава снега соответствующими питательными веществами. В горах благодаря повышенному снегонакоплению и незначительному таянию в течение лета, выпавший снег довольно быстро проходит стадию метаморфизма в фирн, таким образом, вся информация на момент его осаждения оказывается “записанной” в виде последовательности слоев, хорошо различимых в фирновом или ледниковом керне [см. обзор Schwikowski & Eichler, 2010]. Изотопный состав льда и примесей в нем используются для абсолютного датирования слоев и восстановления климатических условий его образования [Гляциологический словарь, 1984]. Таким образом, горные ледники – это натуральные архивы химического состояния окружающей среды. Так, расшифровка химической записи 70 м ледникового керна Монблана (Французские Альпы) за последние тридцать лет (с 1955 по 1985 гг.) выявила значительное содержание кальция, которое обусловлено, по мнению авторов работы, скорее всего, регулярным переносом почвенной пыли из Северной Африки [De Angelis & Gaudichet, 1991]. В дальнейшем эти данные были подтверждены анализом 126 м ледникового керна Монблана (датировка около 1919 – 1994 гг.), в ходе которого было установлено присутствие 98 летних и 4-х зимних слоев соответствующих осаждению пыли Сахары [Preunkert et al., 2001b]. Периодические события переноса пыли приводят к появлению “щелочного” снега в Альпах, а также к повышению концентрации сульфатов и в меньшей степени нитратов [Maupetit et al., 1995]. Основные источники пыли согласно исследованиям, проведенным на нескольких альпийских станциях, расположены в Северной Африке, а именно, в Алжире, Ливии, Марокко и Тунисе [Schwikowski et al., 1995; Collaud et al., 2004; Sodemann et al., 2006]. В связи с тем, что объем переносимой из Сахары в Европу пыли составляет около 80 – 120 млн. тонн в год [D’Almeida, 1986], подобные события значимо влияют на состав и концентрацию

содержащихся в снежном покрове веществ, но и, в целом, - на функционирование ледниковой экосистемы.

Свет, жидкая вода (зависит от температуры) и наличие питательных веществ, во многом, определяют характеристики снежного покрова горных ледников как среды обитания. Живые организмы участвуют в основных биогеохимических циклах, имеющих место в снежном покрове. На сегодняшний день известно, что для снежного покрова горных ледников характерны такие процессы, как фотосинтез и гетеротрофия [см. например Kohshima, 1984; Takeuchi, 2001; Segawa et al., 2005; Uetake et al., 2006]. Жизнедеятельность водорослей и микроорганизмов, развивающихся на ледниках, приводит к изменению структуры снежной толщи, удлинению срока существования криоконитов, дополнительному протаиванию снега за счет процессов дыхания и снижения альбедо, что в целом отражается на общем балансе массы ледников [Thomas & Duval, 1995; Takeuchi et al., 2001; Hodson et al., 2010]. Последние исследования показали участие бактерий в биodeградации соединений ртути на примере арктического снежного покрова [Larose, 2010]. Недавно Amoroso с соавторами [2010] обнаружили эмиссию газов NO, NO₂, HONO и необычно высокую концентрацию ионов NO₂⁻ в снежном покрове Арктики, регистрируемых на протяжении полярной ночи с февраля по март. Авторы утверждают, что данное явление, скорее всего, связано с деятельностью нитрифицирующих бактерий, на что могут указывать также данные изотопного состава газов [Amoroso et al., 2010]. Следовательно, снежный покров – это не только активный фотохимический, но и биогеохимический реактор, играющий важную роль в процессах функционирования ледниковых экосистем [Amoroso et al., 2010; Larose, 2010].

1.3 Микробное разнообразие снежного покрова ледников

1.3.1 Физико-химические факторы, контролирующие микробную жизнь в снежном покрове ледников

Огромные площади полярных областей и высокогорных районов, постоянно или сезонно покрытые снегом, на первый взгляд кажутся абсолютно безжизненными. Однако, находятся микроорганизмы способные расти и в этих экстремальных условиях [Stibal et al., 2007].

Считается, что в условиях доступа жидкой воды и различного наносного материала на поверхности ледника, можно ожидать активное развитие микрофлоры [Stibal et al., 2006]. Значения активности воды (a_w), характеризующие ее доступность, при которых возможен рост микроорганизмов, составляют от 0,99 до менее 0,7 [Нетрусов и др., 2004]. Однако, на

основании наименьшей известной оценки $a_w(0,62)$, необходимой для роста микроорганизмов [Harris, 1981], и с учетом дополнительного резерва возможностей микроорганизмов, пороговое значение a_w приравнено к 0,5 [MERAG, 2006]. Одной из причин уменьшения активности воды является понижение температуры до точки замерзания (0°C), но, несмотря на это, существует множество физических механизмов (например, депрессия точки замерзания, отсутствие ядер конденсации, эффект упорядоченности, давление), а также присутствие химических примесей (в основном солей), позволяющих поддерживать жидкую фазу воды в почве, морском и ледниковом льде при температурах от -20 до -56°C [Price, 2000; Jakosky et al., 2003; Bock & Eicken, 2005]. Считается, что большинство холодных местообитаний имеют значения активности воды выше известного минимума (0,62), но при этом нижний температурный предел размножения микроорганизмов на сегодняшний день находится на отметке ниже -20°C [MERAG, 2006].

Одним из лимитирующих рост микроорганизмов факторов в снежном покрове и в условиях ледника является также дефицит фосфора и органического углерода [Mindl et al., 2007; Stibal et al., 2008b]. Первичными источниками обоих элементов служат аэрозольные частицы, поступающие из атмосферы [Stibal et al., 2008a, 2008b]. Первичными продуцентами на поверхности ледников являются фототрофные микроорганизмы (водоросли и цианобактерии), которые могут поддерживать рост гетеротрофных сообществ [Hoham & Duval, 2001; Takeuchi & Kohshima, 2004; Takeuchi et al., 2006]. Дополнительным источником может служить наносной материал из окружающего ландшафта ледника, например, горных пород, предледниковых и береговых заболоченных участков и почвы [Marshall & Chalmers 1997; Kastovska et al., 2007]. Важным источником как органических, так и неорганических элементов также является минеральная пыль и ассоциированные с ней биологический детрит и микробная биомасса [Takeuchi et al., 2001; Usher et al., 2003; Chadwick et al., 1999; Stibal et al., 2008a; Pearce et al., 2009]. Таким образом, субстрат необходимый для жизнедеятельности и размножения микроорганизмов в снежном покрове полярных и высокогорных ледников имеет литогенное и вторично-биогенное происхождение [Hodson et al., 2008, Stibal et al., 2008a, 2008b]. В работе [Stibal et al., 2008b] на примере одного из ледников Свальбарда (о. Шпицберген) показано, что уровень продукции органического вещества микробными сообществами намного ниже, чем уровень органических веществ и фосфора, поступающих извне. Следовательно, снежный покров в первую очередь является резервуаром, а не источником органического вещества [Stibal et al., 2008b].

Микробные клетки могут быть занесены на ледник с потоками воздуха и воды, как из локального окружения (осколки горных пород, растительность), так и более отдаленных регионов, прикрепленные к минеральным или органическим частицам [Davey et al., 1991;

Marshall & Chalmers, 1997]. Последние исследования показали, что частицы биологического происхождения размером менее 10 мкм, включая клетки бактерий, споры грибов и пыльцу могут составлять до 40% массы взвешенного органического углерода над поверхностью снежного покрова в горах [Wiedinmyer et al., 2009]. По мнению Stibal с соавторами [2006] все надледниковые (супрагляциальные) местообитания подвержены воздействию одного и того же пула микробных “propagules” (семян), развитие которых лимитировано вероятнее всего физико-химическими, а не пространственными факторами среды. Таким образом, различия в условиях надледниковых местообитаний (например, морен, кар или криоконитов) определяют различия в составе микробных сообществ [Stibal et al., 2006].

Тем не менее, пространственные факторы также могут играть важную роль в процессе формирования микрофлоры снежного покрова полярных и высокогорных ледников. Во-первых, количественный и качественный состав аэрозолей не одинаков в воздушных массах, пришедших из различных регионов земного шара, и обусловлен физико-географическими условиями районов формирования и прохождения воздушных масс [Атмосфера. Справочник, 1991; Диких, 2002]. Во-вторых, удаленность от континента играет важную роль в размере частиц, которые могут выпадать на снежный покров ледников – важна не столько общая концентрация поступающих в атмосферу аэрозолей, сколько доля частиц, достигающих ледников, которая зависит от их веса и высоты слоя перемешивания атмосферы. И, наконец, в-третьих, важную роль играет атмосферная циркуляция в районе ледников и другие метеорологические процессы, которые обладают кроме того временной изменчивостью [Диких, 2002].

В связи с этим, по-видимому, целесообразно различать два типа снежного покрова ледников с точки зрения возможности микробной жизни: снежный покров, характеризующийся практически отсутствием доступной воды (соответственно экстремально отрицательными температурами) и наносного материала и снежный покров, характеризующийся присутствием обоих факторов.

1.3.2 Микробное разнообразие снежного покрова полярных ледников

Снежной покров первого типа может быть найден в центральных областях антарктического континента, а именно на Восточно-Антарктическом ледниковом щите с высотами более 2000 – 3000 м [Аверьянова, 1990]. Здесь наиболее репрезентативной, с точки зрения географического положения и периода наблюдений, является российская станция Восток, расположенная на высоте 3488 м над у.м. Свойства снежного покрова Центральной Антарктиды формируются под воздействием таких факторов, как солнечная радиация,

температурный и ветровой режим приземного слоя воздуха, а также скорость накопления снега, которые определяют интенсивность процессов метаморфизма снежной толщи [Екайкин, 2003]. Вследствие большого количества ясных дней и благодаря полярному дню приходящая солнечная радиация в центральной Антарктиде очень велика и превышает таковую в экваториальной зоне Земли. В частности, в районе станции Восток годовая суммарная радиация составляет $4,6 \text{ ГДж м}^{-2}$ [Екайкин, 2003]. Согласно данным многолетних наблюдений, средняя многолетняя температура на станции Восток составляет $-55,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, средняя температура зимы равна $-66,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, а лета $-32,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ [Справочник по климату, 1977]. Годовая сумма осадков в районе станции Восток находится в пределах от 20 до 40 мм, а средняя многолетняя скорость накопления снега в районе станции составляет $2,2 \text{ г см}^{-2} \text{ год}^{-1}$ [Барков, Липенков, 1996].

Распределение частиц пыли, выпадающей в районе станции Восток, характеризуется средним диаметром частиц $\sim 2 \text{ мкм}$ [Petit et al, 1999], тогда как для большей части континента последнее значение составляет $\sim 5 \text{ мкм}$ [Delmonte et al., 2004]. Концентрация пыли известная для межледниковой эпохи составляет около 50 нг/г , в ледниковый период – $1000 - 2000 \text{ нг/г}$ [Petit et al., 1999]. В настоящее время основные источники пыли для Центральной Антарктиды и континента в целом расположены в Новой Зеландии, Сухой Долине (Антарктида), южной части Южной Америки и некоторых австралийских регионах (озеро Эйр) [Delmonte et al., 2004; Maher et al., 2010]. В районе станции Восток пыль приносится в основном из Южной Америки [Delmonte et al., 2004]. Вследствие ветрового режима Антарктиды, так называемого стокового или кatabатического ветра, весь наносной материал вместе с холодным воздухом стекает по склону ледникового покрова. Таким образом, условия для возможности существования микробной жизни в этой части континента представляются крайне экстремальными.

В 2000 году была опубликована работа [Carpenter et al., 2000], в которой сообщалось о присутствии значительной численности бактериальных популяций (от 200 до 5000 кл/мл талой воды) в снежном покрове и фирне в районе станции Амундсен-Скотт (Южный Полюс). Авторы сообщали о присутствии бактерий, родственных радиорезистентным *Deinococcus*, несмотря на то, что сходство по последовательности гена 16S рРНК составляло всего 86 – 87% [Carpenter et al., 2000]. Кроме того, экспериментальным путем была показана возможность синтеза ДНК и белков бактериями из снежного покрова Южного Полюса при температуре $-12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-17 \text{ }^{\circ}\text{C}$, откуда был сделан вывод о возможности метаболизма бактерий *in situ* на всей территории Антарктиды [Carpenter et al., 2000]. Тем не менее, три года спустя вышла критика в адрес основных результатов вышеупомянутой работы [Warren et al., 2003]. Критики отмечают, что бактерии, несомненно, присутствуют в снежном покрове Южного

Полюса вследствие возможного переноса с аэрозолями, но за пятнадцать лет они оказываются погребенными под слоем снега в 3 м, где среднегодовая температура близка к -50 °С. Даже при временном пребывании бактерий на поверхности, где доступная вода практически отсутствует, возможность метаболизма *in situ*, показанная в работе [Carpenter et al., 2000], категорически отрицается [Warren et al., 2003].

Недавно показано, что микробная численность поверхностного снега в районе станции Восток составляет от 0 до 0,02 кл/мл [Булат и др., 2009]. В эксперименте под названием МЕГА-СНЕГ авторами был максимально чисто собран и обработан снег в количестве до 10 кг с глубины 4 – 4,3 м и возрастом свыше 50 лет, т.е. до появления в этом месте человека. Кроме того, метод проточной цитофлуоресметрии также позволил определить содержание клеток в концентрированных образцах воды атмосферного и озерного льда типа 1 и 2 над подледниковым озером Восток, которое оказалось в пределах 0 – 24 кл/мл воды [Булат и др., 2009]. Полученные авторами данные на 2 – 3 порядка ниже, чем опубликованные ранее [Priscu et al., 1999; Karl et al., 1999], и свидетельствуют о крайне низкой биомассе, как в снежном покрове, так и во льду Центральной Восточной Антарктиды. В связи с этим подчеркивается важность строгой деконтаминации при отборе и последующей обработке образцов [Bulat et al., 2004; Булат и др., 2009].

Иная картина имеет место при рассмотрении микробного разнообразия снежного покрова побережья Антарктиды и прилегающих территорий, который может быть отнесен к снежному покрову второго типа.

Не смотря на то, что Антарктида – это самый отдаленный и изолированный континент [Pearce et al., 2009], его окраины и расположенные там полярные станции получают достаточно большое количество органического и неорганического вещества благодаря разнообразию форм жизни, населяющих эти районы, включая человека [Marshall, 1996; Sattler et al., 2008]. При изучении микрофлоры атмосферы на биологической станции о. Сайни (Юж. Оркнейские острова, Антарктика) зафиксирован аномальный по концентрации для этих мест перенос частиц биологического происхождения (пыльца, споры) из Южной Америки [Marshall, 1996]. В целом, довольно большое микробное разнообразие обнаруживается в прибрежных районах континента, как в почвенном [например, Saul et al., 2005; Aislabie et al., 2006; Adams et al., 2006; Yergeau et al., 2007; Soo et al., 2009], так и в снежном покрове [Fujii et al., 2010]. Микробная биомасса “красного снега”, встречающегося вдоль побережья Антарктиды из-за развития сообщества водорослей (например, *Chlamydomonas nivalis*), составляет от $5,8 \times 10^2$ до $3,2 \times 10^3$ кл/мл [Fujii et al., 2010]. Анализ генов 16S рРНК методами молекулярного клонирования и ДГГЭ показал доминирование бактерии рода *Hymenobacter* (раздел *Bacteroidetes*), а оставшаяся часть сообщества

представлена разделами *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Cyanobacteria* [Fujii et al., 2010]. Существует также целый ряд работ, посвященный изучению микробиоты антарктических озер, расположенных в оазисах или сухих долинах, где доминируют, в основном, цианобактериальные сообщества [Priscu et al., 1998; Psenner & Sattler; Taton et al., 2006; Laybourn-Parry & Pearce, 2007].

Что касается снежного покрова полярных ледников Северного полушария (Арктика и Гренландия), то он в своей прибрежной части (Гренландия) относится также ко второму типу. Во-первых, континенты, окружающие ледниковые щиты, расположены значительно ближе, чем в Антарктиде, а влияние морских и континентальных аэрозолей существенно даже для центральных областей [De Angelis et al., 1997]. Принос пыли в Гренландию в 10 раз выше, чем в Антарктиде, и основную фракцию составляют карбонатные соли [Steffensen, 1997]. Концентрация пыли в снежном покрове может достигать 150 мкг/л воды (Гренландия) [Bory et al., 2002]. Во-вторых, средняя скорость накопления снега составляет $23 \text{ г см}^{-2} \text{ год}^{-1}$ [купол Гренландии; De Angelis et al., 1997]. Но при этом средний диаметр частиц пыли, достигающих снежного покрова центральной части Гренландии (в настоящее время) сравним с Южным полюсом, и варьирует в пределах от 2 – 3 мкм [Steffensen, 1997]. Источниками континентальной пыли в Гренландии и Арктике являются пустыни Северного полушария, но основной вклад вносят пустыни Азии: Такла-Макан, Ордос и Тэнгэр [Svensson et al., 2000; Bory et al., 2003].

Наиболее известными образованиями, где сосредоточена основная часть микробиома снежного покрова полярных ледников Северного полушария, являются криоконитовые ямы. Под криоконитом понимают мельчайший пылеватый материал, образующийся в результате выветривания моренных отложений и скапливающийся на поверхности ледников и снежников [Гляциологический словарь, 1984]. Из-за относительно низкого альбедо в местах скопления криоконита происходит протаивание снега ледника и образование криоконитовых ям [Gajda, 1958]. В целом криоконитовые ямы характерны для всех ледников, где встречается поверхностное таяние, и ограничены, как правило, ледниковым краем области абляции [Hodson et al., 2008]. Различают три типа криоконитовых ям, формирующихся в результате изменения поверхностного теплового баланса ледников: открытые, погруженные и закрытые [Fountain et al., 2004]. Закрытый тип, встречающийся в Антарктиде, представляет особый интерес с позиции развития фотоавтотрофных процессов в условиях ограничения газового обмена (CO_2 и N_2) с атмосферой в течение десяти и более лет [Tranter et al., 2004; Fountain et al., 2004]. Разнообразие форм жизни криоконитовых ям намного богаче снежного покрова и представлено главным образом бактериями (цианобактерии и фитофлагелляты), микроскопическими водорослями и грибами [см. обзор Hodson et al. 2008]. Кроме того здесь

встречаются диатомеи, различные беспозвоночные (коловратки, нематоды) и вирусы [Stibal et al., 2006]. Численность микробных клеток достигает $3,5 \times 10^5$ кл/мг сухого вещества криоконита, среди которых доминируют клетки цианобактерий (в основном *Leptolyngbya*, *Phormidium* и *Nostoc*) [Stibal et al., 2006]. Молекулярный анализ микробного сообщества криоконитовых ям Антарктиды также выявил численное превосходство цианобактерий, но при этом показал присутствие других бактерий родов *Acidobacterium*, *Actinobacteria*, *Cytophagales*, *Gemmimonas*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* [Christner et al., 2003]. Согласно данным микроскопического анализа структура цианобактериальных сообществ различается для криоконитовых ям открытого и закрытого типов [Mueller & Pollard, 2004]. Интересно то, что уровень фотосинтеза в криоконитовых ямах сравним с таковым для полярных озер, где температура летом повышается до 15 °C [Sawstrom et al., 2002; Hodson et al. 2008; Laybourn-Parry, 2003]. Биологическая активность в криоконитовых ямах играет важную роль в их генезисе и метаморфизме, воздействуя, таким образом, на энергетический баланс ледников. Последние исследования показали, что обильное развитие цианобактерий внутри криоконитовых ям влияет на поверхностное альbedo ледников за счет цементирования материала криоконита внеклеточными полимерами [Hodson et al., 2010]. Данный процесс также способствует увеличению срока жизни криоконитовых образований на леднике [Hodson et al., 2010].

Микробное разнообразие непосредственно снежного покрова полярных ледников Северного полушария изучено на примере ледников Шпицбергена. Общая бактериальная численность, измеренная в снежном покрове в прибрежном районе и на леднике Конгсвеген, составила 6×10^4 кл/мл и 2×10^4 кл/мл, соответственно [Amato et al., 2007]. Анализ культивируемой части микробного сообщества выявил десять изолятов, принадлежащих *Alphaproteobacteria* (*Brevundimonas* sp., *Chelatococcus* sp., неизвестные *Sphingomonadaceae*), *Betaproteobacteria* (*Hydrogenophaga* sp.), *Gammaproteobacteria* (*Moraxella* sp.), *Firmicutes* (*Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp.) и *Actinobacteria* (*Agromyces* sp., *Micromonospora* sp.). На основании способности выделенных бактерий к утилизации формиата, пропионата и ацетата, обнаруживаемых в арктическом снеге, авторы предполагают развитие подобных организмов *in situ* в период таяния снега [Amato et al., 2007]. Согласно данным анализа 16S рРНК в микробных сообществах арктического снежного покрова в начале весны доминируют *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Sphingobacteria* и *Bacilli*, тогда как ближе к лету состав доминантных групп смещается в сторону *Betaproteobacteria*, *Cyanobacteria* и *Flavobacteria* [Larose et al., 2010]. Исследования некультивируемого бактериального разнообразия твердого снега арктического ледника Джон Эванс показали его принципиальное отличие от бактериального состава базального льда и подледниковых ниш

того же ледника, что предполагает важность локальных физико-химических факторов на первый взгляд в однородной ледниковой системе [Bhatia et al., 2006].

1.3.3 Микробное разнообразие снежного покрова горных ледников

Снежный покров высокогорных ледников подвержен большему влиянию континентов, чем полярные ледники, однако численность микробных клеток двух типов ледников может быть вполне сравнима. На сегодняшний день известно, что общая численность микроорганизмов снежного покрова высокогорья варьирует от $0,02 \times 10^3$ кл/мл [Zhang et al., 2010a] до 4×10^5 кл/мл [Alfreider et al., 1996; Sattler et al., 2001; Segawa et al., 2005]. На примере снежного покрова ледника Софийский (3400 м над у.м., Центральный Алтай) показано, что численность фотоавтотрофных цианобактерий может достигать $1,7 \times 10^4$ кл/мл [Uetake et al., 2006]. Высокие значения клеточных концентраций, как правило, связаны с осаждением минеральных частиц (пыли) на снежный покров или их конденсации в период таяния снега (например, $2,3 \times 10^5$ и $5,4 \times 10^5$ кл/мл [Segawa et al., 2005 и Liu et al., 2009a], соответственно). Наименьшая оценка численности клеток была получена для снежного покрова ледника Монблан на высоте более 4000 м, состав всего $1,1$ и $2,14 \times 10^2$ кл/мл [Chuvochina et al., 2011], несмотря на присутствие почвенной пыли Сахары. Особо отметим, что эти значения были получены для снега, собранного в относительно малом объеме (~300 мл) путем погружения пробоотборников непосредственно в места осаждения пыли. При сборе же снега в большем объеме (до 6 - 8 л) с пылью рассеянной по снежной поверхности содержание клеток падает до 0 - 2 кл/мл [Chuvochina et al., 2011]. Таким образом, концентрация пыли в снежном покрове существенно влияет на бактериальную численность.

Наиболее изученным компонентом микробных сообществ снежного покрова высокогорья являются водоросли [Thomas & Duval, 1995; Painter et al., 2001; Takeuchi, 2001], а именно рода *Chlamydomonas* и *Chloromonas*. Красный снег, чей цвет обусловлен массовым развитием *Chlamydomonas nivalis*, был описан еще в сочинениях Аристотеля [Miteva, 2008]. Результаты исследований снежных водорослей показали их значимость в качестве первичных продуцентов, способных поддерживать гетеротрофные сообщества, в том числе бактериальные [Hoham & Duval, 2001; Takeuchi and Kohshima, 2004; Takeuchi et al., 2006]. Также показано, что развитие сообществ водорослей и бактерий в снежном покрове может приводить к существенному снижению альбедо поверхности ледников [Thomas & Duval, 1995; Takeuchi et al., 2001].

Вместе с тем, бактериальное разнообразие поверхностного снега высокогорных ледников изучено лишь в нескольких работах. Первые свидетельства бактериального роста в

сезон таяния снежного покрова (2450 – 2700 м над у.м., горный массив Татэяма, Япония) были получены методом ПЦР в реальном времени на примере психрофильной бактерии *Cryobacterium psychrophilum* и двух психротрофных бактерий *Variovorax paradoxus* и *Janthinobacterium lividum* [Segawa et al., 2005]. Помимо этого исследование микробного разнообразия методом молекулярного клонирования генов 16S рРНК выявило доминирование микроорганизмов, принадлежащих разделу *Betaproteobacteria*, за которыми следовали *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [Segawa et al., 2005]. В данном исследовании впервые была показана позитивная корреляция между концентрацией минеральных частиц, привнесенных из атмосферы, и увеличением бактериальной биомассы в поверхностном слое снега [Segawa et al., 2005].

Подобная связь также была обнаружена при изучении снежного покрова ледников тибетского высокогорья (выше 5000 м над у.м.), расположенных в разных климатических зонах [Liu et al., 2009a]. Авторами показано, что в случае северных ледников Гуоку и Жаданг, где отмечалось влияние переноса почвенной пыли из близлежащих аридных регионов, бактериальная численность и разнообразие были выше, чем в случае двух южных ледников. Однако прямая корреляция с частицами пыли была выявлена только для ледника Гуоку [Liu et al., 2009a]. В составе микробных сообществ ледников Гуоку и Жаданг доминировали представители *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*-), *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* с распределением большей части клонов по родам *Sphingomonas* и *Hymenobacter*. Кроме того сравнение микробного разнообразия четырех ледников выявило присутствие пятнадцати общих родов, большая часть которых: *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Polaromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Hymenobacter*, *Rhodoferrax* и *Kocuria* – была сходна с бактериями из полярных ледников [Liu et al., 2009a]. Недавно в работе [Zhang et al., 2010b] было исследовано микробное разнообразие снежного покрова других ледников тибетского высокогорья, и показано, что во всех изученных образцах состав микробных сообществ был представлен одними и теми же разделами: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, как правило, с доминированием представителей *Betaproteobacteria*.

Микробное разнообразие снежного покрова ледников Европы изучено на примере Французских Альп и Центральных Пиренеев, которые ежегодно подвергаются воздействию переноса пыли из Сахары. В ходе анализа культивируемого разнообразия снежного покрова ледников Монблана (Коль дю Дом и Коль дю Миди) с пылью Сахары от события переноса 2000 г. было выделено десять бактериальных изолятов, относящихся к *Agrobacterium*, *Afipia*, *Bradyrhizobium*, *Hydrogenophaga*, *Limnobacter*, *Pseudomonas*, *Aquiflexus*, *Sinella* и *Dietzia* [Gonzalez-Toril et al., 2009]. Авторы отмечают, что колонии бактерий *Dietzia* и *Aquiflexum*

продуцировали пигменты, которые, вероятно, способствуют защите клетки от действия УФ излучения.

В Центральных Пиренеях были исследованы микробные сообщества снежного покрова озера Редон, расположенного на высоте 2240 м над у.м. [Hervas & Casamayor, 2009]. Авторами показано, что перенос почвенной пыли Сахары (событие 2004 г.) на снежный покров озера, играет важную роль в формировании микрофлоры озерного бактериоценоза. Анализ микробного разнообразия методом секвенирования генов 16S рРНК показал доминирование *Betaproteobacteria* и *Actinobacteria*, за которыми следовали *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Firmicutes* [Hervas & Casamayor, 2009].

Как было отмечено выше, криоконитовые образования характерны для всех ледников, где встречается поверхностное таяние. Очевидно, что объем первичной продукции криоконитовых ям должен без труда поддерживать вторичную бактериальную продукцию (Hodson et al., 2008). Присутствие гетеротрофных сообществ показано на примере изучения криоконитовых ям в Тирольских Альпах на высоте более 3000 м над у.м.) [Margesin et al., 2002]. Показано, что большая часть микробного разнообразия альпийских криоконитов представлена родами *Pseudomonas* и *Sphingomonas* [Margesin et al., 2002]. Кроме того из тех же самых образцов описан новый вид факультативно психрофильной бактерии *Pedobacter cryoconitis* [Margesin et al., 2003].

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что связь между частицами пыли, которые кроме того служат архивом климатических изменений, и структурой микробных сообществ обнаруживается не только в снежном покрове, но и в его последующем состоянии – льде [Liu et al., 2009a; Takeuchi & Kohshima, 2004]. Так, разные бактериальные изоляты были выявлены в разных горизонтах керн ледников Музтаг-Ата (6350 м над у.м.) на Памире и ледника Восточный Ронгбук в Гималаях (6518 м над у.м.) [Zhang et al., 2007, 2008a, 2008b; Xiang et al., 2005]. По мнению авторов, причиной этого могли служить различные источники бактерий, занесенных на ледник, а также смена климатических событий в прошлом ледника. К примеру, доля культивируемых бактерий, осажденных на леднике Восточный Ронгбук в предмуссонный период, совпадающий с эпизодическим транспортом материковой пыли из Северо-Западного Китая, была значительно выше в сравнении с периодами во время и после муссона [Zhang et al., 2007]. В результате был сделан вывод о возможности использования “микробиологической записи” в ледниковом керне для изучения изменений атмосферной циркуляции, а значит, и климата, в прошлом [Zhang et al., 2007]. В дальнейшем было уточнено, что скорее разнообразие, чем численность микроорганизмов позитивно коррелирует с концентрацией атмосферной пыли [Zhang et al., 2008b].

Как уже было отмечено выше, минеральные и органические пылевые частицы, занесенные на снежный покров ледников, служат как средством распространения, так и источником питательных веществ и энергии для микроорганизмов. По-мнению Xiang с соавторами [2009], осаждение наносного материала на ледник определяет изначальный пул микробной биомассы и ее видовое разнообразие, тогда как дальнейшие механизмы “постосаждения” приводят к изменению этих характеристик в связи с развитием отдельных видов при наличии питательных веществ и доступной воды [см. также Thomas & Broady, 1997; Stibal et al., 2007]. Зависимость структуры микробных сообществ от характера и размеров осажденных частиц показана на примере почвенных частиц и криоконитового вещества [Battin et al., 2001; Sawstrom et al., 2002; Certini et al., 2004; Kastovska et al., 2005, 2007; Rehakova et al., 2010]. Показано, что большая часть разнообразия цианобактерий криоконитового вещества представлена нитчатыми формами таких родов как *Phormidium*, *Nostoc* и *Leptolyngbya* [Sawstrom et al., 2002; Stibal et al., 2006; Kastovska et al., 2005, 2007]. Филаменты цианобактерий способствуют их прикреплению к частицам, что играет важную роль в процессе их распространения и колонизации новых экологических ниш [Stibal et al., 2008a; Rehakova et al., 2010]. Распространение микроорганизмов по воздуху (процесс аэролизации) является, по-видимому, одним из ключевых, позволяющий осваивать и занимать новые экологические ниши, часто удаленные на сотни километров от исходного местообитания. Вопрос колонизации полярных и горных ледников микроорганизмами, перенесенными с потоками воздуха, будучи ассоциированными или прикрепленными к аэрозольным частицам, интересует исследователей, прежде всего, с точки зрения адаптационных механизмов к холоду, биогеографического распространения микроорганизмов, их источников, влияния человека на микробное разнообразие и проблем поддержания и хранения жизни в условиях низких температур [Pearce et al., 2009, 2010].

1.4 Роль почвенной пыли Сахары в глобальном распространении микроорганизмов

1.4.1 Пыльные бури: мониторинг и идентификация зарождения

Основным аэрозольным компонентом нижней атмосферы ряда регионов земного шара являются частицы почвенного происхождения, самые большие концентрации которых зафиксированы над аридными зонами, покрывающими более трети поверхности суши [Атмосфера. Справочник, 1991]. Поступление минеральной или почвенной пыли в атмосферу происходит, главным образом, во время пыльных бурь – переноса умеренным и сильным ветром большого количества пыли и песка, сопровождающегося значительным

ухудшением видимости [Атмосфера. Справочник, 1991]. Вклад Северного полушария Земли по количеству выносимой в атмосферу пыли составляет приблизительно 90%, где она в основном и осаждается [Usher et al., 2003].

Крупнейшим источником почвенной пыли в атмосфере является пустыня Сахара, а также прилегающие к ней территории Северной Африки и Сахель [Moulin et al., 1997; Goudie & Middleton, 2001]. Годичная продукция пыли из пустыни Сахара составляет $400 - 700 \times 10^6$ тонн, большая часть которой переносится благодаря так называемому Сахарскому слою воздуха в западном и южном направлениях (около 60%) и по нижним воздушным слоям пассатными ветрами [Schütz et al., 1981; D'Almeida, 1987; Swap et al., 1996; Chiapello et al., 1997; Afeti & Resch, 2000]. Выделяют три основных направления перемещения пыли из регионов Северной Африки: 1) западное направление над Северо-Атлантическим океаном к Северной и Южной Америке; 2) северное направление в сторону Средиземноморья к южной Европе и иногда достигающее Скандинавии; 3) восточное направление в сторону восточного Средиземноморья на Средний Восток [Goudie & Middleton, 2001]. Недавние исследования показали, что почвенная пыль из Северной Африки и Среднего Востока может переноситься трансконтинентально в направлении Восточной Азии и являться причиной пыльной мглы в Японии [Tanaka et al., 2005].

Согласно данным спектрометра для сплошного картирования озонового слоя основными источниками зарождения пыльных бурь в Сахаре являются впадина Боделе в районе озера Чад и области, покрывающие границы западного Мали, южного Алжира и восточной Мавритании [Goudie & Middleton, 2001; Middleton & Goudie, 2001]. Однако, в связи с использованием различных методических подходов к картированию источников зарождения пыльных бурь в Сахаре, Стуут и др. [Stuut et al., 2009] на основании данных литературы [d'Almeida et al., 1986; Middleton & Goudie, 2001; Blanco et al., 2003; Engelstaedter et al., 2007] предложили выделить четыре региона с запада на восток: 1) Марокко и северная Мавритания, 2) южный Алжир, 3) южная Ливия и Чад, 4) Египет и северный Судан (рис. 1).

Пыльные бури Азии, называемые Хуангса (Huangsha) в Китае, “азиатская пыль” или Вангса (Whangsa) в Корее и “желтый песок” или Коза (Kosa) в Японии [Echigo et al., 2005], чаще всего происходят весной с февраля по май [Nishimura et al., 2010]. Источники зарождения пыльных бурь расположены в пустынях северного Китая (Такла-Макан), Лессового плато, северной части Тибетского нагорья и южной части Монголии [Shao et al., 2006; Yoshino, M. 2002]. Несмотря на сезонность азиатских бурь, они переносят значительное количество почвенного материала, который может распределяться повсюду в Северном полушарии [Griffin et al., 2007a]. Так, последствия переноса азиатской пыли от

марта 1990 г. были зарегистрированы методом изотопного анализа осажденных твердых частиц в Тихом океане, Северной Америке, Атлантическом океане и позднее в снежном покрове Французских Альп [Grousset et al., 2003]. Недавно показано, что пыль, поднятая в китайской пустыне Такла-Макан, благодаря подъему в высокие слои атмосферы (8 – 10 км), способна обогнуть земной шар приблизительно за 13 дней [Uno et al., 2009].

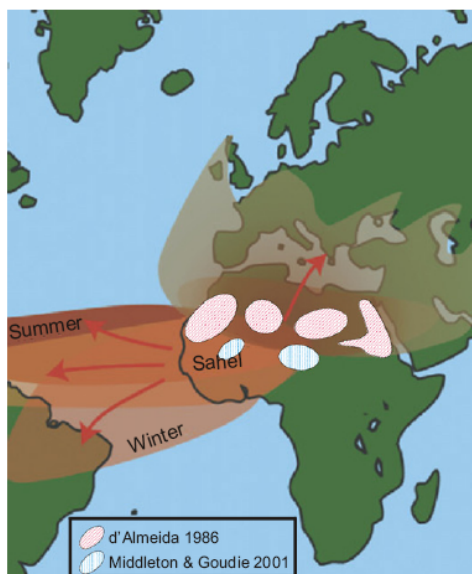


Рисунок 1. Основные источники зарождения пыльных бурь в пустыне Сахаре по литературным данным, обобщенным Stuut с соавторами [2009]

Существует целый ряд методов, позволяющих проводить мониторинг и идентифицировать источники зарождения пыльных бурь. На сегодняшний день это, в основном, достигается с помощью таких методов как анализ наблюдений поверхности пыли, дистанционного зондирования (например, “TOMS” – спектрометрия отображения тотального озона, “AVHRR” – расширенный радиометр с очень высоким разрешением, “IDDI” – спутниковые измерения индекса инфракрасной разницы пыли), обратных траекторий и использования минеральных индикаторов [Middleton & Goudie, 2001]. Показано, что объединение двух последних методов позволяет достаточно точно распознавать регионы-источники различных пылевых осадений [Chester et al., 1984; Bergametti et al., 1989; De Angelis & Gaudichet, 1991; Chiapello et al., 1997; Caquineau et al., 2002].

1.4.2 Метод обратных траекторий

Анализ обратных траекторий переноса воздушных масс или воздушной частицы широко используется при изучении пути переноса минеральной пыли [Schwikowski et al., 1995; Collaud et al., 2004; Sodemann et al., 2006; Goudie & Middleton, 2006]. Согласно этому

методу строятся обратные траектории переноса воздушных масс (частицы) на различных уровнях в атмосфере для определенных периодов наблюдения. Под траекторией понимают набор последовательных положений воздушной частицы (синоптического объекта) за некоторый интервал времени [Дашко, 2005].

Построение обратных траекторий воздушных частиц позволяет определить, откуда пришла (придет) частица в данный район. Для этого траектория откладывается от заданной точки (пункта прогноза) против воздушного потока (способ обратного переноса). При расчётах на срок более 12 часов используются как фактические, так и прогностические карты погоды, построенные на момент прогноза [Дашко, 2005].

С момента создания графической техники расчета траекторий Петтерссеном (Petterssen) в 1940 г. метод был значительно усовершенствован и повышена точность расчетов [Stohl, 1998]. Средняя ошибка при расчете траекторий предполагается около 20% исходя из траекторий, построенных на основании анализа ветровых полей [Stohl, 1998]. При этом наиболее точной и информативной считается техника расчета трехмерных траекторий переноса воздушных масс.

Данный метод находит свое применение не только в метеорологии и отслеживании пылевого переноса, но и при изучении перемещения воздушных масс веществами, загрязняющими атмосферу, позволяя определить дислокацию основных источников загрязнения [Stohl, 1996]. Благодаря анализу обратного переноса воздушных масс и концентрации пыльцы *Cannabis sativa* L. в окружающем воздухе удалось определить районы нелегального культивирования марихуаны в Марокко [Cabezudo et al., 1997].

1.4.3 Минералогический состав почвенной пыли

Типичный аэрозоль пустынь на 75% состоит из глинистых минералов (35% монтмориллонита и по 20% каолинита и иллита), 10% составляют кальцит, и по 5% - кварц, нитрат калия и соединения железа лимонит, гематит и магнетит с примесью некоторых органических веществ [Монин, 1982]. Известно, что минеральный состав почвенной пыли, поступающей от характерных источников, отличается достаточным постоянством [Brust & Waniek, 2010]. К настоящему времени накопились достаточно обширные сведения о минералогическом составе пыли Сахары, собранной в период повышенной запыленности определенного региона и в различных местах осаждения пыли (см. приложение 1). В целом считается, что пыль, происходящая из Северной Сахары, обнаруживает повышенное содержание иллита, хлорита, карбонатов, палыгорскита и монтмориллонита, тогда как в пыли Южной Сахары и Сахель содержится больше каолинита и смектита [Usher et al., 2003].

Минеральный состав пыли дает богатую информацию об ее источнике и характере режима выветривания [Атмосфера. Справочник, 1991]. В тоже время известен ряд ограничений метода рентгеноструктурного анализа, каким получают данные по минералогии почвенной пыли. Во-первых, объем исследуемых проб очень мал. Во-вторых, так как аэрозольное вещество представляет собой наиболее сильно выветриваемую часть почвы, интерпретация результатов рентгеноструктурного анализа становится менее объективной [Атмосфера. Справочник, 1991]. Кроме того, помимо природы и региона источника пыли важное значение для определения характера глинистых минералов, присутствующих в пыли, имеют гравитационные эффекты осаждения при ее переносе [Goudie & Middleton, 2006]. Поэтому выводы рентгеноструктурного анализа следует дополнять результатами других анализов.

Так, анализ элементного состава образцов почвенной пыли методом рентгеновской флуоресценции не обнаружил существенных различий между образцами пыли Сахары, осажденной на леднике Монблан [Chuvochina et al., 2011]. Единственно возможным дискриминирующим фактором было выявлено отношение $K_2O/(SiO_2 + Al_2O_3)$ к SiO_2/Al_2O_3 , свидетельствующее о содержании Al и Si в алюмосиликатах, главным образом глине и полевом шпате. Отношение SiO_2/Al_2O_3 больше 2-х предполагает присутствие глины в виде иллита или смектита, при этом иллит характеризуется более высоким значением отношения $K_2O/(SiO_2 + Al_2O_3)$, чем смектит. В результате все взятые в работу образцы почвенной пыли были разделены на две группы: содержащие в основном иллит и содержащие в основном смектит [Chuvochina et al., 2011]. Однако, так как данные минералы широко распространены в почвах Северной и Западной Сахары, особенно в пустынных областях Туниса и Ливии [Руе, 1987], трудно сделать однозначные выводы об источнике происхождения пыли.

1.4.4 Распределение частиц пыли по размерам

Одной из важных характеристик пыли, позволяющей также проследить источник ее происхождения, является распределение частиц пыли по размерам. Согласно Vagnold [1941] пыль представляет собой частицы диаметром менее 80 мкм, хотя большинство других авторов предпочитает проводить границу в соответствии с границей размеров алевролит/песок, т.е. менее 62,5 мкм [Goudie & Middleton, 2006]. Ниже этой границы мелкодисперсные фракции подразделяют на категории размера алевролитовых и глинистых частиц с диаметром 4,0 – 62,5 мкм и <4,0 мкм соответственно [Wentworth, 1922].

Средние значения частиц пыли Сахары по размеру находятся в диапазоне 5 - 30 мкм в диаметре, хотя некоторые частицы могут достигать 72 – 74 мкм в диаметре [Goudie &

Middleton, 2001]. В образцах пыли Сахары, осажженной в США, на Бермудах, Барбадосе и Гане, средний размер частиц может быть менее 5 мкм. Известно также что, пыльные бури могут переносить значительное количество материала, характеризующегося размерами глинистых частиц, т.е. менее 4 мкм [Stuut et al., 2009]. Большая часть мелкой пыли, производимой в Африке, представляет собой древние озерные отложения (например, из озера Чад), выносимые как мелкие агрегаты глинистого материала [McTainsh, 1985]. Крупная пыль (16 – 62 мкм), выпадающая в Европе путем сухого осаждения представляет собой материал, вынесенный из Сахары и Сахель через Средиземноморье [Stuut et al., 2009].

В зависимости от физико-химических свойств почвы, высоты подъема частицы и метеорологических факторов может происходить распределение частиц по размерам [Атмосфера. Справочник, 1991]. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в подавляющем большинстве случаев после дальнего переноса через Средиземноморье (1000 – 2000 км от источника) мода частиц сахарской пыли смещается в сторону частиц <20 мкм в диаметре [Schutz & Sebert, 1987; Molinaroli et al., 1993; Ridame & Guieu, 2002]. По мнению Israelevich с соавторами [2003], изменения в распределении частиц почвенной пыли из Сахары, связанные непосредственно с физическими и оптическими свойствами пыли, предполагают различия в химическом составе пыли, что, в свою очередь, свидетельствует о ее различных источниках и путях переноса.

Недавно методом регистрации электрических импульсов на счетчике Coulter получены данные по распределению частиц пыли по размерам в образцах пыли Сахары, обнаруженной на леднике Монблан [Chuvochina et al., 2011]. Среднее значение моды частиц пыли, осажженной на леднике составило ~5,5 мкм; основная часть частиц, осажженных на ледник в июне 2006 г. и июне 2008 г., имела близкие значения моды (~6 - 6,5 мкм) (рис. 2). Распределение частиц для события переноса пыли в мае 2009 г. было сдвинуто в область меньших диаметров (мода ~4 мкм). Кроме того, показано, что в случае одного и того же события переноса в мае 2008 г. размер частиц пыли, осажженной на высоте 200 м над у.м. составил ~9 мкм, и смещался в сторону частиц меньшего размера при осаждении на леднике (~6 мкм). Дополнительно также была оценена мода частиц пыли локального происхождения в снежном покрове ледника, которая составила ~3 мкм.

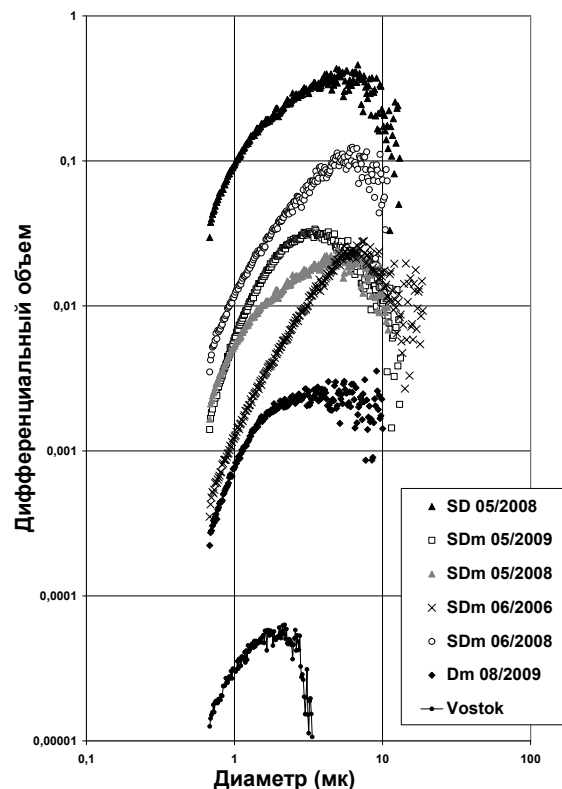


Рисунок 2. Кривые распределение частиц пыли по размерам в снеге ледника Монблан с пылью Сахары от событий переноса в июне 2006 г. (SDm06/2006), мае 2008 г. (SDm05/2008), июне 2008 г. (SDm06/2008), мае 2009 г. (SDm05/2009), в снеге без пыли Сахары (Dm08/2009), а также пыли Сахары, осажденной в Гренобле (SD05/2008) [Chuvochina et al., 2011]. По оси ординат приведены условные единицы объема частиц пыли с целью показать кривые распределения частиц без их наложения друг с другом. Для сравнения приведено распределение частиц пыли, выпадающей в континентальной части Антарктиды (станции Восток), где мода частиц достигает ~2 мкм [Petit et al., 1999]

1.4.5 Роль пыли в экосистеме

Перенос почвенной пыли вследствие пыльных бурь в Сахаре имеет целый ряд экономических и экологических последствий, а также может приводить к ухудшению здоровья человека. На рисунке 3 схематически представлены основные последствия переноса и осаднения почвенной пыли в масштабе планеты. Одной из первопричин изучения пыльных бурь в Сахаре является влияние пыли на климат Земли. Пылевые частицы, поглощая и рассеивая солнечную радиацию, способны изменять температуру окружающего воздуха [Haywood et al., 2003]. В свою очередь такие изменения и увеличение потенциальных ядер конденсации в атмосфере может приводить к осадкообразованию, влияя

на климат отдельных регионов [Goudie & Middleton, 2006; DeMott et al., 2003]. Согласно данным Steltzer с соавторами [2009] увеличение скорости таяния снега, вызванного осаджением почвенной пыли на поверхность горных ледников, приводит к замедлению циклов развития альпийских растений, что может привести к коренной смене ландшафта [Steltzer et al., 2009]. Кроме того, поверхность пылевых частиц представляет собой субстрат для протекания различных химических реакций в тропосфере [Usher et al., 2003] и влияет на концентрацию диоксида углерода [Adams et al., 2005].



Рисунок 3. Значение почвенной пыли в экосистеме

Осаждения почвенной пыли вносят вклад в формирование почвенного покрова в удаленных от пустыни провинциях, к примеру, в образование “terra rossa” (розовой земли) в Южной Европе: Леванте и Испании [Goudie & Middleton, 2001; Delgado et al., 2003]. Согласно Guerzoni с соавторами [1999] вклад пыли Сахары в формирование осадочных отложений на дне Средиземного моря составляет от 50 до 80%.

