

アイスコアサンプルを対象とした蛍光顕微鏡による 微生物定量方法の検討

植竹 淳^{1,2*}・東久美子^{2,3}・本山秀明^{2,3}

Improved direct-count method by fluorescence microscope for low-biomass ice core

Jun Uetake^{1,2*}, Kumiko Goto-Azuma^{2,3} and Hideaki Motoyama^{2,3}

(2011年11月30日受付; 2012年1月11日受理)

Abstract: Ice cores recovered from ice sheets contain microorganisms that were transported to the surface of the ice sheet along with airborne dust. The abundance of microorganisms in ice cores, as measured by direct cell count under a fluorescence microscope, is generally lower than that in other aquatic environments. It is possible that the abundance of microorganisms in ice cores is underestimated due to the degradation of fluorescent dye or because non-specific fluorescence from mineral particles inhibits the fluorescence signal from microorganisms. To investigate this possibility, we tested 4 types of antifade solution and 19 types of fluorescence dye, and selected the best combination in terms of prolonging the fluorescent signal from microorganisms and distinguishing biological signals from noise produced by non-specific particles. The results show that the optimal combination of solution and dye for cell counts of scarce microorganisms in ice cores is the nuclear acid dye “YOYO-1” (Molecular Probes[®]) and the antifade solution “EverBrite Mounting Medium” (Biotium).

要旨: 氷床アイスコア中には、鉱物粒子と共に輸送されてきた微生物が含まれる事が知られている。これら微生物の細胞数の計測には、蛍光顕微鏡による直接観察法が用いられるが、細胞数が少ないアイスコア試料では蛍光染色試薬の退色により数を過小評価しやすい一方で、含まれる鉱物などの非特異的な蛍光により過大評価しやすいため、定量的に細胞数を測定する事が困難である。本研究では5種の退色防止試薬から退色が最も少ないもの、19種の蛍光染色試薬から非特異的な蛍光との選別が容易な試薬をそれぞれ選出し、細胞壁構造の異なる6種の微生物株を用いて染色選択性を確認し、鉱物の混入による染色への影響を調べた。その結果、退色防止試薬にはEverBrite Mounting Medium (Biotium製)、蛍光染色試薬にはYOYO-1 (Molecular Probes[®])が最も適していることがわかり、鉱物が混入する場合は濃度をやや高めに調整することで定量性が高くなる事が示された。

¹ 新領域融合研究センター。Transdisciplinary Research Integration Center, Central place 2nd floor, 4-3-13 Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105-0001.

² 情報・システム研究機構国立極地研究所。National Institute of Polar Research, Research Organization of Information and Systems, Midori-cho 10-3, Tachikawa, Tokyo 190-8518.

³ 総合研究大学院大学複合科学研究科極域科学専攻。Department of Polar Science, School of Multidisciplinary Sciences, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Midori-cho 10-3, Tachikawa, Tokyo 190-8518.

* Corresponding author. E-mail: juetake@nipr.ac.jp

1. はじめに

氷床アイスコアは、過去数十万年以上の気温や大気環境変動の記録を明瞭に保存しており (Watanabe *et al.*, 2003), 大気輸送されてきた鉱物粒子などの風送粒子は乾燥化が進んだ氷期の末期に多くなることが報告されている (Fujii *et al.*, 2003). このような氷期末期のアイスコア試料には、微生物も風送粒子と同じタイミングで氷床に多く堆積している可能性がある (Abyzov *et al.*, 1998). 氷床に飛来してくる風送粒子の量や発生源は氷期と間氷期とでは異なることが報告されており (Revel-Rolland *et al.*, 2006), 周辺の大陸起源と考えられる微生物も風送粒子と同様に、量や発生源が変化していると考えられる. このため、微生物の量や種類といった情報は、これまでのアイスコア解析では明らかにされなかった過去の氷床周辺の微生物相や環境の状態を示すシグナルになると考えられる.

アイスコアサンプルからの細菌数等の直接的な検出法には、メンブレンに濾過した微生物を蛍光顕微鏡でカウントする直接計測法 (Christner *et al.*, 2005) や、レーザーを照射したときのシグナルにより微生物を選別するフローサイトメーターを用いた方法 (Miteva *et al.*, 2009) などが報告されている. フローサイトメーターを用いた方法では、微生物と非微生物粒子の分別が困難であり、特に細胞数が少ないアイスコアにおいては誤差が多い. そのため、少数の微生物を定量的にカウントできる直接計測法がアイスコアにおいて有力な手法であると考えられる.

