

УДК 550.72

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КАРТЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ УНИКАЛЬНЫХ ЛАНДШАФТОВ****<sup>1</sup>Журлов О.С., <sup>2</sup>Грудинин Д.А.**<sup>1</sup>*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, e-mail: jurlov1968@mail.ru;*<sup>2</sup>*Институт степи УрО РАН, Оренбург*

Изучение микробных сообществ уникальных ландшафтов, формирующихся в результате термоэрозии грунтов, затруднено отсутствием методических приемов исследования динамики их качественных изменений. Эмпирический выбор точек отбора проб не позволяет осуществлять хронологический мониторинг качественных изменений микробных сообществ формирующихся уникальных ландшафтов. Сравнительный метагеномный анализ ДНК, выделенной из воды ручья и лужи Батагайского провала, показал схожесть основных таксонов, представленных в сообществах микроорганизмов. Вместе с тем микробные сообщества отличались качественным составом менее представленных таксонов. Метагеномный анализ воды из ручья и лужи Батагайского провала выявил высокий процент неидентифицируемых ридов и низкое содержание архей. На основании полученных данных нами предложен способ картирования филогенетического разнообразия микробных сообществ на основе современных методов метагеномного секвенирования в сочетании с GPS-позиционированием на местности. Способ филогенетического картирования микробных сообществ даст возможность провести таксономическое профилирование микробных сообществ и мониторинг их изменений в процессе формирования ландшафта Батагайского провала.

**Ключевые слова:** метагеномный анализ, микробная экология, филогенетическая карта**THEORETICAL APPROACH TO THE CREATION OF PHYLOGENETIC MAP MICROBIOME UNIQUE LANDSCAPE****<sup>1</sup>Zhurlov O.S., <sup>2</sup>Grudin D.A.**<sup>1</sup>*Institute Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of RAS, Orenburg, e-mail: jurlov1968@mail.ru;*<sup>2</sup>*Steppe Institute Ural Branch of RAS, Orenburg*

The study of microbial communities unique landscapes formed as a result of thermal erosion of soils complicated by the lack of instructional techniques study the dynamics of qualitative changes. Empirical choice of sampling points does not allow chronological monitoring qualitative changes of microbial communities formed of unique landscapes. Comparative analyses of metagenomic DNA extracted of water from creek and puddle the Batagayskiy failure showed similarity major taxa represented in the microbial communities. However, the microbial communities different to qualitative composition with low percentage of taxa. Metagenomic analysis of water from creek and puddle the Batagayskiy failure revealed a high percentage of unidentified reed and low archaea. Based on these data we have provided a method for mapping the phylogenetic diversity of microbial communities based on modern methods of metagenomic sequencing in combination with a GPS-positioning on the ground. The method of phylogenetic mapping of microbial communities will make it possible to conduct the taxonomic profiling of microbial communities and monitoring their changes during the formation of landscape the Batagayskiy failure.

**Keywords:** metagenomic analysis, microbial ecology, phylogenetic map

Исследование микробных сообществ термокарстовых ландшафтов Северо-Восточной Сибири является малоизученной проблемой микробной экологии. Образование уникальных ландшафтов связано с изменением климата и является результатом таяния вечной мерзлоты [4]. Природные сообщества, образующиеся на дне термокарстовых провалов, отличаются от сообществ, окружающих ландшафтов как своим видовым составом, так и разнообразием представленных в них видов. Кроме того, в процессе достаточно стремительного переотложения толщ вечной мерзлоты, на поверхность грунтов выходит ранее заключенная в ней органика, сохранившаяся в результате криоконсервации в условиях низкой микробиологической активности. Это

приводит к загрязнению органическими веществами водоемов, насыщению органикой формирующихся экосистем и включению ее в круговорот веществ [4, 6].