Попадая в океан, почвенная пыль Сахары служит источником питательных веществ и такого важного элемента, как железо [Psenner, 1999; Guerzoni et al., 1999; Ozsoy et al., 2001; Ridame & Guieu, 2002; Mills et al., 2004; Okin et al., 2004; Usher et al., 2003], что нередко сопровождается резким увеличением первичной океанической продукции [Guerzoni et al., 1999; Guieu et al., 2002; Bonnet et al., 2005; Duarte et al., 2006; Moore et al., 2006]. Исследования Mladenov с соавторами [2008] показали, что осаждение пыли Сахары в высокогорных озерах Испании активирует жизнедеятельность бактерий, приводя к накоплению растворенного органического вещества [Mladenov et al., 2008].

Экспериментальные доказательства потребления фосфора, входящего в состав пыли Сахары, гетеротрофными бактериями впервые получены в работе [Pulido-Villena et al., 2008a]. Кроме позитивной корреляции, наблюдаемой между бактериальной численностью и концентрацией пыли в олиготрофном озере Кальдера, авторы также отметили значительное увеличение биомассы фитопланктонной водоросли *Chromulina nevadensis* при добавлении пыли [Pulido-Villena et al., 2008a]. В работах Herut с соавторами [2005] и Pulido-Villena с соавторами [2008b], как в полевых, так и в лабораторных условиях, было продемонстрировано ускорение роста гетеротрофных бактериальных сообществ при внесении пыли Сахары в олиготрофные воды Средиземного моря [Herut et al., 2005; Pulido-Villena et al., 2008b]. Тем не менее, в исследованиях [Reche et al., 2009] не наблюдали, чтобы бактериальный рост, вызванный осаждением пыли, сопровождался увеличением разнообразия или другими изменениями в структуре сообщества. Уровень метаболизма *in situ* при вмешательстве почвенной пыли в тропические воды Северо-Восточной Атлантики был измерен для двух групп бактериопланктона: цианобактерий рода *Prochlorococcus* и клада SAR11 из *Alphaproteobacteria* [Hill et al., 2010]. Показано, что добавление фильтрата пыли сопровождается смещением в составе сообщества в сторону доминирования клады SAR11 [Hill et al., 2010].

Среди прочего, вклад пыли в распространение микроорганизмов и негативные последствия пыльных бурь, связанные со здоровьем человека и состоянием экосистемы, будут обсуждаться ниже.

1.4.6 Видовой состав микроорганизмов, переносимых пылью Сахары

Вмешательство почвенной пыли в различные экосистемы не ограничивается только поступлением дополнительных питательных веществ. Пыль, поднятая в атмосферу вследствие пыльных бурь, способна переносить на значительные расстояния непосредственно саму почвенную микробиоту [Kellogg & Griffin, 2006; Griffin et al., 2007b]. Многими исследованиями отмечено, что в период прохождения пыльной бури, концентрация микроорганизмов в окружающем воздухе возрастает от 2 до 14 раз выше нормы [Griffin et al., 2001, 2003, 2006; Kellogg et al., 2004; Prospero et al., 2005; Kellogg & Griffin, 2006]. Это не удивительно, принимая во внимание тот факт, что 1 грамм почвенного покрова содержит от 10^7 (лесная подстилка) до 10^9 (аридные и другие типы почв) клеток прокариот [Whitman et al., 1998]. Несмотря на обилие летальных и стрессовых факторов (высушивание, низкие температуры, жесткое УФ-излучение и т.д.), переживаемых микроорганизмами при переносе в атмосфере, некоторые из них способны сохранять жизнедеятельность за счет ряда

адаптаций. К таковым относятся, например, покоящиеся формы (мало воды и замедленный метаболизм), пигментация (поглощение свободных радикалов), устойчивость к радиации (высокая скорость процессов ДНК репарации). Кроме того, сами частицы пыли оказывают экранирующее действие, например, для УФ излучения [Griffin et al., 2007b]. Последние исследования подтвердили, что прикрепление бактерий к частицам пыли позволяет клеткам лучше переживать стрессовые условия (действия УФ, озона) и восстанавливать свою жизнедеятельность после воздействия стресса намного быстрее в сравнении со свободными клетками [Tang et al., 2011]. На сегодняшний день существует целый ряд работ, посвященных изучению как культивируемой, так и некультивируемой микробиоты, переносимой с пылью Сахары [см., например, Griffin et al., 2001, 2003, 2004, 2006, 2007a,b; Prospero et al., 2005; Kellogg et al., 2004; Polymenakou et al., 2008] и других аридных регионов [см., например, De Deckker et al., 2008; Nishimura et al., 2010; Yeo & Kim, 2002; Hua et al., 2007]. Кроме представителей домена *Bacteria*, с пылью также переносятся микроскопические грибы, вирусы и пыльца растений.

Как правило, большинство бактериальных изолятов (клонов) из пыли Сахары характеризуются способностью к спорообразованию и наличием пигментированных колоний, и часто представлены такими родами как: *Bacillus* [Kellogg et al., 2004; Prospero et al., 2005; Polymenakou et al., 2008; Griffin et al., 2001, 2003, 2006], *Sphingomonas* [Griffin et al., 2001, 2003], *Streptomyces* [Griffin et al., 2001, 2003, 2007b], *Kocuria* [Griffin et al., 2007b; Kellogg et al., 2004], *Microbacterium* [Griffin et al., 2001, 2003], *Gordonia* и *Staphylococcus* [Griffin et al., 2006]. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что в подавляющем большинстве случаев бактерии, обнаруженные в пыли Сахары, показывают высокое родство с теми, что были найдены в различных типах почв, морских местообитаний и поверхности кожи человека. На примере изучения последствий пыльной бури Сахары в восточном Средиземноморье показано, что состав микробных сообществ варьирует в зависимости от размеров частиц пыли [Polymenakou et al., 2008]. Так, например, спорообразующие *Firmicutes* доминируют при размере частиц пыли более 3,3 мкм, тогда как представители *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* – при размере частиц менее 3,3 мкм [Polymenakou et al., 2008].

Всесторонняя оценка эффекта осаждения пыли Сахары на микробное сообщество в серии экспериментов показала, что помимо увеличения бактериальной численности и продукции биомассы в 1,8 и 5 раз (в сравнении с контролем), соответственно, происходит стимуляция дыхания и смена способа питания сообщества [Lekunberri et al., 2010]. Так, при внесении низкой концентрации пыли (0,05 г/л) наблюдается переключение метаболизма сообщества в сторону гетеротрофии, тогда как при внесении высокой концентрации (0,5 г/л) – в сторону автотрофии [Lekunberri et al., 2010].

Недавно Perfumo и Marchant [2010] получены данные, которые могут свидетельствовать о происхождении термофильных бактерий рода *Geobacillus* в почвах Северной Ирландии из пустыни Сахары. Бактерии, обнаруженные в почвенной пыли Сахары, показали 99% сходства по последовательности 16S рДНК с теми, что населяют холодные почвы Ирландии [Perfumo & Marchant, 2010]. Однако, вопрос о возможности колонизации новых эконих бактериями, переносимыми с пылью Сахары, а, также, об их влиянии на резидентные сообщества, требует пояснения. Так, Lekunberri с соавторами [2010] показано, что внесение пыли Сахары в морскую воду в высоких концентрациях (0,5 г/л) приводит к значительным отличиям в структуре микробных сообществ по сравнению с контролем [Lekunberri et al., 2010]. В работе [Reche et al., 2009] получены экспериментальные доказательства роста представителей *Gammaproteobacteria*, внесенных с пылью Сахары в резервуар, имитирующий олиготрофные условия альпийских озер. Известно, что в естественных условиях водоемов данная группа бактерий встречается редко [Reche et al., 2009]. В другом эксперименте при внесении пыли Сахары непосредственно в воду, взятую из высокогорных озер Испании, было показано развитие *Sphingomonas*-подобных, а также *Acinetobacter*- и *Arthrobacter*-подобных бактерий, которые являлись “иммигрантами” в озерной экосистеме [Hervas et al., 2009]. Сравнение микробных сообществ бактерионейстона, обитающего в поверхностной пленке озера Редон (2240 м, Центральные Пиренеи), и бактерий, обнаруженных в снежном покрове с пылью Сахары того же озера, показало, что последние могут служить важным источником в формировании микрофлоры скорее бактерионейстона, чем бактериопланктона озера [Hervas & Casamayor, 2009]. В то же время, авторами работы не было зафиксировано не свойственных нейстону бактериальных групп, и в обоих упомянутых сообществах доминировали *Betaproteobacteria* и *Actinobacteria*.

1.4.7 Видовой состав микроорганизмов, переносимых пылью из других аридных регионов Земли

В Азии, микроорганизмы переносятся с так называемой “желтой пылью” из второй по размеру аридной области Земли, расположенной в пустынях Китая и Монголии [Choi et al., 1997; Hua et al., 2007]. Численность микроорганизмов для 1 г азиатской пыли, собранной над Пекином во время прохождения пыльной бури, составляла от $1,6 \times 10^6$ до $3,5 \times 10^9$ [Nishimura et al., 2010]. Echigo с соавторами [2005] предполагают, что присутствие большого разнообразия галотолерантных бактерий в почве и прибрежном песке окрестностей Токио является следствием переноса желтой пыли, которая могла происходить, к примеру, из соленых озер Монголии [Echigo et al., 2005]. Сравнение результатов культивирования

образцов азиатской пыли, осажденной в 2005 – 2006 г. в Хигасихиросима (Япония), и образца почвы пустыни Гоби, подтвердило перенос доминантной части популяции, представленной *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis* [Hua et al., 2007]. Сходные выводы были получены при сравнении микробного разнообразия пыли, собранной в Пекине в период трех событий переноса, и образцов почвы Лессового плато, пустыней Гоби и Такла-Макан [Nishimura et al., 2010]. Данные ПДРФ (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) анализа показали схожие профили доминантных фрагментов, обнаруженных в образцах пыли и почвы, которые были подтверждены данными ДГТЭ и идентифицированы как представители родов *Serratia* и *Ralstonia* [Nishimura et al., 2010]. В данной работе авторами отмечено также, что сходство структуры микробных сообществ пыли от разных событий переноса варьирует в зависимости от концентрации почвенных аэрозолей.

По результатам анализа генов 16S рРНК микроорганизмов в образцах пыли, собранной в окрестностях Дуньхуан, расположенного на границе с пустыней Такла-Макан, бактериальное разнообразие на высоте 800 м было представлено последовательностями, принадлежащими *Brevibacillus*, *Staphylococcus* sp., *Rhodococcus* sp., *Delftia* sp., *Pseudomonas* sp. и *Agrobacterium tumefaciens*, тогда как на высоте 10 м - *Arthrobacter* sp. *Ornithinimicrobium* sp., *Rubellimicrobium thermophilum*, *Friedmanniella capsulata*, *Geodermatophilus* sp., *Cellulomonas* sp., *Promicromonospora* sp., и *Cryocolla antiquus* [Kakikawa et al., 2008]. Примечательно, что культивирование образцов пыли с 10 и 800 м выявило схожие доминантные бактерии родов *Bacillus* и *Staphylococcus* [Maki et al., 2008].

Распределение микроорганизмов и частиц пыли по размерам в течение одного года в окрестностях Тэджон (Южная Корея) показало, что частицы бактериального происхождения имеют, в основном, диаметр более 4,7 мкм (69,8% от общей фракции частиц), тогда как “микочастицы” – менее 4,7 мкм [Choi et al., 1997]. Принимая во внимание средний размер бактериальной клетки, авторы предположили, что дрейфующие бактерии, скорее всего, прикрепляются к частицам пыли и становятся единым агрегатом, чем перемещаются в виде свободных клеток [Choi et al., 1997]. Также Choi с соавторами обнаружили, что во время явления, называемого “Феномен Желтого Песка” (Yellow Sand Phenomena), концентрация бактериальных клеток значительно возрастала для частиц диаметром от 0,6 до 4,7 мкм. Таким образом, был сделан вывод, что перенос бактерий на значительные расстояния является следствием их прикрепления к частицам пыли [Choi et al., 1997]. Ранее, гипотеза о прикреплении микроорганизмов к частицам пыли была высказана Lighthart с соавторами [1993], исходя из распределения по размерам частиц биологического происхождения, улетающих с поверхности растений в окружающий воздух.

Данные, свидетельствующие в пользу гипотезы о прикреплении микроорганизмов к частицам пыли получены также в работах Maki с соавторами [2008] и Iwasaka с соавторами [2009]. С помощью эпифлуоресцентной микроскопии и окрашивания клеток красителем DAPI, было продемонстрировано наличие ярко-голубых флуоресцирующих коккоидно-подобных частиц диаметром менее 1 мкм на поверхности частиц пыли [Maki et al., 2008; Iwasaka et al., 2009]. Однако, физиологический статус обнаруженных частиц установлен не был. Показано, что доля частиц пыли с адсорбированными на них коккоидно-подобными частицами составляла 10% от общего числа частиц [Maki et al., 2008; Iwasaka et al., 2009]. По мнению Iwasaka с соавторами прикреплению микроорганизмов к частицам пыли – это важный фактор, контролирующий время жизни дрейфующей микробиоты, так как в такой ситуации микроорганизмы защищены частицами пыли от стрессовых факторов во время переноса в атмосфере [Iwasaka et al., 2009].

Микробиологическая характеристика пыльных бурь Австралии практически отсутствует, несмотря на то, что они происходят довольно регулярно и масса переносимой пыли может составлять 4,85 Мт [McTainsh et al., 2004]. На сегодняшний день нам известна только одна работа [De Deckker et al., 2008], в которой изучена структура микробного сообщества на примере переноса пыли из семиаридной области в окрестностях реки Дарлинг в Канберру. Анализ некультивируемого микробного сообщества показал, что большая часть клонов принадлежала *Proteobacteria* (25%), *Bacteroidetes* (23%), и *Firmicutes* (23%) [De Deckker et al., 2008].

1.4.8 Микробная колонизация

Периодический перенос почвенной пыли представляет собой важный путь в освоении микроорганизмами отдаленных местообитаний. Многие авторы предполагают, что микроорганизмы, населяющие аридные области являются более устойчивыми к различным экстремальным физико-химическим факторам и, следовательно, обладают большим преимуществом для расселения и оккупации новых “экстремальных” экологических ниш [см., например, Flechtner, 1999; González-Toril et al., 2009]. Таким образом, врожденная способность микроорганизмов к выживанию в неблагоприятных условиях определяет их захватнический потенциал при интродукции в новое местообитание [Isard et al., 2005]. Кроме того, в различных участках пространства может создаваться сходная совокупность условий, поэтому одни и те же виды могут существовать в различных местообитаниях [Нетрусов и др., 2004]. Объединение способностей к расселению и размер популяции таксона определяют скорость колонизации им новых и отдаленных местообитаний. В то время как одни виды

обладают сочетанием черт, позволяющих им колонизировать новые территории в глобальном масштабе (генералисты, например, виды рода *Bacillus*), другие могут распространяться только на короткие дистанции и имеют узкую экологическую нишу (узкоспециализированные виды, например, *Sulfolobus*) [Martiny et al., 2006; Нетрусов и др., 2004].

Согласно вышеприведенным литературным данным следствием “интродукции” микроорганизмов с пылью Сахары могут быть изменения в структуре резидентного или автохтонного сообщества. Например, спорообразующие виды, такие как *Bacillus sp.* имеют больше шансов, чем другие грамотрицательные бактерии, выжить в условиях длительного переноса в атмосфере и, как следствие, чаще всего, обнаруживаются в образцах осажденной почвенной пыли [Kellogg et al., 2004; Prospero et al., 2005; Polymenakou et al., 2008; Griffin et al., 2001, 2003, 2006]. Таким образом, способность к колонизации или захвату новых местообитаний будет варьировать от вида к виду, если даже не от штамма к штамму [Kellogg, & Griffin, 2006]. Считается, что микроорганизмы являются космополитами по эколого-географическому распределению вследствие обширного размера популяций, микроскопических размеров, разнообразия и гибкости метаболизма и устойчивости к неблагоприятным факторам среды [Пиневиц, 2007]. Однако, тот или иной вид микроорганизма, живущий в данном местообитании, является функцией избирательных свойств среды, включая особенности целового микробного сообщества, которая, конечно же, имеет историю и сама по себе изменчива в большей или меньшей мере.

На фоне вышесказанного формулируются центральные вопросы биогеографической модели, которые также могут быть применены к распространению микроорганизмов с помощью пыльных бурь:

- являются ли микробные виды географически ограниченными и, если да, то каким образом;
- какие факторы контролируют распространение микроорганизмов;
- где находится граница адаптивных возможностей микроорганизмов;
- учитывая историческую длительность процесса переноса пыли в отдаленные регионы, можно ли различить автохтонные и аллохтонные сообщества;
- какие методы (генетические, молекулярные или биохимические) лучше всего использовать для определения биогеографических различий, обусловленных распространением микроорганизмов с помощью почвенной пыли [Martiny et al., 2006; Kellogg, & Griffin, 2006]?

По мнению Ramette и Tiedje [2007] лучшее решение может быть найдено с помощью методов молекулярной филогенетики, интегрированных со статистическими моделями

пространственного распределения видов [Liebhold & Gurevitch, 2002]. Предварительный обзор показывает, что применение пространственного масштаба в микробной экологии может быть найдено в целом ряде работ и, часто, имеет первостепенное значение в формировании видового разнообразия микробных сообществ [Prosser et al., 2007; Horner-Devine et al., 2004; Reche et al., 2005].

1.4.9 Негативные последствия переноса пыли для здоровья человека и экосистемы

Пыльные бури имеют множество отрицательных последствий для человека и экосистемы. Сами по себе, частицы пыли при размере <10 мкм могут проникать в легкие, а при размере $<2,5$ мкм – в глубокие ткани легких и субэпителиальное пространство дыхательных путей [Griffin, 2007a]. В целом ряде работ, исследовавших роль пыльных бурь, показано наличие ассоциированных с пылью заболеваний, таких как астма, аллергические реакции и легочный фиброз [см., например, Chang et al., 2006; Kwon et al., 2002; Norboo et al., 1991; Park et al., 2005]. Известно, что регионы Ближнего Востока и Карибских островов, подверженные регулярным пыльным бурям, имеют один из наиболее высоких индексов регистрации астмы на планете [Griffin, 2007a; Griffin & Kellogg, 2004]. В работе [Gyan et al., 2005] показана связь между переносом пыли Сахары и увеличением случаев детской астмы на о. Тринидад в Карибском море.

К аллергенам, часто ассоциированным с пыльными бурями, относятся споры грибов, пыльца растений, антропогенные выбросы и органический детрит [Kwaasi, 2003; Ichinose et al., 2006; Ezeamuzie et al., 2000]. Holmes и Miller [2004] подсчитали, что $\sim 20\%$ отложений атмосферного мышьяка в юго-восточных штатах США имеют африканское происхождение. В пыли Сахары, осаждаемой в результате, так называемого, “красного дождя” в Греции в апреле 2000 г., были обнаружены радиоактивные частицы чернобыльского происхождения такие как цезий-137 [Papastefanou et al., 2001]. Кроме присутствия токсичных металлов, перенос пыли может стимулировать развитие токсичных водорослей в прибрежных областях, приводя к явлению “красных приливов” [Walsh et al., 2001].

Облака пыли могут содержать высокие концентрации органических веществ растительного происхождения и собирать дополнительный “биологический груз” по ходу своего перемещения. Усиление отрицательного эффекта на человека может происходить при переносе различных микроорганизмов и их спор, выступающих в роли условных патогенов. Кроме того, производные метаболизма микроорганизмов, такие как эндотоксины (липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий) и микотоксины грибов могут вызывать дыхательные спазмы [Braun-Fahrlander et al., 2002].

Известно, что вспышки менингококковой инфекции (возбудитель *Neisseria meningitidis*), встречающиеся в пределах “менингококкового пояса” Северной Африки, коррелирует с частотой пыльных бурь с февраля по май [Griffin, 2007a]. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что в подавляющем большинстве работ, в которых исследовалось микробное разнообразие пыли Сахары, обнаруживались как условно-патогенные виды бактерий, так и непосредственные возбудители различных заболеваний (см. приложение 2). Показано, что среди всех обнаруженных видов, от 10 до 27% могут составлять условно-патогенные микроорганизмы [Griffin et al., 2001; Kellogg et al., 2004]. Кроме того, часто среди бактерий, обнаруженных в пыли Сахары, идентифицируют возбудителей болезней животных и растений [Griffin, 2007a].

Воздействие пыли Сахары на экосистему распространяется так далеко, как далеко может быть перенесена пыль: до Северной Европы [Franzen et al. 1994], Амазонии [Swar et al. 1992] и Карибского моря [см., например, Griffin et al., 2001, 2003]. Пагубное воздействие переноса микроорганизмов с пылью Сахары на экосистему показано на примере коралловых рифов. Появление заболевания и гибели кораллов в Карибском море по причине аспергиллёза связано с присутствием возбудителя *Aspergillus sydowii* в пыли, переносимой из Северной Африки [Shinn et al., 2000; Garrison et al., 2003; Weir-Brush et al., 2004]. Стоит также отметить, что, в связи с ростом использования генномодифицированных (ГМ) растений, увеличивается риск распространения ГМ-пыльцы с облаками пыли на значительные расстояния [McTainsh et al., 2007]. Последствия такого переноса пока трудно предсказать, но, очевидно, что, благодаря латеральному переносу генов, в будущем, они могут внести изменения в природный ландшафт.

1.5 Микробное разнообразие почвенного покрова пустыни Сахара

Для более полной интерпретации данных, полученных при анализе микробного разнообразия почвенной пыли пустынь, осажденной где-либо вне своего источника, необходимо, в первую очередь, знать состав микрофлоры самой почвы, откуда происходит пыль. Природа стрессовых факторов атмосферы и пустыни во многом схожа и включает в себя такие виды стресса как высушивание, резкие колебания температуры, УФ излучение и низкое содержание органического углерода [Griffin, 2007a].

Пустыни характеризуются практически полным отсутствием свободной воды (≤ 250 мм осадков в год) и могут быть как экстремально жаркими, так и холодными [Torsvik & Øvreås, 2008]. К наиболее экстремальным пустыням относятся пустыни Рокса и Сухие Долины в Антарктиде, Атакама в Чили и центральная Сахара [Torsvik & Øvreås, 2008].

Жизнедеятельность микроорганизмов аридных почв, главным образом, зависит от таких факторов как влажность, температура, и доступность органического углерода. Из них доступность воды является основным лимитирующим фактором, контролирующим микробное разнообразие, структуру сообщества и метаболическую активность [Bhatnagar & Bhatnagar, 2005]. Численность аэробных бактерий в почвах пустынь варьирует от <10 (0 – в верхних слоях почвы отдельных районов Атакамы) [Maier et al., 2004; Navarro-Gonzalez et al., 2003] до $1,6 \times 10^7$ кл/г [Skujinš, 1984]. Данные о численности бактерий в почве Сахары отсутствуют, однако, в пресажарских песчаных дюнах Татуина (Южный Тунис) она составляет 10^5 кл/г почвы [Chanal et al., 2006]. В работе [Benzerara et al., 2006] численность бактерий, населяющих метеорит, пролежавший более семидесяти лет в пустыне Татуина, составила 2×10^8 кл/г почвы.

Основной стратегией выживания в условиях пустыни служит образование различных форм переживающих клеток (спор, конидий, цист). Именно поэтому грамположительные спорообразующие бактерии, как правило, являются доминирующим компонентом микробного сообщества аридных почв [Torsvik & Øvreås, 2008; Barak et al., 2005]. Кроме того, представители *Actinomycetales* могут составлять до 50% от общей бактериальной популяции почвы пустынь [Bhatnagar & Bhatnagar, 2005]. Из почвы Туниса были выделены культуры симбиотических бактерий родов *Ensifer*, *Rhizobium* и *Phyllobacterium* [Romdhane et al., 2006; Mahdhi et al., 2007]. С целью изучения новых антимикробных и антигрибковых веществ из почвы Алжирской Сахары были выделены представители порядка *Actinomycetales*: штамм *Nonomuraea* sp. NM94 [Badji et al., 2007], штаммы *Streptosporangium* Sg 10 и Sg3 [Boudjella et al., 2006, 2007] и штамм *Saccharothrix algeriensis* SA 233T [Zitouni et al., 2004]. Кроме того, в работе [Zitouni et al., 2005] из двадцати пяти образцов почв Алжирской Сахары в культуры было выделено восемьдесят шесть представителей родов *Nocardiopsis* и *Saccharothrix*.

Одним из источников зарождения пыльных бурь в Сахаре является район солевых озер Южного Туниса, называемый местными жителями Шоттс [Stivaletta & Barbieri, 2009; Jilbert et al., 2010]. Бактериальное разнообразие этого региона, изученное на примере озера Эль-Голеа [Hacene et al., 2004], представлено в основном родами *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, а также *Streptococcus* и бактериями из семейства *Enterobacteriaceae* (рода *Salmonella*, *Shigella* и *Escherichia*). Кроме того в культуры выделено пятьдесят два галотолерантных представителя домена *Archaea* из семейства *Halobacteriaceae* [Hacene et al., 2004].

Устойчивость к высушиванию у микроорганизмов, населяющих пустыни, часто коррелирует с адаптациями к другим видам стресса: повышенной солености, низкой

концентрации питательных веществ и УФ излучению [Torsvik & Øvreås, 2008]. Так, два устойчивых к радиации штамма, *Deinococcus deserti* VCD115T и VCD117, были выделены в культуру после гамма-облучения в 15 Гр смеси образцов почвы Сахары из Марокко и Туниса [De Groot et al., 2005]. Из почвы пустыни Татауина (Южный Тунис) выделены 31 штамм, относящиеся к *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и группе *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) [Chanal et al., 2006]. Анализ некультивируемого разнообразия путем клонирования генов 16S рРНК показал присутствие 11 бактериальных разделов, из которых доминировали представители *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*, а также нетермофильной группы архей – *Crenarcheota*. После облучения образцов почвы 15 Гр гамма-излучения наблюдали только бактерий, родственных *Firmicutes* (*Bacillus*), *Deinococcus-Thermus* и *Alphaproteobacteria* [Chanal et al., 2006].

Анализ микробного сообщества метеорита из пустыни Татуина по данным секвенирования генов 16S рРНК показал, что большинство микроорганизмов были сходны с обнаруженными ранее в почве пустыни [Chanal et al., 2006], при этом доминировали представители *CFB*, *Cyanobacteria* и *Alphaproteobacteria* [Benzerara et al., 2006].

1.6 Статистические методы анализа в оценке биоразнообразия микробных сообществ

Биологическое разнообразие или биоразнообразие – это совокупность разных видов организмов, присутствующих в виде сообщества в данном образце или заселяющих данную экосистему. Ключевым вопросом большинства экологических исследований является документирование и сравнение разнокачественности, разнообразия сообществ в окружающей среде [Hughes & Bohannan, 2004; Терещенко и др., 1994]. Основные характеристики понятия “биоразнообразия”: *видовое богатство* и *выравненность* обилия видов. Под первым понимается либо общее число видов, либо отношение числа видов к общему числу особей, площади (в наземных экосистемах) или объема (в водных экосистемах) [Залепухин, 2003]. Выравненностью же называют равномерность распределения видов по их обилию в сообществе [География и мониторинг биоразнообразия, 2002]. На этих показателях, чаще всего, основан расчет различных индексов, характеризующих структуру сообществ и позволяющих, таким образом, наиболее полно сравнить их между собой [Терещенко и др., 1994].

Несмотря на то, что теория оценки биоразнообразия была основана на примере макроорганизмов, для которых существует определенное понятие вида, она, также, позволяет проводить оценку видового богатства сообществ микроорганизмов [Hughes & Bohannan, 2004]. Так, в случае микробного разнообразия пользуются понятиями “филотипа”

(когда вид определяется по сходству эволюционно-консервативных генов, к примеру, 16S рРНК – >97% сходства [Stackebrandt & Goebel, 1994]) или “операционных таксономических единиц” (operational taxonomic units – OTUs).

Для оценки микробного разнообразия используют три подхода: 1) расчет индексов; 2) построение кривых относительного обилия или доминирования-разнообразия; 3) построение моделей распределения видового обилия. В работах, посвященных измерению разнообразия микробных сообществ, используются многочисленные индексы, из которых самым популярным является индекс Шеннона-Уивера [Hill et al., 2003]. Данный индекс был заимствован из теории информации и относится к группе индексов неоднородности, так как он учитывает, одновременно, и выравненность и видовое богатство [География и мониторинг биоразнообразия, 2002]. Индекс Шеннона-Уивера рассчитывается по формуле:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i,$$

где p_i – доля клонов i -того фило типа; s – общее число фило типов в библиотеке клонов.

Расчеты индекса Шеннона-Уивера предполагают, что особи (клоны) попадают в выборку случайно из “неопределенно большой” генеральной совокупности, причем в выборке представлены все виды генеральной совокупности [География и мониторинг биоразнообразия, 2002]. Индекс положительно коррелирует с числом и выравненностью видов в популяции, так что каждый новый фило тип повышает значение индекса [Hughes & Bohannan, 2004]. Причины ошибок и трудности связанные с использованием этого индекса заключаются в том, что невозможно включить в выборку все виды реального сообщества (т.е. покрыть все разнообразие сообщества библиотекой клонов) и сложно интерпретировать значения индекса для разных сообществ. Чтобы избежать зависимости оценки индекса от числа видов, прибегают к использованию показателя выравненности, рассчитываемого на основе индекса Шеннона-Уивера. Кроме того менее чувствительными к размеру выборки считаются индексы доминирования Симпсона и Бергера-Паркера [Hill et al., 2003]. Последнее время, наравне с индексом Шеннона-Уивера, в оценке разнообразия микробных сообществ часто используют индекс видового богатства Чао 1 [Chao, 1984]. Индекс Чао 1 предполагает, что редкие виды несут основную информацию о числе “отсутствующих” видов, поэтому при расчете используются только единичные или дважды встреченные виды. Расчет проводится согласно формуле:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1^2}{2n_2},$$

где S_{obs} – число наблюдаемых видов, n_1 – число единичных видов и n_2 – число видов встреченных дважды [Chao, 1984]. Индекс Чао 1 особенно успешно применим в случае

сообществ со смещением в сторону классов низкого обилия, что часто актуально для микробных сообществ. Однако, при малом объеме выборки, индекс значительно недооценивает реальное видовое богатство сообщества [Colwell & Coddington, 1994; Hughes et al., 2001].

На сегодняшний день, в связи с широким применением молекулярного клонирования и секвенирования к изучению микробных сообществ, основной проблемой является проблема репрезентативности выборки. Несмотря на то, что оценка реального разнообразия прокариот в природе остается предметом полемики [Hughes et al., 2001; Curtis et al., 2002; Schloss & Handelsman, 2004; Kemp & Aller, 2004], существует ряд подходов, позволяющих получить некоторые представления о достаточности выборки для оценки разнообразия конкретного сообщества. С этой целью многие авторы используют кривые сбора или, иначе, кривые зависимости математического ожидания количества флотипов в случайной выборке из библиотеки от размера этой выборки [см. например, Stach et al., 2003; Curtis et al., 2006; Yergeau et al., 2007; Soo et al., 2009]. Считается, что выход кривой на плато является индикатором достаточности выборки. Однако, в связи со значительным различием видового богатства природных сообществ, определить исходный размер выборки практически невозможно. Так, в случае почвы дождевых лесов Амазонки, исследователями было отобрано 98 нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, из которых только две пары последовательностей оказались схожи между собой. Предполагается, что, в среднем, для оценки видового богатства почв необходимо отобрать около 10000 нуклеотидных последовательностей [Schloss & Handelsman, 2004]. Несмотря на это, применение кривых сбора позволяет получить полезную информацию о степени разнообразия природных сообществ и дает возможность их сравнения между собой. Развитие технологий секвенирования и метагеномный подход, по-видимому, позволят решить проблему размера выборки в ближайшем будущем для большинства экологических ниш [например, Venter et al., 2004; Simon et al., 2009]. По-мнению американского исследователя Н. Пэйса, для оценки и документирования биоразнообразия микробных сообществ каждой возможной экологической ниши необходимо изучить, по крайней мере, 1000 клонов на сообщество [Pace, 1997].

Помимо сравнения микробных сообществ с использованием вышеизложенных подходов, основанных на теории оценки биоразнообразия, существуют также статистические методы, позволяющие оценить, насколько существенными являются различия в структуре двух или более сообществ. К одним из первых и наиболее часто используемых методов относится LIBSHUFF анализ (от “LIBrary SHUFFling” – перетасовка библиотек) [Singleton et al., 2001]. Данный анализ основан на расчете покрытия библиотек по формуле Good:

$$C = (1 - n/N) \times 100,$$

где n – это число единичных клонов, и N – общее число клонов в библиотеке [Good, 1953]. Покрытие каждой отдельной библиотеки называют “гомологичным”, тогда как для сравнения библиотек рассчитывают “гетерологичное”, т.е. покрытие одной библиотеки (X) относительно другой (Y):

$$C_{XY} = (1 - n_{XY}/N) \times 100,$$

где n_{XY} – это число клонов в библиотеке X , которые не представлены в библиотеке Y [Singleton et al., 2004]. Кроме того, во внимание принимается эволюционная дистанция (D), согласно которой определяют родство нуклеотидных последовательностей между собой внутри каждой библиотеки и между собой. Гомологичное и гетерологичное покрытие, таким образом, будут варьировать в зависимости от заданной эволюционной дистанции, что можно выразить в виде соответствующих кривых $C_{X/Y}$ от D и C_{XY} от D . Сходство гомологичных и гетерологичных кривых отражает сходство библиотек между собой. В свою очередь степень различия двух библиотек (ΔC_{XY}) между собой определяют согласно статистическому тесту Крамера-Вон Миза [Pettitt, 1982]. Если две библиотеки сходны между собой, то значение $C_X(D)$ близко к $C_{XY}(D)$ на всех эволюционных дистанциях после перетасовки последовательностей в случайном порядке, порождая небольшое различие для ΔC_{XY} [Schloss et al., 2004]. Насколько существенным является различие, помогает расчет значения P :

$$P = r/(N + 1),$$

где r – это ранг эмпирических значений ΔC_{XY} . Считается, что две библиотеки существенно различаются, когда наименьшее из двух значений P , рассчитанных при попарном сравнении библиотек, меньше или равно 0,025 с достоверностью 95% ($P = 0,05$), что называют поправкой Бонферрони [Singleton et al., 2004]. При увеличении числа сравниваемых библиотек критическое значение P изменяется с учетом данной поправки (например, для четырех библиотек критическое значение $P \leq 0,0043$). Однако интерпретация данных, полученных с помощью LIBSHUFF анализа, должна учитывать методику создания клоновых библиотек, праймеры используемые в ПЦР и протокол последней, методику выделения ДНК и другие процедуры, которые могут варьировать для разных образцов [Singleton et al., 2004].

На сегодняшний день в связи с активным применением методов экологической статистики при оценке микробных сообществ, в мировой литературе можно существует достаточно большой выбор анализов, позволяющих сравнить структуру микробных сообществ [см. например Lozupone et al., 2005; Schloss & Handelsman, 2006]. Подводя итоги, следует отметить, что выбор того или иного анализа в оценке микробного разнообразия все еще остается на рассмотрение исследователя.

SUMMARY OF THE CHAPTER 2: MATERIALS AND METHODS

Four snow samples with Saharan dust layers dating to 2006, 2008 and 2009 deposition and one sample of clean snow (with no visible sign of Saharan dust) were collected at Col du Dôme, located at 4250 m a.s.l. close to the MtBl summit (French Alps), during several field trips (Table 1, Fig. 4). A sample of Saharan dust was collected during a short rain deposition at ~ 200 m a.s.l. in the vicinity of the city of Grenoble, France in May 2008. Dust deposited at the same time also contaminated one of the snow samples described above. Finally, surface soil was collected in March 2008 in the vicinity of oasis Ksar Ghilane, in the Saharan desert, Tunisia, 2000 km away from MtBl (part 2.1). Samples described above served as the objects of this study (part 2.2).

Due to the expected low biomass in snow samples, all precautions were taken to exclude possible contaminations. The snow samples were melted at room temperature within the class 10 000 (ISO 7) dust-free room facilities inside a class 100 (ISO 5) laminar flow hood of LGGE (Grenoble, France) and obtained meltwater was concentrated several thousands times (part 2.3).

Part 2.4 combines all molecular-biological means which was used in this study. The genomic DNA (gDNA) was extracted using the PowerSoil DNA Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (MoBio Laboratories) in the class 10 000 (ISO 7) dust-free room facility (LGGE). The V3-V5 variable region of bacterial 16S rRNA genes was amplified with bacterial primers 338Fb and Com2-905Rm (a bit modified version of primer com2) as described previously (Bulat et al., 2004; Lavire et al., 2006). The full-length sequence of bacterial 16S rRNA genes was amplified with bacterial primers 1492R and w001 using the same cycling protocol as for the partial gene amplification. Total RNA was extracted using a PowerWater RNA Isolation Kit (MoBio Laboratories). The RT-PCR reaction was carried out using SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The RT step involved the same V3-V5 rRNA gene specific primers described above and was performed at 55 °C for 30 min followed by PCR for 43 cycles at a 53 °C primer annealing temperature under the same conditions as with gDNA. For both DNA and RNA samples, sham nucleic acid (NA) extractions and NA-free PCR/RT-PCR were always run in parallel as contamination controls.

The amplicons were cloned into the TOPO TA cloning vector using chemically competent TOP10 cells (both Invitrogen). The presence and size of inserts were assessed by PCR using a vector pCR-4 sequence-based primers flanking insert.

All clones were analyzed by amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) using *AluI*, *HpaII* and *HaeIII* restrictases (NEB). The restriction fragments were separated by electrophoresis in 4.5%

agarose gel and visualized after ethidium bromide staining. Similar restriction band profiles were combined into a single ribotype.

As a preliminary estimate of library diversity, Good's coverage (Good, 1953) was computed, and additional clones were analyzed, if needed, in order to improve coverage and to reach the $\geq 50\%$ threshold. One to three clones representing a ribogroup were amplified with pCR-4-based primers, the amplicons were purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and sequenced by LGC Genomics GmbH (Germany).

Part 2.5 presents the bioinformatical means which we used to analyse the sequence data. Sequences were edited using Chromas Lite 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) and checked for chimera formation using Chimera Check 2.7 (http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/docs/chimera_doc.html). Sequences were grouped into phylotypes using a threshold of $\geq 98\%$ sequence similarity. The same value was used for phylotype identification amongst BLAST-found closest relatives in GenBank. Since only representative clones of unique ARDRA ribotype were sequenced, the clones within the group were assigned to the same phylotype.

Phylotypes were compared with the Contaminant Library (CL) (the sequences revealed in different control reactions; Bulat et al., 2004), and only those absent in the CL were further identified using the GenBank database with the BLAST software in a binary mode: closest environmental clone and closest taxon. Phylotypes showing $\leq 90\%$ sequence similarity with known taxa were assigned to UNCLASSIFIED while those showing con-specificity with normal human microbiome members (Grice et al., 2009; Turnbaugh et al., 2009) - Human-Associated (HA) phylotypes. Phylotypes demonstrating con-specificity with Genbank clones/isolates recovered from cold environments were assigned as 'icy' phylotypes.

The nucleotide sequence data determined in this study were deposited in the GenBank database under the accession numbers: HM104591-HM104622, HQ396527-HQ396619, HQ402563-HQ402566, and JF832298-JF832350.

Sequences were aligned using CLUSTALW (Higgins et al., 1994). The phylogenetic trees were generated using the Maximum parsimony algorithm with the MEGA4 (Kumar et al., 2008). The branch support was calculated for 500 bootstrap replicates of the data. The percent coverage of the clone libraries was calculated using Good's formula (1953). Shannon-Weaver index and Chao1 richness estimate were generated through the DOTUR 1.53 (Schloss and Handelsman, 2005). Rarefaction curves were computed using the aRarefact Win 1.3 (available <http://www.uga.edu/strata/software/anRareReadme.html>). The 16S rRNA clone libraries were compared using the LIBSHUFF option in Mothur v. 1.15.0 (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page).

In order to identify the potential source of the dust transported to Col du Dôme, the back-trajectories were reconstructed based on approximate dating of the dust events using a HYSPLIT model with GDAS (global data assimilation system) meteorological data (National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), Air Resources Laboratory (ARL), <http://ready.arl.noaa.gov/index.php>) (part 2.6).

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Отбор проб

Сбор образцов снежного покрова проводили в ходе экспедиций сотрудников ЛГГОС 2006, 2008 и 2009 гг. на ледник Монблан, Французские Альпы, на высоте 4250 м над у.м. (рис. 4; табл. 1). Среднегодовая температура воздуха на леднике составляет -11°C , а сезонная аккумуляция снежного покрова варьирует от 0,5 до 2,4 м водного эквивалента/год. В летний период температура на данной высоте может достигать 0°C , что приводит к образованию очагов поверхностного таяния снега [Vincent et al., 2007]. Как правило, в весенне-летний период отмечается высокая частота пыльных бурь в Северной Африке, последствия которых можно наблюдать в виде дискретных слоев пыли в толще снежного покрова на леднике Монблан.

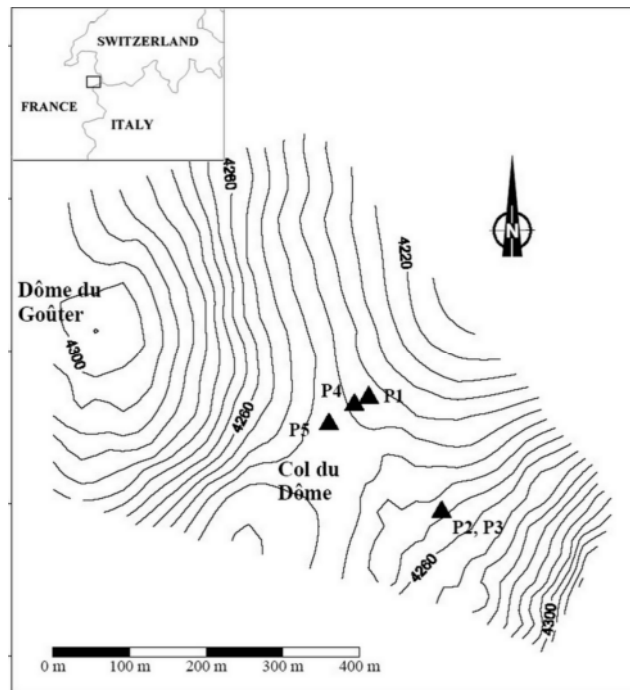


Рисунок 4. Место отбора проб снежного покрова на леднике Монблан (4250 м над у.м.). Изогипсы поверхности ледника проведены согласно Vincent et al. [2007]. Точки отбора проб и образцы: P1 - SDm06/2006; P2 - SDm05/2008; P3 - SDm06/2008 (P2 и P3 – два разных горизонта одного снежного шурфа), P4 - SDm05/2009 и P5 - Dm08/2009. В верхнем левом углу карты показано географическое положение ледника Монблан

В результате сотрудниками ЛГГОС были отобраны образцы снега со слоями почвенной пыли, осажженной на поверхность ледника вследствие переноса пыли из Сахары в июне 2006 г. (SDm06/2006), мае 2008 г. (SDm05/2008), июне 2008 г. (SDm06/2008), и мае 2009 г.

(SDm05/2009). Время нахождения почвенной пыли в снежном покрове варьировало от недели до 3-х месяцев (табл. 1). Образец снега, не содержащий пыль Сахары, был отобран на леднике в августе 2009 г. (Dm08/2009). Три образца снега с пылью Сахары (SDm06/2006, SDm05/2008 и SDm06/2008) были отобраны путем погружения контейнера в нескольких случайных точках (от 2 до 8 точек с интервалом 10 – 15 см) в стенку снегового шурфа (на глубине от 4 до 140 см), содержащего слой осажденной пыли. Образец снега с пылью Сахары от мая 2009 г. (SDm05/2009) и образец снега без пыли Сахары (Dm08/2009) были собраны в пластиковые ящики путем забора слоев снега (до 15 см глубиной) с участка размером 50 на 100 см с помощью деконтаминированного совка. В связи с ожидаемой малой биомассой в образцах снежного покрова, в особенности в образце снега без пыли Сахары, были предприняты все возможные меры предосторожности с целью ограничения сопутствующей контаминации. Поверхностные слои снега (верхние 2 - 5 см), находящиеся в контакте с окружающим воздухом, предварительно удаляли с помощью чистых совков. Исследователи надевали одноразовые комбинезоны “Tyvek” и виниловые перчатки и собирали образцы в одноразовые/деконтаминированные пластиковые контейнеры. Контейнеры и пластиковые ящики с образцами помещали в металлические ящики и доставляли в ЛГГОС (Франция). До начала обработки образцы хранили в холодной комнате при -15 °C.

В сравнительный анализ были также взяты следующие образцы:

1. Образец почвенной пыли, осажденной в г. Гренобль (Франция) вследствие переноса пыли Сахары в мае 2008 г. (SD05/2008), был отобран С.А. Булатом и J.R. Petit (ЛГГОС, Франция). Образец пыли, соответствующий этому событию переноса, был позднее отобран сотрудниками ЛГГОС в снежном покрове ледника Монблан (SDm05/2008);

2. Образец песчаной пустынной почвы (SS03/2008), отобранный в марте 2008 г. в окрестностях (10 - 15 км) оазиса Ксар Гилан, Тунис, Северная Африка, был предоставлен Р. Normand (ОЭМ, Франция). Оазис Ксар Гилан один из труднодоступных и самых южных оазисов Туниса, расположен в 140 км в глубине Туниской Сахары. Образец отобранной почвы представлял собой крупнозернистый кирпично-охристый песок.

Таблица 1 – Места отбора проб и характеристика исследуемых образцов

Образец	Место отбора пробы, дата	Объем	Тип пробоотборника и объем, мл	Концентрационный фактор	Дата пыльной бури	Время нахождения пыли в снеге, мес/глубина слоя пыли, см	Модалность частиц пыли*, мкм	Численность клеток**, мл ⁻¹
Образцы, содержащие пыль Сахары типа смектит								
SDm05/2008	Монблан, 30.06.2008	345 мл	Elkay 100	х 176,3	05.2008	1,0/70 - 76	~ 6	2,14 x 10 ²
SD05/2008***	Гренобль, 28.05.2008	1,0 г	Eppendorf tube 1,5	н.п.	05.2008	н.п.	~ 9	н.д.
SDm06/2008	Монблан, 30.06.2008	90 мл	Elkay 100	х 111,3	06.2008	0,25/4 - 7	~ 6,5	1,10 x 10 ²
Образцы, содержащие пыль Сахары типа иллит								
SDm06/2006	Монблан, 10.09.2006	250 мл	Elkay 100	х 121,3	06.2006	3,5/139	~ 6	н.д.
SDm05/2009	Монблан, 20.05.2009	МЕГА	Crate 36000	х 1275	05.2009	0,25/5 - 15	~ 4	0
н.д.								
Dm08/2009	Монблан, 27.08.2009	МЕГА	Crate 36000	х 6035	н.п.	н.п.	~ 3	2
SS03/2008	Сахара (Ксар Гилан, Тунис), 03.2008	0,1 г	Eppendorf tube 1,5	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	н.д.

Примечания

1 н.п. – не применимо.

2 н.д. – нет данных.

3 МЕГА – до 8 л талой воды.

* Приведены данные полученные J-R. Petit [Chuvochina et al., 2011].

** Приведены данные, полученные D. Marie [Chuvochina et al., 2011].

*** Образец пыли Сахары, собранный в г. Гренобль вследствие переноса пыли в мае 2008 г. Слой пыли, соответствующий этому событию, был отобран в снежном покрове ледника приблизительно через один месяц (SDm05/2008).

2.2 Объекты исследований

Объектами данного исследования служили образцы: 1) снежного покрова ледника Монблан, содержащего почвенную пыль Сахары вследствие четырех событий переноса пыли; 2) снежного покрова ледника Монблан, не содержащего пыли Сахары. Также дополнительными объектами исследования были образцы почвенной пыли Сахары, осажденной в г. Гренобль (Франция) вследствие события переноса пыли в мае 2008 г., зафиксированного позднее на леднике; песчанной пустынной почвы Сахары, собранной в окрестностях оазиса Ксар Гилан (Тунис).