一般に細菌数等の計測を目的とした染色では、DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) や SYBR Green I や SYBR Gold といった、核酸に特異的に結合する蛍光染色試薬が用いられる事が多いが、環境サンプルの計測においては二つの問題点が挙げられる. まず、DAPI など一部の蛍光染色試薬は、強い励起光の照射により急速に分解されてしまうことが知られている. そのため、退色による蛍光シグナルの急速な減少により微生物数を過小評価してしまう恐れがある. もう一つは、対象となる染色特異部位 (核酸、細胞膜、タンパク質など) 以外に、試料中に含まれる有機物片や鉱物などに非特異的に蛍光染色試薬が結合し、蛍光を発してしまう現象がある. そのため、これらによるノイズを計測し、微生物数を過大評価してしまう可能性がある. このような現象は微生物細胞数が少ないアイスコア試料において、定量性に大きな影響を与えることが予想される. そこで、アイスコア試料の微生物計測においては非特異的な蛍光と微生物を区別できるように、退色が少なく、蛍光シグナルの強い蛍光染色試薬を利用することが望ましい. しかしながら、このような観点で蛍光染色試薬を検討した報告はこれまで全くなかった.

そこで本研究では、鉱物粒子を多く含み微生物濃度の低いアイスコアサンプルから、蛍光顕微鏡を用いた直接計測法で微生物を高感度で検出する方法の改善を目的として、5種の退色防止試薬と19種の蛍光染色試薬から1) 光退色耐性が高くシグナルの強い、2) グラム陽性菌、グラム陰性菌、アーキアなどさまざまな膜構造を持つ微生物をまんべんなく染色可能

で、3) 鉱物を混入させても微生物のシグナルを明瞭に判断できる、という条件を満たす退色防止試薬と蛍光染色試薬の選定を行った。

2. 方法

2.1. 顕微鏡観察

細菌株懸濁液に全量の3%となるようにホルマリンを加え、一晚暗所にて放置した。この懸濁液1 mlに、蛍光染色試薬をメーカー推奨の一般的な濃度(表1)に加え、アルミ箔で遮蔽して氷上で10分間染色後、ガラスファンネル(KGS-04, アドバンテック製)を使用してフィルター(アイソポア: GTBP01300, ミリポア製)上に濾過濃縮させた。濾過後、フィルターの上に約20 μ lの退色防止試薬を加えてカバーガラスで封じた。フィルター上の微生物は、蛍光顕微鏡(IX81, オリパス製)を用いて、倍率1000倍で直接計測を行った。蛍光装置のミラーユニットにはU-MNUA2, U-MNIB3, U-MWIGA3の3種をそれぞれ蛍光染色試薬の励起及び蛍光特性に合わせて選択した(表1)。U-MNUA2とU-MWIGA3はバンドパスフィルターユニットで、それぞれダイクロイックミラー400 nm, 570 nm, 励起フィルター360–370 nm, 530–550 nm, 吸収フィルター420–460 nm, 575 nm–625 nmにより構成されている。またU-MNIB3はロングパスフィルターで、ダイクロイックミラー505 nm, 励起フィルター470–495 nm, 吸収フィルター510 nm以上で構成されている。

2.2. 染色の評価方法

2.2.1. 退色防止試薬の選定

退色防止試薬には、Slow Fade Antifade, SlowFade Gold (Molecular probes[®]), VECTASHIELD (Vector Laboratories 製), EverBrite Mounting Medium (Biotium 製)の4種を用いた。選定には1倍濃度のSYBR Green (Molecular Probes[®]), 独立行政法人理化学研究所, バイオリソースセンター微生物材料開発室(Japan Collection of Microorganisms: JCM)より提供された*Methylobacterium radiotolerans* (JCM 2831)株を使用した。フィルター上の試料に励起光を当て始めた時を0分とし、以降、同じ視野で励起光を当て続け、5分後と10分後を1セットとして計5セットのカウントを行った。0分時のカウント数に対して、5分後と10分後のカウント数の割合を退色耐性率(%)として表した。

2.2.2. 蛍光染色試薬の選定

表1に、本研究で使用した12種類の核酸染色試薬, 1種類のタンパク質染色試薬, 6種類の細胞膜染色試薬, 計19種について、励起波長, 蛍光波長, 使用したミラーユニットを示す。*Methylobacterium radiotolerans*を染色後に退色防止試薬で処理し、退色防止試薬の選定法と同様に、励起光を当て始めた時を0分とし、照射開始から5分後と10分後を1セットとして計5セットのカウントを行い、退色耐性率(%)を求めた。

表 1 選定を行った 19 種類の蛍光染色試薬と観察に用いたミラーユニット

Table 1. Details of the 19 types of fluorescent dye tested in this analysis, and the type of mirror unit of the microscope.