Батагайский провал – термокарстовое образование, расположенное в Верхоянском районе Якутии (Республика Саха) в окрестностях поселка Батагай, вдоль безымянного притока ручья Батагайка, впадающего в р. Яна. Образование термокарста берет начало с 1969 г., когда на его месте наблюдалась провальная форма рельефа, но более активное развитие процессы термоденудации получили с рубежа 1980–1990-х гг. [4]. Высота провала составляет 40 метров, а протяженность более 2 км. В результате интенсивной оттайки вечной мерзлоты в июле-августе происходят обвалы из верхних слоев

грунта вместе с растительностью, растущей на поверхности вдоль кромки термокастра и палеопочв с включениями ископаемой фауны из вскрытых термокастом толщ [5]. Рост отдельных участков провала достигает 7–15 м в год. В отличие от термокарстовых озер, способствующих выполаживанию дна и более равномерному распределению в пределах термокарстовых образований вещества, вносимого в результате термоденудации, Батагайский провал дренируется, что приводит к образованию на его дне пересеченного рельефа и постепенно формируются экосистемы внутри провала. Сукцессионные изменения растительного покрова дна провала наблюдаются от термоэрозионной промоины в центре провала к его кромке. Микробиологические сообщества провала, их динамика и распределение изучены слабо и представляют интерес в качестве микроиндикаторов процессов современного ландшафтообразования [3].

До появления метагеномных методов анализа изучение почвенных микробных сообществ было основано на выделении культур микроорганизмов и изучении их биологических свойств. Однако в результате исследований почвенного микробиома молекулярно-генетическими методами было обнаружено, что доля культивируемых бактерий может составлять менее 1% [24] состава микробных сообществ. С помощью метагеномных методов анализа были исследованы большие территории земной поверхности [10, 15, 16]. Однако в ряде случаев интерпретация результатов метагеномного анализа вызывает немало вопросов у исследователей [18, 23].

С появлением метагеномных методов исследования большинство ученых восприняло столь большое биоразнообразие микроорганизмов в достаточно бедных и экстремальных средах как существование «редкой биосферы» [21]. Ранее считалось, что объединение ридов в ОТЕ (оперативная таксономическая единица) является объединением ошибок ПЦР-амплификации и приводит к необъективным результатам секвенирования [20] и значительному завышению биоразнообразия микробных сообществ [9]. ПЦР-амплификация является и сегодня одним из слабых мест метагеномного анализа.

На этапе биоинформационного анализа фильтрация ошибок секвенирования имеет важное значение для интерпретации результатов, так как они могут быть связаны с контаминацией проб при подготовке

к ПЦР-амплификации, подготовке библиотеки или неточностями секвенирования. Зачастую это приводит к формированию большого количества химерных последовательностей, которые могут повлиять на распределение таксонов при секвенировании [8] или повышение количества неидентифицируемых ридов, особенно при анализе микробных сообществ малоизвестных территорий. Построение анализа, на основе гомологии с известными последовательностями нуклеотидов, из баз данных, существенно сдвигает результат исследования в сторону более известных таксонов. Это не только увеличивает количество неидентифицируемых ридов, но и затрудняет сопоставимость образцов.

В последнее время активно развивается новое направление молекулярно-генетических исследований – сравнительная метагеномика [15], изучающая экологическую обусловленность существования и взаимодействия сообществ микроорганизмов, расположенных на отдельных участках ландшафта. Делаются попытки с помощью методов сравнительной метагеномики разобраться в особенностях функционирования микробных сообществ, находящихся в разных экологических условиях [14]. Появляются новые, мощные инструменты для сравнительного метагеномного анализа микробных сообществ [17], на основе которого возможно построение моделей межмикробных взаимодействий в микробиоценозах.

Однако изучение влияния экологических факторов на микробное сообщество, зачастую ограничивается несколькими учитываемыми факторами, что приводит к отличиям результатов метагеномного анализа, полученных разными исследователями при анализе одних и тех же образцов грунта и воды.

Поэтому, несомненно, что для получения воспроизводимых результатов необходимо учитывать все (или большинство) экологические факторы, влияющие на качественный состав микробных сообществ. Кроме того, точки отбора проб планируются эмпирически и в большей степени носят характер зондирования территории [1, 2]. При этом они никак не связаны между собой и могут находиться на участках с различными физико-химическими условиями (химический состав почвы, pH грунта, микроклимат). Поэтому в каждом отдельном случае нельзя не учитывать особенности образования микробных сообществ ландшафтов (неравномерность распределения

рН, влажность почвы, распределение растительного покрова), приводящих к формированию «биогеографических узоров» [14] и биотических ядер экосистемы, являющихся источниками распространения микробных сообществ и ограничивающихся влиянием биотических и абиотических факторов окружающей среды. Зачастую результаты метагеномных исследований малоизученных территорий содержат значительное количество неидентифицируемых ридов, отсутствующих в базах данных.