2.3 Подготовка проб

Образцы снега были расплавлены при комнатной температуре в “чистой” комнате класса чистоты 10000 в ламинарном кабинете класса 100 ЛГГОС (Гренобль, Франция). Для концентрирования биомассы путем центрифугирования использовали фильтрующие колоноки Centriprep YM3 или Centricon Plus-70 (“Millipore”, США) с мембранными фильтрами 3000 и 5000 Да, соответственно (табл. 1). Концентрирования проходило в два этапа: на первом этапе образец центрифугировали при 2500 g в течение 15 – 20 мин при 4 °C; на втором этапе осадок элюировали с фильтров центрифугированием при 1000 g в течение 2 мин при 4 °C. Для дополнительных анализов и архива проб из каждого образца отбирали аликвоты по 10 мл и хранили при -20 °C. С целью соблюдения максимально чистых условий, при обработке проб надевали хирургические перчатки, маски и стерильные комбинезоны. Кроме того, все инструменты, оборудование и рабочие поверхности обрабатывали растворами для деконтаминации, например, Proline Biocontrol (Biohit). Процедуры деконтаминации подробно описаны ранее [Булат и Алехина, 2008].

2.4 Молекулярно-филогенетические методы анализа

2.4.1 Экстракция геномной ДНК

Выделение препаратов геномной ДНК из образцов сконцентрированной воды талого снега с пылью и без пыли Сахары, почвенной пыли Сахары и песчанной почвы Сахары проводили с помощью набора PowerSoil DNA Isolation Kit согласно протоколу фирмы-изготовителя (“MO BIO Laboratories”, США). Используемый набор благодаря технологии Inhibitor Removal Technology позволяет получать высокий уровень чистоты препарата ДНК,

что способствует проведению более успешной ПЦР. Процедуру выполняли в “чистой” комнате класса чистоты 10000 в ламинарном кабинете класса 100 ЛГГОС (Гренобль, Франция).

Для проверки чистоты используемого набора реактивов на присутствие посторонней ДНК одновременно с опытной проводили контрольную реакцию экстракции без добавления исследуемого образца.

2.4.2 Экстракция геномной РНК

Выделение препаратов геномной РНК из образца сконцентрированной воды талого снега, не содержащего пыль Сахары, проводили с помощью набора PowerWater RNA Isolation Kit согласно протоколу фирмы-изготовителя (“MO BIO Laboratories”, США). Процедуру выполняли в “чистой” комнате класса чистоты 10000 в ламинарном кабинете класса 100 ЛГГОС (Гренобль, Франция).

Присутствие чужеродной ДНК оценивали по результатам контрольной экстракции без добавления образца.

2.4.3 Амплификация генов 16S рРНК

2.4.3.1 ПЦР с использованием универсальных праймеров (область V3-V5)

Амплификацию генов 16S рРНК осуществляли с использованием пары вырожденных праймеров 338Fb (0,08 пмоль/мкл) и com2mod (0,72 пмоль/мкл) на V3-V5 вариабельную область гена как описано ранее [Bulat et al., 2004; Lavire et al., 2006]. Реакция амплификации включала 43 цикла с использованием 2 ед. FastStart ДНК полимеразы (“Roche”, Франция) в 20 мкл ПЦР смеси и температуре отжига праймеров 53 °С. Реакцию проводили на приборах TProfessional thermocycler (“Biometra”, Германия).

Одновременно с опытной проводили контрольную реакцию амплификации без добавления ДНК матрицы – негативная ПЦР. Результаты опытной и контрольной реакций, а также контрольной ДНК экстракций оценивали визуально с помощью электрофореза в 1,6% агарозном геле в 0,5x TBE-буфере (89 mM трис-HCl, 89 mM борной кислоты, 2 mM ЭДТА, pH 8,0) и последующей окраской SYBR Gold (“Invitrogen”, США).

2.4.3.2 ПЦР с использованием универсальных праймеров (полноразмерный ген)

Для получения полноразмерной последовательности гена 16S рРНК были использованы универсальные праймеры: 1492R [Eden et al., 1991; Weisburg et al., 1991] и слегка модифицированный праймер w001 [Godon et al., 1997]: 5' - AAG AGT TTG ATC MTG GCT C - 3', где М = А : С. Амплификацию проводили в течение 40 циклов в 20 мкл ПЦР смеси того же состава, что и при амплификации V3-V5 вариабельной области гена 16S рРНК с соблюдением тех же температурно-временных параметров (см. подраздел 2.4.3.1), за исключением концентрации праймеров, которая составляла 0,075 пмоль/мкл.

Проведение контрольных реакций и анализ ПЦР продуктов после амплификации см. выше (подраздел 2.4.3.1).

2.4.3.3 ОТ-ПЦР с использованием универсальных праймеров (область V3-V5)

Для проведения ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) использовали набор SuperScript III One-Step RT-PCR System и полимеразу Platinum Taq DNA ("Invitrogen", США) и следовали рекомендациям производителя. Получение кДНК осуществляли путем синтеза на матрице мРНК при 55 °С в течение 30 мин. Далее полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с теми же универсальными праймерами (338Fb/com2mod), что использовали для амплификации V3-V5 области гена 16S рРНК при использовании ДНК в качестве матрицы (см. подраздел 2.4.3.1). Температурно-временной профиль ПЦР реакций также соответствовал реакциям с использованием ДНК в качестве матрицы (см. подраздел 2.4.3.1).

Контроль на присутствие посторонней ДНК проводили аналогично контрольным реакциям с ДНК. Анализ продуктов амплификации опытной и контрольных реакций см. выше (см. подраздел 2.4.3.1).

2.4.3.4 ПЦР с использованием вектор-специфичных праймеров для определения интеграции клонированных ПЦР-фрагментов в вектор

Для проверки интеграции клонируемых ПЦР-фрагментов ожидаемого размера в плазмидный вектор использовали метод ПЦР с вектор-специфичными праймерами. Размер ожидаемой вставки - около 1731 и 811 пар нуклеотидов (п.н.) для полноразмерного гена 16S рРНК и его V3-V5 области, соответственно - суммировали исходя из размера полилинкера вектора pCR 4 TOPO (221 п.н. плюс 1510 и 590 п.н., соответственно). Отбор

материала колоний, предположительно содержащих вставку, производили микробиологическими иглами с параллельным высевом на чашки для сохранения клонов. После соприкосновения с колонией игла непосредственно помещалась в пробирку с ПЦР смесью.

ПЦР включала 24 цикла с парой праймеров Bul1 и Bul2 (30 сек – 93 °С, 60 сек – 55 °С, 60 сек – 72 °С, первая реакция денатурации матрицы 3 мин – 94 °С, последняя реакция элонгации ДНК 3 мин – 72 °С). Продукты амплификации анализировали при помощи электрофореза в 1,6% агарозном геле в 0,5х TBE-буфере с последующей окраской бромистым этидием (1,5 мкг/мл) и документировали с помощью фотосъемки камерой Olympus C-4000 ZOOM.

С целью очистки ПЦР продуктов от красителя и примесей использовали набор MinElute Purification Kit (“Qiagen”, Германия) согласно рекомендациям производителя. Увеличение выхода очищенной ДНК добивались двойной финальной элюцией (10 мкл и 10 мкл) TE-буфером (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0). Конечный объем одного элюата составлял 19 мкл. Количественная оценка очищенной ДНК проводилась визуальным методом электрофореза в 1,6% агарозном геле в 0,5х TBE-буфере в сопоставлении с маркером 100 п.н. DNA Ladder (“New England Biolabs Inc.”, США). Фрагменты длиной в 500 и 1000 п.н. служили референтными точками соответствующими 97 и 95 нг ДНК (из расчета 0,5 мкг маркера на лунку). Полученный очищенный ПЦР продукт секвенировали.

2.4.4 Молекулярное клонирование

ПЦР продукты, наработанные после первичной амплификации, клонировали в вектор pCR-4 с использованием набора TOPO TA Cloning Kit for Sequencing и химически компетентных клеток One Shot TOP10 в соответствии с рекомендациями производителя (“Invitrogen”, США). Объем лигазной смеси для клонирования одного образца составлял 6 мкл (1 – 4 мкл – ПЦР продукта, 1 мкл – солевого раствора, 1 мкл – молекулы вектора, 0 – 3 мкл – стерильной воды). Объем клонируемого ПЦР продукта определялся исходя из количества материала после первичной амплификации. Для повышения эффективности лигирования ДНК время реакции увеличивали до 30 мин при комнатной температуре (22 – 23 °С). После добавления 2 мкл лигазной смеси к компетентным клеткам инкубировали на льду в течение 30 мин. Далее все этапы осуществляли согласно протоколу производителя. Аликвоту трансформированных клеток (50, 30 и 10 мкл) высевали на чашки Петри с LB-агаром с ампициллином (100 мкг/мл LB-агара) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С.

Отбор рекомбинантных клонов осуществляли путем прямой амплификации клонированных фрагментов с использованием вектор-специфичных праймеров (см. подраздел 2.4.3.4).

Эффективность проведения трансформации оценивали путем дополнительной трансформации клеток с интактной плазмидой pUC19, имеющей ген устойчивости к ампициллину, из набора реактивов TOPO TA Cloning Kit for Sequencing по методике, описанной производителем (“Invitrogen”, США).

2.4.5 Приготовление грубых клеточных лизатов из отдельных клонов

Отобранные колонии, со вставкой ожидаемого размера, выращивали на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) в течение ночи при 37 °С. Материал выросших колоний инкубировали (лизировали) 10 мин при 100 °С в растворе, содержащем ТЕ-буфер (10:0,1), 150 мМ NaCl и 0,1% Triton X-100. Для этого видимое количество клеточного материала помещали бактериологической петлей в пробирку 1,5 мл с лизирующим буфером объемом 200 мкл. Обработанные клетки осаждали центрифугированием, и готовые лизаты хранили при температуре 4 °С.

2.4.6 Рестрикционный анализ ПЦР-фрагментов

Предварительную оценку микробного разнообразия проводили методом рестрикционного анализа отобранных рекомбинантных клонов с помощью трех эндонуклеаз рестрикции *AluI* (10 ед./мкл), *HpaII* (20 ед./мкл) и *HaeIII* (10 ед./мкл) (“Fermentas”, Литва). Исходя из общего объема смеси 10 мкл (смесь готовили на стерильной воде), брали 2,5 – 3 мкл амплифицированного образца и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С с рестриктазой (2 - 2,5 ед./образец) в 1х Buffer Tango (“Fermentas”, Литва). Для остановки реакции смесь инкубировали на водяной бане при 65 °С. Продукты расщепления анализировали электрофорезом в 4,5% агарозном геле в 0,5х TBE-буфере и окрашивали бромистым этидием в течение 10 - 15 мин. В качестве маркера молекулярной длины использовали маркер 100 bp DNA Ladder (“New England Biolabs Inc.”, США). Ампликоны, схожие по картине расщепления, объединяли в один риботип и от одного до трех представителей от каждого секвенировали.

2.4.7 Секвенирование ПЦР-фрагментов

Для определения нуклеотидной последовательности репрезентативных клонов образцы очищенных ПЦР продуктов с концентрацией ДНК в растворе не менее 200 нг/мкл отсылали на автоматический секвенатор в коммерческую организацию LGC Genomics GmbH (Берлин, Германия).

2.5 Биоинформационный анализ данных

2.5.1 Анализ нуклеотидных последовательностей

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Chromas Lite 2.01 [<http://www.technelysium.com.au>] и BCM Search Launcher: Sequence Utilities [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>]. Проверку нуклеотидных последовательностей на наличие химерных структур осуществляли с помощью программы CHIMERA_CHECK version 2.7 [http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/docs/chimera_doc.html]. Выравнивание, сравнение и идентификацию нуклеотидных последовательностей проводили, используя программу CLUSTALW2 [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>] и алгоритм BLAST базы данных GenBank [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Последовательности клонов, показывающие более 98% сходства и одинаковый перечень близкородственных последовательностей в базе данных GenBank, объединяли в один флотип. Полученные флотипы сравнивали с собственной библиотекой контаминантов, созданной на основании нуклеотидных последовательностей, выявленных в контрольных реакциях [Bulat et al., 2004]. Нуклеотидные последовательности, показывающие более 98% сходства с последовательностями из библиотеки контаминантов (БК), в дальнейшем не рассматривали. Среди оставшихся “истинных” флотипов те, что показывали 90% и менее сходства по нуклеотидной последовательности с известными (опубликованными) таксонами относили к неидентифицированным флотипам. В свою очередь неидентифицированные флотипы, которые невозможно было отнести хотя бы к одному из филогенетических разделов по результатам филогенетического анализа, относили к неклассифицируемым флотипам. К доминантным флотипам относили флотипы, представленные тремя и более клонами в библиотеке.

Флотипы, показывающие более 98% сходства по нуклеотидной последовательности с микроорганизмами, входящими в состав нормальной микрофлоры человека [например, с

представителями микробиома кожи человека в GenBank – Grice et al., 2009, 2008; Turnbaugh et al., 2009; Ley et al., 2008], были маркированы как НА (Human Associated – “связанные” с человеком). Данные флотипы принимались во внимание на всех последующих стадиях анализа. Нуклеотидные последовательности филоипов, родственные 98% и выше микроорганизмам из различных холодных местообитаний относили к “холодолюбивым” флотипам.

Построение филогенетических дендрограмм проводили методом “maximum parsimony” с помощью программного пакета MEGA4 [Kumar et al., 2008]. Статистическую достоверность топологии выбранного дерева оценивали методом “bootstrap” путем анализа 500 альтернативных деревьев в той же программе.

Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК были депонированы в международную базу данных NCBI под номерами: HM104591 - HM104622, HQ396527 - HQ396619, HQ402563 - HQ402566 и JF832298 – JF832350.

2.5.2 Статистический анализ данных

2.5.2.1 Статистическая оценка достаточности размера библиотеки клонов

Репрезентативность полученных клоновых библиотек, т.е. достаточность размера выборки клонов для достоверного анализа структуры сообщества, оценивали с помощью расчета покрытия библиотек по Гуд (Good) и построения кривых зависимости количества флотипов в библиотеке от размера выборки в клонах (кривые сбора). Для расчета покрытия библиотек по Гуд использовали формулу:

$$(1 - n/N) \times 100,$$

где n – это число единичных клонов, N – общее число клонов в библиотеке [Good, 1953].

Расчет кривых сбора проводили с помощью программы aRarefactWin версия 1.3 [<http://www.uga.edu/strata/software/anRareReadme.html>], основанной на аналитическом алгоритме приближения Гульберта [Hurlbert et al., 1971].

2.5.2.2 Расчет индексов разнообразия

Анализ разнообразия и видового богатства микроорганизмов в исследуемых образцах проводили с помощью расчета индексов разнообразия Шеннона-Уивера [География и мониторинг биоразнообразия, 2002] и индекса видового богатства Чао 1 [Chao, 1984]

используя программу DOTUR 1.53 [Schloss & Handelsman, 2005]. Входные данные для программы подготавливали с помощью программ CLUSTALW2 и Phylip dnadist [<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=dnadist>]. В связи с тем, что секвенировались только репрезентативные клоны от каждого риботипа, допускали, что несеквенированные клоны, входящие в один риботип, сходны по нуклеотидной последовательности на 100% между собой.

2.5.2.3 LIBSHUFF анализ: сравнение клоновых библиотек

Степень различий клоновых библиотек оценивали с помощью расчета значения P , используя функцию LIBSHUFF анализа [Singleton et al., 2001] в программе Mothur v. 1.15.0 [http://www.mothur.org/wiki/Main_Page]. Входные данные для программы подготавливали с помощью программ CLUSTALW2 и Phylip dnadist [<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=dnadist>].

2.6 Идентификация источников зарождения пыльных бурь в Сахаре

Идентификацию возможных источников зарождения пыльных бурь в Сахаре для установления природы пыли (одного или разных источников), обнаруженной на леднике Монблан, выполняли с помощью построения обратных траекторий переноса воздушных масс с использованием метеорологической модели HYSPLIT (NOAA ARL Website [www.arl.noaa.gov/ready.php], GDAS meteorological data). Входные данные содержали информацию о приблизительной дате пыльной бури в пустыне Сахара в 2006, 2008 и 2009 гг. и координаты конечной точки переноса пыли – $45^{\circ} 50'$ с.ш. и $6^{\circ} 90'$ в.д. (место сбора на леднике Монблан).

SUMMARY OF THE CHAPTER 3: RESULTS AND DISCUSSION

Dust of Saharan origin seasonally affects high-elevation Alpine sites by disturbing the chemical composition of snow deposits (Preunkert et al., 2000). In order to determine the potential sources (mobilisation areas) of Saharan dust observed in snow samples collected at MtBl, we reconstructed the back-trajectories of air masses transported to MtBl. Also we used data on the dust elemental composition (kindly provided by S. Chevaillier and P. Formenti). Combined results indicated the North African origin of the dust with the most probable sources located in the Tunisian, Algerian and Libyan deserts (Fig. 5). These results are presented in part 3.1.

In part 3.2.1, bacterial diversity was assessed by constructing 16S rRNA gene clone libraries using partial (V3-V5) and full-length (FL) sequences obtained from the three snow samples containing Saharan dust (June 2006, May 2008 and May 2009 events) and “clean” snow sample containing no Saharan dust (Table 2). The number of the “true” phylotypes having passed our contamination control was 62 and 53 for V3-V5 and FL clone libraries, respectively (Table 3). Estimations of Good coverage, rarefaction curves and diversity indices showed similar results for V3-V5 and FL libraries of each sample except for snow containing Saharan dust of the May 2009 event (Fig. 6). The most complete match in terms of coverage and diversity was observed between V3-V5 and FL libraries for the snow containing Saharan dust of the June 2006 event. Libraries derived from the snow containing Saharan dust demonstrated higher diversity than those derived from the “clean” snow. Identification of partial and full-length sequences yielded 10 unidentified phylotypes, 7 of them were further assigned based on phylogenetic reconstruction as *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Deinococcus-Thermus*. Moreover 3 phylotypes were re-classified as *Alphaproteobacteria*. 12 HA-phylotypes have proved to be conspecific to clones or taxa of normal human microflora and grouped with *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The detail description of V3-V5 and FL libraries for each sample is given in parts 3.2.1.1 - 3.2.1.4 (Fig. 7 - 10). Briefly, dominant phylotypes recovered in our samples were assigned to different bacterial divisions: *Deinococcus-Thermus*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* with one phylotype remaining unclassified for snow containing Saharan dust of the June 2006 event; *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Firmicutes* for snow containing Saharan dust of May 2008 event; *Firmicutes* and *Actinobacteria* for snow containing Saharan dust of May 2009 event; *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria* for snow containing no Saharan dust. The highest similarity between V3-V5 and FL libraries in terms of dominant phylotypes was observed for snow containing Saharan dust of the June 2006 event. This observation is probably related to 3.5 months of dust preservation

period in snow (Table 4). Thus, construction of partial and full-length 16S rRNA clone libraries allowed us to achieve more complete assessment of bacterial diversity in studied samples.

In part 3.2.2, in order to explore the differences in bacterial diversity among snow samples containing Saharan dust, we constructed 3 complementary 16S rRNA gene clone libraries using V3-V5 sequences derived from the snow sample containing Saharan dust of June 2008 event, Saharan dust collected in Grenoble and Saharan sand collected in Tunisia (Table 2). Also a V3-V5 clone library based on RNA transcript was constructed for the snow sample containing no Saharan dust. A total of 67 “true” phylotypes were recognized in above samples, and 6 of them were categorized as HA-phylotypes. Out of 10 unidentified phylotypes, 4 were further assigned to *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and chloroplast DNA. The clone libraries corresponding to the Saharan dust collected in Grenoble and Saharan sand were the most diverse and also the most under-described libraries, as measured by indices and supported by rarefaction analysis and coverage estimates (Table 5, Fig. 11). Parts 3.2.2.1 – 3.2.2.4 present the description of each of complementary clone libraries (Fig. 12 - 15). Briefly, dominant phylotypes were represented by 4 bacterial divisions: *Actinobacteria* in snow containing Saharan dust of June 2008 event; *Cyanobacteria* in snow containing no Saharan dust studied by RNA approach; *Cyanobacteria* and *Alphaproteobacteria* in Saharan dust collected in Grenoble; *Bacteroidetes* in Saharan sand collected in Tunisia. These results were used mostly for comparison purpose.

Comparison of bacterial diversity data, obtained through V3-V5 and FL clone libraries constructions, showed significant differences in phylogenetic composition of microbial assemblages among snow samples containing Saharan dust as well as between samples containing Saharan dust and non-containing one. These results are reported in part 3.3.1 (Fig. 16 - 18) and further explored in part 3.3.2 together with complementary data. Note that results presented in part 3.3.2 (Fig. 19 - 23) are based on data from V3-V5 clone libraries. Additional data such as clay type of dust and dust particle size distribution were also taken into account (kindly provided by S. Chevaillier and J.R. Petit, respectively). Comparison of phylotype content amongst gene libraries showed that bacterial assemblages in alpine snow associated with four Saharan dust depositions over the period 2006 – 2009 are distinct in their phylogenetic composition. The Saharan dust samples of the same May 2008 event collected at low altitudes (as dust Grenoble) and high altitudes (as snowpack with dust on MtBl) also demonstrated different taxa occurrence and distributions. We hypothesize that the variability in bacterial species affiliation and distribution associated with Saharan dust results probably more from the conditions of dust transport and the preservation period in snow, than from dust sources. Together, these factors may also partly explain the differences in bacterial fingerprints observed between the Saharan dust containing samples and the Saharan sand sample. It is worth

noting that representatives of family *Geodermatophilaceae* were recognized almost in all Saharan-associated samples (Fig. 21).

Although the bacterial diversity of snow containing no Saharan dust was assessed using the same technique, the rDNA and rRNA clone libraries revealed a markedly different taxonomic pattern (part 3.3.3). Detailed analysis of the rRNA-based library resulted in the identification of a dominant cyanobacterial phylotype 97% related to *Stigonema ocellatum*. We suggest that this photoautotrophic bacterium may have slowly propagated at sub-zero temperature.

Air-borne microorganisms raised up during dust storms survive long-range transport in the atmosphere and by this can colonize high-altitude snow packs. Fourteen phylotypes (hereafter called icy phylotypes) recognized in the snow samples containing Saharan dust and in a sample of “clean” snow presumably possess survival/colonization abilities in a snowpack. This assumption was inferred from their closest strain physiology and/or closest relative sources (different cold habitats). The majority of these icy phylotypes were grouped with *Cyanobacteria* while the remaining ones were assigned to *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* (Fig. 24, Table 7). Based on the closest strain physiology of icy phylotypes recognized, representatives of *Massilia*, *Phormidium*, *Tumebacillus* and *Clostridium* are related (within species range) to psychrophilic and psychrotrophic bacteria. Also bacteria recognized in MtBl snow are expected to live by autotrophic (photosynthesis, sulfur oxidation) and heterotrophic processes in MtBl snow. Snow samples containing Saharan dust appear to have more icy phylotypes than snow sample containing no Saharan dust (12 vs. 2 phylotypes, respectively). These results are presented in part 3.4 and based on the combined data from V3-V5 and FL clone libraries.

Discussion of the obtained results is integrated in each part of this chapter.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Происхождение почвенной пыли

Определение возможных источников происхождения пыли было осуществлено методом расчета обратных траекторий переноса воздушных масс из пустыни Сахары на ледник Монблан с учетом данных элементного состава пыли⁽¹⁾.

Обратные траектории изученных пылевых событий указывают практически одни и те же области происхождения пыли в Северной Африке (рис. 5). Отметим, что путь переноса пыли при отслеживании обратных траекторий воздушных масс со смещением $\pm$ один-два дня, отличался между четырьмя событиями переноса пыли, что говорит в пользу их различия в отношении источника пыли. Точки сближения траекторий переноса воздушного потока и линии рельефа говорят о возможности захвата почвенной пыли как из пустыни Сахара в момент бури, так и по ходу движения воздушных масс. Это означает, что пыль может быть смешанного типа, хотя основная ее масса, очевидно, происходит из пустыни Сахара.

Анализ обратных траекторий, рассчитанных для событий переноса пыли в июне 2006 г. и 2008 г., показал, что они, по-видимому, происходят из двух регионов Северной Африки: Алжир и Тунис. В то время как обратные траектории событий переноса пыли в мае 2008 г. и 2009 г. больше смещены в сторону Туниса и Ливии. Однако, в связи с большой погрешностью метода [$\sim 20\%$; Stohl, 1998] более точная интерпретация невозможна без дополнительных данных, таких, например, как минеральный состав пыли.

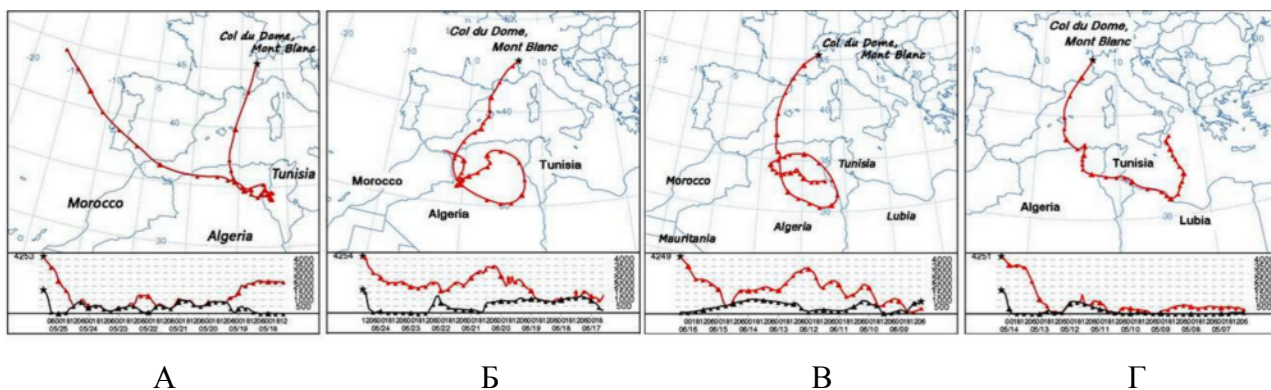


Рисунок 5. Обратные траектории переноса воздушных масс, достигших места сбора образцов (А – SDm05/2008, Б – SDm06/2008, В – SDm06/2006, Г - SDm05/2009) на леднике Монблан (обозначено черной звездой). Графики ниже рисунка показывают процесс перемещения воздушных масс (красная кривая) относительно рельефа (черная кривая)

⁽¹⁾ P. Formenti и S. Chevaillier (ЛАС, Франция) [Chuvochina et al., 2011]

На основании данных элементного состава образцов почвенной пыли методом рентгеновской флуоресценции все образцы, содержащие пыль Сахары были разделены на две группы: содержащие в основном иллит (SDm05/2008, SDm06/2008 и SD05/2008) и смектит (SDm06/2006, SDm05/2009). Оба указанных минерала широко распространены в почвах Северной и Западной Сахары, особенно в пустынных областях Туниса и Ливии [Руе, 1987]. В связи с этим, корреляции между типом минерала и соответствующей обратной траекторией переноса пыли для проанализированных образцов выявлено не было [Chuvochina et al., 2011]. Кроме того, следует отметить, что в образце снега, не содержащем пыль Сахары, при плавлении было обнаружено незначительное количество пылевого материала, который, по-видимому, был перенесен на ледник из окружающих долин вследствие постоянной конвекции воздушных слоев.

Таким образом, нами показано, что источником почвенной пыли, обнаруженной в четырех образцах снежного покрова ледника Монблан, является Северная Африка. Конкретный регион зарождения пыльных бурь остался неопределенным в связи с методологическими особенностями отбора и хранения проб и эрозией пыли как во время переноса в атмосфере, так и нахождения в снежном покрове.

3.2 Молекулярно-филогенетический анализ микробного разнообразия

Для молекулярно-филогенетического анализа микроорганизмов снежного покрова ледника Монблан использовали препараты суммарной ДНК, выделенной из снега, предварительно расплавленного и сконцентрированного. Необходимость концентрирования биоматериала из талой воды перед ДНК экстракцией и применение специальных чистых условий для сбора и обработки материала были обусловлены малой клеточной биомассой в образцах (см. табл. 1). По сравнению с данными литературы на сегодняшний день, численность клеток, измеренная в снежном покрове ледника Монблан, представляет одну из наименьших (после [Zhang et al., 2010a]) известных оценок для снежного покрова горных ледников [Chuvochina et al., 2011].

Исследование бактериального разнообразия проводили независимо с использованием в ПЦР двух праймерных систем: пары праймеров 338Fb и com2mod на V3-V5 варибельную область гена 16S рРНК и пары праймеров 1492R и w001mCFm для получения полноразмерной последовательности этого же гена (табл. 2). В связи с тем, что праймеры были вырождены по-разному, охват ими бактериальных таксонов из разных разделов

различался. В первом случае размер ампликонов составлял около 590 п.н., тогда как во втором – около 1510 п.н.

Таблица 2 – Клоновые библиотеки, созданные для исследуемых образцов с использованием двух праймерных систем на бактериальный ген 16S рPHK

Образец	Тип НК	Библиотека клонов	
		Область V3-V5 гена 16S рPHK	Полноразмерный ген 16S рPHK
Иллит*			
SDm05/2008	рДНК	MB-SD	f2SD
SD05/2008	рДНК	SD	-
SDm06/2008	рДНК	MB-SD2	-
Смектит			
SDm06/2006	рДНК	MB5	5f
SDm05/2009	рДНК	MS5	MS5sf, MS5f
Н.Д.			
Dm08/2009	рДНК	MS7	MS7f
	рPHK	MS7r	-
SS03/2008	рДНК	SS	-

Примечания

1 н.д. – нет данных.

2 НК – нуклеиновая кислота.

* Тип минерала, преобладающий в составе пыли исследуемых образцов.

Таким образом, суммарно для области V3-V5 было создано 8 библиотек клонов (далее V3-V5 библиотеки), а для полноразмерного гена – 4 библиотеки клонов (далее полноразмерные библиотеки). Предварительную оценку разнообразия в исследуемых образцах и степень покрытия библиотек проводили методом риботипирования с использованием трех рестриктаз: *AluI*, *HpaII* и *HaeIII*.

3.2.1 Изучение микробного разнообразия снега с пылью и без пыли Сахары путем анализа двух типов клоновых библиотек (V3-V5 и полноразмерной)

Для анализа микробного разнообразия снежного покрова с пылью Сахары от событий переноса в июне 2006 г., мае 2008 г. и мае 2009 г., а также снега, не содержащего пыль Сахары, были созданы клоновые библиотеки двух типов: на основе полноразмерных ампликонов гена 16S рPHK и ампликонов его V3-V5 варибельной области (см. табл. 2). В целом, для каждого образца было проанализировано около 40 клонов на библиотеку (исключение составила библиотека клонов для образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г., где было взято около 60 клонов каждого типа). Предварительная оценка микробного разнообразия была проведена методом рестрикционного анализа 178 и 179 клонов, полученных в результате создания V3-V5 и полноразмерных библиотек,

соответственно (табл. 3). В первом случае репрезентативные клоны каждого риботипа, имеющего специфический профиль рестрицированных фрагментов, были секвенированы и сгруппированы в 68 фило типов на основании сходства нуклеотидных последовательностей ($\geq 98\%$), а во втором – в 57 фило типов. Отметим, что последовательности, кон-специфичные фило типам контаминантов, были обнаружены во всех библиотеках, кроме V3-V5 библиотеки образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2008 г., и были представлены, как правило, одним-двумя фило типами на библиотеку. После их удаления из анализа, окончательная выборка составила 62 и 53 уникальных фило типа для V3-V5 и полноразмерных библиотек, соответственно. Интересно, что, соотношение количества фило типов к числу анализируемых клонов было практически одинаковым для библиотек обоих типов, за исключением образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г. В последнем случае количество фило типов в V3-V5 библиотеке в два раза превосходило число фило типов, выявленных в полноразмерной библиотеке (табл. 3).

Как правило, идентификация фило типов по генам 16S рРНК тем точнее, чем больше размер фрагмента гена, хотя GenBank в основном содержит неполные последовательности. В нашем случае независимо от образца или типа клоновой библиотеки, суммарная доля фило типов, сходных с известными таксонами по нуклеотидной последовательности на 95% и выше, составила более 74% (см. приложение 3 и 4). Вместе с тем, в случае некоторых библиотек эта доля оказалась довольно мала, свидетельствуя в пользу большого количества новых неизвестных фило типов. Так, для снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. для двух типов библиотек, обе из которых были репрезентативны и схожи по составу фило типов и их распределению, доля фило типов, родственных $\geq 95\%$ известным бактериям, составила 27,3 и 36,4% для полноразмерных и V3-V5 библиотек, соответственно. В то же время неидентифицированные фило типы (менее 90% сходства с известными таксонами) были обнаружены во всех четырех образцах снега: 6 фило типов в V3-V5 библиотеках и 4 фило типа в полноразмерных библиотеках.

Известно, что бактерии, имеющие отношение к сапрофитам, условным патогенам или патогенам человека, часто обнаруживаются в пыли Сахары. Из патогенов самым известным является возбудитель менингококковой инфекции – *Neisseria meningitidis* [Griffin, 2007a]. В данном исследовании нами не было обнаружено патогенных микроорганизмов. Вместе с тем, было обнаружено 12 НА-фило типов в обоих типах библиотек, которые имеют непосредственное отношение к нормальной микрофлоре человека [Grice et al., 2009, 2008; Turnbaugh et al., 2009; Ley et al., 2008].

Таблица 3 – Характеристика клоновых библиотек V3-V5 и полноразмерного (ПГ) типа гена 16S рПНК исследуемых образцов снега

Тип минерала	Иллит		Смектит				н.д.	
Образец	SDm05/2008		SDm06/2006		SDm05/2009		Dm08/2009	
Библиотека (тип)	MB-SD (V3-V5)	f2SD (ПГ)	MB5 (V3-V5)	5f (ПГ)	MS5 (V3-V5)	MS5f (ПГ)	MS7 (V3-V5)	MS7f (ПГ)
Число филоотипов/клонов	19/38	23/48	12/40	12/40	20/60	10/57	17/40	12/34
Число БК филоотипов	0	1	1	1	2	1	3	1
Число “истинных” филоотипов/клонов	19/38	22/47	11/39	11/38	18/57	9/55	14/36	11/33
Индекс Шэннона-Уивера	2,67 (2,40-2,93)	2,87 (2,64-3,1)	2,04 (1,75-2,34)	2,04 (1,76-2,31)	1,67 (1,23-2,02)	1,08 (0,75-1,41)	1,92 (1,5-2,35)	1,41 (0,98-1,84)
Индекс Чао 1	24 (19,33-45,1)	38,5 (26,26-85,95)	12 (11,09-21,68)	16 (11,78-43,14)	22,2 (16,6-47,37)	11 (8,39-30,99)	31 (16,99-94,31)	24 (12,3-77,04)
Покрывание Гуд, %	74	75	92	87	74	93	75	79
Число НА-филоотипов	3	0	2	1	5	1	0	0

Примечания

1 н.д. – нет данных.

2 Расчет индексов разнообразия и покрытия по Гуд проводили только для “истинных” филоотипов, т.е. без учета БК филоотипов.

Критической задачей любого молекулярного метода оценки микробного биоразнообразия является полнота представления ампликонов генов 16S рРНК (или других генетических маркеров) в конкретной выборке клоновой библиотеки. Кривые, описывающие достаточность выборки для достоверного анализа видового состава исследуемых образцов, оказались схожи для полноразмерных и V3-V5 библиотек, за исключением образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г. (рис. 6). Наиболее репрезентативными, судя по выходу аналитических кривых на плато, оказались библиотеки 5f и MB5, созданные для образца снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. Начало выхода кривых на плато наблюдали в случае библиотек f2SD и MB-SD, а также MS7f и MS7, что говорит о покрытии большей части возможных фило типов в пуле микроорганизмов снежного покрова с пылью Сахары от мая 2008 г. и в снеге без пыли Сахары. В случае образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г., полноразмерная библиотека (MS5f) оказалась более репрезентативной, чем V3-V5 библиотека, что непосредственно связано с более богатым разнообразием, выявленным в последней (табл. 3).

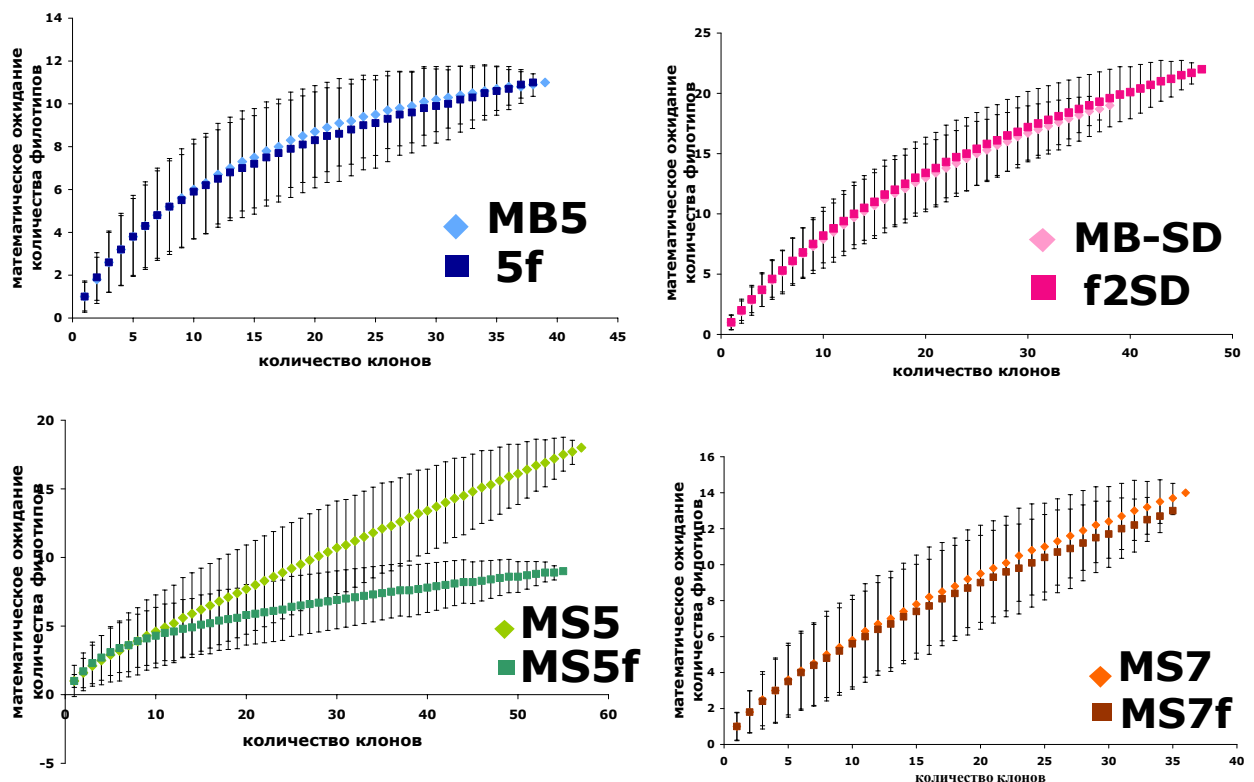


Рисунок 6. Кривые зависимости количества фило типов в библиотеке от размера выборки в клонках. На графиках приведено по две кривых, соответствующих библиотекам V3-V5 и полноразмерного типа (см. табл. 3)

Значения покрытия клоновых библиотек двух типов по Гуд также соответствовали между собой и согласовывались с данными анализа кривых. Среднее значение покрытия по

Гуд для V3-V5 библиотек составило 72%, а для полноразмерных библиотек – 84% (табл. 3). Сравнение индексов Шеннона-Уивера показало, что выборки клонов для библиотек двух типов фактически совпадают для двух из четырех образцов. Почти полное совпадение индексов Шеннона-Уивера и Чао 1 между библиотеками двух типов наблюдали только для снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. (табл. 3). Наибольшим разнообразием, судя по показателю Шеннона-Уивера, характеризовался образец снежного покрова с пылью Сахары от мая 2008 г. (библиотеки MB-SD и f2SD). Наименьшим же разнообразием по данному индексу характеризовались образцы снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г. (библиотека MS5 и MS5f) и снег, не содержащий пыль Сахары (MS7 и MS7f). Кроме того, за исключением образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г., значения Чао 1, будучи разными для различных образцов, предполагают большее число ожидаемых филотипов в полноразмерных библиотеках в сравнении с V3-V5 (см. табл. 3).

Судя по значениям индекса разнообразия Шеннона-Уивера для двух типов библиотек, снежный покров характеризовался более высоким микробным разнообразием при наличии в нем пыли Сахары. Сходный результат был получен ранее в работе Liu et al. [2009a] при изучении микробных сообществ снежного покрова ледников тибетского высокогорья. Авторами показано, что в случае ледников, подверженных периодическому осаждению пыли, значения индексов разнообразия микробных сообществ были выше, чем для тех, что такому влиянию не подвергались [Liu et al., 2009a]. Можно сделать вывод, что микробное разнообразие снежного покрова ледников при периодическом осаждении почвенной пыли из аридных областей, как правило, выше по индексам и богаче по видовому составу в сравнении со снежным покровом, неподверженным подобному влиянию.

Таким образом, применение статистического анализа в оценке микробного разнообразия снежного покрова достоверно подтвердило соответствие данных, полученных на основании амплификации полноразмерного гена 16S рРНК и его V3-V5 области, в двух из четырех случаев.

3.2.1.1 Анализ микробного разнообразия образца снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г.

Для анализа микробного разнообразия снежного покрова с пылью Сахары, осажженной в июне 2006 г. (SDm06/2006), были созданы две библиотеки клонов: MB5 (V3-V5 библиотека) и 5f (полноразмерная библиотека). Без учета филотипов-контаминантов (по 1 минорному филотипу-контаминанту в каждой библиотеке), выявленных путем сравнения с БК,

окончательная выборка для библиотеки MB5 составила 39 клонов и 11 филоотипов (покрытие 92%), а для библиотеки 5f – 38 клонов и 11 филоотипов (покрытие 87%), (см. табл. 3).

Идентификация филоотипов, входящих в состав библиотек MB5 и 5f, представлена в приложениях 3 и 4. Согласно анализу первой из библиотек в микробном пуле снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. доминировали 6 филоотипов: *Deinococcus-Thermus* (2 филоотипа – 43% от общего числа клонов), *Bacteroidetes* (1 филоотип - 8%), *Alphaproteobacteria* (1 филоотип - 13%), *Cyanobacteria* (1 филоотип - 8%) и один неклассифицируемый филоотип (10%) (рис. 7А). Из них, больше половины были представлены в GenBank (97% и более сходства по последовательности с некультивируемыми микроорганизмами) и только два показали родство на уровне 94,5 и 87% сходства. Нуклеотидные последовательности представителей филоотипов MB5-1 и MB5-19 показали 94% сходства с *Deinococcus xinjiangensis* (FJ608132), обнаруженного в микрофлоре личинки малярийного комара [Rani et al., 2009], и радиационно-чувствительной психрофильной бактерией *D. claudionis* (EF635406) из альпийской почвы (5002 м над у.м.) [Callegan et al., 2008], соответственно. Филоотип MB5-4, обнаружил наибольшее сходство (95,2%) с ацидофильной психротолерантной бактерией *Acidisoma sibiricum* из болот Сибири (AM947654) [Belova et al., 2009]. Филоотип MB5-20 показал 93,3% сходства с *Anabaena cylindrica* (AJ630414), выделенной из осадочных пород Балтийского моря [Rajaniemi et al., 2005]. Два оставшихся доминантных филоотипа MB5-5 и MB5-18 показали отдаленное сходство (83 и 85,2%), с таксономически описанными представителями *Anaerobacter polyendosporus* (AJ222546) и *Marinoscillum pacificum* (DQ660388), соответственно и, тем самым, остались неидентифицированными. Однако, первый из них показал более высокое сходство (97%) с последовательностью клонов из снежного покрова тибетского высокогорья [Liu et al., 2009a].

Анализ полноразмерной библиотеки (5f) показал, что из 11 выявленных филоотипов доминируют пять, принадлежащие *Deinococcus-Thermus* (2 филоотипа – 43% от общего числа клонов), *Bacteroidetes* (1 филоотип – 18%), *Alphaproteobacteria* (1 филоотип – 13%) и *Cyanobacteria* (1 филоотип – 8%) (рис. 7Б). Примечательно, что самые часто встречаемые филоотипы - 5f-3 и 5f-6 оказались неидентифицированными, так как показали только 89 и 84% родства с *Deinococcus radiophilus* (NR_026402) и *Flexibacter flexilis* (AB078054), соответственно. Второй филоотип из раздела *Deinococcus-Thermus* (5f-16) обнаруживал 94% сходства с радиационно-чувствительной психрофильной бактерией *D. radiomollis* (EF635405) из альпийской почвы с 5002 м над у.м. [Callegan et al., 2008]. Филоотип 5f-1 из *Alphaproteobacteria*, показал отдаленное родство (92%) с *Gluconacetobacter sacchari*

(AF127412). Наконец, флотип 5f-12 показал наибольшее сходство (97%) с цианобактерией из холодных озер Антарктики *Phormidium pristleyi* (AY493580) [Taton et al., 2006].

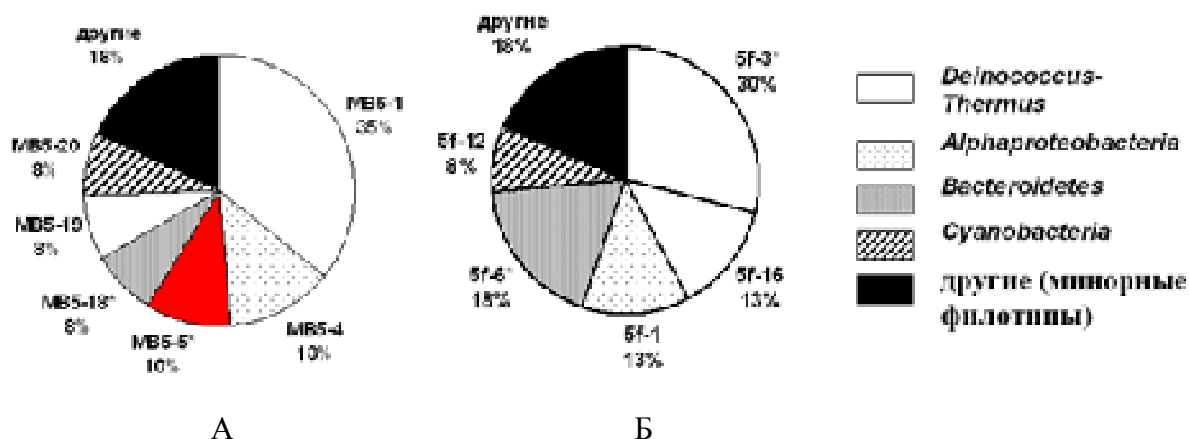


Рисунок 7. Доминантные бактериальные флотипы, выявленные в снежном покрове с пылью Сахары от июня 2006 г. в результате анализа V3-V5 (А) и полноразмерной (Б) библиотек. Звездочкой обозначены неидентифицированные флотипы. Заполнение красным цветом – неидентифицированный и неклассифицированный флотипы

При проведении идентификации флотипов, в обеих библиотеках были выявлены неидентифицированные флотипы. Так, в библиотеке MB5 это были два доминантных флотипа MB5-5 и MB5-18, а в библиотеке 5f два доминантных (5f-3 и 5f-6) и один минорный флотипы (5f-8, 88,2% сходства с известным видом). На основании высокого сходства (98%) с клонами микробиома кожи человека два флотипа из библиотеки MB5 (MB5-4 и MB5-7) и один из библиотеки 5f (5f-1) были отнесены к группе НА-флотипов.

Таким образом, при оценке разнообразия микроорганизмов в снеге с пылью Сахары от события переноса 2006 г., доли доминантных флотипов, принадлежащие *Deinococcus-Thermus*, *Alphaproteobacteria* и *Cyanobacteria* оказались практически одинаковыми для V3-V5 и полноразмерной библиотеки. Кроме того представители *Bacteroidetes* составляли значительную часть в библиотеках обоих типов. Филогенетическое сравнение показало, что большая часть доминантных флотипов совпала между библиотеками обоих типов (табл. 4). Среди них оказались флотипы, относящиеся к родам *Deinococcus* (флотипы MB5-1 и 5f-3, MB5-19 и 5f-16), *Flexibacter* (MB5-18 и 5f-6) и *Gluconacetobacter* (MB5-4 и 5f-1). Из минорных только один флотип (MB5r-2 и 5f-13) отдаленно родственный *Hymenobacter soli*, был обнаружен в библиотеках обоих типов. Подобное соответствие в распределении одних и тех же доминантных флотипов для клоновых библиотек двух типов обусловлено, скорее всего, как достаточно высокой степенью покрытия обеих библиотек (см. табл. 3, рис. 6), так и вероятным размножением (селекцией) данных доминантных флотипов в течение трехмесячного периода нахождения пыли в снеге.