Fluorescence dye	Fluorescence region	Concentration * Dilution rate	Excitation wave length (nm)	Fluorescence wave length (nm)	Mirror unit
DAPI	Nuclear acid	30 nM	358	461	U-MNUA2
Acridine orange	Nuclear acid	10 μ g/mL	500	526	U-MWIGA3
Propidium iodide	Nuclear acid	500 nM	535	617	U-MWIGA3
SYTO [®] 9	Nuclear acid	50 nM	483	503	U-MNIB3
SYTO [®] 13	Nuclear acid	50 nM	488	509	U-MNIB3
SYBR Green I	Nuclear acid	$\times 1$	494	521	U-MNIB3
SYBR Green II	Nuclear acid	$\times 1$	497	520	U-MNIB3
SYBR GOLD	Nuclear acid	$\times 1$	495	537	U-MNIB3
SYTOX-Green	Nuclear acid	$\times 1$	504	523	U-MNIB3
TOTO [®] -1	Nuclear acid	10 nM	514	533	U-MNIB3
YOYO [®] -1	Nuclear acid	10 nM	491	509	U-MNIB3
LDS751	Nuclear acid	$\times 1$	543	712	U-MWIGA3
SYPRO [®] Red	Protain	$\times 1$	550	630	U-MWIGA3
FM1-43	Cell membrem	5 μ g/mL	479	598	U-MNIB3
FM1-43FX	Cell membrem	5 μ g/mL	479	598	U-MNIB3
FM2-10	Cell membrem	5 μ g/mL	485	560	U-MWIGA3
FM4-64	Cell membrem	5 μ g/mL	515	640	U-MWIGA3
FM4-64FX	Cell membrem	5 μ g/mL	515	640	U-MWIGA3
FMS-95	Cell membrem	5 μ g/mL	565	690	U-MWIGA3

2.2.3. 選定に用いた微生物株

選定には JCM より提供されたグラム陽性菌の *Bacillus subtilis* (JCM 2499) と *Methylobacterium extorquens* (JCM 2802), グラム陰性菌の *Paenibacillus alginolyticus* (JCM 9068) と *Pseudomonas alcaligenes* (JCM 20561), アーキアの *Halobacterium salinarum* (JCM 8978) と *Methanosaeta concili* (JCM 10134), 計 6 種の菌株を用いた。

すべての菌株の細菌株懸濁液（細胞濃度不定）を二等分し、それぞれに蛍光染色試薬を加えて染色、濾過を行い、退色防止試薬で処理して、それぞれ 5 セットの計測を行った。

2.2.4. 鉱物混入の影響

選定には 3 種の鉱物（黄砂, JSC MARS-1A, モンモリロナイト）を使用した。黄砂は 2010 年 4 月 18 日に、立山室堂平の積雪表面約 5.8m 深の黄砂濃度の非常に高い層から採取した。JSC MARS-1A (Orbital Technology 製) はハワイ島から採取されたパラゴナイトの火山砕屑物であり、火星の模擬土壌として販売されている。モンモリロナイトは粘土鉱物の一種であり、クニピア F (クニミネ工業製) を使用した。これらの濃度不定の懸濁液に、細胞濃度不定の *Methylobacterium extorquens* (JCM 2802) 株懸濁液をそれぞれ等量加え、蛍光染色試薬には濃度 1 倍と 5 倍の YOYO-1, 退色防止試薬には EverBrite を使用して、それぞれ 5 視野分の計測を行った。

3. 結果と考察

3.1. 退色防止試薬の選定

図1に、4種類の退色防止試薬の励起光照射前から励起光照射開始5分後と10分後の退色耐性率の変化を示す。この結果から、すべての退色防止試薬について、照射時間が長くなるほど退色耐性率が減少していることが明らかになった。今回選択した4種類の退色防止試薬の中では、EverBrite Mounting Mediumが5分後、10分後共に最も安定して退色耐性率が高かった。このため、以降の実験における退色防止試薬には、EverBrite Mounting Mediumを使用した。

3.2. 蛍光染色試薬の選定

図2に、12種類の核酸染色試薬と1種類のタンパク質染色試薬、図3に、6種類の細胞膜染色試薬の励起光照射開始5分後と10分後の退色耐性率の変化を示す。この結果、SYTO-9、SYBR Green II, LDS751, FM4-64, FM4-64FX, FM5-95の6種は、5分後には完全に蛍光シグナルを検出することができなくなっており、DAPI, FM2-10では10分後には検出不可能であった。また、多くの蛍光染色試薬において5分後には照射前の60-80%程度、10分後には30-