Кроме того, наиболее популярными показателями, которые часто используются для сравнительного анализа микробных сообществ, полученных с помощью метагеномного секвенирования, являются индекс Шеннона, Чао и Симпсона [11]. Статистическая оценка биоразнообразия микробных сообществ, основанная на результате метагеномного анализа, адекватно отражает реальное соотношение микроорганизмов в сообществе лишь при учете всех таксонов, входящих в микробное сообщество. Учитывая большое количество неидентифицируемых ридов и значительное число некультивируемых в лабораторных условиях микроорганизмов, содержащихся в пробах воды и грунта, отобранных эмпирически, без учета топографического распределения микробных сообществ ландшафтов, результаты метагеномного анализа не могут в полной мере отражать реальную картину биоразнообразия микробных сообществ уникальных ландшафтов.

В связи с этим целью нашего исследования явилась разработка методических приемов отбора проб воды и грунта при исследовании уникальных ландшафтов Батагайского провала.

#### Материалы и методы исследования

В этой работе был проведен сравнительный метагеномный анализ воды отобранной из ручья и лужи Батагайского провала. Пробы воды отбирали из двух точек, находящихся на расстоянии 9 метров друг от друга, из ручья с частицами грунта, протекающего по дну Батагайского провала и лужи с элементами оттаивающей органики.

Пробы были отобраны в летне-осенний период 2014 года. После отбора пробы помещались в термоконтейнер и хранились там при температуре  $-5^{\circ}\text{C}$ . Для GPS-позиционирования использовали модель GPS-навигатора Garmin Oregon 650 (GPS + Glonass). Дальнейшие исследования проводили в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН. Пробы воды из ручья и лужи Батагайского провала, в объеме 300 мл, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore», США). Фильтры оставляли в холодильнике ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) до проведения 16S метагеномного анализа.

ДНК из проб воды выделяли методом химической экстракции [19], в модификации Бельковой и соавт. [7]. Каждый образец инкубировали в 300 мкл стерильного буфера для лизиса (20 ммоль/л ЭДТА, 14000 ммоль/л NaCl, 100 ммоль/л ТРИС HCl, pH 7.5) с добавлением 50 мкл лизоцима (100 мг/мл) и додецилсульфата натрия до 1%. Смесь инкубировали в течение 30 минут при  $60^{\circ}\text{C}$ . Экстрагировали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1) и смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24:1). ДНК в водной фазе осаждали ацетатом аммония (10 моль/л) и трехкратным объемом безводного этанола в течение ночи при  $20^{\circ}\text{C}$ . После центрифугирования и двукратной промывки 80%-ным этанолом ДНК высушивали и растворяли в TE-буфере. Чистоту ДНК проверяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Концентрацию ДНК оценивали на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies).

Подготовку библиотек ДНК и 16S секвенирование проводили в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН (Оренбург). 16S библиотеки ДНК получали в соответствии с руководством Illumina ([http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)), с использованием праймеров, ограничивающих V<sub>3</sub> и V<sub>4</sub> области гена SSU рибосомальной РНК (рРНК). Высокопроизводительное секвенирование (NGS) проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, USA) в центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов». Биоинформатическую обработку и анализ данных проводили с помощью программы USEARCH v8.0.1623\_win32. [12]. В результате дупликация и кластеризации последовательностей нуклеотидов их объединяли в ОТЕ (оперативные таксономические единицы) с уровнем филогенетического сходства 97%. Для обнаружения и удаления химер использовали программу UCHIME [12].

#### Результаты исследования и их обсуждение

В результате метагеномного анализа пробы воды из ручья (Проба № 1), протекающего на дне Батагайского провала, было получено 139565 ридов. В зависимости от их принадлежности к определенной таксономической группе риды распределились следующим образом: на филогенетическом уровне – 131580 (94,3%) ридов, на уровне классов – 127790 (91,6%), порядков – 122688 (87,9%), семейств – 110885 (79,5%), родов – 104836 (75,1%) и видов – 41650 (29,8%). В основном большинство ридов 139305 (99,8%) относилось к прокариотам, лишь 8 (0,01%) к археям и 252 (0,18%) к неизвестным таксонам.