Таблица 4 – Общие филоциты, обнаруженные в снежном покрове ледника Монблан, содержащего и не содержащего пыль Сахары, по данным V3-V5 и полноразмерных (ПГ) клоновых библиотек

Таксон	V3-V5				ПГ			
	Образец снега				Образец снега			
	с пылью Сахары			-	с пылью Сахары			-
	SDm06/ 2006	SDm05/ 2008	SDm05/ 2009	Dm08/ 2009	SDm06/ 2006	SDm05/ 2008	SDm05/ 2009	Dm08/ 2009
<i>Deinococcus-Thermus</i>								
<i>Deinococcus radiophilus</i>	MB5-1(14)*	-	-	-	5f-3 (11)	-	-	-
<i>D. radiomollis</i>	MB5-19 (3)	-	-	-	5f-16 (5)	-	-	-
<i>Bacteroidetes</i>								
<i>Hymenobacter soli</i>	MB5r-2 (2)	-	-	-	5f-13 (2)	-	-	-
<i>Flexibacter flexilis</i> <i>subsp. Pelliculosus</i>	MB5-18 (3)	-	-		5f-6 (7)			
<i>Alphaproteobacteria</i>								
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	MB5-4 (5)	-	-	-	5f-1 (5)	-	-	-
<i>Firmicutes</i>								
<i>Bacillus niabensis</i>	-	2SD-29 (1)	-	-	-	f2SD-4 (1)	-	-
<i>B. benzoevorans</i>	-	-	-	-	-	f2SD-b14 (5)	MS5sf-11 (2)	-
<i>Actinobacteria</i>								
<i>Blastococcus saxobsidens</i>	-	2SD-21 (6)	MS5s-17 (1)	-	-	-	-	-
Хлоропластная ДНК								
<i>Pinus merkusii</i>	-	-	-	-	-	f2SD-a23 (5)	MS5f-31 (23)	-
<i>Quercus nigra</i>	-	-	MS5s-20 (1)	-		-	MS5sf-3 (7)	-
<i>Picea sitchensis</i>	-	-	MS5-3 (35)	-	-	-	MS5f-3 (16)	-

Примечание – * В скобках приведено количество клонов, отнесенных к данному филоциту.

3.2.1.2 Анализ микробного разнообразия образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2008 г.

Микробное разнообразие снежного покрова с пылью Сахары от события переноса в мае 2008 г. (SDm05/2008) было изучено путем создания библиотеки MB-SD по V3-V5 вариабельной области гена 16S рРНК и библиотеки f2SD по полноразмерной последовательности того же гена. В первом случае размер выборки составил 38 клонов и 19 филоотипов, из которых ни один не был идентичен последовательностям БК, и покрытие библиотеки MB-SD составило 74%. В свою очередь, за вычетом одного минорного филоотипа-контаминанта, анализ 47 клонов библиотеки f2SD выявил 22 филоотипа (покрытие составляло 75%) (см. табл. 3).

Анализ V3-V5 библиотеки показал, что большая часть клонов была распределена по четырем филоотипам, принадлежащим *Actinobacteria* (2 филоотипа - 29% от общего числа клонов) и *Alphaproteobacteria* (2 филоотипа – 19%) (см. приложение 3; рис. 8А). Все они обнаруживали высокий уровень сходства (97,5% и выше) как с некультивируемыми, так и с таксономически описанными микроорганизмами. Так, филоотипы 2SD-21 и 2SD-12 обнаруживали 99% сходства с представителями семейства *Frankia*: *Blastococcus saxobsidens* (AJ316574), выделенного с поверхности известняка [Urzi et al., 2004], и *Geodermatophilus obscurus*, выделенного с поверхности доломитового мрамора (X92359) [Eppard et al., 1996], соответственно. Последовательности клонов филоотипа 2SD-10 проявили наибольшее сходство (97,7%) с *Rubellimicrobium mesophilum* (EF547368), а филоотипа 2SD-40 – с *Sphingomonas kaistensis* (AY769084) (97,5% сходства). Оба штамма были выделены ранее из почвы в Корее [Dastager et al., 2008; Kim et al., 2007].

Согласно проведенной идентификации (см. приложение 4), один из 22 филоотипов, обнаруженных в полноразмерной библиотеке, имел небактериальное происхождение (хлоропластная рДНК). Здесь и далее учет подобных филоотипов опускали при анализе микробного разнообразия. Таким образом, основную часть полноразмерной библиотеки составляли филоотипы раздела *Firmicutes* (58% от общего числа клонов) (рис. 8Б). Среди них четыре филоотипа обнаруживали сходство со спорообразующими бактериями рода *Bacillus*: филоотип f2SD-104 показал 96% с *B. aminovorans* (X62178), филоотип f2SD-11 – 97% с *B. macroides* (AF501367), филоотип f2SD-33 – 98% с *B. simplex* (AJ628745) и филоотип f2SD-b14 – 97% с *B. benzoovorans* (Y14693). Два других филоотипа того же раздела, f2SD-87 и f2SD-a7, показали высокое сходство (98-99%) с облигатным оксалатотрофом из ризосферы щавеля *Ammoniphilus oxalaticus* (Y14579) и психрофильной бактерии *Tumebacillus permanentifrigoris* (DQ444975) из вечной мерзлоты, соответственно [Zaitsev et al., 1998; Steven et al., 2008]. Все

филотипы, как минорные, так и доминантные были представлены в GenBank и показали родство на уровне 95% и выше с таксономически описанными видами.

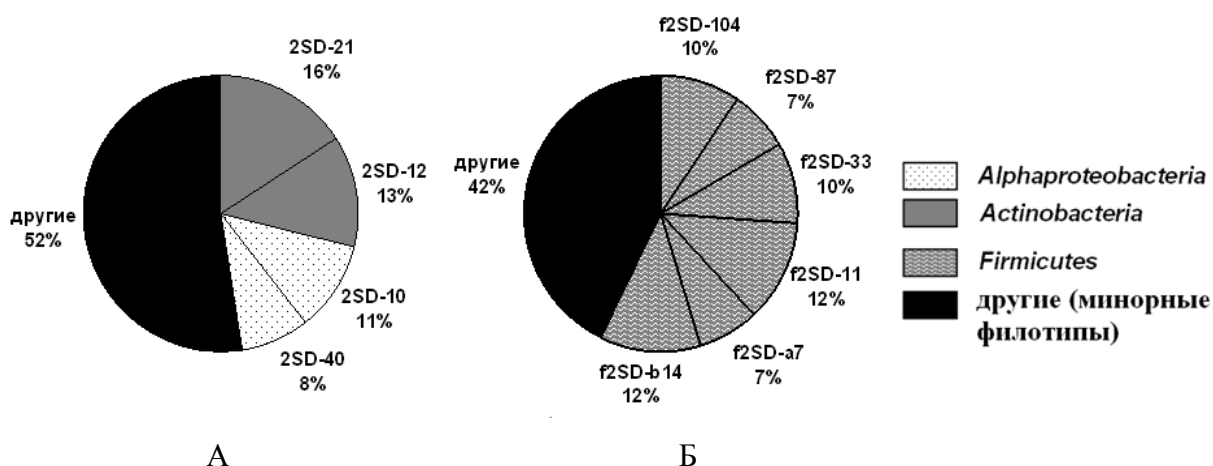


Рисунок 8. Доминантные бактериальные филогены, выявленные в снежном покрове с пылью Сахары от мая 2008 г. в результате анализа V3-V5 (А) и полноразмерной (Б) библиотек

Единственный неидентифицированный филоген, представленный двумя клонами, был обнаружен в библиотеке MB-SD (2SD-1), тогда как последовательности всех филогенов библиотеки f2SD были идентифицированы. Кроме того, согласно проведенной идентификации, HA-филогены были обнаружены только в библиотеке MB-SD (2SD-10, 2SD-40, 2SD-32). Единственный филоген небактериального происхождения (f2SD-a23) был конспецифичен с хлоропластной рДНК *Pinus merkusii* (FJ899579).

Таким образом, несмотря на то, что покрытие библиотек, созданных путем клонирования полноразмерных ампликонов гена 16S рРНК и его V3-V5 области, было практически идентичным, и статистический анализ в обоих случаях показал, что охвачено больше половины возможных филогенов (рис. 6, табл. 3), распределение доминантных филогенов в составе библиотек и их таксономическая принадлежность значительно отличались. В целом по данным двух библиотек в снежном покрове с пылью Сахары от мая 2008 г. доминировали представители *Actinobacteria* (*Blastococcus*, *Geodermatophilus*), *Alphaproteobacteria* (*Rubellimicrobium* и *Sphingomonas*) и *Firmicutes* (*Bacillus*, *Tumebacillus* и *Ammoniphilus*). Так, амплификация V3-V5 области гена 16S рРНК показала доминирование представителей *Actinobacteria* (29% от общего числа клонов) и *Alphaproteobacteria* (19%), тогда как при амплификации полноразмерного гена основную часть микробного разнообразия составляли филогены *Firmicutes* (58%). Сходство библиотек двух типов на уровне филогена можно отметить только для минорных филогенов – 2SD-29 и f2SD-4, родственных *Bacillus niabensis* (см. табл. 4).

3.2.1.3 Анализ микробного разнообразия образца снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г.

Микробное разнообразие снежного покрова с пылью Сахары, осажденной в июне 2006 г. (SDm05/2009), было проанализировано с помощью двух библиотек клонов: MS5 и MS5f (V3-V5 и полноразмерная библиотека, соответственно). После сравнения с последовательностями БК, два фило типа-контаминанта были удалены из выборки V3-V5 библиотеки и один – из выборки полноразмерной библиотеки. В итоге первая библиотека была представлена 57 клонами и 18 фило типами с покрытием по Гуд равным 74%, а вторая - 55 клонами и девятью фило типами с покрытием по Гуд равным 93%.

Идентификация 18 фило типов V3-V5 библиотеки выявила 2 фило типа пластидного происхождения (см. приложение 3, рис. 9А). В пуле бактериальных фило типов по числу клонов (24%) доминировал фило тип MS5s-3, обнаруживающий высокое сходство (99%) с бактерией, выделенной ранее из почвы Сахары, *Saccharothrix algeriensis* (NR025658) [Zitouni et al., 2004].

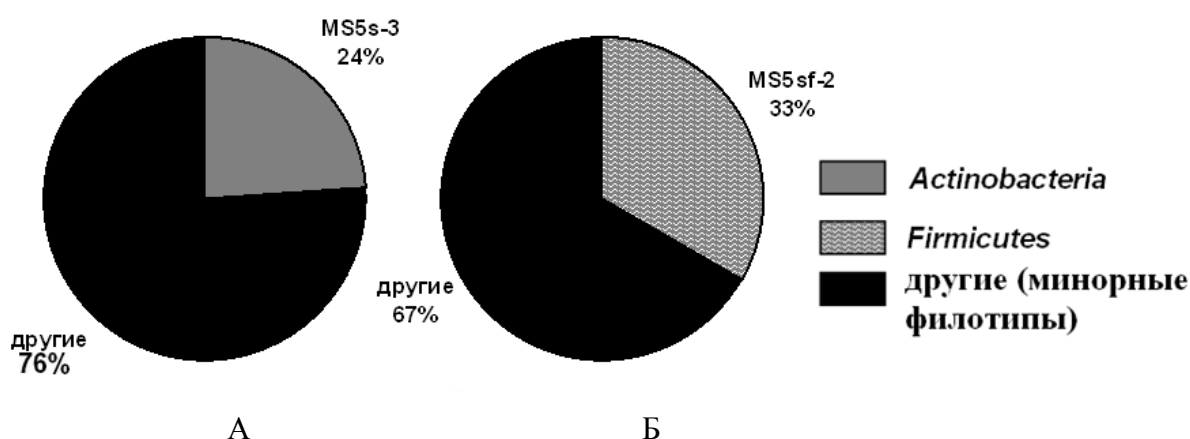


Рисунок 9. Доминантные бактериальные фило типы, выявленные в снежном покрове с пылью Сахары от мая 2009 г. в результате анализа V3-V5 (А) и полноразмерной (Б) библиотек

В свою очередь в полноразмерной библиотеке три из девяти обнаруженных фило типов относились к последовательностям хлоропластной рДНК (см. приложение 4). Подавляющее же большинство клонов бактериального происхождения (33% от общего числа клонов – рис. 9Б) принадлежали фило типу MS5sf-2, обнаруживающему сходство (99%) со спорообразующей бактерией *Bacillus niacini* (NR_024695) и последовательностями клонов, обнаруженных в городских аэрозолях [Brodie et al., 2007].

Согласно проведенной идентификации в каждом типе библиотек было обнаружено по одному неидентифицированному фило типу, представленных минорным числом клонов. Помимо этого, к группе НА-фило типов было отнесено пять минорных фило типов из

библиотеки MS5 (MS5s-12, MS5s-16, MS5s-15, MS5s-7, MS5s-6) и один минорный флотип (MS5sf-18) – из библиотеки MS5f. Что касается флотипов пластидного происхождения (MS5-3, MS5f-31, MS5f-3 и MS5sf-3), то большая их часть была представлена значительным числом клонов. Проведенная идентификация показала их принадлежность (99% сходства) к хлоропластной рДНК *Picea sitchensis* (EU998739), *Pinus merkusii* (FJ899579), и *Quercus nigra* (GQ998717) (см. приложение 4). Отметим также, что флотипы, родственные хлоропластной рДНК *P. sitchensis* (MS5-3 и MS5f-3) и *Q. nigra* (MS5s-20 и MS5sf-3), были обнаружены в библиотеках обоих типов фрагментов (см. табл. 4).

Судя по статистическим расчетам, объем выборки оказался репрезентативным в случае полноразмерной библиотеки, тогда как в случае V3-V5 библиотеки – в лучшем случае было представлено больше половины возможных флотипов (см. рис. 6, табл. 3). Отметим, что индекс разнообразия Шеннона-Уивера и индекс видового богатства Чао 1 были значительно выше для V3-V5 библиотеки, чем для полноразмерной библиотеки.

Таким образом, микробный состав снежного покрова с пылью Сахары от мая 2009 г., согласно анализу V3-V5 и полноразмерной библиотек, был представлен в основном *Firmicutes* (*Bacillus*) и *Actinobacteria* (*Saccharothrix*). При этом первые были выявлены в V3-V5 библиотеке, а вторые – в полноразмерной библиотеке, соответственно. Значительное отличие в репрезентативности библиотек двух типов, по-видимому, является одной из причин различий в составе флотипов и их количественном соотношении. Отметим также, что на уровне флотипа сходство библиотек двух типов фрагментов выражалось в присутствии доминантных флотипов хлоропластной рДНК *Picea sitchensis* и *Quercus nigra*.

3.2.1.4 Анализ микробного разнообразия образца снежного покрова, не содержащего пыль Сахары

Для анализа микробного разнообразия снежного покрова, не содержащего пыль Сахары (Dm08/2009), были созданы две библиотеки: MS7 (V3-V5 библиотека) и MS7f (полноразмерная библиотека). В первом случае после удаления трех флотипов-контаминантов, окончательная выборка составила 36 клонов и 14 флотипов с покрытием библиотеки 75%. Во втором случае был выявлен один флотип-контаминант, и выборка составила 33 клонов и 11 флотипов с покрытием библиотеки 79%.

Флотипы, принадлежащие последовательностям пластидного происхождения, составляли значительную долю по числу клонов в составе V3-V5 библиотеки (см. приложение 3). Бактериальное же разнообразие было представлено 12 флотипами, из которых доминировал (19% от общего числа бактериальных клонов) представитель

Actinobacteria - филотип MS7-40 (рис. 10А). Этот филотип проявлял 95,6% сходства со штаммом *Conexibacter woesei* (CP001854), выделенным из почвы [Pukall et al., 2010] и 99% с другими некультивируемыми почвенными бактериями. Следует отметить, что данная библиотека была единственной, в которой был зафиксирован случай амплификации мтДНК (филотип MS7-29).

Анализ филотипов в полноразмерной библиотеке показал, что 5 из 13 филотипов имеют пластидное происхождение (см. приложение 4, рис. 10Б). Среди 8 бактериальных филотипов к доминантным был отнесен филотип MS7f-15 (44% от общего числа клонов), который согласно проведенной идентификации с последовательностями в GenBank относился к мтДНК мха *Physcomitrella patens* (AB251495), а по филогенетическому анализу был отнесен к классу *Alphaproteobacteria*.

К неидентифицированным филотипам были отнесены только два минорных филотипа (MS7-14 и -15) из библиотеки MS7. Что касается филотипов пластидного происхождения, обнаруженных в библиотеках двух типов, то они показали от 99 до 100% сходства с хлоропластной ДНК мхов *Bartramia pomiformis* (DQ629559) *Syntrichia ruralis* (FJ546412), *Marchantia polymorpha* (X04465) и папоротника *Thelypteris navarrensensis* (DQ629491) (см. приложение 3 и 4).

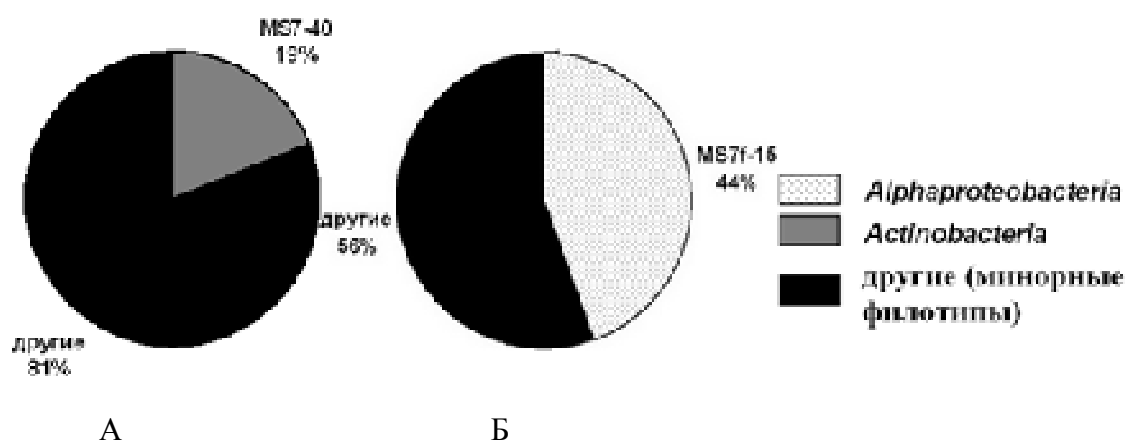


Рисунок 10. Доминантные бактериальные филоотипы, выявленные в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, в результате анализа V3-V5 (А) и полноразмерной (Б) библиотек

Анализ размера библиотек и значительное превышение числа ожидаемых филотипов в сравнении с наблюдаемыми, указывают на недооценку разнообразия по обоим типам библиотек (см. рис. 6, табл. 3). В тоже время покрытие библиотек и рассчитанные значения Шеннона-Уивера и Чао 1 были также достаточно близки для V3-V5 и полноразмерной библиотек.

В целом по данным анализа V3-V5 и полноразмерной библиотек в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, доминировали представители *Actinobacteria* (*Conexibacter*) и

Alphaproteobacteria (род неизвестен). *Actinobacteria* доминировали в V3-V5 библиотеке, а в полноразмерной библиотеке – *Alphaproteobacteria*. Кроме того в библиотеках обоих типов присутствовали минорные родственные друг другу филоотипы, например, филоотипы (MS7f-9 и MS7-37) рода *Bacillus*. Также в составе обеих библиотек значительная доля клонов была представлена последовательностями хлоропластной рДНК мхов *Bartramia*, *Syntrichia* и *Marchantia* и папоротника *Thelypteris*.

3.2.2 Изучение дополнительных образцов путем анализа V3-V5 клоновых библиотек

Для выявления причин различий в видовом составе вышеописанных образцов путем анализа V3-V5 библиотек было изучено 3 дополнительных образца: снега с пылью Сахары от июня 2008 г.; пыли Сахары, собранной в Гренобле; песчаной пустынной почвы Сахары. Кроме того, используя продукты ОТ-ПЦР, была создана РНК-библиотека клонов для снега, не содержащего пыль Сахары. Рестрикционный анализ и последующий секвенирование полученных 155 клонов выявили 74 филоотипа, из которых 7 филоотипов (4,5% от общего числа клонов) оказались в БК и были удалены из соответствующих библиотек (табл. 5). Идентификация оставшихся 67 филоотипов (125 клонов) показала, что более половины из них (67%) показали $\geq 95\%$ сходства по нуклеотидной последовательности с известными таксонами (см. приложение 4). Кроме того, обнаружены 6 других (по сравнению с 4-мя основными образцами) НА- филоотипов (7,2% от общего числа клонов).

Таблица 5 – Характеристика дополнительных клоновых библиотек V3-V5 типа

Тип минерала	иллит		н.д.	
Образец	SDm06/2008	SD05/2008	Dm08/2009	SS03/2008
Библиотека	MB-SD2	SD	MS7r	SS
Число клонов/филоотипов	15/38	24/39	13/38	22/40
Число БК филоотипов	2	0	5	0
Число “истинных” клонов/филоотипов	13/29	24/39	8/17	22/40
Индекс Шэннона-Уивера	2,18 (1,81-2,55)	2,88 (2,59-3,17)	1,8 (1,39-2,22)	2,8 (2,52-3,08)
Индекс Чао 1	20 (14,45-46,8)	68,33 (36,08-180,03)	13 (8,78-40,14)	30,43 (23,48-56,91)
Покрытие Гуд, %	72	54	71	65
Число НА-филоотипов	2	1	3	0

Примечания

1 н.д. – нет данных.

2 Расчет индексов разнообразия и покрытия по Гуд проводили только для “истинных” филоотипов, т.е. без учета БК филоотипов.

Проведенная статистическая оценка репрезентативности полученных библиотек показала покрытие большей части возможных филотипов в случае библиотек MB-SD2 и РНК-библиотеки MS7r, созданных для оценки разнообразия снежного покрова с пылью Сахары от июня 2008 г. и снега, не содержащего пыли Сахары (рис. 11). В то же время выборки библиотек SD и SS оказались недостаточными для охвата возможного микробного разнообразия пыли Сахары, собранной в Гренобле, и почвы Сахары. Полученные данные согласовались с рассчитанным по Гуд покрытием библиотек, которое было наименьшим в случае библиотек SD и SS (54 и 65%, соответственно). Последние характеризовались наибольшим разнообразием, судя по значениям индексов видового богатства и разнообразия. Наименьшим разнообразием, судя по индексам Шеннона-Уивера (1,8) и Чао 1 (13), характеризовалась РНК-библиотека снежного покрова, не содержащего пыль Сахары (MS7r).

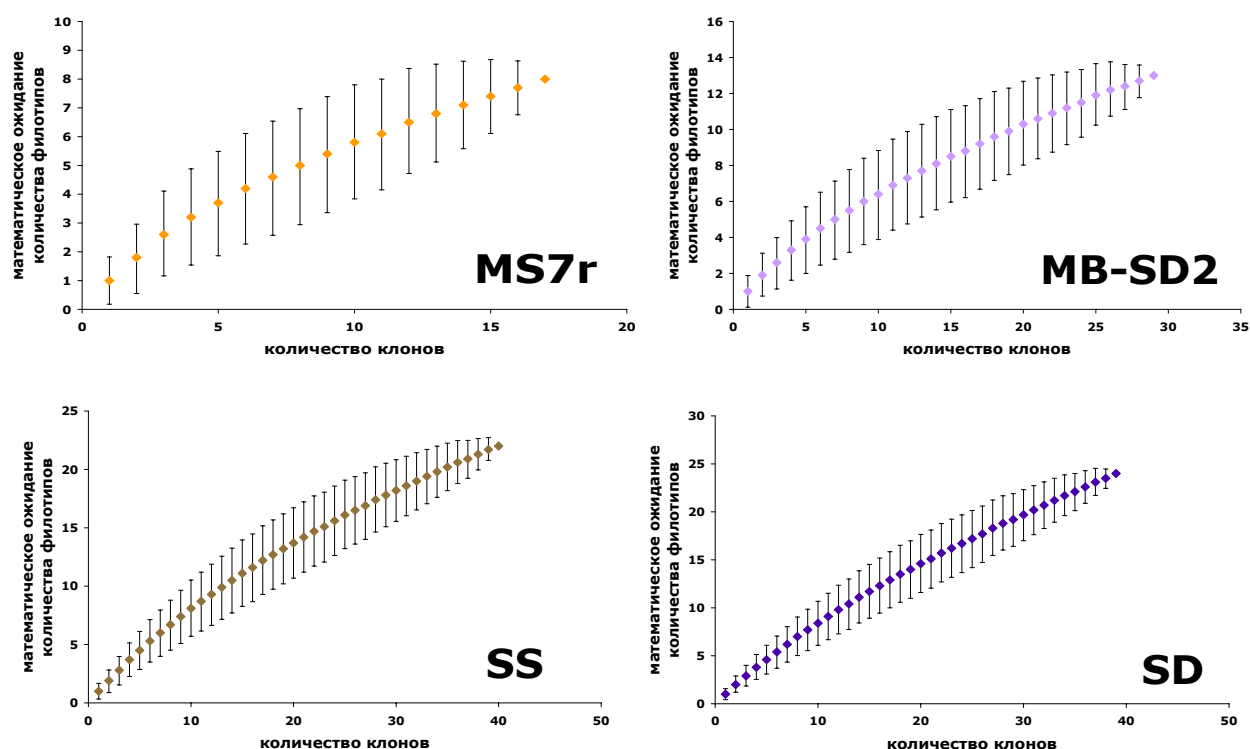


Рисунок 11. Кривые зависимости количества филотипов в библиотеке от размера выборки. Приведены графики и обозначения для библиотек V3-V5 типа

Таким образом, в результате проведенной статистической оценки клоновых библиотек дополнительных образцов и РНК-библиотеки снега, не содержащего пыль Сахары, было показано, что объем выборок библиотек в целом оказался репрезентативным, однако, для образца почвенной пыли Сахары, собранной в Гренобле, и образца песчаной почвы Сахары объемы выборок оказались недостаточными.

3.2.2.1 Анализ микробного разнообразия образца снежного покрова с пылью Сахары от июня 2008 г.

Состав библиотеки клонов MB-SD2 образца снежного покрова с пылью Сахары от июня 2008 г. (SDm06/2008) на момент исследования был представлен 38 клонами, сгруппированными в 20 риботипов. Показатель Гуд составил при этом 67%. Однако, в результате секвенирования риботипов было выявлено 15 филотипов, из которых два оказались родственными последовательностям БК. Таким образом, всего в анализ было взято 29 клонов, отнесенных к 13 филотипам, для которых показатель Гуд был равен 72%.

Анализ полученных филотипов показал, что они принадлежат к трем разделам (см. приложение 3): *Actinobacteria* (7 филотипов), *Alphaproteobacteria* (5 филотипов) и *Verrucomicrobia* (1 филотип). Из них доминировали 2 филотипа первого раздела: MB-SD2-11 и MB-SD2-35 (28 и 24% от общего числа клонов, соответственно; рис. 12). Оба филотипа обнаруживали высокий уровень сходства с известными видами. Так, филотип MB-SD2-11 оказался близким (99% сходства) *Geodermatophilus obscurus* из пустыни Амаргоза в США (CP001867) [Ivanova et al., 2010], а филотип MB-SD2-35 – целлюлозоперерабатывающей бактерии *Cellulomonas cellasea* (X83804) [Rainey et al., 1995]. Идентификация минорных филотипов позволила отнести два из них к группе НА-филотипов (MB-SD2-39, MB-SD2-32). Из минорных филотипов неидентифицированным остался филотип MB-SD2-18 по причине низкого сходства с известным видом (88,7% сходства).

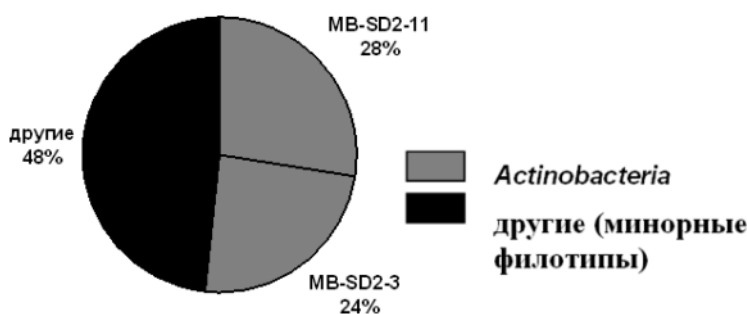


Рисунок 12. Доминантные бактериальные филотипы, выявленные в снежном покрове с пылью Сахары от июня 2008 г. в результате анализа V3-V5 библиотеки

Индекс Чао 1 для данной выборки составил 20 филотипов. Статистическая оценка размера библиотеки показала, что разнообразие библиотеки охвачено не полностью (см. рис. 11).

В целом, в снежном покрове с пылью Сахары от июня 2008 г. (SDm06/2008 - библиотека MB-SD) доминировали представители *Actinobacteria* (*Geodermatophilus* и

Cellulomonas). Один минорный филотип остался неидентифицированным и два минорных филотипа оказались отнесены к группе НА-филотипов. Статистический анализ библиотеки показал, что охвачено больше половины возможных филотипов.

3.2.2.2 Анализ микробного разнообразия образца снежного покрова, не содержащего пыль Сахары

С использованием тех же универсальных праймеров, что и для создания рДНК-библиотек, было получено 38 клонов для рРНК-библиотеки (MS7г) образца снежного покрова, не содержащего пыль Сахары (Dm08/2009). Эти клоны были разделены на 16 риботипов, так что покрытие библиотеки составляло 66%. Далее в результате сиквенс-анализа было получено 19 филотипов, пять из которых были вычтены из состава библиотеки по причине сходства с последовательностями БК. Отметим, что один из филотипов-контаминантов был представлен семнадцатью клонами. В итоге, созданная рРНК-библиотека, которая была покрыта на 71%, состояла всего из 17 клонов и 8 филотипов (см. приложение 3). Последние принадлежали к представителям *Firmicutes* (3 филотипа), *Alphaproteobacteria* (2 филотипа), *Cyanobacteria* (1 филотип), а также последовательностям пластидного происхождения (2 филотипа). Среди бактериальных филотипов к числу доминантных был отнесен филотип, составляющий 45% от общего числа клонов: MS7г-17 (*Cyanobacteria*) (рис. 13). Этот филотип обнаруживал 97% сходства с цианобактерией *Stigonema ocellatum*, выделенной из торфяного болота (AJ544082) [Gugger et al., 2004]. В целом, все филотипы были представлены в GenBank и показали родство на уровне 95,8% и выше с известными видами.

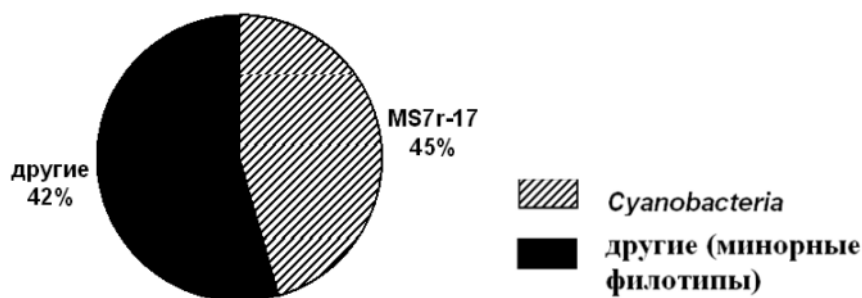


Рисунок 13. Доминантные бактериальные филотипы, выявленные в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, в результате анализа V3-V5 библиотеки

Детальная идентификация филотипов позволила обнаружить три НА-филотипа (MS7г-11, -22, -23). Филотипы небактериального происхождения (MS7г-10 и MS7г-38)

принадлежали хлоропластной рДНК мха *Bryum argenteum* (DQ629556) и папоротника *Thelypteris navarrensis* (DQ629491).

В связи с большим числом последовательностей, представленных в БК, размер изначальной выборки был сокращен до 17 клонов, что является критичным для статистической оценки репрезентативности выборки. Следовательно, разнообразие библиотеки было представлено не полностью (см. рис. 11).

В итоге, по данным анализа 16S рРНК в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары (Dm08/2009 - библиотека MS7г), доминировал филотип, родственный цианобактерии *Stigonema*. Все филотипы, как минорные, так и доминантные были представлены в GenBank. Кроме того, выявлено три НА-филотипа. Статистический анализ библиотеки показал, что охвачена лишь часть возможных филотипов.

3.2.2.3 Анализ микробного разнообразия образца пыли Сахары, собранной в Гренобле

Создание библиотеки SD для образца пыли Сахары, собранной в Гренобле в мае 2008 г. (SD05/2008), было выполнено в два этапа. Изначальный объем выборки составлял 20 клонов, которые были разбиты на 14 риботипов. В итоге, было покрыто 50% библиотеки. На втором этапе было взято дополнительных 19 клонов, сгруппированных в 13 риботипов. Секвенирование риботипов двух суб-выборок позволило сгруппировать их в 24 филотипа. Так как в данной библиотеке не было выявлено последовательностей близких с представителями БК, окончательная выборка составила 39 клонов и 24 филотипа с покрытием библиотеки 54%.

Филогенетический анализ полученных филотипов позволил их отнести к *Bacteroidetes* (4 филотипа), *Firmicutes* (3 филотипа), *Alphaproteobacteria* (4 филотипа), *Deinococcus-Thermus* (1 филотип), *Dictyoglomi* (1 филотип), *Planctomycetes* (1 филотип), *Cyanobacteria* (5 филотипов), а также к последовательностям пластидного происхождения (5 филотипов) (см. приложение 3). Из бактериального пула доминировали представители *Cyanobacteria* (2 филотипа – 32% от общего числа бактериальных клонов) и *Alphaproteobacteria* (1 филотип – 10%) (рис. 14). Кроме филотипа SD5, все указанные филотипы были представлены в GenBank, но при этом все они имели сходство с таксонимически описанными видами на уровне 93-96%.

Доминантный кластер *Cyanobacteria* был представлен филотипами SD5 и SD2, обнаруживающими сходство с *Anabaena planctonica* (AJ293108) и *Calothrix sp.* (AM230682) (93 и 96%, соответственно). Филотип SD25 проявлял наибольшее сходство (95%) с бактерией

геотермальных почв Новой Зеландии – *Acidicaldus* sp. (AM749786) [Stott et al., 2008]. Последний был отнесен к числу НА-филотипов.

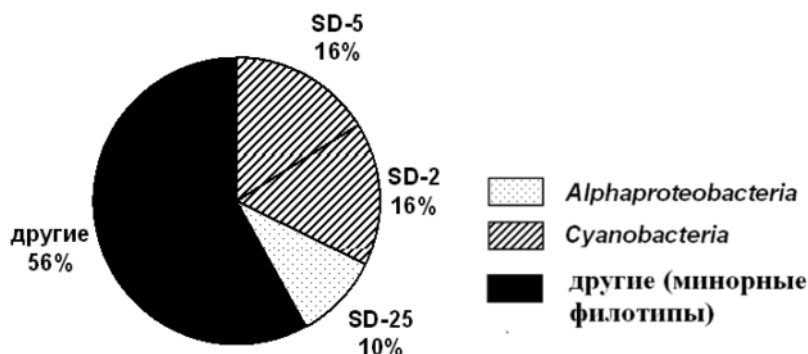


Рисунок 14. Доминантные бактериальные филотипы, выявленные в пыли Сахары, собранной в Гренобле, в результате анализа V3-V5 библиотеки

Семь минорных филотипов (SD27, SD18, SD24, SD29, SD8, SD11 и SD26) остались неидентифицированными по причине отдаленного сходства (<90%) с известными видами. В отношении последовательностей пластидного происхождения отметим, что они принадлежали (96-99% сходства) хлоропластной рДНК зеленых водорослей *Stichococcus bacillaris* (AF278751) и *Chlorella saccharophila* (D11348), а также представителю голосеменных - *Pinus thunbergii* (FJ899562). Два неидентифицированных филотипа (SD27, SD18) согласно филогенетическому анализу также имели пластидное происхождение.

Достаточно высокое разнообразие библиотеки SD отразилось как на низком уровне покрытия (54%), так и на высоком значении Чео 1 (68,3). Анализ репрезентативности выборки показал, что, в лучшем случае, лишь половина возможных филотипов охвачена созданной библиотекой (см. рис. 11).

В целом в пыли Сахары, собранной в мае 2008 г. в Гренобле (SD05/2008 - библиотека SD) доминировали (почти 42% клонов) три филотипа, принадлежащие *Cyanobacteria* (*Anabaena*, *Calothrix*) и *Alphaproteobacteria* (*Acidicaldus*). Семь минорных филотипов остались таксономически неидентифицированными. Выявлен один доминантный НА-филотип. Статистический анализ библиотеки показал, что в лучшем случае охвачено лишь половина возможных филотипов.

3.2.2.4 Анализ микробного разнообразия образца песчаной почвы пустыни Сахара

Для анализа филогенетического разнообразия почвенного образца из Сахары (SS03/2008) создание библиотеки SS было проведено в два этапа, для которых объем выборки составлял по 20 клонов. На первом этапе было выявлено 11 риботипов, тогда как на

втором – 14. На основании данных риботипирования покрытие библиотеки составило: в первом случае – 60%, во втором – 55%. Последующее секвенирование и сопоставление последовательностей дало 22 филотипа с покрытием библиотеки 65% (контаминантов не обнаружено). Таким образом, окончательная выборка состояла из 40 клонов и 22 филотипов (см. приложение 3). Последние принадлежали *Bacteroidetes* (10 филотипов), *Actinobacteria* (6 филотипов), *Gammaproteobacteria* (2 филотипа), *Firmicutes* (1 филотип), *Alphaproteobacteria* (1 филотип), *Betaproteobacteria* (1 филотип) и *Deinococcus-Thermus* (1 филотип). Однако доминантную часть сообщества составляли представители *Bacteroidetes* (3 филотипа - 41% от общего числа клонов; рис. 15). Последовательности данных филотипов были представлены в GenBank, но уровень сходства с таксономически описанными видами составлял 95 - 98%. Интересно, что филотипы SS28 и SS11 оказались родственными друг другу и обнаруживали сходство (95%) с бактерией *Flavisolibacter ginsengisoli* (AB267477), выделенной из почвы [Yoon et al., 2007]. Филотип SS22 проявлял 98% сходства с бактерией *Adhaeribacter aquaticus* (AJ626894), выделенной из биопленки питьевой воды [Rickard et al., 2005]. НА-филотипов в данной библиотеке не обнаружено. Неидентифицированными остались два минорных филотипа (SS38 и SS10) по причине их отдаленного сходства (83% в обоих случаях) с известными видами.

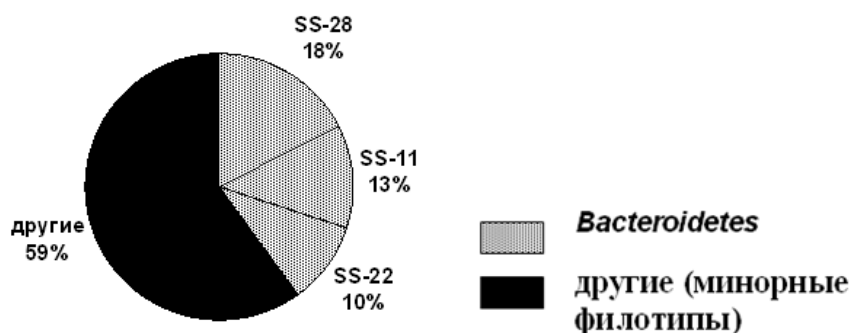


Рисунок 15. Доминантные бактериальные филотипы, выявленные в песчанной почве пустыни Сахара в результате анализа V3-V5 библиотеки

Большое число филотипов, обнаруженных в составе библиотеки, выразилось в относительно высоком значении Чео 1 (30,4) при данном числе филотипов (22) и сравнительно низком покрытии (64%). Анализ репрезентативности выборки показал, что, в лучшем случае, лишь половина основных филотипов была охвачена библиотекой (рис. 11).

Таким образом, в микробном сообществе образца песчаной пустынной почвы Сахары (SS03/2008 – библиотека SS) доминировали (41% клонов) три филотипа, принадлежащие *Bacteroidetes* (рода *Flavisolibacter* (два филотипа) и *Adhaeribacter*). Два минорных филотипа

остались неидентифицированными. НА-филотипы выявлены не были. Статистический анализ библиотеки показал, что в лучшем случае охвачено лишь половина возможных филотипов.

3.3 Сравнительный анализ микробного разнообразия исследуемых образцов

3.3.1 Сравнение образцов снега с пылью и без пыли Сахары по объединенным данным двух типов клоновых библиотек

Молекулярно-филогенетический анализ микробного разнообразия образцов снежного покрова ледника Монблан с пылью Сахары и образца, не содержащего пыль Сахары, путем создания V3-V5 и полноразмерных библиотек показал, что состав бактериальных видов и их распределение по филогенетическим разделам существенно варьируют от образца к образцу. Это было также подтверждено LIBSHUFF анализом для клоновых библиотек обоих типов (приложение 6 табл. 1). Даже в случае одного и того же раздела (например, *Alphaproteobacteria*) видовой состав образцов отличался. Таким образом, нами не было выявлено не только единого набора филотипов, но и общих разделов между тремя образцами снега с пылью Сахары, а также при их сравнении со снегом, не содержащим пыль Сахары. Вместе с тем, отдельно взятые образцы показали сходство в принадлежности доминантных филотипов (не идентичных друг другу) к одним и тем же филогенетическим разделам, а также присутствие нескольких общих филотипов (табл. 4 и 6).

Таблица 6. Доминантные бактериальные филотипы (% от общего числа клонов в библиотеке), выявленные в образцах снежного покрова с пылью Сахары (SDm) и без пыли Сахары (Dm) путем создания V3-V5 и полноразмерных (ПГ) библиотек гена 16S рРНК

Филогенетический раздел	Тип минерала пыли Сахары							
	иллит		сметит				н.д.	
	SDm05/2008		SDm06/2006		SDm05/2009		Dm08/2009	
	V3-V5*	ПГ	V3-V5	ПГ	V3-V5	ПГ	V3-V5	ПГ
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0	0	43	43	0	0	0	0
<i>Alphaproteobacteria</i>	19	0	13	13	0	0	0	44
<i>Firmicutes</i>	0	58	0	0	0	33	0	0
<i>Bacteroidetes</i>	0	0	8	18	0	0	0	0
<i>Actinobacteria</i>	29	0	0	0	24	0	19	0
<i>Cyanobacteria</i>	0	0	8	8	0	0	0	0
Неклассифицируемые	0	0	10	0	0	0	0	0
Другие (минорные филотипы)	52	42	18	18	76	67	81	56

Примечание – * Обозначения библиотек см. табл. 3.

По объединенным данным двух типов клоновых библиотек, образцы снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. (SDm06/2006 – библиотеки MB5, 5f) и мая 2009 г. (SDm05/2009 - библиотеки MS5, MS5f), отнесенные по минеральной компоненте пыли к одному типу (сметит), но с разницей во времени в три года, содержали разные доминантные флотипы (см. приложение 3 и 4, табл. 6). В первом образце основная часть разнообразия была представлена флотипами из *Deinococcus-Thermus*, тогда как во втором *Deinococcus-Thermus* не были выявлены вообще и доминировали представители *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Интересно отметить, что представители *Deinococcus-Thermus* были обнаружены ранее в снежном покрове тибетского высокогорья [Liu et al., 2009a], где они составляли лишь минорную фракцию микробного сообщества. Бактерии семейства *Deinococcaceae* являются одними из самых устойчивых к радиации и высушиванию организмов за счет высокой эффективности процессов ДНК репарации [Makarova et al., 2001]. Известны виды, изолированные как в пустынях [Rainey et al., 2005; Rainey et al., 2007; Yuan et al., 2009], в том числе Сахаре [De Groot et al., 2005; Chanal et al., 2006], так и в холодных местообитаниях (Hirsch et al., 2004), в том числе высокогорье [> 3500 м над у.м. - Callegan et al., 2008]. Недавно были описаны новые виды *Deinococcus*, выделенные в культуры из проб окружающего воздуха [Weon et al., 2007; Yoo et al., 2010], а также из образцов пыли, собранной в стратосфере над Японией [Yang et al., 2009, 2010]. Следовательно, присутствие данных бактерий в снежном покрове с пылью Сахары (июнь 2006 г.) не является неожиданной находкой. Факт доминирования обнаруженных флотипов (43% от общего числа клонов в обеих библиотеках) в снежном покрове, а также амплификация значительного числа полноразмерных последовательностей 16S рРНК генов этих организмов, могут быть связаны с размножением представителей *Deinococcus-Thermus* в толще снега с пылью Сахары, находящейся там более трех месяцев. Период развития и продолжительность существования микробного сообщества в условиях снежного покрова горного ледника, по-видимому, ограничены действием таких факторов, как высокая скорость снегонакопления и последующие процессы метаморфизма снега. В связи с этим, по-видимому, можно говорить о формировании микробного сообщества в полном смысле этого термина применительно к данному типу местообитания даже на таком коротком временном промежутке, как три месяца в случае образца SDm06/2006. Дополнительное исследование, проведенное в лаборатории ОЭМ, с целью выделения в культуры обнаруженных по ДНК последовательности флотипов *Deinococcaceae*, к сожалению, не дало положительного результата [Чувочина и др., 2011].

Образцы снега двух последних лет сбора (2008 – 2009 гг.) оказались сходны между собой: содержали доминантные флотипы разделов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и

Alphaproteobacteria (табл. 6). Это наблюдение, по-видимому, связано не столько с природой пыли в снеге (Сахара или пыль, постоянно оседаемая на ледник из окружающих долин), сколько с тем, что бактерии разделов *Proteobacteria* и *Actinobacteria* доминируют, как правило, повсеместно в почвах, а представители *Firmicutes* – одни из самых часто обнаруживаемых в пыли Сахары. На уровне филотипа были сходны образцы снежного покрова с пылью Сахары от мая 2008 г. и мая 2009 г., где были обнаружены два общих бактериальных филотипа, принадлежащие *Blastococcus saxobsidens* и *Bacillus benzoovorans*, а также один филотип небактериального происхождения - хлоропластная ДНК *Pinus merkusii* (см. табл. 4, приложение 3).

Кроме того, во всех образцах снега, за исключением сбора 2006 г., наблюдали присутствие значительного количества клонов пластидного происхождения (рис. 16). Однако, в снежном покрове, содержащем пыль Сахары, хлоропластная рДНК принадлежала голо- и покрытосеменным деревьям *Pinus merkusii*, *Picea sitchensis* и *Quercus nigra*, а в снеге, не содержащем пыль Сахары - мхам *Bartramia pomiformis*, *Syntrichia ruralis*, *Marchantia polymorpha* и папоротнику *Thelypteris navarrensis* (см. подразделы 3.2.1.3 и 3.2.1.4). По-видимому, видовая принадлежность пластидной рДНК может являться одним из индикаторов путей и источников переноса пылевого материала на ледник.

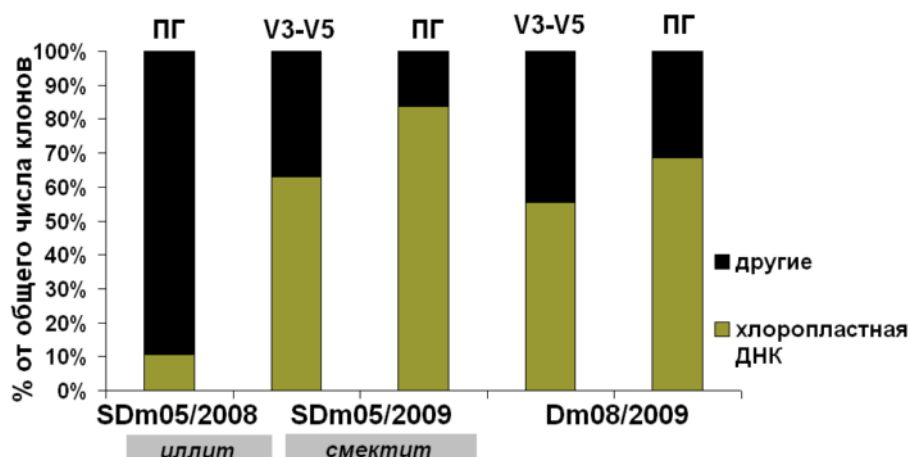
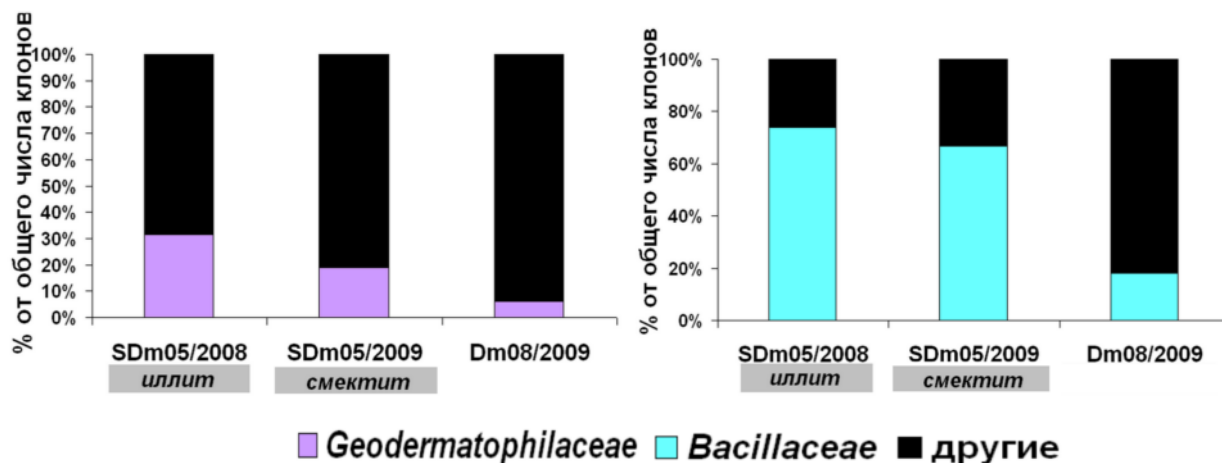


Рисунок 16. Распределение клонов, принадлежащих филотипам пластидного происхождения, по отношению к общему числу клонов в библиотеках V3-V5 и полноразмерного (ПГ) типа для образцов снежного покрова, содержащего (SDm) и не содержащего пыль Сахары (Dm). Другие – все остальные клоны

Следует отметить, что практически во всех образцах снега (в большей мере с пылью Сахары), кроме образца снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г., в V3-V5 библиотеках были выявлены филотипы семейства *Geodermatophilaceae* (рода *Geodermatophilus*, *Blastococcus* и *Modestobacter*), тогда как в полноразмерных библиотеках –

представители семейства *Bacillaceae* (*Bacillus*) (рис. 17). Представители первого семейства ранее были выделены из различных аридных регионов, таких как Уипловские Горы в Калифорнии [Kuhlman et al., 2005], пустынь Нежев, Можав и Намибии [Eppard et al., 1996], пустыни Амаргоза [Gordon, 1964] и один представитель – в почве Татауин [Chanal et al., 2006]. Недавно бактерии родов *Geodermatophilus*, *Blastococcus* и *Modestobacter* были выделены в культуры с поверхности камней и монументов в Сахаре (Тунис) [Essoussi et al., 2010]. В свою очередь, выявление значительного числа родственных *Bacillaceae* филотипов согласуется с результатами полученными ранее при изучении пыли Сахары [Kellogg et al., 2004; Prospero et al., 2005; Polymenakou et al., 2008; Griffin et al., 2001, 2003, 2006]. Доминирование изолятов рода *Bacillus* также наблюдали в образцах азиатской пыли, осажденной в окрестностях городов Хигасихиросима и Дуньхуан [Hua et al., 2007; Maki et al., 2008]. Известно, что основной стратегией выживания в условиях пустыни служит образование различных форм покоящихся клеток. Как следствие спорообразующие виды, такие как *Bacillus spp.* чаще всего обнаруживаются в образцах почвенной пыли и имеют больше шансов, чем другие бактерии (например, грамотрицательные), выжить в условиях длительного переноса в атмосфере [Kellogg & Griffin, 2006]. Кроме того, два филотипа из *Bacillaceae* были встречены в образце, не содержащем пыль Сахары (рис. 18Б). Другие спорообразующие бактерии, присутствовавшие в вышеуказанных образцах, относились к семействам *Paenibacillaceae*, *Clostridiaceae* и *Planococcaceae* (см. приложение 3). Таким образом, представители обоих семейств имеют преимущества в переживании неблагоприятных условий и часто обнаруживаются в аридных почвах. Это может свидетельствовать в пользу более полного представления данными образцами почвы Сахары. Можно ожидать, что подобные микроорганизмы более приспособлены к успешному расселению и колонизации экстремальных экологических ниш посредством переноса с пылью.

Отметим также, что бактерии, принадлежащие роду *Geodermatophilus*, проявляют устойчивость к высоким дозам облучения наряду с *Deinococcus* [Raine et al., 2005]. Обнаруженные в нашем исследовании представители *Hymenobacter* и *Methylobacterium* также известны проявлением подобных свойств. Ранее на примере *D. radiodurans* показано, что радиационная устойчивость у прокариот коррелирует с засухоустойчивостью [Mattimore & Battista, 1996]. Таким образом, микроорганизмы, обладающие устойчивостью к обоим типам стрессов, имеют очевидное преимущество в процессе расселения путем переноса пыли в атмосфере и последующем ее осаждении на поверхности снежного покрова ледников.



А

Б

Рисунок 17. Распределение клонов, принадлежащих семейству *Geodermatophilaceae* и *Bacillaceae* по отношению к общему числу клонов в библиотеке (без учета небактериальных клонов), выявленных в библиотеках V3-V5 (А) и полноразмерного (Б) типа, соответственно. Образцы снежного покрова, содержащие пыль Сахары – SDm, образец, не содержащий пыль Сахары - Dm. Другие – все остальные бактериальные клоны

Отметим, что микробное разнообразие исследованных образцов снега с пылью Сахары и образца снега, не содержащего пыль Сахары, характеризовалось, как правило, известными организмами. Однако, для некоторых филоотипов невозможно было точно определить таксономическую принадлежность только по базе данных Genbank. С этой целью был проведен филогенетический анализ, который показал, что 7 из 10 неидентифицированных филоотипов можно было приписать к следующим разделам: *Gammaproteobacteria* (филотип MS7-15), *Bacteroidetes* (MB5-18, 5f-6, 5f-8 и MS5sf-18), *Actinobacteria* (2SD-1), *Deinococcus-Thermus* (5f-3) (см. приложение 5). Таким образом, неидентифицированными и неклассифицированными остались только 3 филотипа. Филогенетическое положение филоотипов MS7-34, MS7-19 и MS7f-15, указанное в GenBank, было исправлено на *Alphaproteobacteria*.

На основании высокого родства с бактериальными клонами/изолятами, обнаруженными в ходе исследований нормальной микрофлоры человека, в нашем исследовании было обнаружено 12 НА-филоотипов, относящихся к *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* в снеге с пылью Сахары, и ни одного подобного филотипа в снеге без пыли Сахары (см. приложение 3 и 4). Это, по-видимому, связано с большим влиянием антропогенного фактора в пустыне в отличие от высокогорного ледника.

Что касается сравнения микробного разнообразия, выявленного путем создания V3-V5 и полноразмерных библиотек для каждого из изученных образцов, показано, что распределение основных филотипов и их таксономическая принадлежность в библиотеках первого и второго типа, были наиболее схожи для снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. Во всех остальных трех случаях имело место значительное несовпадение, за исключением филотипов хлоропластной рРНК. Помимо этого, характерной чертой микробного разнообразия исследуемых образцов, представленных V3-V5 библиотеками, было присутствие филотипов *Geodermatophilaceae*, а в случае полноразмерных библиотек – филотипов *Bacillaceae* (см. выше).

Таким образом, результаты, полученные с использованием двух типов клоновых библиотек гена 16S рРНК, дополнили друг друга и позволили получить более полную картину микробного разнообразия исследуемых образцов. Различия, обнаруженные между V3-V5 и полноразмерными библиотеками, могут быть обусловлены, по-крайней мере, двумя причинами. Во-первых, степенью вырожденности праймеров и, как следствие, проявлением избирательной амплификации. Во-вторых, во время воздушного транспорта клеток накоплением повреждений в их геномной ДНК, препятствующих амплификации полноразмерных копий рРНК генов и, как следствие, обогащением выборки короткими фрагментами гена. В отношении второй причины известно, что в условиях голодания и низких температур большинство бактерий переходит в состояние “некультивируемой формы бактерий” (НФБ), в котором степень сохранности молекул ДНК и РНК может различаться для разных видов. Так, при инкубации в течение пяти месяцев клеток патогенной бактерии *Vibrio vulnificus*, перешедших в НФБ, при температуре 5 °C показано, что ДНК и РНК сохранялись менее чем в 0,05% популяции клеток [Weichert et al., 1997]. В тоже время другая патогенная бактерия *Campylobacter jejuni* в состоянии НФБ при инкубации около четырех месяцев при температуре 4 °C была способна сохранять хромосомную ДНК без видимой дегградации [Lazaro et al., 1999]. У спорообразующих бактерий, таких как *Bacillus* и *Clostridium*, ДНК может сохраняться в течение очень длительного времени под воздействием различных видов стресса [Setlow, 1995]. Имеются также данные о сохранении интактной ДНК у неспорообразующих бактерии при отрицательных температурах вплоть до нескольких тысяч лет [Johnson et al., 2007]. Кроме того, некоторые микроорганизмы способны продолжать жизнедеятельность при температуре значительно ниже 0 °C [Lewis et al., 2008]. Сохранность нуклеиновых кислот вне клетки хорошо изучена в почве и воде [Nielsen et al., 2007], но в тоже время нам не известны подобные работы для неспорообразующих видов в условиях атмосферы или снежного покрова.

Рисунок 18. Филогенетическое дерево для 123 филотипов (без учета филотипа MS7-29 - мтДНК), выявленных в ходе настоящего исследования путем амплификации V3-V5 области гена 16S рРНК (метод Maximum Parsimony для 494 н.п., из которых 303 н.п. филогенетически информативны). Красными заполненными кругами обозначены филотипы, встреченные более чем в одной библиотеке, а черными заполненными кругами – неидентифицированные филотипы

Как и по объединенным данным библиотек двух типов микробный состав и доминантные филоотипы значительно различались для образцов снега с пылью Сахары безотносительно минерального типа смектит или иллит (рис. 19). Однако, если образцы снежного покрова с пылью Сахары типа смектит (SDm06/2006 и SDm05/2009) различались полностью по видовому составу обнаруженных микроорганизмов, то для образцов с пылью Сахары типа иллит (SDm05/2008 и SDm06/2008), отобранных с интервалом в 1 месяц, было выявлено некоторое сходство. Так, в обоих образцах присутствовали доминантные филоотипы раздела *Actinobacteria*, а также представителей родов *Rubellimicrobium* и *Geodermatophilus* (см. приложение 3). Помимо этого, значительная часть клонов V3-V5 библиотек двух вышеуказанных образцов принадлежали разделу *Alphaproteobacteria*. Также в образце снежного покрова с пылью Сахары от мая и июня 2008 г. был обнаружен общий минорный филоотип, родственный (96,4% сходства) бактерии *Sphingomonas kaistensis*.

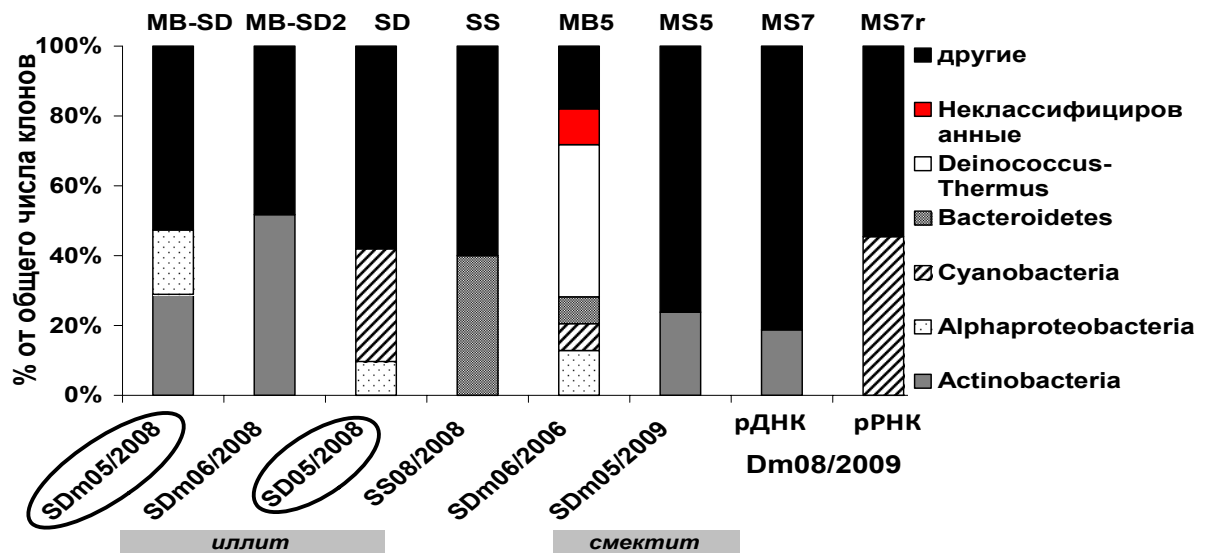


Рисунок 19. Соотношение доминантных бактериальных филоотипов, выявленных путем создания V3-V5 библиотек для образцов снега, содержащих (SDm) и не содержащих пыль Сахары (Dm), а также образцов пыли, выпавшей в Гренобле (SD) и песчаной почвы пустыни Сахара (SS). Другие – минорные бактериальные филоотипы

Несмотря на выраженное различие видового состава четырех образцов снежного покрова с пылью Сахары между собой, три образца снега с пылью Сахары, осажденной в мае 2008 г., июне 2008 г. и мае 2009 г. (SDm05/2008, SDm06/2008 и SDm05/2009), обнаруживали некоторое сходство на уровне филогенетического раздела и филоотипа. Во всех трех образцах присутствовали доминантные филоотипы раздела *Actinobacteria*. Кроме того, данные образцы содержали общие филоотипы: доминантный филоотип, родственный *Blastococcus saxobidens*

(99% сходства) был обнаружен в снежном покрове с пылью Сахары от мая 2008 г. и от мая 2009 г.; минорный флотип, родственник *Rubellimicrobium mesophilum* (98% сходства), был найден в снежном покрове с пылью Сахары от июня 2008 г. и мая 2009 г.

Как было отмечено ранее, в снеге, не содержащем пыль Сахары (Dm08/2009), также доминировали представители *Actinobacteria*, а, кроме того, значительное количество клонов пластидного происхождения было обнаружено в образцах Dm08/2009, SDm05/2009 и SD05/2008 (рис. 20, см. подраздел 3.3.1). Однако, состав флотипов значительно отличался между снегом с пылью и без пыли Сахары и общих флотипов между этими образцами нами выявлено не было.

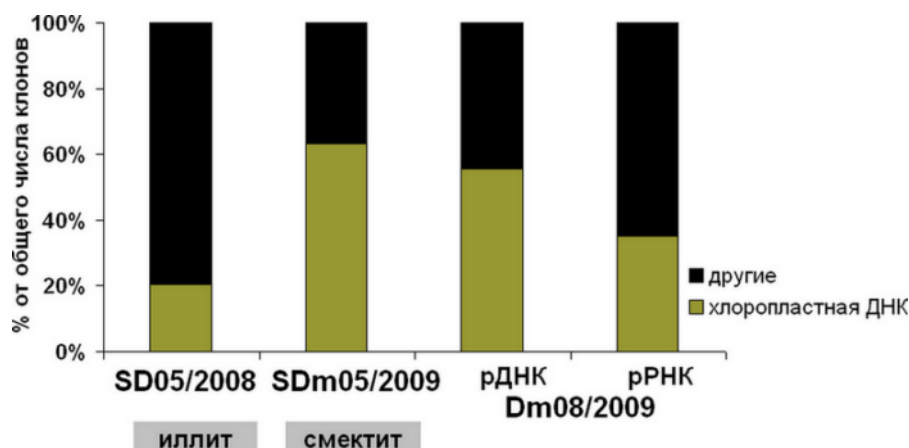


Рисунок 20. Распределение клонов, принадлежащих флотипам пластидного происхождения, по отношению к общему числу клонов в V3-V5 библиотеках образцов: пыли Сахары, собранной в Гренобле (SD), снега с пылью (SDm) и без пыли Сахары (Dm). Другие – все остальные клоны

Образцы пыли Сахары от одного и того же события переноса в мае 2008 г., собранные на высоте ~200 м (г. Гренобль) и 4250 м (Монблан) над у.м., показали лишь незначительное сходство, которое проявлялось в принадлежности доминантных флотипов к разделу *Alphaproteobacteria* и принадлежности двух минорных неидентичных друг другу флотипов к роду *Novosphingobium* (см. приложение 3). Так, в пыли Сахары, осажденной в Гренобле (SD05/2008), доминирующее положение занимали *Alphaproteobacteria*, *Cyanobacteria* и, кроме того, обнаруживалось значительное количество флотипов небактериального происхождения (рис. 20). В свою очередь, в пыли Сахары, осажденной на леднике (SDm05/2008), были выявлены доминантные флотипы *Actinobacteria* и *Alphaproteobacteria*. Общих флотипов между данными образцами нами не выявлено. По-видимому, различия видового состава флотипов между вышерассмотренными образцами указывают, как на возможную ассоциацию определенных видов микроорганизмов с частицами пыли разного

размера, так и вклад условий переноса пыли: осаждение одних и захват других видов микроорганизмов.

Микробный состав почвы Сахары (SS03/2008) оказался уникален по распределению бактериальных филотипов, где доминирующее положение занимали *Bacteroidetes* (рис. 20). Однако, несмотря на значительные отличия с другими образцами, содержащими пыль Сахары, представители родов *Truepera*, *Geodermatophilus*, *Blastococcus*, *Solirubrobacter* и *Segetibacter*, выявленные в образце почвы Сахары, были встречены также в некоторых из образцов снега с пылью Сахары и в образце пыли Сахары, осажденной в Гренобле (см. приложение 3). Кроме того, филотипы, родственные *Geodermatophilus*, *Blastococcus*, а также *Modestobacter* были обнаружены помимо почвы Сахары практически во всех образцах, содержащих пыль Сахары, кроме образца снега с пылью от июня 2006 г. и образца пыли Сахары, собранной в Гренобле (SDm06/2006 и SD05/2008, соответственно) (рис. 21). Как было отмечено ранее, представители этих трех родов недавно были выделены с поверхности камней и монументов в Тунисе и проявляют устойчивость к таким видам стресса, как засуха и ионизирующая радиация (см. подраздел 3.3.1). Перекрестное сравнение всех филотипов, выявленных в почвенном образце и образцах, содержащих пыль Сахары, выявило лишь один общий филотип (98% сходства с *Rubellimicrobium mesophilum*), который помимо почвенного образца был найден в образцах снега с пылью Сахары от июня 2008 г. и мая 2009 г.

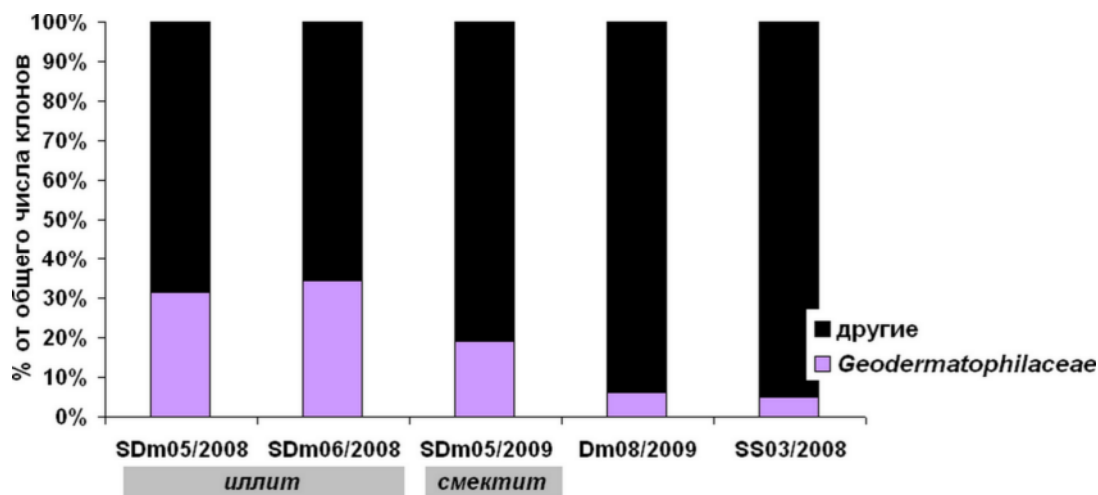


Рисунок 21. Распределение клонов, принадлежащих семейству *Geodermatophilaceae* по отношению к общему числу клонов в библиотеке (без учета небактериальных клонов), выявленных в V3-V5 библиотеках образцов: снега с пылью (SDm) и без пыли Сахары (Dm), и песчанной почвы пустыни Сахара (SS). Другие – все остальные бактериальные клоны

Статистический анализ LIBSHUFF, основанный на попарном сравнении клоновых библиотек между собой, подтвердил различия видового состава исследуемых образцов снежного покрова с пылью Сахары между собой, а также в сравнении с дополнительно

изученными образцами, включая снег, не содержащий пыль Сахары. Так как полученные при этом наименьшие значения P для каждой из сравниваемых пар библиотек были меньше известного критического значения P (0,0025), существенная степень различий была обнаружена между всеми сравниваемыми библиотеками.

Несовпадение видового состава микроорганизмов, обнаруженных в четырех образцах снежного покрова с пылью Сахары, а также при их сравнении с образцами снега, не содержащего пыль Сахары, песчанной почвы Сахары и пыли Сахары, осажденной в Гренобле, по-видимому, можно объяснить с точки зрения физических факторов, задействованных в процессе переноса пыли из Сахары. Причинами вариабельности состава микроорганизмов, переносимых с пылью Сахары, по-видимому, в большей степени являются особенности переноса пыли ветром и возможный захватом микрофлоры из других источников, чем источник происхождения пыли. Данное предположение основывается на том факте, что образцы снега с пылью Сахары, принадлежащей к одному минеральному типу, характеризовались различным распределением частиц пыли по размерам [Chuvochina et al., 2011]. Кроме того, размер частиц пыли Сахары, осажденной в Гренобле (~9 мкм), был больше частиц пыли того же самого события переноса, осажденных на леднике Монблан (~6 мкм) [Chuvochina et al., 2011]. Ранее было показано, что изменчивость в распределении частиц пыли по размерам связана с различными путями переноса пыли [Israelevich et al., 2003]. Кроме того, пыль, переносимая за короткий промежуток времени, также как и пыль, осажденная вблизи своего источника, характеризуется большим размером частиц в сравнении с пылью, переносимой за более длительный временной промежуток [Goudie & Middleton, 2001]. В связи с тем, что некоторые бактерии могут быть прикреплены к частицам пыли, их размер может играть важную роль в процессе распространения микроорганизмов [Choi et al., 1997]. Прикрепление к частицам пыли также способствует защите микроорганизмов от таких видов стресса, как действие УФ и озона [Tang et al., 2011]. Недавно показано, что различные таксономические группы бактерий переносятся разными по размеру частицами пыли Сахары [Polymenakou et al., 2008].

Таким образом, такие факторы как временной интервал и условия переноса пыли влияют на размер переносимых частиц, что в свою очередь может играть важную роль в регулировании состава переносимого микробного пула. Различия в путях переноса пыли в атмосфере, по-видимому, также значительно влияют на микробный состав оседаемой пыли, так как по ходу движения воздушных масс микробные клетки могут быть захвачены из других источников: поверхность растений или водная пленка (например, Средиземного моря). Кроме того, дополнительными факторами, определяющими различия между образцами снежного покрова с пылью являются сезон и временной интервал нахождения

пыли в снеге с момента ее осаждения на ледник (см. подраздел 3.3.1). Все эти факторы вместе взятые, по-видимому, могут объяснить различия микробного разнообразия между образцами снега с пылью Сахары и образцом снега, не содержащего пыль Сахары. Вместе с тем отметим, что разнообразие микроорганизмов снежного покрова без пыли Сахары было изучено на примере одного единственного образца, что не позволяет сделать достоверных выводов о сходстве/различии снега с пылью разной природы. Что касается образца песчанной пустынной почвы Сахары, то стоит также отметить, что для достоверной оценки разнообразия почвенной микрофлоры, требуется значительно больший размер выборки клоновой библиотеки в сравнении с выборкой, проанализированной в данном исследовании.

В целом, полученные данные согласуются с данными литературы для почв пустынь. Так, представители *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* и *Alphaproteobacteria* были доминирующим компонентом микробного сообщества поверхности метеорита, пролежавшего более семидесяти лет в почве пустыни Татаун (100 км от границы с Сахарой) [Benzerara et al., 2006]. Некультивируемое разнообразие непосредственно пустынной почвы Татаун было представлено в основном тремя разделами *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*, но также отмечены представители *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и *Firmicutes* [Chanal et al., 2006]. Культивирование дало изоляты фактически тех же разделов (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*) [Chanal et al., 2006].

Кроме того, в ходе исследования культивируемого разнообразия снежного покрова ледника Монблан с пылью Сахары от события переноса 2000 г. [Gonzalez-Toril et al., 2009] были обнаружены представители тех же разделов (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*) с преобладанием изолятов *Alphaproteobacteria*. В микробном сообществе снежного покрова озера Редон (2240 м, Центральные Пиренеи) с пылью Сахары (событие переноса 2004 г.) также доминировали *Betaproteobacteria* и *Actinobacteria* [Hervas & Casamayor, 2009]. Исследования микробного разнообразия снежного покрова горного массива Татэяма в Японии показали доминирование бактерий, также принадлежащих разделу *Betaproteobacteria*, за которыми следовали *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [Segawa et al., 2005]. Кроме того представители *Betaproteobacteria* в значительном количестве присутствовали в арктическом снеге архипелага Шпицберген, где также доминировали *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* и *Alphaproteobacteria* [Larose et al., 2010].

Напротив, в нашем исследовании раздел *Betaproteobacteria* был представлен тремя минорными филотипами в образцах с пылью Сахары от июня 2006 г. и мая 2009 г. Отметим, что один из этих филотипов (*Massilia*) был близкородственен бактерии из снега в антарктических оазисах [Fujii et al., 2010]. Основное разнообразие сообщества

антарктического снежного покрова было представлено разделами *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, и *Cyanobacteria* с значительным преобладанием *Bacteroidetes*, в основном рода *Hymenobacter*. Бактерии рода *Hymenobacter* доминировали также в снежном покрове тибетского высокогорья ледников Гуоку и Жаданг, где отмечалось влияние переноса почвенной пыли из аридных регионов Китая [Liu et al., 2009a]. Нам удалось идентифицировать только два отдаленно родственных *Hymenobacter*-подобных филотипа в снежном покрове с пылью Сахары от июня 2006г. Кроме того, основное микробное разнообразие ледников Гуоку и Жаданг было представлено разделами *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*-) и *Actinobacteria*, из которых три филотипа оказались близкородственными филотипам, обнаруженным нами в сообществах снежного покрова с пылью Сахары от мая 2008 г., июня 2008 г. и мая 2009 г. Интересно, что два из данных трех филотипов принадлежали роду *Sphingomonas*, который входил в число общих родов микроорганизмов, выявленных на четырех ледниках тибетского высокогорья [Liu et al., 2009a]. Также изоляты близкие *Sphingomonas* были получены при исследовании культивируемого разнообразия снежного покрова ледников Шпицбергена [Amato et al., 2007b], который среди прочего населяли бактерии принадлежащие *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*.

Таким образом, бактерии разделов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, как правило, встречаются чаще других в обоих типах экосистем: почве Сахары и снежном покрове ледников (как горных, так и полярных). Кроме того, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* обнаруживаются в большом количестве в паковом льде Арктики и Антарктики как традиционными методами культивирования, так и молекулярными [Brinkmeyer et al., 2003; Groudieva et al., 2004]. Доминирование представителей *Betaproteobacteria* и *Actinobacteria* отмечено во многих альпийских регионах (Alfreider et al., 1996; Glockner et al., 2000; Zwart et al., 2002). Последние в свою очередь могут составлять до 50% от общей бактериальной популяции почвы пустынь [Bhatnagar & Bhatnagar, 2005]. Лимитирующими микробное разнообразие факторами, общими для аридных областей и высокогорных ледников, являются засуха, жесткое УФ излучение и действие крайних температур. Отсюда, по-видимому, не случайно наблюдаемое совпадение, так как бактерии вышеупомянутых разделов могут обладать рядом характеристик, позволяющих им выживать в определенной степени сходных экстремальных условиях среды.

Отметим, что при анализе дополнительных образцов и рРНК-библиотеки было выявлено 10 неидентифицированных филотипов, 4 из которых удалось приписать определенным разделам (см. приложение 3, рис. 19). Так филотип MB-SD2-18 оказался в

одном кластере с *Actinobacteria*, филотип SD24 - в *Bacteroidetes*, а два других (SD27 и SD18) – в кластере хлоропластной ДНК. Филогенетическое положение 6 неидентифицированных филотипов, а также филотипа SD15, обнаруживающего 91% сходства с известным таксоном, установить не удалось.

В отношении НА-филотипов, 6 других НА-филотипов (по сравнению с выявленными ранее в 4-х основных образцах снега) были найдены в образце снега с пылью Сахары от июня 2008 г. (*Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*), образце снега без пыли Сахары (*Alphaproteobacteria*, *Firmicutes* – 2 филотипа) и образце пыли Сахары, собранной в Гренобле (*Alphaproteobacteria*).

Подводя итоги данного раздела, отметим, что включение в анализ трех дополнительных образцов, а именно снега с пылью Сахары от события переноса в июне 2008 г., пыли Сахары, собранной в Гренобле, и песчанной почвы Сахары, а также сравнение со снегом, не содержащим пыль Сахары, позволило сделать более достоверные выводы в отношении причин, лежащих в основе различий микробного состава образцов снежного покрова с пылью Сахары. Показано, что перенос почвенной пыли Сахары на ледник с интервалом событий в пределах года и одного минерального типа, может приносить с собой микрофлору, характеризующуюся различным составом как на видовом уровне, так и на уровне раздела. Даже в случае одного и того же события переноса пыли, зарегистрированного на различных высотах, видовой состав и разделы микроорганизмов отличались, что, по-видимому, указывает на ассоциацию различных бактерий с частицами пыли разного размера. Вариабельность состава микроорганизмов, переносимых с пылью из Сахары, по-видимому, связана не столько с источником происхождения пыли, сколько с особыми условиями во время переноса пыли в атмосфере, включая различные пути переноса и возможный захват микрофлоры из других источников по пути из Северной Африки.

3.3.3 Сравнительный анализ бактериального разнообразия снега путем клонирования рДНК и рРНК

Для образца снежного покрова, не содержащего пыль Сахары (Dm08/2009) были созданы две клоновые библиотеки – одна, основанная на рДНК (MS7), а другая – на рРНК транскриптах (MS7r) (см. табл. 2). Несмотря на то, что бактериальное разнообразие снежного покрова, не содержащего пыль Сахары, было изучено практически идентичным способом (ПЦР, праймеры и т.д.) таксономический состав выявленных филотипов оказался различен, за исключением группы хлоропластной ДНК из *Viridiplantae*. Общий филотип, родственный хлоропластной ДНК папоротника *Thelypteris navarrensis* (100% сходства), был обнаружен в

обеих библиотеках. Из бактериальных филоотипов в библиотеке MS7 доминировал филоотип *Conexibacter*, тогда как в библиотеке MS7г – уникальный филоотип, родственный цианобактерии (97%) *Stigonema ocellatum* (подразделы 3.2.1.4 и 3.2.2.2). Цианобактерии были ранее обнаружены во многих экстремальных холодных местообитаниях как полярных, так и горных ледников, благодаря наличию различных адаптационных приспособлений к холоду [Vincent, 2007]. Находка цианобактерии рода *Stigonema* может свидетельствовать в пользу не только метаболической активности, но и размножения данной бактерии в снеге при отрицательной температуре. Отметим, что различие таксономического состава между рДНК и рРНК библиотеками было подтверждено статистическим анализом (см. приложение 6 табл. 2). Причины несовпадения большей части доминантных групп и филоотипов, выявленных в рДНК и рРНК библиотеках, могут быть связаны как с деградацией рРНК, избирательной для части доминантных филоотипов в процессе месячного хранения снега при отрицательной температуре по причине их неспособности к размножению в снеге, так и напротив, размножением отдельных “приспособившихся” филоотипов.

Таким образом, анализ снежного покрова ледника Монблан путем создания клоновых библиотек на основе рДНК и рРНК, позволил обнаружить доминантный филоотип, относящийся к цианобактерии рода *Stigonema*, по-видимому, способный к размножению (активному метаболизму) при отрицательной температуре.

3.4 Выявление филоотипов – потенциальных колонизаторов снежного покрова ледника Монблан по результатам изучения образцов снега

На сегодняшний день показано, что перенос почвенной пыли Сахары на отдаленные расстояния играет важную роль не только в биогеохимических циклах за счет внесения дополнительных питательных веществ и увеличения, таким образом, первичной продукции в различных экосистемах, но и способствует переносу микроорганизмов, населяющих почвы пустыни. Несмотря на присутствие различных стрессовых факторов (высушивание, низкое содержание питательных веществ, жесткое УФ излучение и т.д.), многие микроорганизмы способны сохранять свою жизнедеятельность после длительного переноса в атмосфере [Griffin et al., 2007b]. Влияние почвенной микробиоты Сахары на резидентные сообщества других экосистем пока еще малоизучено. Однако, недавно обнаружено, что бактерии, переносимые с пылью Сахары, могут принимать участие в формировании микрофлоры бактерионейстона высокогорных озер [Hervas & Casamayor, 2009]. Кроме того, получены экспериментальные доказательства роста представителей *Gammaproteobacteria*, внесенных с пылью Сахары в резервуар, имитирующий олиготрофные условия альпийских озер [Reche et

al., 2009]. Исходя из вышеизложенного, мы предположили, что осаждение почвенной пыли Сахары на снежный покров альпийских ледников может способствовать формированию микрофлоры снежного покрова, что подразумевает развитие бактерий в составе определенного набора видов [Чувочина и др., 2011]. Данное предположение основывается на следующих фактах. Во-первых, перенос пыли Сахары происходит, как правило, в летне-весенний период, когда температура воздуха в районе изучаемого ледника близка к 0 °С. Во-вторых, микроорганизмы, развивающиеся в почвах пустынь, имеют ряд адаптаций как к температурным колебаниям, так и к действию засухи и УФ излучения [Gonzalez-Toril et al., 2009] и поэтому, вероятно, могут выживать в снеге. Присутствие в снежном покрове бактерий, происходящих из аридных почв, было отмечено ранее при изучении микробного разнообразия горных и полярных ледников [Gonzalez-Toril et al., 2009; Larose et al., 2010; Liu et al., 2009a].

Для проверки выдвинутой гипотезы, все филоотипы (за исключением НА-филоотипов), обнаруженные в библиотеках двух типов 4-х образцов снега, содержащего и не содержащего пыль Сахары, и V3-V5 библиотеке дополнительного образца снега с пылью Сахары, были рассмотрены на предмет возможной колонизации снежного покрова путем детального анализа описания наиболее близкородственных последовательностей ($\geq 98\%$, в пределах филоотипа) в GenBank. В результате подобного анализа в V3-V5 библиотеках образцов снежного покрова ледника Монблан с пылью Сахары и без пыли Сахары было выявлено 9 филоотипов, а в полноразмерных библиотеках – 5 филоотипов, конспецифичные клонам или филоотипам, которые были обнаружены в различных холодных местообитаниях (табл. 7). По числу клонов большая часть данных филоотипов принадлежала *Cyanobacteria*, за которыми следовали представители *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Последние были выявлены только в полноразмерных библиотеках. Филогенетические взаимоотношения “холодолобивых” филоотипов для библиотек двух типов показаны на рисунке 22.

Амплификация V3-V5 области гена 16S рРНК для образца снежного покрова с пылью Сахары от июня 2006 г. показала присутствие одного “холодолобивого” филоотипа – представителя рода *Anabaena*, родственного бактериям из антарктической почвы Сухих Долин. В свою очередь амплификации полноразмерного гена обнаружила 3 “холодолобивых” филоотипа, также относящихся к *Cyanobacteria*. Из них два филоотипа, отнесенные к *Phormidium* и *Chamaesiphon*, были родственны бактериям из холодных озер Антарктики (табл. 7), тогда как третий, *Anabaena*-подобный филоотип, обнаруживал сходство с цианобактериями из холодных почв Антарктики и Аляски. Стоит отметить, что филоотипы MB5-20 и 5fr-19, встреченные в библиотеках двух типов, оказались родственны между собой и оба обнаруживали сходство с цианобактериями из холодных почв Антарктики (табл. 7).

Таблица 7 – Характеристика фило типов, конспецифичные последовательности которым обнаружены в различных холодных местообитаниях согласно анализу библиотек V3-V5 и полноразмерного (ПГ) типа

Таксон	Библио-тека клонов (тип)	Филотип	№ доступа по базе данных NCBI	% сходства	Источник	Ссылка	Физиологи-ческая группа
<i>Actinobacteria</i>							
<i>Crossiella</i>	MB-SD (V3-V5)	2SD-17	EU931049 AY571815 FJ570484	99 98 98	Почва, Антарктика; Альпийская тундра	Babalola et al., 2009; Saul et al., 2005; Zinger et al., 2009	ПТ ХО°
<i>Pseudoclavibacter</i>	MS5 (V3-V5)	MS5s-2	EU375384	99	Озеро, Тибет	Liu et al., 2009b	МФ ХО°
<i>Modestobacter</i>	MS5 (V3-V5)	MS5-34	EU527133	99	Снег, Тибет	Liu et al., 2009a	ПТ ХО°
<i>Alphaproteobacteria</i>							
<i>Devosia</i>	MB-SD (V3-V5)	2SD-34	EU083461 AY315165	99 98	почва, освобожденная от ледника; подледниковые отложения	Noll et al., 2008 Foght et al., 2004	МФ ХО°
<i>Sphingomonas</i>	MB-SD (V3-V5)	2SD-2	EU152998	99	Снег, Тибет	Liu et al., 2009a	МФ ХО°
<i>Sphingomonas</i>	MB-SD2 (V3-V5)	MB-SD2-1	DQ366009 EU153027	98 98	Почва, Антарктика; Снег, Тибет	Aislabie et al., 2006; Liu et al., 2009a	МФ ХО°
<i>Betaproteobacteria</i>							
<i>Massilia</i>	MS5 (V3-V5)	MS5s-4	FM955855 DQ628923 DQ512747 AB519655	99 99 98 99	Ледниковые отложения, Арктика; осадочные породы, ледник Джон Эванс; облака; красный снег, Антарктика	Reddy et al., 2009; Cheng and Foght, 2007; Amato et al., 2007a; Fujii et al., 2010	ПТ ХО°

Продолжение таблицы 7

<i>Cyanobacteria</i>							
<i>Anabaena</i>	MB5 (V3-V5)	<u>MB5-20</u>	FJ490285	100	Почва, Антарктика	Pointing et al., 2009	ПТ ФЛ°
<i>Anabaena</i>	5f (ПГ)	5fr-19	FJ490320 GQ396895	99 99	Почва, Антарктика; почва, освобожденная от ледника, Аляска	Pointing et al., 2009; Sattin et al., 2009	ПТ ФЛ°
<i>Stigonema</i>	MS7r (V3-V5)	<u>MS7r-17</u>	AY493624	96,6	Озера, Антарктика	Taton et al., 2006	ПТ ФЛ°
<i>Phormidium</i>	5f (ПГ)	<u>5f-12</u>	AY493580 AF076159	97,9 97,6	Озера, Антарктика	Taton et al., 2006 ; Priscu et al., 1998	ПТ ФЛ°
<i>Chamaesiphon</i>	5f (ПГ)	5f-17	AF076163	97,3	Озера, Антарктика	Priscu et al., 1998	ПТ ФЛ°
<i>Firmicutes</i>							
<i>Clostridium</i>	MS7f (ПГ)	MS7f-18	AJ506120 GQ397026 DQ521488	98 98 98	Микробный мат озера Фрикселл, Антарктика; почва, освобожденная от ледника, Аляска; Озеро Вида, Антарктика	Spring et al., 2003; Sattin et al., 2009; Mosier et al., 2007	ПФ ХО°
<i>Tumebacillus</i>	f2SD (ПГ)	<u>f2SD-a7</u>	DQ444975	99	Вечная мерзлота, Канада	Steven et al., 2006, 2008	ПТ ХО ^{ф*}

Примечания

1 В графах начиная с “№ доступа...” приведены данные для близкородственной последовательности из холодных местообитаний.

2 Сокращения метаболического статуса штамма, родственного “холодолюбивому” фило типу, по отношению к температуре: ПТ – психротолерантный, МФ – мезофильный, ПФ – психрофильный; по отношению к источнику энергии: ФЛ – фотолитотроф, ХО – хемоорганотроф. Верхние индексы “о” или “ф” означают облигатный и факультативный, соответственно.

3 Подчеркиванием обозначены доминантные фило типы.

* Штамм, способен к окислению соединений серы.

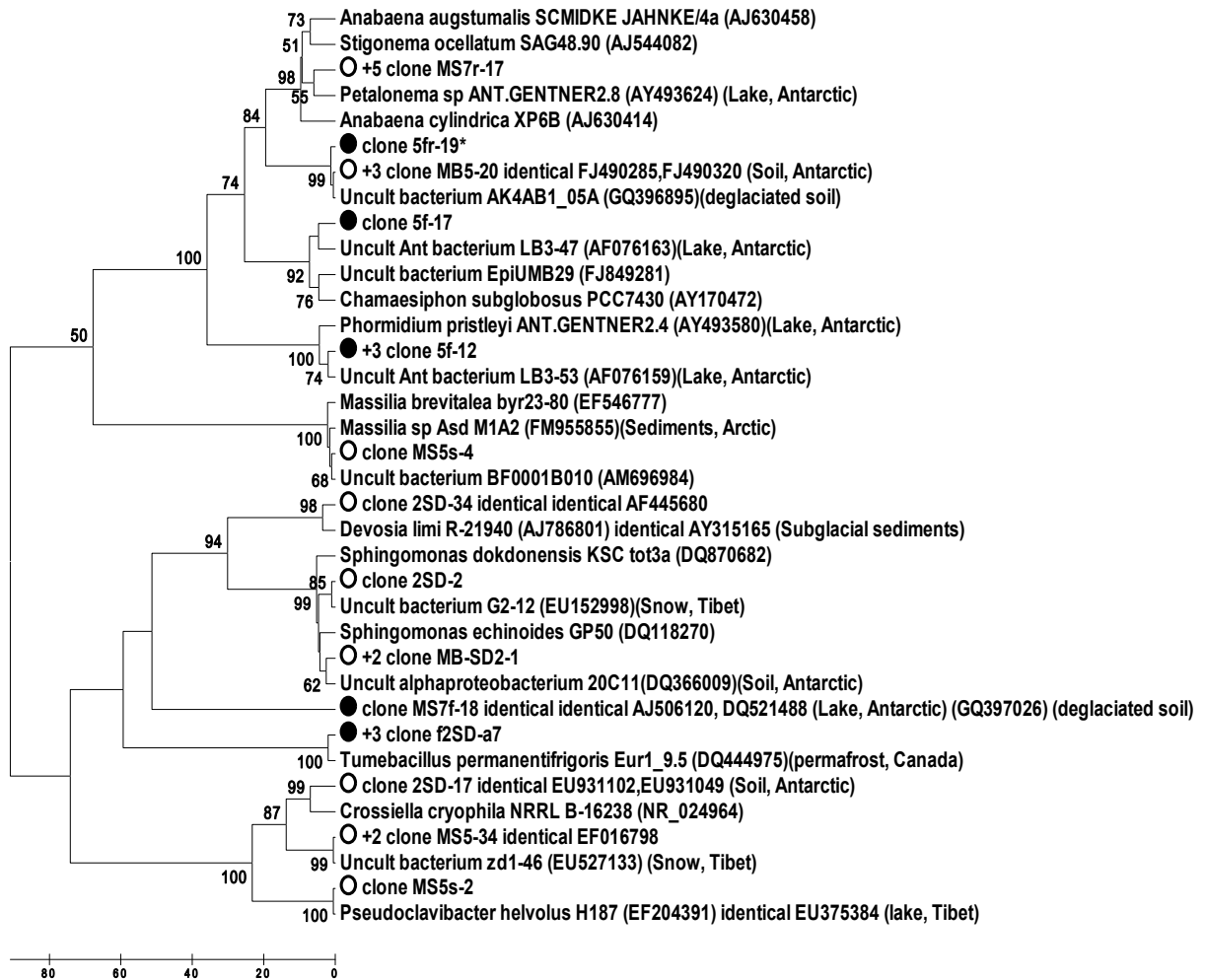


Рисунок 22. Филогенетическое дерево “холодолюбивых” филофитов, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей полноразмерного гена 16S рРНК (черные круги) и его V3-V5 области (прозрачные круги) (метод Maximum Parsimony для 485 н.п., из которых 191 н.п. филогенетически информативны). Также приведены близкородственные последовательности клонов из холодных местообитаний и известных штаммов. Цифрами показана статистическая поддержка ветвления (50% и выше), определенная с помощью bootstrap-анализа 500 альтернативных деревьев. Шкала показывает минимальное количество филогенетически информативных нуклеотидных замен, необходимых для получения данной топологии дерева

В снежном покрове с пылью Сахары от мая 2008 г., согласно анализу V3-V5 библиотеки, было выявлено три “холодолюбивых” филофита из разделов *Actinobacteria* и *Alphaproteobacteria*, родственных бактериям из холодных почв и снежного покрова (табл. 7). Так, филофит, родственник бактерии *Crossiella cryophila*, оказался близок микроорганизмам, населяющим холодные почвы антарктических пустынь и альпийской тундры. Близкородственные последовательности филофита, сходного с бактерией *Devosia limi*, были

обнаружены в образцах почвы на месте таяния ледника Дамма в Швейцарии и в отложениях ложа ледника Франц Джозеф в Новой Зеландии. Филотип, относящийся к роду *Sphingomonas*, оказался родственен бактериям из снежного покрова тибетского высокогорья. Другой “холодолюбивый” филотип, родственник *Sphingomonas*, был выявлен в образце снежного покрова с пылью Сахары от июня 2008 г. и также оказался сходен с бактериями из снежного покрова тибетского высокогорья. Бактерии рода *Sphingomonas* часто встречаются в холодных почвах Антарктики и известны своей способностью метаболизировать широкий спектр органических субстратов, а также расти и выживать в олиготрофных условиях [Saul et al., 2005; Liu et al., 2009a]. В полноразмерной библиотеке вышеуказанного образца был обнаружен один доминантный “холодолюбивый” филотип, родственник бактерии *Tumebacillus permanentifrigoris* из вечномерзлотных почв Канады.

В снежном покрове с пылью Сахары от мая 2009 г. согласно анализу V3-V5 библиотеки были выявлены три “холодолюбивых” филотипа, принадлежащие родам *Pseudoclavibacter*, *Modestobacter* и *Massilia*. Их ближайшие родственные бактерии происходили из снежного покрова и озер тибетского высокогорья, арктических отложений и антарктического снега. Вместе с тем, данные и любые другие “холодолюбивые” филотипы отсутствовали в полноразмерной библиотеке рассматриваемого образца.

Примечательно, что в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, было обнаружено по одному “холодолюбивому” филотипу для каждого типа библиотек (табл. 7). При этом филотип, родственник цианобактерии из озер Антарктики, был выявлен только в V3-V5 библиотеке, основанной на рРНК (MS7r). В полноразмерной библиотеке единственный “холодолюбивый” филотип из раздела *Firmicutes* оказался родственен бактериям антарктических озер и почвы, освобожденной от ледника.

Таким образом, “холодолюбивые” филотипы, выявленные в снежном покрове с пылью Сахары по двум типам библиотек, оказались в основном родственны бактериям из холодных почв и озер (например, Антарктики и Арктики). Однако, четыре филотипа (2SD-2, MB-SD2-1, MS5s-4 и MS5-34) были близки бактериям из снежного покрова горных и окраинных (в оазисах) полярных ледников [Liu et al., 2009a; Fujii et al., 2010]. Можно предположить, что данные филотипы встречаются повсеместно в снежном покрове. В свою очередь “холодолюбивые” филотипы, обнаруженные в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, по данным библиотек двух типов, были близки бактериям из холодных озер Антарктиды.