На филогенетическом уровне все риды были собраны в 25 уникальных ОТЕ, 7 из которых представлены в таблице. Наибольший процент всех идентифицированных таксонов составляли филы Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Planctomycetes. Это соответствует основным широко распространенным таксонам встречающихся в почвах северных территорий. На уровне семейства все риды были

собраны в 211 ОТЕ, среди семи уникальных ОТЕ доминировали – Rhodocyclaceae, Rhodospirillaceae, Hyphomicrobiaceae и Legionellaceae. На видовом уровне идентифицировано 711 таксонов, 7 из них представлены в таблице. При этом на всех таксономических уровнях отмечался значительный рост относительного количества неидентифицируемых ридов. Так на филогенетическом уровне доля неидентифицированных ридов составляла 10,7%, семейств – 25,3%, а на видовом уровне количество неидентифицируемых ридов значительно выросло и составило более 70%. В дальнейшем, с помощью биоинформационного анализа, были удалены 489 химерных последовательностей и ридов содержащих менее 415 bp. В результате было собраны 16 уникальных ОТЕ, из них лишь 6 ОТЕ принадлежали к культивируемым бактериям и 10 ОТЕ к некультивируемым прокариотам (с достоверностью – 97%).

Пробу воды (Проба № 2) из лужи, с оттаивающей органикой, отбирали на расстоянии 9 метров от первой точки. При сравнении с первой пробой, общее количество идентифицированных прочтений было значительно ниже (128611 ридов). Однако различия в общем количестве прочтений не коснулись их таксономических соотношений. Все идентифицированные риды были распределены в соответствии с их таксономическими группами: филы – 121394 (94,4%), классы – 119698 (93,1%), порядки – 115451 (89,8%),

семейства – 101678 (79,1%), роды – 97848 (76,1%) и виды – 52821 (41,1%). Большинство идентифицируемых прочтений нуклеотидов относилось к прокариотам 128477 (99,9%), лишь 2 рида к археям и 132 (0,1%) к неклассифицируемым таксонам.

На филогенетическом уровне доминировали Proteobacteria, Chlamydiae, Firmicutes и Planctomycetes (таблица) и минорные филы (Tenericutes, Actinobacteria), а доля неклассифицируемых таксонов составила 10,5%. На уровне семейства мажорные таксоны были представлены – Rhabdochlamydiaceae, Hyphomicrobiaceae и Comamonadaceae, а количество не классифицируемых прочтений возросло до 25,6%, в сравнении с Пробой № 1. На уровне вида количество идентифицированных таксонов составляло всего лишь 12,5%. Среди них с наибольшей частотой встречались Candidatus Rhabdochlamydia crassificans, Phyllobacterium catacumbae и Desulfonatrum thiosulfatophilum, а неклассифицируемые риды составляли более 60%. С помощью биоинформационного анализа из 128611 ридов было собрано 918 ОТЕ и 667 химерных последовательностей (2,8%), из оставшихся удалены ОТЕ, содержащие менее 40 нуклеотидов. Риды, содержащие более 400 последовательностей нуклеотидов, объединены в 16 ОТЕ. Из них лишь 5 ОТЕ были идентифицированы как культивируемые бактерии, а 11 ОТЕ как некультивируемые (с достоверностью 97%).

Сравнительный анализ проб воды из ручья и лужи Багайского провала

Таксоны	Проба № 1	Проба № 2
Филы	1. Proteobacteria (66%) 2. Bacteroidetes (9,3%) 3. Firmicutes (6,1%) 4. Chlamydiae (1,7%) 5. Planctomycetes (1,5%) 6. Verrucomicrobia (2,8%) 7. Nitrospirae (1,7%)	1. Proteobacteria (54,2%) 2. Bacteroidetes (4,1%) 3. Firmicutes (9,1%) 4. Chlamydiae (14,0%) 5. Planctomycetes (1,9%) 6. Actinobacteria (3,1%) 7. Tenericutes (3,1%)
Семейства	1. Rhodocyclaceae (17,1%) 2. Legionellaceae (4,1%) 3. Hyphomicrobiaceae (4,9%) 4. Rhodospirillaceae (7,2%) 5. Sphingobacteriaceae (2,6%) 6. Chitinophagaceae (2,5%) 7. Thermoanaerobacteraceae (2,4%)	1. Rhodocyclaceae (2,7%) 2. Legionellaceae (2,7%) 3. Hyphomicrobiaceae (5,9%) 4. Rhabdochlamydiaceae (12,8%) 5. Comamonadaceae (5,9%) 6. Bacillaceae (4,7%) 7. Phyllobacteriaceae (2,9%)
Виды	1. Legionella pneumophila (2,5%) 2. Candidatus Rhabdochlamydia crassificans (1,4%) 3. Desulfonatrum thiosulfatophilum (1,4%) 4. Thermoanaerobacter inferii (1,8%) 5. Rhodothermus clarus (1,6%) 6. Pedobacter koreensis (1,2%) 7. Oleomonas sagaranensis (1,2%)	1. Legionella rowbothamii (0,8%) 2. Candidatus Rhabdochlamydia crassificans (12%) 3. Desulfonatrum thiosulfatophilum (2,2%) 4. Rhodoferax ferrireducens (0,7%) 5. Phyllobacterium catacumbae (2,7%) 6. Arthrospira fusiformis (1,1%) 7. Rhodoplanes roseus (0,9%)