Согласно анализу близкородственных штаммов ($\geq 98\%$ сходства) к истинно психрофильным или психротолерантным бактериям были отнесены филотипы, представленные родами *Massilia*, *Phormidium*, *Tumebacillus* и *Clostridium*, выявленные в

снежном покрове с пылью и без пыли Сахары. Филотип, родственный (98,7%) хемоорганотрофной психротолерантной бактерии *Massilia brevitalea* (EF546777) [Zul et al., 2008], был выявлен в V3-V5 библиотеке. Три других оставшихся филотипа были обнаружены в полноразмерных библиотеках гена 16S рРНК. Согласно характеру метаболизма ближайших штаммов, цианобактерия *Phormidium* может представлять фотолитотрофный способ питания, а бактерии рода *Clostridium* и *Tumebacillus* – облигатный и факультативный хемоорганотрофный способы питания, соответственно. Примечательно, что хемолитоавтотрофия последней бактерии проявляется в окислении тиосульфатов и сульфитов в сульфаты [Steven et al., 2008]. Известно, что сульфаты не только содержатся в составе почвенной пыли Сахары (в виде гипса), но могут также образовываться на ее поверхности в ходе окислительных реакций в атмосфере [Preunkert et al., 2001a; Ullerstam et al., 2002]. Кроме того, средняя концентрация сульфатов (без учета пыли Сахары), согласно анализу ледникового керна Коль дю Дом за период с 1982 по 1991 гг., может составлять от 200 ppb зимой до 740 ppb летом [Preunkert et al., 2000]. Отметим, что филотип, родственный анаэробной психрофильной бактерии рода *Clostridium*, способный благодаря спорообразованию выживать в снежном покрове, по-видимому, не способен к развитию в снеге из-за присутствия большого количества кислорода и явного отсутствия анаэробных микрониш. Таким образом, три из четырех вышеуказанных филотипов, могут рассматриваться как наиболее вероятные кандидаты на формирование микрофлоры снежного покрова ледника Монблан, занесенные с пылью Сахары или локального окружения ледника.

Что касается остальных десяти “холодолобивых” филотипов, то по типу метаболизма и отношению к температуре они были представлены в основном хемоорганотрофными и фотолитотрофными микроорганизмами, способными развиваться как обычные мезофильные или психротолерантные виды. Однако, в некоторых случаях (сходство по нуклеотидной последовательности с ближайшим штаммом менее 98%) нельзя было сделать каких-либо предположений о возможном характере жизнедеятельности бактерий. В данном случае отнесение их к микроорганизмам, имеющим потенциал к развитию в условиях снежного покрова ледника Монблан, основано большей частью на родстве с микроорганизмами из холодных местообитаний. Однако, известно, что адаптация к росту при низких температурах проявляется у разных групп микроорганизмов независимо от их филогенетического родства. Поэтому, в пределах одного рода могут обнаруживаться бактерии как с психрофильным, так и мезофильным типами роста. Отметим также, что мезофилы, обнаруженные в образцах с пылью Сахары, должны обладать достаточно широкой нормой выраженности признака (фенотипа) в отношении температуры как представители микрофлоры пустынь, так как им

приходится существовать в условиях большой разницы как сезонных температур (50 °C летом и ниже 0 °C зимой) так и дневных температур (от -0,5 °C до 37,5 °C) [Cloudsley-Thompson, 1984]. Поэтому “пустынные” мезофиллы могут оказаться приспособленными переживать отрицательные температуры снежного покрова.

Во время нахождения в снеге почвенная пыль подвергается эрозии, что приводит к обогащению химического состава снега органическими и неорганическими компонентами [Maupetit et al., 1995], которые в свою очередь могут обеспечивать микроорганизмы источниками углерода и энергии. Кроме того, перенос пыли Сахары способствует появлению щелочного снега в Альпах и созданию, таким образом, благоприятного pH для развития таких алкалофильных микроорганизмов, как большинство цианобактерий. Цианобактерии благодаря фотолитотрофному способу получения энергии играют важную роль как первичные продуценты во многих экстремальных олиготрофных, в том числе холодных местообитаниях [Vincent, 2007], и были обнаружены в снежном покрове тибетского высокогорья и в Антарктических оазисах [Liu et al., 2009a; Fujii et al., 2010]. Представители *Cyanobacteria* составляют также значительную часть микробного сообщества альпийских почв и скальных пород в Швейцарских Альпах [Sigler et al., 2003]. В нашем исследовании в снежном покрове с пылью Сахары и без пыли Сахары по анализу двух типов библиотек обнаружено пять фило типов (MB5-20, MS7r-17, 5f-12, 5f-17 и 5fr-19), принадлежащих цианобактериям родов *Stigonema*, *Anabaena*, *Phormidium* и *Chamaesiphon*. Из них единственный фило тип - MS7r-17, который, по-видимому, может иметь прямое отношение к колонизации снежного покрова ледника Монблан, был обнаружен в снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, по анализу рРНК (V3-V5 библиотека - MS7r). Все 5 клонов этого фило типа показали 96,6% сходства с цианобактерией *Stigonema ocellatum*, выделенной ранее в культуру в ходе исследования антарктических озер [Taton et al., 2006]. Поскольку данный фило тип не был обнаружен в рДНК-основанной библиотеке (MS7) того же самого образца с использованием тех же самых праймеров, то его доминирование в библиотеке MS7r может быть связано с размножением данной бактерии в снежном покрове при минусовой температуре (фактически накопительная культура). Возможность развития четырех других цианобактериальных фило типов в снежном покрове ледника Монблан может быть аргументирована: 1) наличием близкородственных бактерий в холодных местообитаний; 2) фотоавтотрофным способом питания; 3) в случае фило типов MB5-20 и 5f-12 – их доминированием в составе “сообществ”; 4) в случае фило типов 5f-17 и 5fr-19 – неповрежденностью ДНК (возможность амплификации полноразмерных копий гена 16S рРНК). С учетом всего вышеизложенного, выявленные цианобактериальные фило типы имеют потенциал к развитию в снежном покрове ледника Монблан. Из них наиболее

вероятным кандидатом в колонизаторы снежного покрова ледника, обнаруженным по анализу 16S рРНК, является представитель рода *Stigonema*.

Подводя итоги, следует отметить, что в результате проведенного молекулярно-филогенетического анализа микробного разнообразия снежного покрова ледника Монблан с пылью и без пыли Сахары путем амплификации полноразмерного гена 16S рРНК и его V3-V5 области удалось выявить некоторые бактериальные флотипы, имеющие потенциал к развитию в условиях снежного покрова ледника Монблан. Данные флотипы показали родство с культивируемыми и некультивируемыми бактериями из различных холодных местообитаний, в том числе из снежного покрова полярных и высокогорных ледников, что может говорить об их космополитном распространении в сходных по экстремальным условиям экологических нишах. Однако, стоит отметить, что некоторые из флотипов, обнаруженные в снежном покрове с пылью Сахары, могли быть также захвачены по ходу переноса пыли в атмосфере.

Как правило, экосистемы природных экстремальных местообитаний с широко варьирующими факторами среды заселяются не столько высокоспециализированными формами, сколько организмами с широкой нормой выраженности признака [Нетрусов и др., 2004]. В данном исследовании показано, что “холодолобивые” флотипы, обнаруженные в образцах снега Монблана с пылью Сахары, родственны бактериям с различным типом метаболизма (фотолитотрофы и хемоорганотрофы, из которых один способен к хемолитоавтотрофии) и отношением к температуре (мезофильные и психротолерантные). Из них непосредственно к психрофильным/психротолерантным бактериям, были отнесены флотипы, родственные (98% и выше) *Massilia*, *Phormidium* и *Tumebacillus*. В свою очередь в образце снега, не содержащем пыль Сахары, нами было обнаружено только два “холодолобивых” флотипа, родственных бактериям, специализированным к жизни при отрицательной температуре (психрофил и психротроф) и ранее найденным в холодных озерах. Данный факт, основанный, правда, на одном лишь образце, может свидетельствовать в пользу локального происхождения этих бактерий, которые вероятно живут в альпийских озерах. Кроме того, трудно сделать какие-либо выводы о соотношении количества “холодолобивых” флотипов, выявленных в снеге с пылью и без пыли Сахары, в связи с анализом только одного образца снега, не содержащего пыль Сахары. Попытки селективного выделения “холодолобивых” радиорезистентных флотипов в культуру с целью изучения морфофизиологического ответа на воздействие экстремальных факторов среды в условиях ледника Монблана закончились неудачей [Chuvochina et al., 2011].

На сегодняшний день роль микроорганизмов, развивающихся в снежном покрове ледников, в глобальных циклах элементов (углерода, азота, серы, фосфора) практически не

изучена. Согласно характеру метаболизма ближайших штаммов ($\geq 98\%$ сходства) “холодолюбивых” фило типов, выявленных в нашем исследовании, можно предположить участие бактерий снежного покрова Монблан в циклах таких элементов как углерод и сера. Развитие фотосинтезирующих цианобактерий в снеге делает возможным последующее формирование популяций хемоорганотрофных микроорганизмов. В свою очередь присутствие пыли Сахары способствует обогащению химического состава снега ионами NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} и Ca^{2+} , а также соединениями углерода, серы, фосфора и аммония [Preunkert et al., 2000].

Индикацией возможной активной жизнедеятельности “холодолюбивых” фило типов в случае полноразмерных библиотек является принадлежность выявленных фило типов к психротолерантным и психрофильным организмам. В случае V3-V5 библиотек статус “активной жизнедеятельности” представляется наиболее вероятным для доминантных фило типов и фило типа, родственного цианобактерии *Stigonema ocellatum* и выявленного в рРНК-основанной библиотеке. Кроме того, согласно анализу библиотек двух типов, как доминантные, так и минорные фило типы, обнаруженные в образцах снега с пылью Сахары и в самом снежном покрове ледника Монблан и относящиеся к четырем разделам (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Cyanobacteria*), могут иметь отношение к колонизации снежного покрова. В любом случае только прямые методы обнаружения метаболической активности *in situ* и количественный учет прироста биомассы позволят сделать более определенные выводы.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The main goal of this thesis was to gain insight into uncultured bacterial diversity in the snowpack of the Mont Blanc (MtBl) glacier containing Saharan dust of different deposition time and preservation period in snow. To this end, we studied bacterial diversity: 1) in the MtBl snow samples containing Saharan dust of four dust events over the period 2006 – 2009, 2) in MtBl snow samples containing no Saharan dust using both DNA and RNA approaches, 3) in the Saharan dust depositions of the same dust event collected at low and high altitudes, 4) in the Saharan sand collected in Tunisia. Furthermore, we compared the data obtained on bacterial diversity among all above samples and evaluated the contribution of the airborne bacteria associated with Saharan dust to the formation of snow microbiota under conditions of the MtBl glacier. In addition, we evaluated the efficiency of two different PCR primers, generating partial (V3-V5) and nearly full-length 16S rRNA gene sequences, for estimation of bacterial richness, diversity and composition. As a result, these investigations have led to the following conclusions:

1. Bacterial diversity in alpine snow on a Mont Blanc glacier was described using 16S rRNA gene sequencing (V3-V5 and full-length gene sizes) by the example of snow containing Saharan dust depositions over the period 2006 - 2009. For the first time, it has been shown that species content and dominant phylotypes and their assigning to major divisions varied significantly in snow containing dust depositions over a 3-year. This is probably defined more by conditions of dust transport than bacterial load from the original dust source. Out of 90 phylotypes revealed, dominant phylotypes are belonged to *Actinobacteria*, *Proteobactreia*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Bacteroidetes* and *Cyanobacteria*.

2. Dominant as well as minor bacterial phylotypes recognized in snow samples can be viewed as potential colonizers of Alpine glaciers. For snow containing Saharan dust, these icy phylotypes were found belonging to *Crossiella*, *Pseudoclavibacter*, *Modestobacter*, *Devosia*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Clostridium*, *Tumebacillus*, *Phormidium*, *Chamaesiphon* and *Anabaena*. Icy phylotypes in snow containing no Saharan dust belonged to *Clostridium* and *Stigonema*. Data on the closest strain physiology of recognized icy phylotypes suggests that representatives of genera *Massilia*, *Tumebacillus*, *Phormidium* and *Stigonema* are most relevant findings in terms of propagation in snow.

3. The *Stigonema*-like cyanobacterium is suggested to be active in snow at subzero temperature, reasoning from the analysis of 16S rRNA derived from the “clean” snow containing no Saharan dust.

4. Out of all identified phylotypes, 10% were categorized as HA-phylotypes based on their con-specificity ($\geq 98\%$ similarity) with normal (non-pathogenic) human microbiome representatives. Furthermore, 11% out of all phylotypes showed less than 90% similarity with known taxa, thus, presenting novel taxa.

5. Sequencing of both partial (V3-V5) and full-length 16S rRNA genes permitted to describe microbial diversity more fully and get more detailed picture due to different primer degeneracy and structure.

In summary, the results of this study contribute to the conception of microbiota formation and function in alpine snow. Dust transport from arid areas such as the Saharan desert appears to play an important role in alpine snow ecosystem by serving not only as a source of nutrients but also a vehicle for diverse bacteria, which could thrive on or within snow. The differences in bacterial diversity among four Saharan dust depositions in alpine snow over the period 2006 – 2009 indicate that dust events of the same clay types and in rather short time periods, can bring to the Alpine glaciers completely different taxa. Results from the comparative study of bacterial diversity between snow samples containing dust and “clean” snow could help to understand the importance of the dust source in microbiota formation in snow.

Still, it remains problematic whether the conditions of dust transport or the dust sources play the main role in regulating the bacterial diversity in alpine snow. Thus, further investigation could be useful in order to retrieve sufficient information to make ecological inferences. This should include the larger number of snow samples containing Saharan dust from known sources, soil samples representing these sources and snow samples containing no Saharan dust. The data on meteorological conditions experienced during the dust transport, as well as a description of pathways will also be required for each of the events.

Other interesting perspectives could further increase the knowledge presented in this thesis: 1) Study of bacterial diversity in alpine snow in presence and absence of Saharan dust using high-throughput sequencing and metagenomics, 2) Study of cultured bacterial diversity in alpine snow in presence and absence of Saharan dust (at least by three samples for each case), 3) Study of spatial and temporal bacterial diversity in snow associated with Saharan dust depositions of long preservation period, 4) Deeper analysis of active bacteria in snow using direct RNA extraction from the fresh snow samples, metatranscriptomic or isotope probing, 5) Analysis of microbiological records in MtBl ice core containing Saharan dust depositions.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность существования микроорганизмов в условиях снежного покрова горных ледников определяется главным образом, тремя факторами: температурой и связанным с нею наличием доступной воды, присутствием основных неорганических ионов и (растворимого) органического углерода. В условиях ледника Монблан на высоте 4250 м над у.м., где среднегодовая температура окружающего воздуха составляет около -11°C , в летний сезон отмечается поднятие температуры до 0°C и наблюдается поверхностное таяние снега [Vincent et al., 2007]. Известно, что при температуре -10°C и давлении 1 атм., пленка квазижидкого слоя воды вокруг снежных зерен достигает 1 нм [Anderson, 1967], и толщина ее зависит от химического состава снега. Способствовать появлению не только жидкой воды и питательных веществ, но и микробных клеток в снеге Монблана могут периодические события переноса пыли из Сахары, а также возможно из локального окружения.

Оценку микробного разнообразия снежного покрова ледника Монблан с пылью Сахары проводили молекулярно-биологическим методом, основанном на секвенировании разных областей гена 16S рРНК: вариабельной области V3-V5 и полноразмерного гена. Предварительный скрининг биоразнообразия осуществляли рестрикционным анализом ПЦР-ампликонов.

В результате исследования показано, что видовой состав и доминантные группы (разделы) микроорганизмов, обнаруженные в снежном покрове ледника Монблан с пылью Сахары, существенно различаются для разновременных событий переноса пыли (2006, 2008 и 2009 гг.). Вариабельность в составе бактериальных видов, переносимых с пылью из Северной Африки, по-видимому, связана не столько с источниками происхождения пыли, сколько с особыми условиями при переносе пыли в атмосфере.

Согласно молекулярно-филогенетическому анализу клоновых библиотек двух типов (V3-V5 и полноразмерных) доминантные флотипы, обнаруженные в снежном покрове с пылью Сахары вследствие трех событий переноса пыли в 2006, 2008 и 2009 гг., относятся к филогенетическим разделам: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria*. Наибольшее сходство по составу доминантных флотипов в библиотеках двух типов обнаружено для снежного покрова с пылью Сахары от события переноса 2006 г. Это может являться следствием как хорошей репрезентативности обеих клоновых библиотек, так и селективным размножением (выявленные доминантные флотипы) микроорганизмов в снеге в течение трех месяцев с момента осаждения пыли. Характерной чертой микробного разнообразия, выявленного путем создания V3-V5 библиотек, было практически повсеместное присутствие флотипов семейства

Geodermatophilaceae, а в случае полноразмерных библиотек – *Bacillaceae*. Подобный результат может быть связан как с избирательной амплификацией данных таксонов той или иной праймерной комбинацией, так и степенью селективной деградации ДНК полноразмерного гена во время переноса пыли в атмосфере. Известно, что представители *Bacillaceae* выделяются из прочих благодаря спорообразованию и связанной с этим стабильностью геномной ДНК по отношению к различным экстремальным факторам [Setlow, 1995]. Независимая оценка микробного разнообразия с использованием клоновых библиотек двух типов позволила полнее охарактеризовать исследуемые природные образцы и подтвердить принципиальное различие состава микроорганизмов снежного покрова ледника Монблан, содержащего пыль Сахары от трех событий переноса пыли. Включение в анализ дополнительного четвертого образца снега с пылью Сахары от события переноса в июне 2008 г., показало, что разнообразие микроорганизмов в снеге с пылью Сахары одного минерального типа при ее переносе на ледник с интервалом событий даже в пределах месяца значительно отличается как на видовом уровне, так и на уровне разделов.

На примере сравнения микробного разнообразия пыли Сахары, осаждаемой на разных высотах (4250 м и 200 м над у.м.), показало принципиальное различие таксономического состава переносимых микроорганизмов. Данный факт предположительно обусловлен избирательной ассоциацией бактерий с частицами пыли разного размера и вкладом условий переноса пыли: осаждение одних и захват других видов микроорганизмов.

Сравнение микробного разнообразия всех образцов, содержащих пыль Сахары, с образцом песчанной пустынной почвы Сахары, собранной в Тунисе, показало незначительное сходство на уровне филотипов. Данное наблюдение, по-видимому, связано как с недооценкой почвенного разнообразия (неполное покрытие библиотеки) пустынной почвы Сахары, так и с тем, что важен не столько источник пыли, сколько условия пути и время ее переноса в атмосфере.

Сходным образом проанализировали разнообразие микроорганизмов снежного покрова ледника Монблан, не содержащего пыль Сахары. При этом дополнительно исследовали 16S рРНК транскрипты путем проведения ПЦР с обратной транскрипцией с теми же праймерами, что использовали для ДНК-библиотек. В результате разнообразие выявленных микроорганизмов оказалось иным по составу филотипов (доминировали филоотипы *Actinobacteria* и *Proteobacteria*) и значительно ниже в сравнении со снегом, содержащим пыль Сахары.

Основываясь на сходстве нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК выявленных филоотипов с известными таксонами (в пределах вида – 98% и выше) в работе была сделана попытка выявить филоотипы, которые могут участвовать в формировании

микрофлоры снежного покрова ледника Монблан. Показано, что в снежном покрове с пылью Сахары в сравнении со снегом, не содержащим пыль Сахары, присутствует значительно больше “холодолобивых” филотипов. В первом случае это рода *Crossiella*, *Pseudoclavibacter*, *Modestobacter*, *Devosia*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Clostridium*, *Tumebacillus*, *Phormidium*, *Chamaesiphon* и *Anabaena*, а во втором – *Clostridium* и *Stigonema*, хотя во втором случае исследован был лишь один образец снега. Отметим, что все выявленные “холодолобивые” филотипы оказались родственны бактериям, как выделенным в культуры, так и некультивируемым клонам из различных холодных местообитаний, в том числе из снежного покрова горных и полярных ледников. Доминирование филотипа, родственного цианобактерии рода *Stigonema* в РНК-библиотеке клонов, полученной из образца снега, не содержащего пыль Сахары, возможно, свидетельствует о метаболической активности и размножении данной бактерии при отрицательной температуре.

В связи с известной радикальной недооценкой культивируемого разнообразия прокариот и ограниченности базы данных некультивируемых микроорганизмов (последовательностей генов 16S рРНК) в нашем исследовании были выявлены так называемые неидентифицированные филотипы, показавшие менее 90% сходства с известными таксонами в Genbank. Филогенетический анализ позволил приписать большую часть данных филотипов к известным филогенетическим разделам или переопределить их таксономическую принадлежность.

Известно, что при анализе микробного состава пыли Сахары часто обнаруживаются условно-патогенные микроорганизмы. В нашем исследовании были найдены филотипы (НА), родственные лишь микроорганизмам нормальной микрофлоры человека. Так, согласно анализу V3-V5 и полноразмерных библиотек гена 16S рРНК, 15 НА-филотипов было идентифицировано в образцах с пылью Сахары и 3 НА-филотипа в образце снега, не содержащего пыль Сахары.

Таким образом, результаты данного исследования, вносят вклад в понимание формирования микрофлоры снежного покрова высокогорных ледников и важность участия в этом процессе таких явлений, как воздушный перенос пыли из аридных областей, самым крупным источником которых является пустыня Сахара. Для подтверждения выводов, сделанных на основе анализа дополнительных образцов снега, необходимо проведение более детального исследования с увеличением числа проб и выборок клоновых библиотек. В плане дальнейших исследований особый интерес представляет изучение пространственного распределения и активности *in situ* как отдельных бактериальных филотипов (кандидатов на колонизацию снежного покрова), так и, в целом, микробных сообществ вдоль средового градиента, в данном случае с глубиной снежного покрова.

ВЫВОДЫ

1. Методом молекулярно-филогенетического анализа путем секвенирования генов 16S рРНК описано бактериальное разнообразие снежного покрова высокогорного ледника Монблан, содержащего пыль Сахары, на примере 4-х событий переноса пыли (2006, 2008 и 2009 гг.). Впервые показано, что видовой состав и доминантные группы микроорганизмов существенно различаются между образцами снега. Причиной этого может являться не столько источник происхождения пыли, сколько условия ее переноса ветром из Северной Африки. Из 90 выявленных филотипов преобладали представители филогенетических разделов *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*.

2. Среди доминантных и минорных филотипов различной таксономической принадлежности выявлены кандидаты на колонизацию снежного покрова высокогорных ледников. “Холодололюбивые” филотипы в образцах снега с пылью Сахары включали рода *Crossiella*, *Pseudoclavibacter*, *Modestobacter*, *Devosia*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Clostridium*, *Tumebacillus*, *Phormidium*, *Chamaesiphon* и *Anabaena*. В снежном покрове, не содержащем пыль Сахары, к “холодололюбивым” были отнесены представители родов *Clostridium* и *Stigonema*. Наиболее вероятными микроорганизмами, способными к размножению в снеге, следует считать представителей родов *Massilia*, *Tumebacillus*, *Phormidium* и *Stigonema*.

3. Анализом 16S рРНК была обнаружена цианобактерия рода *Stigonema*, для которой предполагается метаболическая активность при отрицательной температуре.

4. Установлено, что 10% от всех выявленных филотипов были родственны представителям нормальной микрофлоры человека, и 11% оказались новыми таксонами, показав отдаленное сходство ($\leq 90\%$) с известными таксонами.

5. Применение двух праймерных систем, амплифицирующих в ПЦР полноразмерный ген 16S рРНК и его V3-V5 область, позволяет полнее охарактеризовать микробное разнообразие за счет различий в структуре и вырожденности праймеров.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абызов С.С., Бобин Н.Е., Кудряшов Б.Б. Микробиологические исследования ледниковой толщи центральной Антарктиды // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. – 1979. – № 6. – С. 828-836.
2. Аверьянов В.Г. Гляциоклиматология Антарктиды. – Л.: Гидрометеиздат, 1990. – 200 с.
3. Атмосфера. Справочник / под ред. Седунова Ю.С и др. – Л.: Гидрометеиздат, 1991. – 502 с.
4. Барков Н.И., Липенков В.Я. Накопление снега в районе станции Восток, Антарктида, в 1970–1992 гг. // Материалы гляциол. исслед. – М., 1996. – Вып. 80. – С. 87–88.
5. Богородский В.В., Гаврило В.П. Лед. Физические свойства. Современные методы гляциологии. – Л.: Гидрометеиздат, 1980. – 383 с.
6. Булат С.А., Алехина И.А., Липенков В.Я., Лукин В.В., Мари Д., Пети Ж.Р. Клеточные концентрации микроорганизмов в атмосферном и озерном льду керна Восток, Восточная Антарктида // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 6. – С. 850-852.
7. География и мониторинг биоразнообразия (серия учебных пособий «Сохранение биоразнообразия») / колл. авторов. – М.: Изд-во Научного и учебно-методического центра, 2002. – 432 с.
8. Гляциологический словарь / под ред. Котлякова В.М. – Л.: Гидрометеиздат, 1984. – 528 с.
9. Дашко Н.А. Курс лекций по синоптической метеорологии. – В: ДВГУ. – 2005.
10. Диких А.Н. Атмосферная циркуляция и химическое загрязнение ледников Тянь-Шаня // Метеорология и гидрология в Кыргызстане. – Бишкек, 2002. – Вып. 2. – С.126-133.
11. Екайкин А.А. Метеорологический режим Центральной Антарктиды и его роль в формировании изотопного состава снежной толщи: Дис. ... канд. геогр. наук. Санкт-Петербург. 2003. – 170 с.
12. Залепухин В.В. Теоретические аспекты биоразнообразия: Учебное пособие. — Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2003. — 192 с.
13. Котляков В.М. Мир снега и льда. – М.: Наука, 1994. – 285 с.
14. Котляков В.М. Снег и лед в природе Земли. – М.: Наука, 1986. – 155 с.
15. Монин А.С. Введение в теорию климата. – Л.: Гидрометеиздат, 1982. – 248 с.
16. Нетрусов А.И. и др. / под ред. Нетрусова А.И. Экология микроорганизмов. – М.: Академия, 2004. – 272 с.

17. Пиневи́ч А.В. Микробиология. Биология прокариот: Учебник. В 3 т. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2007. – 2-е изд. – Т. 1. – 352с.
18. Снег. Справочник / под ред. Д.М.Грея, Д.Х.Мейла (перевод Д.Я.Иоффе, С.И.Ушакова). – Л.: Гидрометеиздат, 1986. – 751 с.
19. Способ деконтаминации образцов водного льда для биологических исследований: Заявка на изобретение 2008105836/13(006326) Рос. Федерация / Булат С.А., Алехина И.А. – приоритет 15.02.2008.
20. Справочник по климату Антарктиды. – Л.: Гидрометеиздат, 1977. – Т. 2. – 493 с.
21. Терещенко В.Г., Терещенко Л.И., Сметанин М.М. Оценка различных индексов для выражения биологического разнообразия сообщества // Биоразнообразие: Степень таксономической изученности. М.: Наука. – 1994. – С. 86-98.
22. Чувочина М.С., Алехина И.А., Норманн Ф., Пети Ж-Р., Булат С.А. Три события транспорта пыли из пустыни Сахара на ледник Монблан ассоциированы с разными бактериальными флотипами-колонизаторами снежного покрова // Микробиология. – 2011. – Т. 80, № 1. – С. 129–135.
23. Adams B.J., Bardgett R.D., Ayres E., Wall D.H., Aislabie J., Bamforth S., Bargagli R., Cary C., Cavacini P., Connell L., Convey P., Fell J. W., Frati F., Hogg I.D., Newsham K.K., O'Donnell A., Russell N., Seppelt R.D., Stevens M.I. Diversity and distribution of Victoria Land biota // Soil Biol. Biochem. – 2006. – Vol. 38, № 10. – P. 3003–3018.
24. Adams J.W., Rodriguez D., Cox R.A. The uptake of SO₂ on Saharan dust: a flow tube study // Atmos. Chem. Phys. – 2005. – Vol. 5, № 3. – P. 2679–2689.
25. Afeti G.M., Resch F.J. Physical characteristics of Saharan dust near the Gulf of Guinea // Atmos. Environ. – 2000. – Vol. 34. – P. 1273–1279.
26. Aislabie J.M., Chhour K., Saul D.J., Miyauchi S., Ayton J., Paetzold R.F., Balks M.R. Dominant Bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica // Soil Biol. Biochem. – 2006. – Vol.38, № 10. – P. 3041–3056.
27. Alekhina I.A., Marie D., Petit J.R., Lukin V.V., Zubkov V.M., Bulat S.A. Molecular analysis of bacterial diversity in kerosene-based drilling fluid from the deep ice borehole at Vostok, East Antarctica // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – Vol. 59, № 2. – P. 289-299.
28. Alfreider A., Pernthaler J., Amann R., Sattler B., Glockner F., Wille A., Psenner R. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62, № 6. – P. 2138-2144.

29. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* – 1995. – Vol. 59. – P. 143–169.
30. Amato P., Hennebelle R., Magand O., Sancelme M., Delort A.-M., Barbante C., Boutron C., Ferrari C. Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2007b. – Vol. 59, № 2. – P. 255-264.
31. Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A.M. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dome: major groups and growth abilities at low temperatures // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2007a. – Vol. 59, № 2. – P. 242-254.
32. Amoroso A., Domine F., Esposito G., Morin S., Savarino J., Nardino M., Montagnoli M., Bonneville J.-M., Clement J.-C., Ianniello A., Beine H. J. Microorganisms in dry polar snow are involved in the exchanges of reactive nitrogen species with the atmosphere // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 44, № 2. – P. 714-719.
33. Anderson D.M. Ice nucleation and the substrate-ice interface // *Nature.* – 1967. – Vol. 216, № 5115. – P. 563–566.
34. Avila A., Queralt I., Gallart F., Martin-Vide J. African dust over northeastern Spain: mineralogy and source regions // *The impact of desert dust across the Mediterranean.* / Edited by Guerzoni S., Chester R. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. – P. 201–205.
35. Avila A., Queralt-Mitjans I., Alarcon, M. Mineralogical composition of African dust delivered by red rains over northeastern Spain // *J. Geophys. Res.* – 1997. – Vol. 102, № D18. – P. 21977–21996.
36. Babalola O.O., Kirby B.M., Le Roes-Hill M., Cook A.E., Cary S.C., Burton S.G., Cowan D.A. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils // *Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 566-576.
37. Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E., Tillequin, F.O. Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94 // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 34, № 5. – P. 403-412.
38. Bagnold R.A. The physics of blown sand and desert dunes. – London: Methuen, 1941. – 265 p.
39. Baker V.R. Water and the Martian landscape // *Nature.* – 2001. – Vol. 412. – P. 228-236.

40. Bakermans C. Limits for Microbial Life at Subzero Temperatures // Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. / Edited by R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx and Gerday C. – Berlin Heidelberg: Springer, 2008. – P. 17-28.
41. Barak I., Ricca E., Cutting S.M. From fundamental studies of sporulation to applied spore research // Mol. Microbiol. – 2005. – Vol. 55, № 2. – P. 330–338.
42. Battin T., Wille A., Sattler B., Psenner R. Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, № 2. – P. 799-807.
43. Belova S.E., Pankratov T.A., Detkova E.N., Kaparullina E.N., Dedysh S.N. *Acidisoma tundrae* gen. nov., sp. nov. and *Acidisoma sibiricum* sp. nov., two acidophilic, psychrotolerant members of the *Alphaproteobacteria* from acidic northern wetlands // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – Vol. 59, № 9. – P. 2283-2290.
44. Benzerara K., Chapon V., Moreira D., Lopez-Garcia P., Guyot F., Heulin, T. Microbial diversity on the Tatahouine meteorite // Meteorit. Planet. Sci. – 2006. – Vol. 41, № 8. – P. 1249-1265.
45. Bergametti G., Gomes L., Remoudaki E., Desbois M., Martin D., Buat-Ménard P. Present transport and deposition patterns of African dusts to the north-western Mediterranean // Palaeoclimatology and palaeometeorology: modern and past patterns of global atmospheric transport. / Edited by Leinen M. and Sarnthein M. – Kluwer Academic Publishers, 1989. – P. 227-252.
46. Bhatia M., Sharp M., Foght J. Distinct bacterial communities exist beneath a high arctic polythermal glacier // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 9. – P. 5838–5845.
47. Bhatnagar A., Bhatnagar M. Microbial diversity in desert ecosystems // Curr. Sci. – 2005. – Vol. 89, № 1. – P. 91-100.
48. Blanco A., F. De Tomasi, Filippo E., Manno D., Perrone M. R., Serra A., Tafuro A. M., Tepore A. Characterization of African dust over southern Italy // Atmos. Chem. Phys. Disc. – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 4633-4670.
49. Blumthaler M., Ambach W., Rehwald W. Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at two Alpine stations at different altitudes // Theor. Appl. Climatol. – 1992. – Vol. 46, № 1. – P. 39-44.
50. Bock C., Eicken H. A magnetic resonance study of temperature-dependent microstructural evolution and self-diffusion of water in Arctic first-year sea ice // Ann. Glaciol. – 2005. – Vol. 40. – P. 179–184.

51. Bonnet S., Guieu C., Chiaverini J., Ras J., Stock A. Effect of atmospheric nutrients on the autotrophic communities in a low nutrient, low chlorophyll system // *Limnol. Oceanogr.* – 2005. – Vol. 50, № 6. – P. 1810–1819.
52. Bory A.J.M., Biscaye P.E., Svensson A., Grousset F.E. Seasonal variability in the origin of recent atmospheric mineral dust at NorthGRIP, Greenland, Earth Planet // *Sci. Lett.* – 2002. – Vol. 196. – P. 123–134.
53. Bory A.J.M., Biscaye P.E., Grousset F.E. Two distinct seasonal Asian source regions for mineral dust deposited in Greenland (NorthGRIP) // *Geophys. Res. Lett.* – 2003. – Vol. 30, № 4. – P. 1167.
54. Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil // *Microbiol. Res.* – 2006. – Vol. 161, № 4. – P. 288-298.
55. Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – Vol. 103, № 1. – P. 228-236.
56. Braun-Fahrlander C., Riedler J., Herz U., Eder W., Waser M., Grize L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufer, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., von Mutius, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347. – P. 869–877.
57. Brinkmeyer R., Knittel K., Jurgens J., Weyland H., Amann R., Helmke E. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, № 11. – P. 6610–6619.
58. Brodie E.L., DeSantis T.Z., Parker J.P., Zubietta I.X., Piceno Y.M., Andersen G.L. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – Vol. 104, № 1. – P. 299-304.
59. Brust J., Waniek J.J. Atmospheric dust contribution to deep-sea particle fluxes in the subtropical Northeast Atlantic // *Deep-Sea Res. PT. I.* – 2010. – Vol. 57. – P. 988-998.
60. Bulat S.A., Alekhina I.A., Blot M., Petit JR., De Angelis M., Wagenbach D., Lipenkov V. Ya., Vasilyeva L.P., Wloch D.M., Raynaud D., Lukin V.V. DNA signature of thermophilic bacteria from the aged accretion ice of Lake Vostok, Antarctica: implications for searching for life in extreme icy environments // *Int. J. Astrobiology.* – 2004. – Vol. 3, № 1. – P. 1–12.
61. Cabezudo B., Recio M., Sánchez-Laulhé J., Trigo M.D.M., Toro F.J., Polvorinos, F. Atmospheric transportation of marihuana pollen from North Africa to the Southwest of Europe // *Atmos. Environ.* – 1997. – Vol. 31. – P. 3323-3328.

62. Callegan R.P., Nobre M.F., McTernan P.M., Battista J.R., Navarro-Gonzalez R., McKay C.P., da Costa M.S., Rainey F.A. Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58, № 5. – P. 1252-1258.
63. Caquineau S., Gaudichet A., Gomes L., Legrand M. Mineralogy of Saharan dust transported over northwestern tropical Atlantic Ocean in relation to source regions // J. Geophys. Res. – 2002. – Vol. 107, № D15. – P. 4251-4263.
64. Caquineau S., Gaudichet A., Gomes L., Magonthier M-C., Chatenet B. Saharan dust:clay ratio as a relevant tracer to assess the origin of soil-derived aerosols // Geophys. Res. Lett. – 1998. – Vol. 25. – P. 983–986.
65. Carpenter E.J., Lin, S., Capone D.G. Bacterial activity in South Pole snow // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, № 10. – P. 4514-4517.
66. Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R. Low-temperature extremophiles and their applications // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – Vol. 13. – P. 253-261.
67. Certini G., Campbell C.D., Edwards A.C. Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth // Soil Biol. Biochem. – 2004. – Vol. 36. – P. 1119-1128.
68. Chadwick O.A., Derry L.A., Vitousek P.M., Huebert B.J., Hedin L.O. Changing sources of nutrients during four million years of ecosystem development // Nature. – 1999. – Vol. 397. – P. 491–497.
69. Chanal A., Chapon V., Benzerara K., Barakat M., Christen R., Achouak W., Barras F., Heulin T. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8, № 3. – P. 514-525.
70. Chang C. C., Lee I. M., Tsai S. S., Yang C. Y. Correlation of Asian dust storm events with daily clinic visits for allergic rhinitis in Taipei, Taiwan // J. Toxicol. Environ. Health. – 2006. – Vol. 69. – P. 229–235.
71. Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population // Scand. J. Statist. – 1984. – Vol. 11. – P. 265-270.
72. Cheng S.M., Foght J.M. Cultivation-independent and -dependent characterization of Bacteria resident beneath John Evans Glacier // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – Vol. 59, № 2. – P. 318-330.
73. Chester R., Sharples E.J., Sanders G.S., Saydam A.C. Saharan dust incursion over the Tyrrhenian Sea // Atmos. Environ. – 1984. – Vol. 18. – P. 929–935.

74. Chester R., Elderfield H., Griffin J.J., Johnson L.R., Padgham R.C. Eolian dust along the eastern margins of the Atlantic ocean // *Marine Geology*. – 1972. – Vol. 13. – P. 91-105.
75. Chiapello I., Bergametti G., Cautenet B., Bousquet P., Dulac F., Santos Soares E. Origins of African dust transported over the northeastern tropical Atlantic // *J. Geophys. Res.* – 1997. – Vol. 102, № 13. – P. 701–709.
76. Choi D.-S., Park Y.-K., Oh S.-K., Yoon H.-J., Kim J., Seo W.-J., Cha S.-H. Distribution of airborne microorganisms in yellow sands of Korea // *J. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 1–9.
77. Christner B.C. Recovery of bacteria from glacial and subglacial environments. – Thesis, Ohio State University. – Columbus, Ohio, 2002.
78. Christner B.C., Kvitko B.H., Reeve J.N. Molecular identification of Bacteria and Eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole // *Extremophiles*. – 2003. – Vol. 7, № 3. – P. 177–183.
79. Chuvochina M.S., Marie D., Chevaillier S., Petit J.R., Normand P., Petit J.R., Alekhina I.A., Bulat S.A. Community variability of bacteria in alpine snow (Mont Blanc) containing Saharan dust deposition and their snow colonisation potential // *Microbes Environ.* – 2011. – Vol. 26, № 3. – P. 237-247.
80. Chyba C.F., Phillips C.B. Europa as an abode of life // *Orig. Life Evol. Biosph.* – 2002. – Vol. 32. – P. 47-68.
81. Clarke A., Johnston N.M., Murphy E.J., Rogers A.D. Introduction. Antarctic ecology from genes to ecosystems: the impact of climate change and the importance of scale // *Philos. T. Roy. Soc. B.* – 2007. – Vol. 362. – P. 5-9.
82. Cloudsley-Thompson J.L. Sahara Desert. – 1st ed. – Oxford: Perhamon Press, 1984. – 384 p.
83. Cockell C., Rettberg P., Horneck G., Scherer K., Stokes D. Measurements of microbial protection from ultraviolet radiation in polar terrestrial microhabitats // *Polar Biol.* – 2003. – Vol. 26, № 1. – P. 62-69.
84. Collaud M. Coen, Weingartner E., Schaub D., Hueglin C., Corrigan C., Henning S., Schwikowski M., Baltensperger U. Saharan dust events at the Jungfraujoeh: detection by wavelength dependence of the single scattering albedo and first climatology analysis // *Atmos. Chem. Phys.* – 2004. – Vol. 4. – P. 2465–2480.
85. Colwell R.K., Jonathan A., Coddington. Estimating Terrestrial Biodiversity through Extrapolation // *Philos. Tran. R. Soc. Lond. B.* – 1994. – Vol. 345, № 1311. – P. 101-118.
86. Colwell R.R., Bryton P. R., Grimes D.J. et.al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for the release of genetically engineered microorganisms // *Bio. Technol.* – 1985. – Vol. 3. – P. 817-820.

87. Curtis T.P., Head I.M., Lunn M., Woodcock S., Schloss P.D., Sloan W.T. What is the extent of prokaryotic diversity? // *Philos. Tran. R. Soc. Lond. B.* – 2006. – Vol. 361. – P. 2023-2037.
88. Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 10494-10499.
89. D'Almeida G.A. Desert aerosol characteristics and effects on climate // *Palaeoclimatology and palaeometeorology: modern and past patterns of global atmospheric transport.* / Edited by Leinen M., Sarnthein M. – NATO ASI Ser. C, 1987. – 282. – P. 311–338.
90. D'Almeida G.A. A model for Saharan dust transport // *J. Clim. Appl. Meteorol.* – 1986. – Vol. 25. – P. 903–916.
91. Daly G. L., Wania F. Simulating the influence of snow on the fate of organic compounds // *Environ. Sci. Technol.* – 2004. – Vol. 38. – P. 4176-4186.
92. D'Amico S., Collins T., Marx J.-C., Feller G., Gerday C., Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life // *EMBO Rep.* – 2006. – Vol. 7, № 4. – P. 385-389.
93. Dastager S.G., Lee J.C., Ju Y.J., Park D.J., Kim C.J. *Rubellimicrobium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, pigmented bacterium isolated from soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 58, № 8. – P. 1797-1800.
94. Davey M.C., Davidson H.P.B., Richard K.J., Wynn-Williams D.D. Attachment and growth of antarctic soil cyanobacteria and algae on natural and artificial substrata // *Soil Biol. Biochem.* – 1991. – Vol. 23. – P. 185-191.
95. De Angelis M., Gaudichet A. Saharan dust deposition over Mont Blanc (French Alps) during the last 30 years // *Tellus.* – 1991. – Vol. 43B. – P. 61– 75.
96. De Angelis M., Steffensen J.P., Legrand M., Clausen H., Hammer C. Primary aerosol (sea salt and soil dust) deposited in Greenland ice during the last climatic cycle: comparison with east Antarctic records // *J. Geophys. Res.* – 1997. – Vol. 102. – P. 26681–26698.
97. De Deckker P., Abed R.M.M., de Beer D., Hinrichs K.-U., O'Loingsigh T., Schefuß E., Stuut J.-B.W., Tapper N.J., van der Kaars S. Geochemical and microbiological fingerprinting of airborne dust that fell in Canberra, Australia, in October 2002 // *Geochem. Geophys. Geosyst.* – 2008. – Vol. 9, № 12. – Q12Q10.
98. de Groot A., Chapon V., Servant P., Christen R., Saux M.F., Sommer S., Heulin T. *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – P. 2441-2446.
99. Delgado R., Martín-García J.M., Oyonarte C., Delgado G. Genesis of the terrae rossae of the Sierra Gador (Andalusia, Spain) // *Eur. J. Soil Sci.* – 2003. – Vol. 54. – P. 1-16.

100. Delmonte B., Basile-Doelsch I., Petit J.-R., Maggi V., Revel-Rolland M., Michard A., Jagoutz E., Grousset F. Comparing the Epica and Vostok dust records during the last 220,000 years: stratigraphical correlation and provenance in glacial periods // *Earth-Sci. Rev.* – 2004. – Vol. 66. – P. 63-87.
101. Deming J.W. Psychrophiles and polar regions // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 5, № 3. – P. 301-309.
102. DeMott P.J., Sassen K., Poellot M.R., Baumgardner D., Rogers D.C., Brooks S.D., Prenni, A.J., Kreidenweis S.M. African dust aerosols as atmospheric ice nuclei // *Geophys. Res. Lett.* – 2003. – Vol. 30, № 14. – P. 1732-1736.
103. Domine F., Albert M., Huthwelker T., Jacobi H.-W., Kokhanovsky A.A., Lehning M., Picard G., Simpson W.R. Snow physics as relevant to snow photochemistry // *Atmos. Chem. Phys.* – 2008. – Vol. 8. – P. 171-208.
104. Drees L.R., Manu A., Wilding L.P. Characteristics of aeolian dusts in Niger, West Africa // *Geoderma*. – 1993. – Vol. 59. – P. 213–233.
105. Duarte C.M., Dachs J., Llabres M., Alonso-Laita P., Gasol J.M., Tovar-Sanchez A., Sañudo-Wilhemmy S., Agustí, S. Aerosol inputs enhance new production in the subtropical northeast Atlantic // *J. Geophys. Res.* – 2006. – Vol. 111, № 11. – P. G04006-G04014.
106. Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M., Usami R. Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm) // *Saline Systems*. – 2005. – Vol. 1, № 1. - P. 8.
107. Eden P.E., Schmidt T.M., Blakemore R.P., Pace N.R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1991. – Vol. 41. – P. 324-325.
108. Engelstaedter S., Tegen I., Washington R. North African dust emissions and transport // *Earth-Sci. Rev.* – 2006. – Vol. 79. – P. 73-100.
109. Eppard M., Krumbein W. E., Koch C., Rhiel E., Staley J. T., Stackebrandt E. Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surfaces // *Arch. Microbiol.* – 1996. – Vol. 166, № 1. – P. 12-22.
110. Essoussi I., Ghodhbane-Gtari F., Amairi H., Sghaier H., Jaouani A., Brusetti L., Daffonchio D., Boudabous A., Gtari M. Esterase as an enzymatic signature of *Geodermatophilaceae* adaptability to Sahara desert stones and monuments // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – Vol. 108. – P. 1723-1732.

111. Ezeamuzie C.I., Thomson M.S., Al-Ali S., Dowaisan A., Khan M., Hijazi Z. Asthma in the desert: spectrum of the sensitizing aeroallergens // *Allergy*. – 2000. – Vol. 55. – P. 157–162.
112. Feller G. Life at low temperatures: is disorder the driving force? // *Extremophiles*. – 2007. – Vol. 11, № 2. – P. 211–216.
113. Flechtner V. R. Enigmatic desert soil algae. Soil algal flora of the Western USA and Baja California, Mexico // *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. / Edited by Seckbach J. – Kluwer Academic Publishers, 1999. – P. 231–241.
114. Foght J., Aislabie J., Turner S., Brown C.E., Ryburn J., Saul D.J., Lawson W. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two Southern Hemisphere glaciers // *Microb. Ecol.* – 2004. – Vol. 47, № 4. – P. 329–340.
115. Foucault A., Mélières F. Palaeoclimatic cyclicity in central Mediterranean Pliocene sediments: the mineralogical signal // *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* – 2000. – Vol. 158. – P. 311–323.
116. Fountain A.G., Tranter M., Nylen T. H., Lewis K. J., Mueller D. R. Evolution of cryoconite holes and their contribution to meltwater runoff from glaciers in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica // *J. Glaciol.* - 2004. – Vol. 50. – P. 35–45.
117. Franzen L.G., Hjelmroos M., Kallberg P., Brorstrom-Lunden E., Juntto S., Savolainen A.-L. The 'yellow snow' episode of northern Fennoscandia, March 1991—a case study of long-distance transport of soil, pollen and stable organic compounds // *Atmos. Environ.* - 1994. – Vol. 28, № 22. – P. 3587–3604.
118. Fujii M., Takano Y., Kojima H., Hoshino T., Tanaka R., Fukui M. Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica // *Microb. Ecol.* – 2010. – Vol. 59. – P. 466–475.
119. Gajda R.T. Cryoconite phenomena on the Greenland Ice Cap in the Thule area // *Can. Geogr.* – 1958. – Vol. 12. – P. 35–44.
120. Gallego V., Sanchez-Porro C., Garcia M.T., Ventosa, A. *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006a. – Vol. 56, № 10. – P. 2449–2453.
121. Gallego V., Garcia M.T., Ventosa A. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006b. – Vol. 56, № 2. – P. 339–342.
122. Ganor E., Foner H.A. The mineralogical and chemical properties and the behaviour of aeolian Saharan dust over Israel // *The impact of desert dust across the Mediterranean*. / Edited by Guerzoni S., Chester R. – Dordrecht: Kluwer, 1996. – P. 163–172.

123. Ganor E. The composition of clay minerals transported to Israel as indicators of Saharan dust emission // *Atmos. Environ. Part A.* – 1991. – Vol. 25, № 12. – P. 2657–2664.
124. Garrison V.H., Shinn E.A., Foreman W.T., Griffin D.W., Holmes C.W., Kellogg C.A., Majewski M.S., Richardson L.L., Ritchie K.B., Smith G.W. African and Asian Dust: From Desert Soils to Coral Reefs // *BioScience.* – 2003. – Vol. 53, № 5. – P. 469–480.
125. Georlette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., Marx J.-C., Sonan G., Feller G., Gerday C. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 28. – P. 25–42.
126. Gewin V. Genomics: Discovery in the dirt // *Nature* – 2006. – Vol. 439. – P. 384–386.
127. Glockner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., Amann R. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria // *Appl. Environ. Microb.* – 2000. – Vol. 66. – P. 5053–5065.
128. Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Muletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 2802–2813.
129. Gonzalez-Toril E., Amils R., Delmas R. J., Petit J.-R., Komárek J., Elster J. Bacterial diversity of autotrophic enriched cultures from remote, glacial Antarctic, Alpine and Andean aerosol, snow and soil samples // *Biogeosciences.* – 2009. – Vol. 6. – P. 33–44.
130. Good I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters // *Biometrika.* – 1953. – Vol. 40. – P. 237–264.
131. Gordon M.A. The genus *Dermatophilus* // *J. Bacteriol.* – 1964. – Vol. 88. – P. 509–522.
132. Gorton H.L., Vogelmann T.C. Ultraviolet radiation and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 608–615.
133. Gorton H.L., Williams W.E., Vogelmann T.C. The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille // *Photochem. Photobiol.* – 2001. – Vol. 73. – P. 611–620.
134. Goudie A.S., Middleton N.J. Saharan dust storms: nature and consequences // *Earth-Sci. Rev.* – 2001. – Vol. 56. – P. 179–204.
135. Goudie A.S., Middleton N.J. Desert Dust in the Global System. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006. – 287 p.
136. Grannas A.M., Jones A.E., Dibb J., Ammann M., Anastasio C., Beine H. J., Bergin M., Bottenheim J., Boxe C.S., Carver G., Chen G., Crawford J. H., Domine F., Frey M. M., Guzman M.I., Heard D.E., Helmig D., Hoffmann M.R., Honrath R.E., Huey L.G., Hutterli, M., Jacobi H.W., Kian P., Lefer B., McConnell J., Plane J., Sander R., Savarino J., Shepson

- P.B., Simpson W.R., Sodeau J. R., Von Glasow R., Weller R., Wolff E.W., Zhu T. An overview of snow photochemistry: evidence, mechanisms and impacts // *Atmos. Chem. Phys. Disc.* – 2007. – Vol.7, № 2. – P. 4165-4283.
137. Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J., Young A.C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard G.G., Blakesley R.W., Murray P.R., Green E.D., Turner M.L., Segre J.A. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome // *Science.* – 2009. – Vol. 324. – P. 1190-1192.
 138. Grice E.A., Kong H.H., Renaud G., Young A.C., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Wolfsberg T.G., Turner M.L., Segre J.A. A diversity profile of the human skin microbiota // *Genome Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 1043-1050.
 139. Griffin D.W., Garrison V.H., Herman J.R., Shinn E.A. African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health // *Aerobiologia.* – 2001. – Vol. 17. – P. 203–213.
 140. Griffin D.W., Kellogg C.A. Dust storms and their impact on ocean and human health: dust in the Earth atmosphere // *EcoHealth.* – 2004. – Vol. 1. – P. 284-295.
 141. Griffin D. W. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007a. – Vol. 20. – P. 459-477.
 142. Griffin D.W., Kellogg C.A., Garrison V.H., Lisle J.T., Borden T.C., Shinn E.A. Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events // *Aerobiologia.* – 2003. – Vol. 19. – P. 143-157.
 143. Griffin D.W., Kubilay N., Koçak M., Gray M.A., Borden T.C., Shinn E.A. Airborne desert dust and aeromicrobiology over the Turkish Mediterranean coastline // *Atmos. Environ.* – 2007b. – Vol. 41. – P. 4050-4062.
 144. Griffin D., Westphal D., Gray M. Airborne microorganisms in the African desert dust corridor over the mid-Atlantic ridge, Ocean Drilling Program, Leg 209 // *Aerobiologia.* – 2006. – Vol. 22. – P. 211-226.
 145. Groudieva T., Kambourova M., Yusef H., Royter M., Grote R., Trinks H., Antranikian G. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen // *Extremophiles.* – 2004. – Vol. 8. – P. 475–488.
 146. Grousset F.E., Ginoux P., Bory A., Biscaye P.E. Case study of a Chinese dust plume reaching the French Alps // *Geophys. Res. Lett.* – 2003. – Vol. 30, № 6. – P. 1277-1281.
 147. Guerzoni S., Chester R., Dulac F., Herut B., Loye-Pilot M.D., Measures C., Mignon C., Molinari E., Moulin C., Rossini P., Saydam C., Soudine A., Ziveri P. The role of atmospheric deposition in the biogeochemistry of the Mediterranean Sea // *Progr. Oceanogr.* – 1999. – Vol. 44. – P. 147–190.

148. Gugger M.F., Hoffmann L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (*Stigonematales*) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54, № 2. – P. 349-357.
149. Guieu C., Bozec Y., Blain S., Ridame C., Sarthou G., Leblond N. Impact of high Saharan dust inputs on dissolved iron concentrations in the Mediterranean Sea // Geophys. Res. Lett. – 2002. – Vol. 29, № 19. – P. 1911-1915.
150. Gundlapally S.R., Garcia-Pichel F. The community and phylogenetic diversity of biological soil crusts in the Colorado Plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation // Microb. Ecol. – 2006. – Vol. 52, № 2. – P. 345-357.
151. Gyan K., Henry W., Lacaille S., Laloo A., Lamesee-Eubanks C., McKay S., Antoine R.M., Monteil M.A. African dust clouds are associated with increased paediatric asthma accident and emergency admissions on the Caribbean island of Trinidad // Int. J. Biometeorol. – 2005. – Vol. 49. – P. 371–376.
152. Hacene H., Rafa F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J.C., Ollivier B. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara // J. Arid Environ. – 2004. – Vol. 58. – P. 273-284.
153. Harris R.F. The effect of water potential on microbial growth and activity // Water Potential Relations in Soil Microbiology. / Edited by Parr J.F. and Gardner W.R. – Madison: Soil Science Society of America, WI, 1981. – P. 23–95.
154. Haywood J., Francis P., Osborne S., Glew M., Loeb N., Highwood E., Tanre D., Myrhe G., Formenti P., Hirst E. Radiative properties and direct radiative effect of Saharan dust measured by the C-130 aircraft during SHADE: 1. Solar spectrum // J. Geophys. Res. – 2003. – Vol. 108. – P. 8577- 8593.
155. Herut B., Zohary T., Krom M.D., Mantoura R.F.C., Pitta P., Psarra S., Rassoulzadegan F., Tanaka T., Frede T. Response of East Mediterranean surface water to Saharan dust: On-board microcosm experiment and field observations // Deep Sea Res. PT. II. – 2005. – Vol. 52. – P. 3024-3040.
156. Hervas A., Casamayor E.O. High similarity between bacterioneuston and airborne bacterial community compositions in a high mountain lake area // FEMS Microbiol. Ecol. – 2009. – Vol. 67. – P. 219-228.
157. Hervas A., Camarero L., Reche I., Casamayor E.O. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe // Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 11. – P. 1612-1623.
158. Hill P.G., Zubkov M.V., Purdie D.A. Differential responses of *Prochlorococcus* and SAR11-dominated bacterioplankton groups to atmospheric dust inputs in the tropical Northeast Atlantic Ocean // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – Vol. 306. – P. 82-89.

159. Hill T.C., Walsh K.A., Harris J.A., Moffett B.F. Using ecological diversity measures with bacterial communities // FEMS Microbiol. Ecol. – 2003. – Vol. 43. – P. 1-11.
160. Hirsch P., Gallikowski C.A., Siebert J., Peissl K., Kroppenstedt R., Schumann P., Stackebrandt E., Anderson R. *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., low temperature and draught-tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica // Syst. Appl. Microbiol. – 2004. – Vol. 27. – P. 636-645.
161. Hodson A., Anesio A.M., Tranter M., Fountain A., Osborn M., Priscu J., Laybourn-Parry J., Sattler B. Glacial ecosystems // Ecol. Monographs. – 2008. – Vol. 78. – P. 41-67.
162. Hodson, A., Cameron K., Boggild C., Irvine-Fynn T., Langford H., Pearce D., Banwart S. The structure, biological activity and biogeochemistry of cryoconite aggregates upon an Arctic valley glacier: Longyearbreen, Svalbard // J. Glaciology. – 2010. – Vol. 56, № 196. – P. 349-362.
163. Hoham R.W., Duval B. Microbial ecology of snow and freshwater ice with emphasis on snow algae // Snow ecology: an interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems. / Edited by Jones H.G., Pomeroy J.W., Walker D.A., Hoham R.W. – United Kingdom: Cambridge University Press, 2001. – P. 168–228.
164. Holmes C.W., Miller R. Atmospherically transported metals and deposition in the southeastern United States: local or transoceanic? // Appl. Geochem. – 2004. – Vol. 19. – P. 1189–1200.
165. Horner-Devine M.C., Carney K.M., Bohannon B.J.M. An ecological perspective on bacterial biodiversity // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2004. – Vol. 271. – P. 113–122.
166. Hua N.-P., Kobayashi F., Iwasaka Y., Shi G.-Y., Naganuma T. Detailed identification of desert-originated bacteria carried by Asian dust storms to Japan // Aerobiologia. – 2007. – Vol. 23. – P. 291-298.
167. Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannon B.J.M. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, № 10. – P. 4399-4406.
168. Hughes J.B., Bohannon B.J.M. Application of ecological diversity statistics in microbial ecology // Molecular Microbial Ecology Manual. / Edited by Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D., van Elsas J.D. – Berlin, Germany: Springer, 2004. – P. 1321–1344.
169. Hurlbert S.H. The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters // Ecology. – 1971. – Vol. 52. – P. 577-586.

170. Ichinose T., Sadakane K., Takano H., Yanagisawa R., Nishikawa M., Mori I., Kawazato H., Yasuda A., Hiyoshi K., Shibamoto T. Enhancement of mite allergen-induced eosinophil infiltration in the murine airway and local cytokine/chemokine expression by Asian sand dust // J. Toxicol. Environ. Health. – 2006. – Vol. A69. – P. 1571–1585.
171. Isard S.A., Gage S.H., Comtois P., Russo J.M. Principles of the Atmospheric Pathway for Invasive Species Applied to Soybean Rust // BioScience. – 2005. – Vol. 55. – P. 851–861.
172. Israelevich P.L., Ganor E., Levin Z., Joseph J.H. Annual variations of physical properties of desert dust over Israel // J. Geophys. Res. – 2003. – Vol. 108, № D13. – P. 4381–4390.
173. Ivanova N., Sikorski J., Jando M., Munk C., Lapidus A., Glavina Del Rio T., Copeland A., Tice H., Cheng J.-F., Lucas S., Chen F., Nolan M., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Mavromatis K., Mikhailova N., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C.D., Meincke L., Brettin T., Detter J.C., Detter J.C., Rohde M., Goeker M., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P. Complete genome sequence of *Geodermatophilus obscurus* type strain (G-20T) // Stand Genomic Sci. – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 158–167.
174. Iwasaka Y., Shi G.-Y., Yamada M., Kobayashi F., Kakikawa M., Maki T., Naganuma T., Chen B., Tobo Y., Hong, C. Mixture of Kosa (Asian dust) and bioaerosols detected in the atmosphere over the Kosa particles source regions with balloon-borne measurements: possibility of long-range transport // Air Quality, Atmosphere & Health. – 2009. – Vol. 2. – P. 29–38.
175. Jakosky B.M., Nealson K.H., Bakermans C., Ley R.E., Mellon M.T. Subfreezing activity of microorganisms and the potential habitability of Mars' polar regions // Astrobiology. – 2003. – Vol. 3. – P. 343–350.
176. Jilbert T., Reichart G.-J., Aeschlimann B., Ganther D., Boer W., de Lange G. Climate-controlled multidecadal variability in North African dust transport to the Mediterranean // Geology. – 2010. – Vol. 38. – P. 19–22.
177. Johnson S.S., Hebsgaard M.B., Christensen T.R., Mastepanov M., Nielsen R., Munch K., Brand T., Gilbert M.T.P., Zuber M.T., Bunce M., Rann R., Gilichinsky D., Froese D., Willerslev E. Ancient bacteria show evidence of DNA repair // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – Vol. 104. – P. 14401–14405.
178. Junge K., Imhoff J.F., Staley J.T., Deming J.W. Phylogenetic diversity of numerically important bacteria in Arctic sea ice // Microb. Ecol. – 2002. – Vol. 43, № 3. – P. 315–328.
179. Kakikawa M., Kobayashi F., Maki T., Yamada M., Higashi T., Chen B., Shi G., Hong C., Tobo Y., Iwasaka Y. Dustborne microorganisms in the atmosphere over an Asian dust

- source region, Dunhuang // Air Quality, Atmosphere & Health. – 2008. – Vol. 1. – P. 195-202.
180. Karl D.M., Bird D.F., Bjornlrkman K., Houlihan T., Shackelford R., Tupas L. Microorganisms in the Accreted Ice of Lake Vostok, Antarctica // Science. – 1999. – Vol. 286. – P. 2144-2147.
 181. Kastovska K., Elster J., Stibal M., Santruckova H. Microbial Assemblages in Soil Microbial Succession After Glacial Retreat in Svalbard (High Arctic) // Microb. Ecol. – 2005. – Vol. 50, № 3. – P. 396-407.
 182. Kastovska K., Stibal M., Sabacka M., Cerna B., Santruckova H., Elster J. Microbial community structure and ecology of subglacial sediments in two polythermal Svalbard glaciers characterized by epifluorescence microscopy and PLFA // Polar Biol. – 2007. – Vol. 30. – P. 277-287.
 183. Kellogg C.A., Griffin D.W. Aerobiology and the global transport of desert dust // Trends Ecol. Evol. – 2006. – Vol. 21. – P. 638-644.
 184. Kellogg C.A., Griffin D.W., Garrison V.H., Peak K.K., Royall N., Smith R.R., Shinn E.A. Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa // Aerobiologia. – 2004. – Vol. 20. – P. 99-110.
 185. Kemp P.F., Aller J.Y. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? // Limnol. Oceanogr. Methods. – 2004. – Vol. 2. – P. 114-125.
 186. Kim M.K., Schubert K., Im W.T., Kim K.H., Lee S.T., Overmann J. *Sphingomonas kaistensis* sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing pufLM genes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57, № 7. – P. 1527-1534.
 187. Kohshima S. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier // Nature. – 1984. – Vol. 310. – P. 225-227.
 188. Kuhlman K.R., Allenbach L.B., Ball C.L., Fusco W.G., La Duc M.T. Kuhlman G.M., Anderson R.C., Stuecker T., Erickson, I.K., Benardini J. Crawford R.L. Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California // Icarus. – 2005. – Vol. 174, № 2. – P. 585-595.
 189. Kuhn M. The nutrient cycle through snow and ice, a review // Aquatic Sci. – Res. Across Boundaries. – 2001. – Vol. 63. – P. 150-167.
 190. Kuhn M. Micro-meteorological conditions for snow melt // J. Glaciology. – 1987. – Vol. 33, № 113. – P. 24-26.
 191. Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // Brief Bioinform. – 2008. – Vol. 9. – P. 299-306.

192. Kwaasi A.A. Date palm and sandstorm-borne allergens // Clin. Exp. Allergy. – 2003. – Vol. 33. – P. 419–426.
193. Kwon H.J., Cho S.H., Chun Y., Lagarde F., Pershagen G. Effects of the Asian dust events on daily mortality in Seoul, Korea // Environ. Res. – 2002. – Vol. A90. – P. 1–5.
194. Larose C., Berger S., Ferrari C., Navarro E., Dommergue A., Schneider D., Vogel T.M. Microbial sequences retrieved from environmental samples from seasonal arctic snow and meltwater from Svalbard, Norway // Extremophiles. – 2010. – Vol. 14, № 2. – P. 205–212.
195. Larose C. Interactions entre composition chimique et populations microbiennes de la neige: quelles sont les conséquences sur le cycle du mercure en Arctique? – Thèse Doctorat de l'Université Joseph-Fourier-Grenoble. – Grenoble, 2010. – 157 p.
196. Lavire C., Normand P., Alekhina I.A., Bulat S.A., Prieur D., Birrien J.L., Fournier P., Hänni C., Petit J.R. Presence of *Hydrogenophilus thermoluteolus* DNA in accretion ice in the subglacial Lake Vostok, Antarctica, assessed using *rrs*, *cbb* and *hox* // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8, № 12. – P. 2106–2114.
197. Laybourn-Parry J., Pearce D.A. The biodiversity and ecology of Antarctic lakes: models for evolution // Phil. T. Roy. Soc. B. – 2007. – Vol. 362. – P. 2273–2289.
198. Laybourn-Parry J. Polar limnology, the past, the present and the future // Antarctic biology in a global context. / Edited by Huiskes A.H.L., Gieskes W.W.C., Rozema J., Schorno R.M.L., der Vies S.M., Wolff W.J. – The Netherlands, Leiden: Backhuys Publishers, 2003. – P. 321–329.
199. Lazaro B., Carcamo J., Audicana A., Perales I., Fernandez-Astorga A. Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 10. – P. 4677–4681.
200. Lekunberri I., Lefort T., Romero E., Vazquez-Dominguez E., Romera-Castillo C., Marrase C., Peters F., Weinbauer M., Gasol J.M. Effects of a dust deposition event on coastal marine microbial abundance and activity, bacterial community structure and ecosystem function // J. Plankton. Res. – 2010. – Vol. 32. – P. 381–396.
201. Lewis K., Epstein S., Godoy V.G., Hong S.-H. Intact DNA in ancient permafrost // Trends Microbiol. – 2008. – Vol. 16. – P. 92–94.
202. Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., Schlegel M.L., Tucker T.A., Schrenzel M.D., Knight R., Gordon J.I. Evolution of mammals and their gut microbes // Science. – 2008. – Vol. 320. – P. 1647–1651.
203. Liebhold A.M., Gurevitch J. Integrating the statistical analysis of spatial data in ecology // Ecography. – 2002. – Vol. 25. – P. 553–557.

204. Lighthart B., Shaffer B.T., Marthi B., Ganio L.M. Artificial wind-gust liberation of microbial bioaerosols previously deposited on plants // *Aerobiologia*. – 1993. – Vol. 9. – P. 189-196.
205. Liu Y., Yao T., Jiao N., Kang S., Xu B., Zeng Y., Huang S., Liu X. Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers // *Extremophiles*. – 2009a. – Vol. 13, №3. – P. 411-423.
206. Liu Y., Yao T., Zhu L., Jiao N., Liu X., Zeng Y., Jiang H. Bacterial diversity of freshwater Alpine lake Puma Yumco on the Tibetan Plateau // *Geomicrobiology J.* – 2009b. – Vol. 26. – P. 131 - 145.
207. Lozupone C., Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, № 12. – P. 8228-8235.
208. Lucey P.G. A Lunar Waterworld // *Science*. – 2009. – Vol. 326. – P. 531-532.
209. Mahdhi M., Nzoué A., Gueye F., Merabet C., Lajudie P. d., Mars M. Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae* microsymbionts from the infra-arid region of Tunisia // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 604-609.
210. Maher B.A., Prospero J.M., Mackie D., Gaiero D., Hesse P.P., Balkanski Y. Global connections between aeolian dust, climate and ocean biogeochemistry at the present day and at the last glacial maximum // *Earth-Science Rev.* – 2010. – Vol. 99. – P. 61-97.
211. Maier R.M., Drees K.P., Neilson J.W., Henderson D.A., Quade J., Betancourt J.L. Microbial life in the Atacama Desert // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – P. 1289–1290.
212. Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V., Daly M.J. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2001. – Vol. 65, № 1. – P. 44-79.
213. Maki T., Susuki S., Kobayashi F., Kakikawa M., Yamada M., Higashi T., Chen B., Shi G., Hong C., Tobo Y., Hasegawa H., Ueda K., Iwasaka Y. Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City // *Air Quality, Atmosphere & Health* – 2008. – Vol. 1. – P. 81-89.
214. Mangin I.n., Bonnet R.g., Seksik P., Rigottier-Gois L., Sutren M.n., Bouhnik Y., Neut C., Collins M.D., Colombel J.-F. d. r., Marteau P., Dore J.I. Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2004. – Vol. 50. – P. 25-36.
215. Margesin R., Sproer C., Schumann P., Schinner F. *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53, № 5. – P. 1291–1296.

216. Margesin R., Zacke G., Schinner F. Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite // *Arct. Antarct. Alp. Res.* – 2002. – Vol. 34. – P. 88–93.
217. Marshall W.A. Biological particles over Antarctica // *Nature*. – 1996. – Vol. 383. – P. 680.
218. Marshall W.A., Chalmers M.O. Airborne dispersal of Antarctic algae and cyanobacteria // *Ecography*. – 1997. – Vol. 20. – P. 585–594.
219. Martiny J.B.H., Bohannon B.J.M., Brown J.H., Colwell R.K., Fuhrman J.A., Green J.L., Horner-Devine M.C., Kane M., Krumins J.A., Kuske C.R., Morin P.J., Naeem S., Ovreas L., Reysenbach A.-L., Smith V.H., Staley J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map // *Nature Rev. Microbiol.* – 2006. – Vol. 4. – P. 102–112.
220. Mattimore V., Battista J.R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive desiccation // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 633–637.
221. Maupetit F., Wagenbach D., Weddeling P., Delmas R.J. Seasonal fluxes of major ions to a high altitude cold alpine glacier // *Atmos. Environ.* – 1995. – Vol. 29. – P. 1–9.
222. McTainsh G.H., Walker P.H. Nature and distribution of Harmattan dust // *J. Geomorphol.* – 1982. – Vol. 26. – P. 417–435.
223. McTainsh G., Strong C. The role of aeolian dust in ecosystems // *Geomorphology 36th Binghamton Geomorphology Symposium - Geomorphology and Ecosystems*. – 2007. – Vol. 89. – P. 39–54.
224. McTainsh G.H. Dust processes in Australia and West Africa: a comparison // *Search*. – 1985. – Vol. 16, № 3–4. – P. 104–106.
225. McTainsh G.H., Chan Y.C., McGowan H., Leys J.F., Tews E.K. The 23rd October, 2002 dust storm in eastern Australia: characteristics and meteorological conditions // *Atmos. Environ.* – 2004. – Vol. 39. – P. 1227–1236.
226. Middleton N.J., Goudie A.S. Saharan dust: sources and trajectories // *T. I. Brit. Geogr.* – 2001. – Vol. 26. – P. 165–181.
227. Mills M.M., Ridame C., Davey M., La Roche J., Geider R.J. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P. 292–294.
228. Mindl B., Anesio A.M., Meirer K., Hodson A.J., Laybourn-Parry J., Sommaruga R., Sattler B. Factors influencing bacterial dynamics along a transect from supraglacial runoff to proglacial lakes of a high Arctic glacier // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2007. – Vol. 59. – P. 307–317.

229. Miteva V.I., Sheridan P.P., Brenchley J.B. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland ice core // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, № 1. – P. 202–213.
230. Miteva V. Bacteria in Snow and Glacier Ice // *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology.* / Edited by Margesin R., Schinner F., Marx J.-C., Gerday C. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. – P. 31-50.
231. Mladenov N., Pulido-Villena E., Morales-Baquero R., Ortega-Retuerta E., Sommaruga R., Reche I. Spatiotemporal drivers of dissolved organic matter in high alpine lakes: Role of Saharan dust inputs and bacterial activity // *J. Geophys. Res.* – 2008. – Vol. 113. – P. G00D01- G00D10.
232. Molinaroli E., Guerzoni S., Rampazzo G. Contribution of Saharan dust to the Central Mediterranean basin // *Processes controlling the composition of clastic sediments.* / Edited by Johnsson M.J., Basu A. – *Geol. Soc. Am. Special Paper* 284, 1993. – P. 303–312.
233. Moore C.M., Mills M.M., Milne A., Langlois R., Achterberg E.P., Lochte K., Geider R.J., Roche J.L. Iron limits primary productivity during spring bloom development in the central North Atlantic // *Global Change Biol.* – 2006. – Vol. 12. – P. 626-634.
234. Morgan-Kiss R.M., Priscu J.C., Pockock T., Gudynaite-Savitch, L. Huner N.P.A. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – Vol. 70. – P. 222-252.
235. Morris C.E., Georgakopoulos D.G., Sands D.C. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation // *J. Phys.* – 2004. – Vol. 121. – P. 87-103.
236. Mosier A.C., Murray A.E., Fritsen C.H. Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2007. – Vol. 59, № 2. – P. 274-288.
237. Moulin C., Lambert C.E., Dulac F., Dayan U. Control of atmospheric export of dust from North Africa by the North Atlantic Oscillation // *Nature.* 1997. – Vol. 387, № 6634. – P. 691-694.
238. Mueller D.R., Pollard W.H. Gradient analysis of cryoconite ecosystems from two polar glaciers // *Polar Biol.* – 2004. – Vol. 27. – P. 66–74.
239. Navarro-Gonzalez R., Rainey F.A., Molina P., Bagaley D.R., Hollen B.J., de la Rosa J., A. Small M., Quinn R.C., Grunthaner F.J., Caceres L., Gomez-Silva B., McKay C.P. Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life // *Science.* – 2003. – Vol. 302. – P. 1018–1021.
240. Nielsen K., M., Johnsen P.I., J., Bensasson D., Daffonchio D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment // *Environ. Biosafety Res.* – 2007. – Vol. 6. – P. 37-53.

241. Nishimura Y., Kenzaka T., Sueyoshi A., Li P., Fujiyama H., Baba T., Yamaguchi N., Nasu M. Similarity of bacterial community structure between Asian dust and its sources determined by rRNA gene-targeted approaches // *Microbes Environ.* – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 22-27.
242. Noll M., Wellinger M. Changes of the soil ecosystem along a receding glacier: Testing the correlation between environmental factors and bacterial community structure // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – Vol. 40, № 10. – P. 2611-2619.
243. Norboo T., Angchuk P.T., Yahya M., Kamat S.R., Pooley F.D., Corrin B., Kerr I.H., Bruce N., Ball K.P. Silicosis in a Himalayan village population: role of environmental dust // *Thorax.* – 1991. – Vol. 46. – P. 861–863.
244. Okin G.S., Mahowald N., Chadwick O.A., Artaxo P. Impact of desert dust on the biogeochemistry of phosphorus in terrestrial ecosystems // *Global Biogeochem. Cycles.* – 2004. – Vol. 18, № 2. – P. GB2005.1- GB2005.9.
245. Ozsoy T., Saydam A.C. Iron speciation in precipitation in the North-Eastern Mediterranean and its relationship with Sahara dust // *J. Atmos. Chem.* – 2001. – Vol. 40. – P. 41-76.
246. Pace N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere // *Science.* – 1997. – Vol. 276. – P. 734–740.
247. Painter T.H., Barrett A.P., Landry C.C., Neff J.C., Cassidy M.P., Lawrence C.R., McBride K.E., Farmer G.L. Impact of disturbed desert soils on duration of mountain snow cover // *Geophys. Res. Lett.* – 2007. – Vol. 34. – P. L12502.1-L12502.8.
248. Painter T.H., Duval B., Thomas W.H., Mendez M., Heintzelman S., Dozier J. Detection and quantification of snow algae with an airborne imaging spectrometer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67, № 11. – P. 5267–5272.
249. Papastefanou C., Manolopoulou M., Stoulos S., Ioannidou A., Gerasopoulos E. Coloured rain dust from Sahara Desert is still radioactive // *J. Environ. Radioactiv.* – 2001. – Vol. 55. – P. 109–112.
250. Paquet H., Coudé-Gaussen G., Rognon P. Etude minéralogique de poussières sahariennes le long d'un itinéraire entre 19° et 35° de latitude nord // *Rev. Geol. Dyn. Geogr. Phys.* – 1984. – Vol. 25. – P. 257–265.
251. Park J.W., Lim Y.H., Kyung S.Y., An C.H., Lee S.P., Jeong S.H., Ju Y.S. Effects of ambient particulate matter on peak expiratory flow rates and respiratory symptoms of asthmatics during Asian dust periods in Korea // *Respirology.* – 2005. – Vol. 10. – P. 470–476.
252. Pearce D.A., Bridge P.D., Hughes K.A., Sattler B., Psenner R., Russell N.J. Microorganisms in the atmosphere over Antarctica // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2009. – Vol. 69. – P. 143-157.

253. Pearce D., Hughes K., Lachlan-Cope T., Harangozo S., Jones A. Biodiversity of air-borne microorganisms at Halley station, Antarctica // *Extremophiles*. – 2010. – Vol. 14. – P. 145-159.
254. Perfumo A., Marchant R. Global transport of thermophilic bacteria in atmospheric dust // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2010. – Vol. 2. – P. 333-339.
255. Petit J.R., Jouzel J., Raynaud D., Barkov N.I., Barnola J.M., Basile I., Bender M., Chappellaz J., Davis M., Delaygue G., Delmotte M., Kotlyakov V.M., Legrand M., Lipenkov V.Y., Lorius C., Pepin L., Ritz C., Saltzman E., Stievenard M. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica // *Nature*. – 1999. – Vol. 399. – P. 429–436.
256. Pettitt A.N. Cramer-von Mises statistic // *Encyclopedia of statistical sciences*. / Edited by Kotz S., Johnson N.L. – New York: Wiley-Interscience, 1982. – P. 220–221.
257. Petterssen S. *Weather Analysis and Forecasting*. – New York: McGraw-Hill, 1940. – P. 428.
258. Pointing S.B., Warren-Rhodes K.A., Lacap D.C., Rhodes K.L., McKay C.P. Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts // *Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 9, № 2. – P. 414-424.
259. Polymenakou P.N., Mandalakis M., Stephanou E.G., Tselepides A. Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the eastern Mediterranean // *Environ. Health Perspect.* – 2008. – Vol. 116, №3. – P. 292-296.
260. Pratt K.A., DeMott P.J., French J.R., Wang Z., Westphal D.L., Heymsfield A.J., Twohy C.H., Prenni A.J., Prather K.A. In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals // *Nature*. – 2009. – Vol. 2. – P. 398-401.
261. Preunkert S., Wagenbach D., Legrand M., Vincent C. Col du Dome (Mt Blanc Massif, French Alps) suitability for ice-core studies in relation with past atmospheric chemistry over Europe // *Tellus*. – 2000. – Vol. 52B, № 3. – P. 993-1012.
262. Preunkert S., Legrand M., Wagenbach D. Sulfate trends in a Col du Dôme (French Alps) ice core: A record of anthropogenic sulfate levels in the European midtroposphere over the twentieth century // *J. Geophys. Res.* – 2001a. – Vol. 106. – P. 31991-32004.
263. Preunkert S., Legrand M., Wagenbach D. Causes of enhanced fluoride levels in Alpine ice cores over the last 75 years: Implications for the atmospheric fluoride budget // *J. Geophys. Res.* – 2001b. – Vol. 106. – P. 12619-12632.
264. Price P.B., Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2004. – Vol. 101. – P. 4631–4636.

265. Price P.B. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2000. – Vol. 97. – P. 1247–1251.
266. Price P.B. Microbial genesis, life and death in glacial ice // Can. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 55. – P. 1–11.
267. Priscu J.C., Fritsen C.H., Adams E.E., Giovannoni S.J., Paerl H.W., McKay C.P., Doran P.T., Gordon D.A., Lanoil B.D., Pinckney J.L. Perennial Antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert // Science. – 1998. – Vol. 280. – P. 2095–2098.
268. Priscu J.C., Adams E.E., Lyons W.B., Voytek M.A., Mogk D.W., Brown R.L., McKay C.P., Takacs C.D., Welch K.A., Wolf C.F., Kirshtein J.D., Avcı R. Geomicrobiology of Subglacial Ice Above Lake Vostok, Antarctica // Science. – 1999. – Vol. 286. – P. 2141–2144.
269. Priscu J.C., Christner B.C. Earth's icy biosphere // Microbial Diversity and Bioprospecting. / Edited by Bull A. – Washington, D.C.: ASM Press, 2004. – Chap 13. – P. 130–145.
270. Prospero J.M., Blades E., Mathison G., Naidu R. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust // Aerobiologia. – 2005. – Vol. 21. – P. 1–19.
271. Prosser J.I., Bohannan B.J.M., Curtis T.P., Ellis R.J., Firestone M.K., Freckleton R.P., Green J.L., Green L.E., Killham K., Lennon J.J., Osborn A.M., Solan M., van der Gast C. J., Young J.P.W. The role of ecological theory in microbial ecology // Nature Rev. Microbiol. – 2007. – Vol. 5. – P. 384–392.
272. Psenner R., Sattler B. Life at the freezing point // Science. – 1998. – Vol. 280, № 5372. – P. 2073–2074.
273. Psenner R. Living in a dusty world: airborne dust as a key factor for Alpine lakes // Water, Air, Soil Pollution. – 1999. – Vol. 112. – P. 217–227.
274. Pukall R., Lapidus A., Glavina Del Rio T., Copeland A., Tice H., Cheng J.-F., Lucas S., Chen F., Nolan M., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Mavromatis K., Ivanova N., Ovchinnikova G., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C.D., Chain P., Meincke L., Sims D., Brettin T., Detter J.C., Rohde M., Goeker M., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Kyrpides N.C., Klenk H.-P., Hugenholtz P. Complete genome sequence of *Conexibacter woesei* type strain (ID131577T) // Stand Genomic Sci. – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 212–219.
275. Pulido-Villena E., Morales-Baquero R., Reche I. Evidence of an atmospheric forcing of bacterioplankton and phytoplankton dynamics in a high mountain lake // Aqua. Sci. – Rese. Across Boundaries. – 2008a. – Vol. 70. – P. 1–9.

276. Pulido-Villena E., Wagener T., Guieu C. Bacterial response to dust pulses in the western Mediterranean: Implications for carbon cycling in the oligotrophic ocean // *Global Biogeochem. Cycles.* – 2008. – Vol. 22. – P. GB1020.1- GB1020.12.
277. Pye K. Aeolian dust and dust deposits. – London: Academic Press, 1987. – 334 p.
278. Rainey F.A., Ferreira M., Nobre M.F., Ray K., Bagaley D., Earl A.M., Battista J.R., Gomez-Silva B., McKay C.P., da Costa M.S. *Deinococcus peraridilitoris* sp. nov., isolated from a coastal desert // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 1408-1412.
279. Rainey F.A., Ray K., Ferreira M., Gatz B.Z., Nobre M.F., Bagaley D., Rash B.A., Park M.-J., Earl A.M., Shank N.C., Small A.M., Henk M.C., Battista J.R., Kampfer P., da Costa M.S. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, № 9. - P. 5225-5235.
280. Rainey F.A., Weiss N., Stackebrandt E. Phylogenetic analysis of the genera *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, and *Jonesia* and proposal to exclude the genus *Jonesia* from the family *Cellulomonadaceae* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 45, № 4. – P. 649-652.
281. Rajaniemi P., Hrouzek P., Kastovska K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komarek J., Sivonen K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (*Nostocales*, *Cyanobacteria*) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55, № 1. – P. 11-26.
282. Ramette A., Tiedje J. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution // *Microb. Ecol.* – 2007. – Vol. 53. – P. 197-207.
283. Rani A., Sharma A., Rajagopal R., Adak T., Bhatnagar R.K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 96.
284. Reche I., Ortega-Retuerta E., Romera O., Pulido-Villena E., Morales-Baquero R., Casamayor E.O. Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs // *Limnol. Oceanogr.* – 2009. – Vol. 54, № 3. – P. 869-879.
285. Reche I., Pulido-Villena E., Morales-Baquero R., Casamayor E.O. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? // *Ecology.* – 2005. – Vol. 86. – P. 1715–1722.
286. Reddy V.P.V., Shiva Nageswara Rao S.S., Pratibha M.S., Sailaja B., Kavya B., Manorama R.R., Singh S.M., Radha Srinivas T.N., Shivaji S. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water

- stream of Midtre Lovenbreen glacier, an Arctic glacier // *Res. Microbiol.* – 2009. – Vol. 160, № 8. – P. 538-546.
287. Rehakova K., Stibal M., Sabacka M., Rehak J. Survival and colonisation potential of photoautotrophic microorganisms within a glacierised catchment on Svalbard, High Arctic // *Polar Biol.* – 2010. – Vol. 33. – P. 737-745.
 288. Rickard A.H., Stead A.T., O'May G.A., Lindsay S., Banner M., Handley P.S., Gilbert P. *Adhaeribacter aquaticus* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative isolate from a potable water biofilm // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55, № 2. – P. 821-829.
 289. Ridame C., Guieu C. Saharan input of phosphate to the oligotrophic water of the open Western Mediterranean sea // *Limnol. Oceanogr.* – 2002. – Vol. 47, № 3. – P. 856-869.
 290. Rogers S.O., Starmer W.T., Castello J.D. Recycling of pathogenic microbes through survival in ice // *Medical Hypotheses.* – 2004. – Vol. 63. – P. 773-777.
 291. Romdhane S.B., Nasr H., Samba-Mbaye R., Neyra M., Ghorbal M.H., Lajudie P. Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – Vol. 100. – P. 436-445.
 292. Sarnthein M., Thiede J., Pflaumann U., Erlenkeuser H., Fütterer D., Koopman B., Lange H., Seibold E. Atmospheric and oceanic circulation patterns off northwest Africa during the past 25 million years // *Geology of the northwest African continental margin.* / Edited by Rad U. von, Hinz K., Sarnthein M., Seibold E. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1982. – P. 545–604.
 293. Sattin S., Cleveland C., Hood E., Reed S., King A., Schmidt S., Robeson M., Ascarrunz N., Nemergut D. Functional shifts in unvegetated, perhumid, recently-deglaciated soils do not correlate with shifts in soil bacterial community composition // *The J. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 673-681.
 294. Sattler B., Puxbaum H., Psenner R. Bacterial growth in supercooled cloud droplets // *Geophys. Res. Lett.* – 2001. – Vol. 28. – P. 239–242.
 295. Sattler B., Sipiera P., Psenner R. Life in ice. // *From the Vacuum to the Universe.* / Edited by Bass S.D., Schallhart F., Tasser B. – Proceedings of the first Austria-France-Italy Symposium 2007. – 2008. – P. 129-140.
 296. Saul D.J., Aislabie J.M., Brown C.E., Harris L., Foght J.M. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2005. – Vol. 53. – P. 141–155.
 297. Sawstrom C., Mumford P., Marshall W., Hodson A., Laybourn-Parry J. The microbial communities and primary productivity of cryoconite holes in Arctic glacier (Svalbard 79-N) // *Polar Biol.* – 2002. – Vol. 25. – P. 591–596.

298. Schloss P.D., Handelsman J. Status of the microbial census // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – Vol. 68, № 4. – P. 686-691.
299. Schloss P.D., Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – P. 1501-1506.
300. Schloss P.D., Handelsman J. Introducing TreeClimber, a Test To Compare Microbial Community Structures // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 2379-2384.
301. Schutz L., Jaenicke R., Pietrek H. Saharan dust transport over the North Atlantic Ocean // Desert dust: Origin, characteristics, and effect on man. / Edited by Péwé T.L. – Geol. Soc. Am. Spec. Pap., 1981. – 186. – P. 87–100.
302. Schutz L., Seibert M. Mineral aerosols and source identification // J. Aerosol Sci. – 1987. – Vol. 18. – P. 1–10.
303. Schwikowski M., Eichler A. Alpine Glaciers as Archives of Atmospheric Deposition // Alpine Waters (The Handbook of Environmental Chemistry). / Edited by Bundi U. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – Vol. 6. – P. 141-150.
304. Schwikowski M., Seibert P., Baltensperger U., Gaggeler H.W. A study of an outstanding Saharan dust event at the high-alpine site Jungfrauoch, Switzerland // Atmos. Environ. – 1995. – Vol. 29. – P. 1829-1842.
305. Segawa T., Miyamoto K., Ushida K., Agata K., Okada N., Kohshima S. Seasonal change in bacterial flora and biomass in mountain snow from the Tateyama mountains, Japan, analyzed by 16S rRNA gene sequencing and real-time PCR // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 1. – P. 123-130.
306. Setlow P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species // Annu. Rev. Microbiol. – 1995. – Vol. 49. – P. 29-54.
307. Shao Y., Dong C.H. A review on East Asian dust storm climate, modelling and monitoring // Glob. Planet. Change. – 2006. – Vol. 52. – P. 1–22.
308. Shinn E.A., Smith G.W., Prospero J.M., Betzer P., Hayes M.L., Garrison V., Barber R.T. African dust and the demise of Caribbean Coral Reefs // Geophys. Res. Lett. – 2000. – Vol. 27. – P. 3029-3032.
309. Shivaji S., Prakash J. How do bacteria sense and respond to low temperature? // Archiv. Microbiol. – 2010. – Vol. 192, № 2. – P. 85-95.
310. Sigler W.V., Bachofen R., Zeier J. Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5. – P. 618–627.

311. Simon C., Wiezer A., Strittmatter A.W., Daniel R. Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, № 23. – P. 7519-7526.
312. Simpson W.R., King M.D., Beine H.J., Honrath R.E., Zhou X. Radiation-transfer modeling of snow-pack photochemical processes during ALERT 2000 // *Atmos. Environ.* – 2002. – Vol. 36. – P. 2663-2670.
313. Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L., Whitman W.B. Quantitative comparisons of 16S rDNA sequence libraries from environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 4373-4376.
314. Singleton D.R., Rathbun S.L., Dyszynski G.E., Whitman W.B. LIBSHUFF Comparisons of 16S rRNA Gene Clone Libraries // *Molecular Microbial Ecology Manual.* / Edited by Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D., van Elsas J.D. – Berlin, Germany: Springer, 2004. – P. 1321–1344.
315. Skujinš J., Microbial ecology of desert soils // *Adv. Microbial Ecol.* – 1984. – Vol. 7. – P. 49–91.
316. Sodemann H., Palmer A.S., Schwierz C., Schwikowski M., Wernli H. The transport history of two Saharan dust events archived in an Alpine ice core // *Atmos. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 6. – P. 667–688.
317. Soina V.S., Vorobyova E.A. Role of cell differentiation in high tolerance by prokaryotes of long-term preservation in permafrost // *Adv. Space Res.* – 1996. – Vol. 18. – P. 97-101.
318. Soo R.M., Wood S.A., Grzymski J.J., McDonald I.R., Cary S.C. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica // *Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 11. – P. 715-728.
319. Spring S., Merkhoffer B., Weiss N., Kroppenstedt R.M., Hippe H., Stackebrandt E. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53, № 4. – P. 1019-1029.
320. Stach J.E.M., Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M., Bull A.T. Statistical approaches for estimating Actinobacterial diversity in marine sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, № 10. – P. 6189-6200.
321. Stackebrandt E., Goebel B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 44. – P. 846-849.

322. Steffensen J.P. The size distribution of microparticles from selected segments of the Greenland Ice Core Project ice core representing different climatic periods // J. Geophys. Res. – 1997. – Vol. 102. – P. 26755-26763.
323. Steltzer H., Landry C., Painter T.H., Anderson J., Ayres E. Biological consequences of earlier snowmelt from desert dust deposition in alpine landscapes // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2009. – Vol. 106. – P. 11629-11634.
324. Steven B., Chen M.Q., Greer C.W., Whyte L.G., Niederberger T.D. *Tumebacillus permanentifrigoris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, spore-forming bacterium isolated from Canadian high Arctic permafrost // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – P. 1497-1501.
325. Steven B., Leveille R., Pollard W., Whyte L. Microbial ecology and biodiversity in permafrost // Extremophiles. – 2006. – Vol. 10, № 4. – P. 259-267.
326. Stibal M., Šabacká M., Kaštovská K. Microbial communities on glacier surfaces in Svalbard: impact of physical and chemical properties on abundance and structure of Cyanobacteria and algae // Microb. Ecol. – 2006. – Vol. 52, № 4. – P. 644-654.
327. Stibal M., Elster J., Sabacká M., Kastovská K. Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – Vol. 59. – P. 265-273.
328. Stibal, M., Tranter, M., Benning L.G., Reháč J. Microbial primary production on an Arctic glacier is insignificant in comparison with allochthonous organic carbon input // Environ. Microbiol. – 2008b. – Vol. 10. – P. 2172-2178.
329. Stibal M., Tranter M., Telling J., Benning L. Speciation, phase association and potential bioavailability of phosphorus on a Svalbard glacier // Biogeochemistry. – 2008a. – Vol. 90. – P. 1-13.
330. Stivaletta N., Barbieri R. Endolithic microorganisms from spring mound evaporite deposits (southern Tunisia) // J. Arid Environ. – 2009. – Vol. 73. – P. 33-39.
331. Stohl A. Trajectory statistics - a new method to establish source-receptor relationships of air pollutants and its application to the transport of particulate sulfate in Europe // Atmos. Environ. – 1996. – Vol. 30. – P. 579-587.
332. Stohl A. Computation, accuracy and applications of trajectories - A review and bibliography // Atmos. Environ. – 1998. – Vol. 32. – P. 947-966.
333. Stott M.B., Crowe M.A., Mountain B.W., Smirnova A.V., Hou S., Alam M., Dunfield P.F. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand // Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 10, № 8. – P. 2030-2041.

334. Stuut, J.-B., Smalley I., O'Hara-Dhand K. Aeolian dust in Europe: African sources and European deposits // *Quatern. Int.* – 2009. – Vol. 198. – P. 234-245.
335. Svensson A., Biscaye P.E., Grousset F.E. Characterization of late glacial continental dust in the Greenland Ice Core Project ice core // *J. Geophys. Res.-Atmos.* – 2000. – Vol. 105, № D4. – P. 4637–4656.
336. Swap R., Garstang M., Greco S., Talbot R., Kallberg P. Saharan dust in the Amazon basin // *Tellus.* – 1992. – Vol. 44. – P. 133–149.
337. Swap R., Ulanski S., Cobbett M., Garstang M. Temporal and spatial characteristics of Saharan dust outbreaks // *J. Geophys. Res.* – 1996. – Vol. 101, № D2. – P. 4205–4220.
338. Takeuchi N. The altitudinal distribution of snow algae on an Alaska glacier (Gulkana Glacier in the Alaska Range) // *Hydrol. Process.* – 2001. – Vol. 15. – P. 3447–3459.
339. Takeuchi N., Koshima S. A snow algal community on Tyndall glacier in the Southern Patagonia icefield, Chile // *Arc. Ant. Alp. Res.* – 2004. – Vol. 36. – P. 92-99.
340. Takeuchi N., Kohshima S., Seko K. Structure, formation and darkening process of albedo-reducing material (cryoconite) on a Himalayan glacier: a granular algal mat growing on the glacier // *Arc., Ant., Alp. Res.* – 2001. – Vol. 33. – P. 115–122.
341. Takeuchi N., Uetake J., Fujita K., Aizen V.B., Nikitin S.D. A snow algal community on Akkem glacier in the Russian Altai mountains // *Anna. Glaciol.* – 2006. – Vol. 43. – P. 378-384.
342. Tanaka T.Y., Kurosaki Y., Chiba M., Matsumura T., Nagai T., Yamazaki A., Uchiyama A., Tsunematsu N., Kai K. Possible transcontinental dust transport from North Africa and the Middle East to East Asia // *Atmos. Environ.* – 2005. – Vol. 39. – P. 3901–3909.
343. Tang K.W., Dziallas C., Grossart H.-P. Zooplankton and aggregates as refuge for aquatic bacteria: protection from UV, heat and ozone stresses used for water treatment // *Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 13. – P. 378-390.
344. Taton A., Grubisic S., Ertz D., Hodgson D.A., Picardi R., Biondi N., Tredici M., Mainini M., Losi D., Marinelli F., Wilmotte A. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains // *J. Phycol.* – 2006. – Vol. 42, № 6. – P. 1257-1270.
345. The MEPAG Special Regions – Science Analysis Group // Findings of the mars special regions science analysis group // *Astrobiology.* – 2006. – Vol. 6, № 5. – P. 677–732.
346. Thomas W.H., Duval B. Snow algae: Snow albedo changes, algal-bacterial interrelationships, and ultraviolet radiation effects // *Arct. Alp. Res.* – 1995. – Vol. 27, № 4. – P. 389-399.