На основании анализа полученных данных, содержащих большое количество неидентифицируемых ридов и различий в филогенетическом составе микробных сообществ, полученных из близлежащих точек, нами был предложен способ отбора проб (воды и грунта) для проведения метагеномного анализа микробных сообществ уникальных ландшафтов.

На первом этапе исследования формируется карта-схема географического объекта (Батагайский провал), в зависимости от площади с сеткой (ячейка – 9 м<sup>2</sup>) и равноудаленными точками (узлы сетки). Пробы грунта отбирают из равноудаленных точек (9, 18, 27 метров), в пределах окружности с центром в точке GPS-позиционирования и диаметром 1 метр (радиус 50 см), разделенной на 8 секторов с углом 45°. Отбор проб грунта производится стеклянными стерильными цилиндрами 2×10 см, на глубину 5 см. После отбора грунта лунка выемки грунта засыпается грунтом с краев лунки отбора. Контаминация проб бактериями с обуви исследователя в дальнейшем вносится в качестве негативного контроля. Систематизация данных метагеномного анализа с GPS-позиционированием позволит не только охарактеризовать микробные сообщества, находящиеся в равноудаленных точках, но и определить границы сообществ и осуществлять их хронологический мониторинг. Появление новых грунтов с увеличением площади провала за счет разрушения стен лёсса не нарушит систему GPS-позиционирования точек отбора проб и позволит отбирать пробы в той же точке, но уже изменившегося ландшафта.

Сравнительный филогенетический анализ двух проб воды, из ручья и лужи Батагайского провала, показал, что основными таксонами, образующими микробные сообщества Батагайского провала, являются представители фил Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes и Chlamydiae. Отличия филогенетического состава сообществ микроорганизмов были связаны с менее представленными филами (Verrucomicrobia, Nitrospirae, Tenericutes, Actinobacteria). Это свидетельствует об особенностях формирования качественного состава микробных сообществ на разных участках Батагайского провала.

Как неоднократно было показано, с помощью методов метагеномного анализа, биоразнообразии микробных сообществ почв представлено ограниченным числом мажорных таксонов, имеющих повсемест-

ное распространение, однако отличия характерны для качественного состава минорных таксонов и их топографического распределения. В этой связи несомненный интерес представляет изменение состава менее представленных таксонов при изменяющихся климатических условиях.

В последнее время активно развиваются методы биосенсорики территорий [22], т.е. использование природных бактериальных сообществ в качестве экологических датчиков (индикаторов), изменяющихся при загрязнении окружающей среды. Использование предложенного нами способа филогенетического картирования уникальных ландшафтов будет способствовать выявлению биосенсоров качественных изменений микробных сообществ, происходящих под действием биотических и абиотических факторов внешней среды.

Способ отбора проб грунта из равноудаленных точек будет способствовать анализу топографического распределения микробных сообществ уникальных ландшафтов Батагайского провала, а в сочетании с физико-химическим анализом позволит оценить влияние химического состава почв и воды на качественный состав микробных сообществ. Точная локация при отборе проб позволит выявить биологические ядра экосистемы уникальных ландшафтов и проводить мониторинг их изменений. В перспективе исследований, на основании полученных данных, можно будет составить геоинформационную систему «Микробные сообщества Батагайского провала», отражающую качественный состав микробных сообществ Батагайского провала, а снижение стоимости секвенирования приведет к доступности этого метода анализа [13].

Работа проведена в рамках проекта «Ландшафтно-экологическое обоснование организации национального природного парка на Новосибирских островах» программы фундаментальных исследований РАН 44П «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации».