347. Thomas W.H., Broady P.A. Distribution of coloured snow and associated algal genera in New Zealand // New Zeal J. Bot. – 1997. – Vol. 35. – P. 113–117.
348. Tindall B.J. Prokaryotic Diversity in the Antarctic: The Tip of the Iceberg // Microb. Ecol. – 2004. – Vol. 47. – P. 271–283.
349. Torsvik V., Ovreas, L. Microbial Diversity, Life Strategies, and Adaptation to Life in Extreme Soils // Microbiology of Extreme Soils. / Edited by Dion P., Nautiyal C.S. – Berlin: Springer, 2008. – P. 15–43.
350. Tranter M., Fountain A., Fritsen C., Lyons B., Priscu J., Statham P., Welch K. Extreme hydrochemical conditions in natural microcosms entombed within Antarctic ice // Hydrological Processes. – 2004. – Vol. 18. – P. 379–387.
351. Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., Egholm M., Henrissat B., Heath A.C., Knight R., Gordon J.I. A core gut microbiome in obese and lean twins // Nature. – 2009. – Vol. 457. – P. 480–484.
352. Uetake J., Kohshima S., Nakazawa F., Suzuki K., Kohno M., Kameda T., Arkhipov S., Fujii Y. Biological ice-core analysis of Sofiyskiy glacier in the Russian Altai // Ann. Glaciol. – 2006. – Vol. 43. – P. 70–78.
353. Ullerstam M., Vogt R., Langer S., Ljungstrom E. The kinetics and mechanism of SO₂ oxidation by O₃ on mineral dust // Phys. Chem. Chem.Phys. – 2002. – Vol. 4, № 19. – P. 4694–4699.
354. Uno I., Eguchi K., Yumimoto K., Takemura T., Shimizu A., Uematsu M., Liu Z., Wang Z., Hara Y., Sugimoto N. Asian dust transported one full circuit around the globe // Nature. – 2009. – Vol. 2. – P. 557–560.
355. Urzi C., Salamone P., Schumann P., Rohde M., Stackebrandt E. *Blastococcus saxobidens* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Blastococcus* Ahrens and Moll 1970 and *Blastococcus aggregatus* Ahrens and Moll 1970 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54, № 1. – P. 253–259.
356. Usher C.R., Michel A.E., Grassian V.H. Reactions on Mineral Dust // Chem. Rev. – 2003. – Vol. 103. – P. 4883–4940.
357. Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.H., Smith H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea // Science. – 2004. – Vol. 304. – P. 66–74.

358. Vincent C., Le Meur E., Six D., Possenti P., Lefebvre E., Funk M. Climate warming revealed by glacial temperatures at Col du Dome (4250 m, Mont Blanc area) // *Geophys. Res. Lett.* – 2007. – Vol. 34, № 16. – P. L16502.1- L16502.5.
359. Vincent W.F. Cold tolerance in cyanobacteria and life in the cryosphere // *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments.* / Edited by Seckbach J. – Heidelberg: Springer, 2007. – Vol. 11. – P. 287–301.
360. Vorobyova E.A., Soina V.S., Mulukin A.L. Microorganisms and enzyme activity in permafrost after removal of long-term cold stress // *Adv. Space Res.* – 1996. – Vol. 18. – P. 103-108.
361. Walsh J.J., K.A. Steidinger. Saharan dust and Florida red tides: the cyanophyte connection // *J. Geophys. Res.* – 2001. – Vol. 106. – P. 11597–11612.
362. Warren S.G., Hudson S.R., Carpenter E.J., Capone D.G. Bacterial activity in South Pole snow is questionable // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. - Vol. 69, № 10. – P.6340-6341.
363. Weichart D., McDougald D., Jacobs D., Kjelleberg S. In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 2754-2758.
364. Weir-Brush J.R., Garrison V.H., Smith G.W., Shinn E.A. The Relationship between gorgonian coral (Cnidaria: Gorgonacea) diseases and African dust storms // *Aerobiologia.* – 2004. – Vol. 20. – P. 119-126.
365. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173. – P. 697-703.
366. Wentworth C.K. A scale of grade and class terms for clastic sediments // *J. Geol.* – 1922. – Vol. 30. – P. 377–392.
367. Weon H.-Y., Kim B.-Y., Schumann P., Son J.-A., Jang J., Go S.-J., Kwon S.-W. *Deinococcus cellulosilyticus* sp. nov., isolated from air // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 1685-1688.
368. Weon H.Y., Kim B.Y., Joa J.H., Son J.A., Song M.H., Kwon S.W., Go S.J., Yoon S.H. *Methylobacterium iners* sp. nov. and *Methylobacterium aerolatum* sp. nov., isolated from air samples in Korea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 58, № 1. – P. 93-96.
369. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: The unseen majority // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 6578–6583.
370. Wiedinmyer C., Bowers R.M., Fierer N., Horanyi E., Hannigan M., Hallar A.G., McCubbin I., Baustian K. The contribution of biological particles to observed particulate organic carbon at a remote high altitude site // *Atmos. Environ.* - 2009. – Vol. 43. – P. 4278-4282.

371. Wilke B.M., Duke B.J., Jimoh W.L.O. Mineralogy and chemistry of Harmattan dust in northern Nigeria // *Catena*. – 1984. – Vol. 11. – P. 91–96.
372. Xiang S., Yao T., An L., Xu B., Wang J. 16S rRNA sequences and differences in bacteria isolated from the Muztag Ata glacier at increasing depths // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, № 8. – P. 4619-4627.
373. Xiang S.-R., Shang T.-C., Chen Y., Yao T.-D. Deposition and postdeposition mechanisms as possible drivers of microbial population variability in glacier ice // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2009. – Vol. 70. – P. 165-176.
374. Yang Y., Itoh T., Yokobori S.-i., Itahashi S., Shimada H., Satoh K., Ohba H., Narumi I., Yamagishi A. *Deinococcus aerius* sp. nov., isolated from the high atmosphere // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59. – P. 1862-1866.
375. Yang Y., Itoh T., Yokobori S.-i., Shimada H., Itahashi S., Satoh K., Ohba H., Narumi I., Yamagishi A. *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 776-779.
376. Yeo H.-G., Kim J.-H. SPM and fungal spores in the ambient air of west Korea during the Asian dust (Yellow sand) period // *Atmos. Environ.* – 2002. – Vol. 36. – P. 5437-5442.
377. Yergeau E., Newsham K.K., Pearce D.A., Kowalchuk G.A. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats // *Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 9, № 11. – P. 2670-2682.
378. Yoo S.-H., Weon H.-Y., Kim S.-J., Kim Y.-S., Kim B.-Y., Kwon S.-W. *Deinococcus aerolatus* sp. nov. and *Deinococcus aerophilus* sp. nov., isolated from air samples // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 1191-1195.
379. Yoon J., Matsuo Y., Adachi K., Nozawa M., Matsuda S., Kasai H., Yokota A. Description of *Persicirhabdus sediminis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ishigakijimensis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ponti* sp. nov., *Roseibacillus persicicus* sp. nov., *Luteolibacter pohnpeiensis* gen. nov., sp. nov. and *Luteolibacter algae* sp. nov., six marine members of the phylum 'Verrucomicrobia', and emended descriptions of the class *Verrucomicrobiae*, the order *Verrucomicrobiales* and the family *Verrucomicrobiaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 58, № 4. – P. 998-1007.
380. Yoon M.H., ImW.T. *Flavisolibacter ginsengiterrae* gen. nov., sp. nov. and *Flavisolibacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57, № 8. – P. 1834-1839.
381. Yoshino M. Climatology of yellow sand (Asian sand, Asian dust or Kosa) in East Asia // *Sci.China Ser. D Earth Sci.* – 2002. – Vol. 45. – P. 59–70.

382. Yuan M., Zhang W., Dai S., Wu J., Wang Y., Tao T., Chen M., Lin M. *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – P. 1513-1517.
383. Zaitsev G.M., Tsitko I.V., Rainey F.A., Trotsenko Y.A., Uotila J.S., Stackebrandt E., Salkinoja-Salonen M.S. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – Vol. 48, № 1. – P. 151-163.
384. Zhang S., Hou S., Wu, Y., Qin D. Bacteria in Himalayan glacial ice and its relationship to dust // Biogeosciences. – 2008b. – Vol. 5, № 6. – P. 1741-1750.
385. Zhang X.F., Yao T.D., Tian L.D., Xu S.J., An L.Z. Phylogenetic and physiological diversity of bacteria isolated from Puruogangri ice core // Microb. Ecol. – 2008a. – Vol. 55. – P. 476–488.
386. Zhang X.J., Yao T.D., Ma X.J., Wang N.L. Microorganisms in a high altitude glacier ice in Tibet // Folia Microbiol. – 2002. – Vol. 47. – P. 241–245.
387. Zhang S., Hou S., Ma. X., Qin D., Chen T. Culturable bacteria in Himalayan ice in response to atmospheric circulation // Biogeosciences. – 2007. – Vol. 4. – P. 1–9.
388. Zhang S. h., Hou,S. g., Yang G. l., Wang, J. h. Bacterial community in the East Rongbuk Glacier, Mt. Qomolangma (Everest) by culture and culture-independent methods. Microbiol. Res. – 2010a. – Vol. 165. – P. 336-345.
389. Zhang S., Yang G., Hou S., Wang Y. Abundance and diversity of glacial bacteria on the Tibetan Plateau with environment // Geomicrobiol. J. – 2010b. – Vol. 27. – P. 649-655.
390. Zinger L., Shahnava B., Baptist F., Geremia R.A., Choler P. Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics // ISME J. – 2009. – Vol. 3, № 7. – P. 850-859.
391. Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics // Res. Microbiol. – 2005. – Vol. 156, № 10. – P. 984–993.
392. Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda D.P. *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54, № 4. – P. 1377-1381.
393. Zul D., Wanner G., Overmann J. *Massilia brevitalea* sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from lysimeter soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – P. 1245-1251.

394. Zwart G., Crump B.C., Kamst-van-Agterveld M.P., Hagen F., Han S-K. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2002. – Vol. 28. – P. 141–155.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Состав основных глинистых минералов почвенной пыли из различных регионов
Сахары

Глинистый минерал	Источник	Ссылка
Иллит	Северная и Западная Сахара	Caquineau et al., 1998, 2002
Иллит и хлорит	Северный и Южный Алжир, Северный Мали	Paquet et al., 1984
Иллит, хлорит, палыгорскит и монтмориillonит	Северная и Центральная Сахара	Sarnthein et al., 1982
Иллит, смектит, палыгорскит и каолинит	Северная Сахара	Avila et al., 1996, 1997
Каолинит	Сахель	Caquineau et al., 1998, 2002
	Южная и Центральная Сахара	Chester et al., 1972
	Нигер и Северная Нигерия	Drees et al., 1993; Wilke et al., 1984; McTainsh & Walker, 1982
	Восточная часть Средиземноморья	Foucault & Mélières, 2000
Каолинит и монтмориillonит	Южная Сахара, Сахель	Sarnthein et al., 1982
Смектит и каолинит	Южный Алжир и Мали	Paquet et al., 1984
	Ливия, Египет	Ganor, 1991; Ganor & Foner, 1996
Смектит	Тунис, Ливия, Алжир	Avila et al., 1996, 1997

Примеры патогенных бактерий, обнаруженных в пыли Сахары

Бактерия	Болезнь	Ссылка
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Нозокомиальные инфекции респираторного тракта	Kellog et al., 2004
<i>A. lwoffii</i>	Бактериемия и менингит	Polymenakou et al., 2008
<i>A. johnsonii</i>	Бактериемия и менингит	Polymenakou et al., 2008
<i>Brevibacterium casei</i>	Сепсис	Griffin et al., 2006
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	Инфекция мочевыводящих путей, сепсис	Kellog et al., 2004; Griffin et al., 2007
<i>Gordonia terrae</i>	Инфекции нервной системы, кожи	Griffin et al., 2006; Kellog et al., 2004
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Менингит	Polymenakou et al., 2008
<i>Kocuria rosea</i>	Бактериемия	Griffin et al., 2006, 2007; Kellog et al., 2004
<i>K. spp.</i>	Нома	Griffin et al., 2003, 2007; Kellog et al., 2004
<i>Massilia timonae</i>	Иммунодефицит	Griffin et al., 2007
<i>Microbacterium arborescens</i>	Нома	Griffin et al., 2003
<i>Propionibacterium acnes</i>	Инфекционный эндокардит	Polymenakou et al., 2008
<i>S. spp.</i>	Нома	Griffin et al., 2003; Polymenakou et al., 2008; Hervas et al., 2009; Hervas & Casamayor, 2009
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Инфекционный эндокардит, инфекция мочевыводящих путей	Griffin et al., 2006
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пневмония, бактериальный синусит, острый отит, менингит	Polymenakou et al., 2008
<i>S. gordonii</i>	Инфекционный эндокардит, инфекции полости рта	Polymenakou et al., 2008
<i>S. mitis</i>	Пневмония, бактериальный синусит, острый отит, менингит	Polymenakou et al., 2008

Идентификация клонов, полученных путем амплификации V3-V5 области бактериальных генов 16S рРНК

Название организма: % сходства с ближайшим известным родственником (штаммом) по базе данных NCBI	Библиотека клонов, созданная на основании амплификации V3-V5 области генов 16S рРНК								№ доступа по базе данных NCBI
	MB5 (39)	MB-SD (38)	MB-SD2 (29)	MS5 (57)	MS7 (36)	MS7r (17)	SD (39)	SS (40)	
<u>Bacteria; Deinococcus-Thermus</u>									
<u>Deinococcaceae</u>									
94% <i>Deinococcus xinjiangensis</i> (FJ608132)	MB5-1 (14)								HM104591
94% <i>Deinococcus claudionis</i> (EF635406)	MB5-19 (3)								HM104594
<u>Trueperaceae</u>									
95% <i>Truepera radiovictrix</i> (DQ022077)							SD16 (1)		HQ396583
94% <i>Truepera radiovictrix</i> (DQ022077)								SS16 (1)	HQ396611
<u>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria</u>									
<u>Acetobacteraceae</u>									
HA_95.2% <i>Acidisoma sibiricum</i> (AM947654)	MB5-4 (5)								HQ396614
95% <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (AM889285)							SD1 (1)		HQ396580
HA_95% <i>Acidicaldus organivorans</i> (AY140238)							SD25 (3)		HQ396589
<u>Sphingomonadaceae</u>									
≥96.4% <i>Sphingomonas kaistensis</i> (AY769084)		2SD-4 (2)	MB-SD2- 41 (2)						HM104615 HM104615
HA_97.5% <i>Sphingomonas kaistensis</i> (AY76908)		2SD-40 (3)							HQ396617
98.3% <i>Sphingomonas jaspsi</i> (AB264131)		2SD-6 (1)							HQ402564
98% <i>Sphingomonas dokdonensis</i> (DQ870682)		2SD-2 (1)							HQ402565
96.3% <i>Sphingomonas wittichii</i> (AB021492)			MB-SD2- 10 (1)						HM104622
98% <i>Sphingomonas echinoides</i> (DQ118270)			MB-SD2- 1 (2)						HQ402566
95% <i>Novosphingobium hassiacum</i> (NR_028962)							SD10 (1)		HQ396581
99% <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (AB331237)		2SD-11 (1)							HM104606
<u>Bradyrhizobiaceae</u>									
99% <i>Bosea thiooxidans</i> (AF508112)		2SD-23							HM104604

		(2)							
99% <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (FJ534721)						MS7r-21 (1)			HQ396563
<u>Methylobacteriaceae</u>									
HA_98.5% <i>Methylobacterium adhaesivum</i> (AM040156)				MS5s-12 (1)					HQ396540
HA_98.7% <i>Methylobacterium adhaesivum</i> (AM040156)				MS5s-16 (1)					HQ396541
HA_99% <i>Methylobacterium iners</i> (EF174497)				MS5s-15 (1)					HQ396544
HA_95.8% <i>Methylobacterium iners</i> (EF174497)						MS7r-22 (1)			HQ396564
99% <i>Methylobacterium iners</i> (EF174497)							SD4 (1)		HQ396587
<u>Hyphomicrobiaceae</u>									
98.7% <i>Devosia limi</i> (AJ786801)		2SD-34 (1)							HM104612
<u>Rhodobiaceae</u>									
93.2% <i>Rhodobium orientis</i> (D30792)			MB-SD2-40 (1)						HM104617
<u>Rhodobacteraceae</u>									
97.9% <i>Rubellimicrobium aerolatum</i> (EU338486)		2SD-15 (1)							HM104607
HA_97.7% <i>Rubellimicrobium mesophilum</i> (EF547368)		2SD-10 (4)							HQ396616
98% <i>Rubellimicrobium mesophilum</i> (EF547368)			MB-SD2-17 (1)	MS5s-8 (1)				SS32(1)	HM104621 HQ396535 HQ396603
<u>Rickettsiaceae</u>									
96% <i>Rickettsia slovaca</i> (L36224)					MS7-4 (1)				HQ396550
<u>Реклассифицированные на основании филогенетического анализа</u>									
99% EU376200					MS7-19 (1)				HQ396557
AB251495					MS7-34 (1)				HQ396553
<u>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria</u>									
<u>Comamonadaceae</u>									
HA_99.6% <i>Schlegelella aquatica</i> (DQ417336)	MB5-7 (1)								HQ396613
97% <i>Pseudorhodofex caeni</i> (AJ606333)								SS12 (1)	HQ396606

<u>Oxalobacteraceae</u>									
98.7% <i>Massilia brevitalea</i> (EF546777)				MS5s-4 (1)					HQ396531
HA_99% <i>Massilia aurea</i> (AM231588)				MS5s-7 (1)					HQ396542
<u>Bacteria; Proteobacteria;</u> <u>Gammaproteobacteria;</u>									
<u>Pseudomonadaceae</u>									
99% <i>Pseudomonas stutzeri</i> (DSM50227)								SS5 (1)	HQ396607
<u>Xanthomonadaceae</u>									
95% <i>Lysobacter yangpyeongensis</i> (DQ191179)								SS14 (1)	HQ396608
Неидентифицированные классифицированные на основании филогенетического анализа									
87% <i>Ectothiorhodospira variabilis</i> (AM943123)					MS7- 15 (1)				HQ396555
<u>Bacteria; Actinobacteria</u>									
<u>Geodermatophilaceae</u>									
99% <i>Blastococcus saxobsidens</i> (AJ316574)		2SD-21 (6)		MS5s-17 (1)					HM104599 HQ396534
98% <i>Blastococcus saxobsidens</i> (AJ316574)								SS7 (1)	HQ396612
99% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (X92359)		2SD-12 (5)							HM104600
97% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (CP001867)		2SD-20 (1)							HM104609
99% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (CP001867)			MB-SD2- 11 (8)						HM104613
98% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (X92355)			MB-SD2- 23 (1)						HM104620
99% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (CP001867)				MS5-9R (1)					HQ396532
95% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (X92359)								SS25 (1)	HQ396601
HA_98.7% <i>Modestobacter versicolor</i> (AJ871304)			MB-SD2- 39 (1)						HQ396618
95.5% <i>Modestobacter versicolor</i> (AJ871304)				MS5-34 (2)					HQ396528
96.4% <i>Modestobacter multiseptatus</i> (NR_026508)					MS7-1 (1)				HQ396549

94% <i>Frankia alni</i> (CT573213)								SS42 (1)	HQ396602
<u>Thermoleophilaceae</u>									
93% <i>Thermoleophilum minutum</i> (AJ458464)			MB-SD2- 34 (1)						HM104618
<u>Nocardioidaceae</u>									
94.5% <i>Nocardioides jensenii</i> (AF005006)				MS5-28 (1)					HQ396533
<u>Streptomycetaceae</u>									
99% <i>Streptomyces</i> sp. (EU734637)		2SD-22 (2)							HM104603
99% <i>Streptomyces macrosporeus</i> (GU184336)				MS5s-14 (1)					HQ396536
99% <i>Streptomyces turgidiscabies</i> (FJ546741)				MS5s-9 (1)					HQ396537
<u>Solirubrobacteraceae</u>									
93.2% <i>Solirubrobacter soli</i> (AB245334)			MB-SD2- 26 (1)						HM104619
HA_98% <i>Solirubrobacter soli</i> (AB245334)				MS5s-6 (1)					HQ396543
96% <i>Solirubrobacter soli</i> (AB245334)								SS33 (1)	HQ396604
<u>Conexibacteraceae</u>									
95.6% <i>Conexibacter woesei</i> (CP001854)					MS7- 40 (3)				HQ396546
<u>Thermoleophilaceae</u>									
93.1% <i>Thermoleophilum album</i> (AJ458463)		2SD-27 (2)							HM104605
<u>Pseudonocardiaceae</u>									
96.6% <i>Crossiella cryophilis</i> (NR_024964)		2SD-17 (1)							HM104608
99% <i>Saccharothrix algeriensis</i> (NR_025658)				MS5s-3 (5)					HQ396527
95.8% <i>Pseudonocardia acaciae</i> (EU921261)					MS7- 13 (1)				HQ396551
<u>Cellulomonadaceae</u>									
<i>Cellulomonas cellasea</i> (X83804)			MB-SD2- 35 (7)						HM104614
<u>Microbacteriaceae</u>									
99% <i>Pseudoclavibacter helvolus</i> (EF204391)				MS5s-2					HQ396530

				(1)					
<u>Mycobacteriaceae</u>									
99% <i>Mycobacterium brisbanense</i> (EU825951)					MS7-8 (2)				HQ396547
97.9% <i>Mycobacterium holsaticum</i> (NR_028945)					MS7-26 (1)				HQ396552
<u>Неидентифицированные классифицированные на основании филогенетического анализа</u>									
90.2% <i>Solirubrobacter soli</i> (AB245334)		2SD-1 (2)							HM104601
88.7% <i>Solirubrobacter soli</i> (AB245334)			MB-SD2-18 (2)						HM104616
<u>Bacteria; Firmicutes</u>									
<u>Bacillaceae</u>									
99% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (AB301024)	MB5-12 (1)								HM104598
99% <i>Bacillus beijingensis</i> (EF371374)	MB5r-20 (1)								HQ402563
<i>Bacillus massiliensis</i> (AY677116)		2SD-24 (1)							HM104610
98.2% <i>Bacillus niabensis</i> (AY998119)		2SD-29 (1)							HM104611
<i>Bacillus massiliensis</i> (DQ350816)					MS7-37 (1)				HQ396554
<u>Clostridiaceae</u>									
HA 98.7% <i>Clostridium paraputrificum</i> (AB032556)		2SD-32 (1)							HQ396615
HA <i>Clostridium disporicum</i> (Y18176)						MS7r-11 (1)			HQ396565
HA 98.8% <i>Clostridium sp.</i> (FJ606757)						MS7r-23 (1)			HQ396566
<u>Erysipelotrichaceae</u>									
98% <i>Turicibacter sanguin</i> (NR_028816)						MS7r-3 (2)			HQ396562
<u>Bacteria; Bacteroidetes</u>									
<u>Cytophagaceae</u>									
92% <i>Hymenobacter soli</i> (AB251884)	MB5-8 (2)								HM104596
91.4% <i>Hymenobacter soli</i> (AB251884)	MB5r-2 (2)								HM104597
94% <i>Spirosoma rigui</i> (EF507900)							SD6 (2)		HQ396571
92% <i>Spirosoma linguale</i> (CP001769)							SD30 (1)		HQ396577
96% <i>Pontibacter akesuensis</i> (DQ672723)								SS6 (1)	HQ396610
98% <i>Adhaeribacter aquaticus</i> (AJ626894)								SS22 (4)	HQ396593
98% <i>Adhaeribacter aquaticus</i> (AJ626894)								SS41 (2)	HQ396594

93% <i>Adhaeribacter aquaticus</i> (AJ626894)								SS4 (2)	HQ396595
96% <i>Segetibacter koreensis</i> (AB267478)							SD12 (1)		HQ396582
94% <i>Segetibacter koreensis</i> (AB267478)								SS24 (2)	HQ396596
<u>Chitinophagaceae</u>									
95% <i>Flavisolibacter ginsengisoli</i> (AB267477)								SS28 (7)	HQ396591
95% <i>Flavisolibacter ginsengisoli</i> (AB267477)								SS11 (5)	HQ396592
93% <i>Flavisolibacter ginsengisoli</i> (AB267477)								SS21 (2)	HQ396597
<u>Sphingobacteriaceae</u>									
96% <i>Pedobacter composti</i> (AB267720)								SS13 (2)	HQ396598
98% <i>Pedobacter steynii</i> (AM491372)								SS8 (1)	HQ396609
<u>Неидентифицированные классифицированные на основании филогенетического анализа</u>									
85.2% <i>Marinoscillum pacificum</i> (DQ660388)	MB5-18 (3)								HM104595
88% <i>Adhaeribacter terreus</i> (EU682684)							SD24 (1)		HQ396573
<u>Bacteria; Fibrobacteres/Acidobacteria group</u>									
92% <i>Acidobacteria sp.</i> (AM887762)								SS43 (1)	HQ396600
<u>Bacteria; Chlamydiae/Verrucomicrobia group: Verrucomicrobiaceae</u>									
HA 95.8% <i>Luteolibacter pohnpensis</i> (AB331895)			MB-SD2-32 (1)						HQ396619
<u>Bacteria; Cyanobacteria</u>									
<u>Nostocaceae</u>									
94% <i>Anabaena cylindrica</i> (AJ630414)	MB5-20 (3)								HM104593
93% <i>Anabaena planctonica</i> (AJ293108)							SD5 (5)		HQ396567
93% <i>Anabaena planctonica</i> (AJ293108)							SD35 (1)		HQ396574
94% <i>Anabaena cylindrica</i> (AF247592)							SD14 (1)		HQ396584
<u>Rivulariaceae</u>									
96% <i>Calothrix sp.</i> (AM230682)							SD2 (5)		HQ396568
94% <i>Calothrix sp.</i> (AM230682)							SD40 (1)		HQ396572
<u>Stigonematales</u>									
96.6% <i>Stigonema ocellatum</i> (AJ544082)						MS7r-17 (5)			HQ396560

<u>Eukaryota; Viridiplantae</u>									
<u>Chlorophyta; Trebouxiophyceae</u>									
96% <i>Stichococcus bacillaris</i> (AF278751)							SD3 (4)		HQ396569
97% <i>Chlorella saccharophila</i> (D11348)							SD13 (1)		HQ396585
<u>Streptophyta; Pinaceae</u>									
99% <i>Pinus thunbergii</i> (FJ899562)							SD36 (1)		HQ396590
99% <i>Picea sitchensis</i> (EU998739)				MS5-3 (35)					HQ396538
<u>Streptophyta; Fagaceae</u>									
<i>Quercus nigra</i> (GQ998717)				MS5s-20 (1)					HQ396539
<u>Streptophyta; Bartramiaceae</u>									
<i>Bartramia pomiformis</i> (DQ629559)					MS7- 22 (16)				HQ396558
<u>Streptophyta; Bryaceae</u>									
99% <i>Bryum argenteum</i> (DQ629556)						MS7r-10 (5)			HQ396561
<u>Streptophyta; Thelypteridaceae</u>									
<i>Thelypteris navarrensis</i> (DQ629491)					MS7-2 (4)	MS7r-38 (1)			HQ396545 HQ396559
<u>Неидентифицированные классифицированные на основании филогенетического анализа</u>									
90% <i>Chlorella saccharophila</i> (D11348)							SD27 (1)		HQ396575
85% <i>Oocystis solitaria</i> (FJ968739)							SD18 (1)		HQ396586
<u>Митохондриальная ДНК</u>									
<u>Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Pleuroziaceae</u>									
98.4% <i>Pleurozia purpurea</i> (FJ999996)					MS7- 29 (2)				HQ396548
<u>Неидентифицированные неклассифицированные филотипы</u>									
83% <i>Thermoleophilum album</i> (AJ458463)								SS10 (1)	HQ396605
83% <i>Atopobium parvulum</i> (X67150)								SS38 (1)	HQ396599
83% <i>Anaerobacter polyendosporus</i> (AJ222546)	MB5-5 (4)								HM104592
80% <i>Clostridium orbiscindens</i> (Y18187)							SD8(1)		HQ396578
84% <i>Dictyoglomus</i> sp. (FJ626840)							SD11 (1)		HQ396579
91% <i>Oscillibacter valericigenes</i> (AB238598)							SD15 (1)		HQ396588
84% <i>Clostridium</i> sp. (X95274)							SD29 (1)		HQ396576

89% <i>Gemmata obscuriglobus</i> (X81957)							SD26 (2)		HQ396570
89% <i>Sporomusa rhizae</i> (AM158322)					MS7-14 (1)				HQ396556
84.4% <i>Kouleothrix aurantiaca</i> (AB079640)				MS5-38 (1)					HQ396529

Примечания

1 К неидентифицируемым филотипам отнесены филотипы, обнаруживающие 90% и менее сходства по нуклеотидной последовательности с известными (опубликованными) таксонами.

2 Под неклассифицируемыми филотипами понимается невозможность отнесения филотипа к какому-либо таксону, а под реклассифицируемыми филотипами – отнесение филотипа к таксону отличному от указанного в базе данных на основании собственного филогенетического анализа.

Идентификация клонов, полученных путем амплификации полноразмерных последовательностей бактериальных генов 16S рРНК

Название организма: % сходства с ближайшим известным родственником (штаммом) по базе данных NCBI	Библиотека клонов, созданная на основании амплификации полноразмерных генов 16S рРНК				№ доступа по базе данных NCBI
	5f (38)	f2SD (47)	MS5f (55)	MS7f (33)	
<u>Bacteria; Deinococcus-Thermus</u>					
<u>Deinococcaceae</u>					
94% <i>Deinococcus radiomollis</i> (EF635405)	5f-16 (5)				JF832299
92% <i>Deinococcus radiomollis</i> (EF635405)	5f-7 (1)				JF832306
<u>Неидентифицированные классифицированные на основании филогенетического анализа</u>					
89% <i>Deinococcus radiophilus</i> (NR 026402)	5f-3 (11)				JF832298
<u>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria</u>					
<u>Acetobacteraceae</u>					
HA 92% <i>Gluconacetobacter sacchari</i> (AF127412)	5f-1 (5)				JF832308
91% <i>Acidosphaera rubrifaciens</i> (D86512)				MS7f-37 (1)	JF832342
97% <i>Belnapia moabensis</i> (AJ871428)		f2SD-45 (1)			JF832329
<u>Rickettsiaceae</u>					
92.5% <i>Rickettsia raoultii</i> (DQ36581)			MS5sf-8 (1)		JF832334
<u>Реклассифицированные на основании филогенетического анализа</u>					
99% <i>Physcomitrella patens</i> (AB251495)				MS7f-15 (4)	JF832343
<u>Bacteria; Actinobacteria</u>					
<u>Geodermatophilaceae</u>					
99% <i>Geodermatophilus obscurus</i> (CP001867)	5f-15 (1)				JF832300
<u>Bacteria; Firmicutes</u>					
<u>Bacillaceae</u>					
99% <i>Bacillus niacini</i> (NR 024695)			MS5sf-2 (3)		JF832333
97% <i>Bacillus sp.</i> (AY289499)			MS5f-6 (1)		JF832332
99% <i>Bacillus sp.</i> (AJ544784)				MS7f-9 (1)	JF832349
92% <i>Virgibacillus salarius sp.</i> (AB197851)				MS7f-32 (1)	JF832350
96% <i>Bacillus niabensis</i> (AY998119)		f2SD-4 (1)			JF832309
97% <i>Bacillus sp.</i> (DQ448754)		f2SD-85 (1)			JF832312
96% <i>Bacillus aminovorans</i> (X62178)		f2SD-104 (4)			JF832313
97% <i>Bacillus thioarans</i> (DQ371431)		f2SD-68(2)			JF832314
98% <i>Bacillus simplex</i> (AJ628745)		f2SD-33 (4)			JF832316
97% <i>Bacillus macroides</i> (AF501367)		f2SD-11 (5)			JF832317
97% <i>Bacillus muralis</i> (AJ628748)		f2SD-b33 (1)			JF832318

96% <i>Bacillus foraminis</i> (AJ717382)		f2SD-88 (1)			JF832319
96% <i>Bacillus benzoovorans</i> (Y14693)		f2SD-73 (1)			JF832320
99% <i>Tumebacillus permanentifrigoris</i> (DQ444975)		f2SD-a7 (3)			JF832321
96% <i>Bacillus endophyticus</i> sp. (NR 025122)		f2SD-83 (1)			JF832322
<i>Bacillus</i> sp. (EU733231)		f2SD-a25 (1)			JF832324
96% <i>Oceanobacillus picturae</i> (NR 028952)		f2SD-b16 (1)			JF832323
99% <i>Bacillus</i> sp. (DQ416782)		f2SD-50 (1)			JF832325
98% <i>Bacillus</i> sp. (AJ544783)		f2SD-2 (2)			JF832326
98% <i>Bacillus</i> sp. (AJ544784)		f2SD-a21 (2)			JF832327
97% <i>Bacillus benzoovorans</i> (Y14693)		f2SD-b14 (5)	MS5sf-11 (2)		JF832328 JF832337
<u><i>Clostridiaceae</i></u>					
98.9% <i>Clostridium bowmanii</i> (AJ506120)				MS7f-18 (1)	JF832340
<u><i>Paenibacillaceae</i></u>					
98.2% <i>Ammoniphilus oxalaticus</i> (Y14579)			MS5sf-16 (1)		JF832331
98% <i>Ammoniphilus oxalaticus</i> (Y14579)		f2SD-87 (3)			JF832315
93% <i>Paenibacillus validus</i> (AB073203)				MS7f-8 (1)	JF832341
96% <i>Brevibacillus levickii</i> (AJ715381)		f2SD-42 (1)			JF832310
<u><i>Planococcaceae</i></u>					
98% <i>Sporosarcina soli</i> (DQ073394)		f2SD-67 (1)			JF832311
<u><i>Bacteria; Bacteroidetes</i></u>					
<u><i>Cytophagaceae</i></u>					
93% <i>Hymenobacter soli</i> (AB251884)	5f-13 (2)				JF832302
<u>Неидентифицированные</u> <u>классифицированные на основании филогенетического анализа</u>					
HA 90.7% <i>Hymenobacter soli</i> (AB251884)			MS5sf-18		JF832339
84% <i>Flexibacter flexilis</i> subsp. <i>Pelliculosus</i> (AB078054)	5f-6 (7)				JF832303
88.2% <i>Mucilaginibacter daejeonensis</i> (AB267717)	5fr-8 (1)				JF832305
<u><i>Bacteria; Cyanobacteria</i></u>					
<u><i>Chroococcales</i></u>					
97% <i>Chamaesiphon subglobosus</i> (AY170472)	5f-17 (1)				JF832304
<u><i>Oscillatoriales</i></u>					
97% <i>Phormidium pristleyi</i> (AY493580)	5f-12 (3)				JF832301
<u><i>Nostocaceae</i></u>					
91% <i>Anabaena augstumalis</i> (AJ630458)	5fr-19 (1)				JF832307
88.2% <i>Mucilaginibacter daejeonensis</i> (AB267717)					
<u><i>Eukaryota; Viridiplantae</i></u>					
<u><i>Streptophyta; Pinaceae</i></u>					
<i>Pinus merkusii</i> (FJ899579)		f2SD-a23 (5)	MS5f-31 (23)		JF832330 JF832336

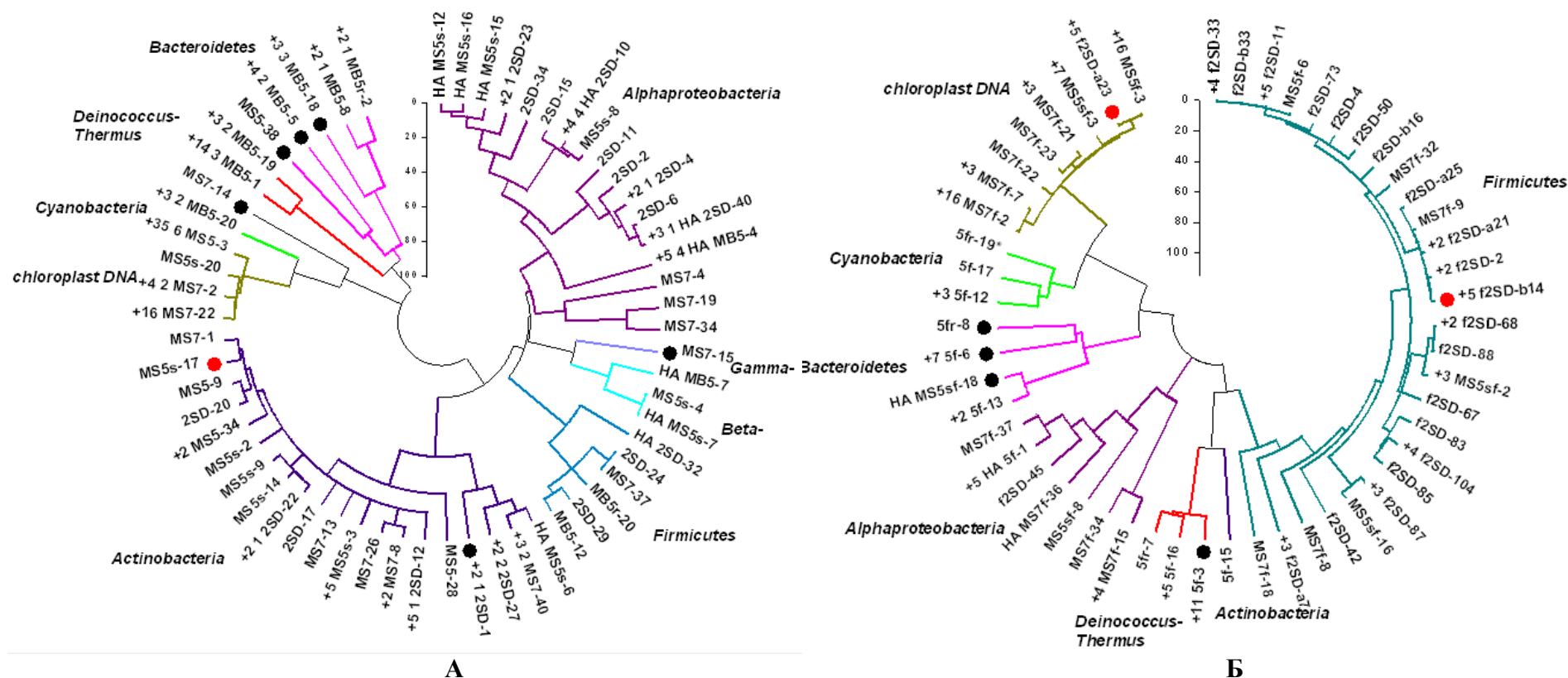
99% <i>Picea sitchensis</i> (EU998739)			MS5f-3 (16)		JF832335
<u><i>Streptophyta; Fagaceae</i></u>					
99% <i>Quercus nigra</i> (GQ998717)			MS5sf-3 (7)		JF832338
<u><i>Streptophyta; Pottiaceae</i></u>					
99% <i>Syntrichia ruralis</i> (FJ546412)				MS7f-7 (3)	JF832344
99% <i>Syntrichia ruralis</i> (FJ546412)				MS7f-2 (16)	JF832345
<u><i>Streptophyta; Polytrichaceae</i></u>					
99% <i>Polytrichum commune</i> (AF244563)				MS7f-23 (1)	JF832346
<u><i>Streptophyta; Marchantiaceae</i></u>					
99% <i>Marchantia polymorpha</i> (X04465)				MS7f-21 (3)	JF832347
<u><i>Streptophyta; Dryopteridaceae</i></u>					
99% <i>Dryopteris wallichiana</i> (DQ629490)				MS7f-22 (1)	JF832348

Примечания

1 К неидентифицируемым филотипам отнесены филотипы, обнаруживающие 90% и менее сходства по нуклеотидной последовательности с известными (опубликованными) таксонами.

2 Под неклассифицируемыми филотипами понимается невозможность отнесения филотипа к какому-либо таксону, а под реклассифицируемыми филотипами – отнесение филотипа к таксону отличному от указанного в базе данных на основании собственного филогенетического анализа.

Филогенетические дендрогаммы, построенные на основе нуклеотидных последовательностей генов
16S рРНК: V3-V5 области гена и полноразмерной последовательности



А – Филогенетическое дерево для 60 филофитов, выявленных путем секвенирования V3-V5 области гена 16S рРНК (метод Maximum Parsimony (MP) для 484 н.о., из которых 247 н.о. филогенетически информативны). Красными заполненными кругами отмечены филофиты, встречающиеся более чем в одной библиотеке. Черными заполненными кругами – неидентифицированные филофиты.

Б – Филогенетическое дерево для 53 филофитов, выявленных путем секвенирования полноразмерного гена 16S рРНК (метод MP для 578 н.о., из которых 284 н.о. филогенетически информативны).

Таблица 1 – Значения Р, полученные при сравнении клоновых библиотек V3-V5 и полноразмерного (ПГ) типа с помощью LIBSHUFF анализа

Значение Р									
Библиотека клонов									
V3-V5					ПГ				
-	MB5	MB-SD	MS5	MS7	-	5f	f2SD	MS5f	MS7f
MB5	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	5f	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MB-SD	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	f2SD	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001
MS5	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	MS5f	<0,0001	0,0024	-	<0,0001
MS7	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	MS7f	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-

Примечание – Так как сравнение проводили одновременно для четырех библиотек по каждому типу соответственно, то учитывали поправку Бонферрони для четырех библиотек (критическое значение $P = 0,0043$). Если наименьшее из двух значений Р для пары библиотек было меньше или равно критического значения, то наблюдаемая степень различий между сравниваемыми библиотеками статистически существенна.

Таблица 2 – Значения Р, полученные при сравнении клоновых библиотек V3-V5 типа с помощью LIBSHUFF анализа

	Значение Р							
Библи-отека	MB5	MB-SD	MB-SD2	MS5	MS7	MS7r	SD	SS
MB5	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MB-SD	<0,0001	-	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MB-SD2	<0,0001	0,0001	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MS5	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	0,0001	0,0003	0,0004	<0,0001
MS7	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	0,0352	-	-
MS7r	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	-	-	-
SD	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-		-	<0,0001
SS	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-		<0,0001	-

Примечание – Сравнение проводили для каждой пары библиотек отдельно с учетом поправки Бонферрони для двух библиотек (критическое значение $P = 0,0025$). Если наименьшее из двух значений Р для пары библиотек было меньше или равно критического значения, то наблюдаемая степень различий между сравниваемыми библиотеками статистически существенна.

ACKNOWLEDGMENTS

First of all, I would like to thank sincerely my supervisor, Dr. Sergey A. Bulat, who helped me through all PhD period. I am also very grateful to Dr. Jean-Robert Petit, my other supervisor, who was also very helpful and always available. Thank to their collaboration and friendship it became possible this work to appear in the frame of a “co-tutelle” project between Université Joseph Fourier (UJF, Grenoble, France) and Petersburg Nuclear Physics Institute of Russian Academy of Sciences (PNPI RAS, Gatchina, Russia). In Russia, I worked at the Laboratory of Genetics of Eukaryotes (PNPI RAS) and in France my host laboratory was the Laboratoire de Glaciologie et de Géophysique de l'Environnement (LGGE, CNRS).

This work could not have been done without participation of Maxim Debret, Emmanuel Le Meur, Bruno Jourdain, Delphine Six and Christian Vincent who collected the snow samples at Mont Blanc glacier. Also special thanks to my both supervisors who collected the Saharan dust sample at the roof of LGGE, and Philippe Normand (Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Lyon, France) who kindly provided the sample of Saharan soil collected in Tunisia.

My special thanks to Marie-France Cesbron Delauw for the opportunity to work at the Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM, Grenoble, France) and to many people who was around me that time: Evelyne Coursange, Mickael Le Gac, Elisabeth Kay, Dominique Schneider, Guillaume Baptist, Jérôme Izard, Woei-Fuh Wang, Stephan Lacour, Hans Geiselmann, Corinne Pinel...

My appreciative thanks to Jean Martins (Laboratoire d'étude des Transferts en Hydrologie et Environnement, Grenoble, France) for letting me use their work place and facilities.

This work benefited greatly from the collaboration with Dominique Marie (Station Biologique de Roscoff, France) who estimated cell concentrations in snow samples, Pascale Fournier (LEM) who performed culturing attempt, Paola Formenti and Servanne Chevaillier (LISA, Créteil, France) who help with X-ray fluorescence analysis and subsequent interpretations and discussions.

I am also very grateful to Irina A. Alekhina (LGE) who patiently taught me at the beginning of my study and gave many advices through last study years;

to Philippe Normand (LEM) from whom I received a lot of good advises and criticism;

to Hubert Gallée and Susanne Preunkert (LGGE) for their help with back-trajectory analysis and advices concerning meteorological aspects of dust events;

to all administration staff, colleagues and friends from the Division of Molecular and Radiation Biophysics of PNPI RAS headed by Prof. Vladimir G. Korolev, and especially to Dr.

Valeriy N. Verbenko, Dr. Svetlana V. Saranceva, Nina A. Gudkova, Lubov A. Shestakova, Denis S. Karvol, Andrey U. Chernenkov;

to all administration staff, colleagues and friends from the LGGE, especially to Michel Fily, Dominique Raynaud, Michel Poisson, Florent Domine, Christian Vincent, Alvaro Soruco, Isabel Moreno, Irina Gorodetskaya and Daphné Buiron;

to Dr. Svetlana N. Dedysh (Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow, Russia) for her advises on manuscript preparation and thesis presentation.

My warmest thanks to Dr. Victor V. Habluk (Kuban State University, Krasnodar, Russia) for his admonitions, advises, encouragement, support and great heart.

I dedicate this work to my family – mother Lyudmila, father Sergey, my brother Denis and his wife Ella and daughter Victoria, my husband Adrien and his big family, who are a constant source of love, support and inspiration.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность научному руководителю – старшему научному сотруднику ПИЯФ РАН, к.б.н. Булату Сергею Алексеевичу за грамотное руководство, плодотворные дискуссии, критически замечания и ценные советы.

Выражаю также благодарность сотрудникам ЛГТОС Maxim Debret, Emmanuel Le Meur, Bruno Jourdain, Delphine Six and Christian Vincent за помощь в получении образцов снега с ледника Монблан, Jean-Robert Petit за сбор образцов пыли Сахары в Гренобле, Hubert Gallée и Susanne Preunkert за помощь в освоении метеорологической модели HUSPLIT для построения обратных траекторий и полезные консультации; сотруднику ОЭМ Philippe Normand за предоставление образца почвы Сахары, а также за полезные консультации, замечания и помощь в написании статей.

Кроме того, хотелось бы выразить благодарность заведующей лаборатории адаптации и патогенеза микроорганизмов (Гренобль, Франция) Marie-France Cesbron Delauw за предоставления рабочего места в лаборатории, а также сотрудникам ЛАПМ, которые были всегда отзывчивы и приветливы и готовы прийти на помощь: Evelyne Coursange, Mickael Le Gac, Elisabeth Kay, Dominique Schneider, Guillaume Baptist, Jérôme Izard, Woei-Fuh Wang, Stephan Lacour, Hans Geiselmann, Corinne Pinel...; заведующему лаборатории исследования связи гидрологии и окружающей среды Jean Martins (Гренобль, Франция) за предоставления рабочего места в лаборатории и возможность использования оборудования.

Эта работа получила большой вклад от сотрудничества с Dominique Marie (БСР), кто выполнил подсчет клеток методом проточной цитофлуоремитрии, Pascale Fournier (ОЭМ), кто осуществил попытку культивирования радиационно устойчивых микроорганизмов из снега ледника Моблан, Paola Formenti и Servanne Chevaillier (ЛАС), выполнивших анализ элементного состава пыли из снега ледника Монблан.

Автор признателен всем сотрудникам ОМРБ ПИЯФ РАН во главе с директором отдела Королевым Владимиром Генадьевичем, и в особенности Вербенко Валерию Николаевичу, Саранцевой Светлане Владимировне, Нине Андреевне Гудковой, Шестаковой Любове Александровне. Отдельное спасибо Алехиной Ирине Александровне за всестороннюю помощь в теоретической и практической подготовке к выполнению работы и моральную поддержку.

Выражаю искреннюю благодарность сотруднику Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН Дедыш Светлане Николаевне за ценные советы по написанию и представлению диссертации, преподавателю кафедры микробиологии Кубанского Государственного Университета Волченко Никите Николаевичу за помощь при написании и оформлении работы.

Искреннее спасибо заведующему кафедрой биохимии и физиологии Хаблюку Виктору Викторовичу за рекомендацию к прохождению аспирантуры, помощь в оформлении работы, а также моральную поддержку в течение всего периода обучения.

Выражаю искреннюю и глубокую признательность своей семье и мужу за понимание, поддержку и любовь.