*Работа была выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН.*

#### Список литературы

1. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Выделение ДНК из образцов почвы (методические указания). – СПб: ВНИИСХМ РАСХН, 2011. – 27 с.
2. ГОСТ 17.4.3.01-83. (СТ СЭВ 3847-82). Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. Введ.

с 01.07.84 по 01.01.89. – Москва: Изд-во стандартов, 1983. – 2 с.

3. Журлов О.С., Грудинин Д.А., Яковлев И.Г. Филогенетический 16S метагеномный анализ и антибиотикорезистентность психротолерантных бактерий, выделенных из грунтов Батагайского провала // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2015. – № 11. – С. 648–651.

4. Куницкий В.В., Сыромятников И.И., Ширрмейстер Л. и др. Льдистые породы и термоденудация в районе поселка Батагай (Янское плоскогорье, Восточная Сибирь)/ *Криосфера Земли*. – 2013. – Т. XVII. – № 1. – С. 56–68.

5. Лазарев П.А., Григорьев С.Е., Плотников В.В., Саввинов Г.Н. Находки уникальных останков туш лошади и бизона в Верхоянском районе Якутии / *Проблемы региональной экологии*. – 2011. – № 4. – С. 13–19.

6. Томирдиаро С.В. Вечная мерзлота и освоение горных стран и низменностей. – Магадан: Магаданское книжное издательство, 1972. – 173 с.

7. Belkova N.L., Dzyuba E.V., Sukhanova E.V., Khanaeva T.A. Adaptation of molecular genetic methods to study microorganisms associated with fish. *Inland Water Biol.* – 2008. – № 1(2). – P. 192–195.

8. Brodin J., Mild M., Hedskog C., et al. PCR-induced transitions are the major source of error in cleaned ultra-deep pyrosequencing data. *PLoS One*. 2013;8(7):e70388–e70388.

9. Brown S.P., Veach A.M., Rigdon-Huss A.R., Grond K., Lothamer K.L., Lickteig S.K. Scraping the bottom of the barrel: are rare high throughput sequences artifacts? *Fungal Ecol.* – 2014. – № 13. – P. 6–10.

10. Bryant J.A., Lamanna C., Morlon H. et al. Microbes on mountain sides: Contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 5. – P. 1505–1511.

11. Colwell R.K. Biodiversity: concepts, patterns, and measurement. In: Levin SA, ed. *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press, Princeton, N.J. – 2009. – P. 257–63.

12. Edgar RC Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. – 2010. – № 26(19). – P. 460–2461.

13. Eisen J.A. Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS Biol.* – 2007. – № 5(3): e82.

14. Fierer N., Morse J.L., Berthrong S.T. et al. Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology*. – 2007. – Vol. 88. – P. 2162–2173.

15. Fierer N, Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 626–631.

16. Horner-Devine MC, Bohannan B.J.M. Phylogenetic clustering and over dispersion in bacterial communities. *Ecology*. – 2006. – Vol. 87. – P. 100–108.

17. Kuntal B.K., Ghosh T.S., Mande S.S. Community-analyzer: a platform for visualizing and comparing microbial community structure across microbiomes. *Genomics*. – 2013. – Vol. 102. – Issue 4. – P. 409-18.

18. Lavire C., Normand, P., Alekhina, I., Bulat, S. et al. Presence of *Hydrogenophilus thermoluteolus* DNA in accretion ice in the subglacial Lake Vostok, Antarctica, assessed using rrs, cbb and hox. *Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 8. – P. 2106–2114.

19. 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*. – 2009. – № 13. – P. 411–423.

20. Rosen M.J., Callahan B.J., Fisher D.S., Holmes S.P. Denoising PCR-amplified metagenome data. *BMC Bioinformatics*. – 2012. – № 13(1). – P. 283.

21. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored «rare biosphere». *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – № 103(32). – P. 12115–20.

22. Smith M.B, Rocha A.M, Smillie C.S. et al. Natural bacterial communities serve as quantitative geochemical biosensors. *mBio*. – 2015. – № 6(3): e00326-15.

23. Shtarkman Y.M., Kocer Z.A., Edgar R. et al. Subglacial Lake Vostok (Antarctica) Accretion Ice Contains a Diverse Set of Sequences from Aquatic, Marine and Sediment-Inhabiting Bacteria and Eukarya. *PLoS ONE*. – 2013. – № 8(7): e67221.

24. Tyson G.W., Banfield J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends Microbiol.* – 2005. – № 13. – P. 411–415.