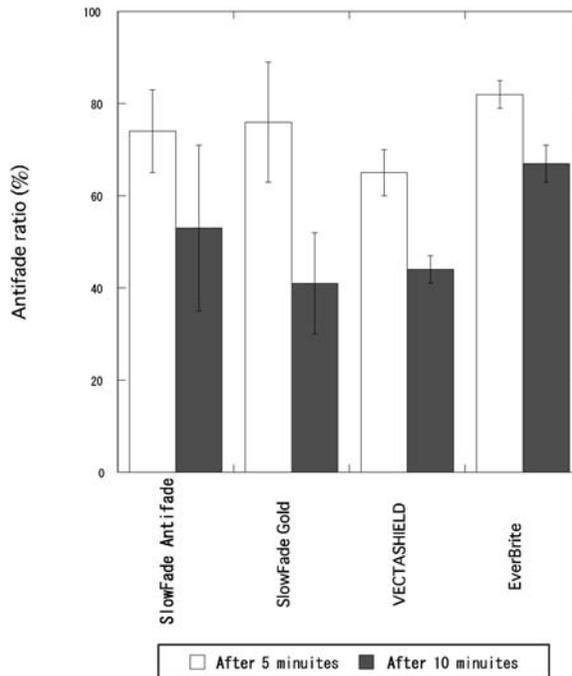


図1 4種類の退色防止試薬の励起光照射から5分後、10分後の退色耐性率。エラーバーは5サンプルの標準偏差。

Fig. 1. Antifade ratio of four types of antifade solution after 5 and 10 minutes of excitation (light absorption). Error bar = one standard deviation.

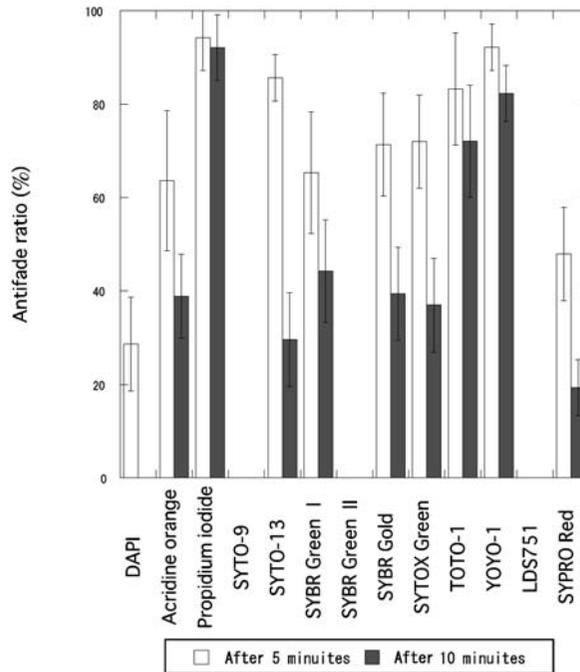


図 2 12 種類の核酸染色試薬と 1 種類のタンパク染色試薬の励起光照射から 5 分後、10 分後の退色耐性率。エラーバーは 5 サンプルの標準偏差。
 Fig. 2. Antifade ratio of 12 types of nuclear acid dye and 1 protein dye after 5 and 10 minutes of excitation (light absorption). Error bar = one standard deviation.

50% 程度になっていた。一方で、Propidium iodide, YOYO-1, FM1-43FX は、10 分間の照射でも退色耐性率 92%, 82%, 92% と非常に高かった。しかしながら、Propidium iodide は蛍光のシグナルが弱く、バックグラウンドが高いために判別がしにくいことから、以後の実験にはこれを除いた YOYO-1 と FM1-43FX を使用した。

3.3. 微生物の染色選択性

図 4 に、膜構造の異なるグラム陽性菌 (*Bacillus subtilis*, *Methylobacterium extorquens*), グラム陰性菌 (*Paenibacillus alginolyticus*, *Pseudomonas alcaligenes*), アーキア (*Halobacterium salinarum*) を含む 5 種の培養株を、YOYO-1 と FM1-43FX でそれぞれ染色した時のカウント数を示す。この結果、*Bacillus subtilis* ではカウント数は両者で同程度であったが、*Methylobacterium extorquens* と *Pseudomonas alcaligenes* では FM1-43FX が若干多く、*Paenibacillus alginolyticus* では FM1-43FX のカウント数が YOYO-1 の半分程度であった。また、*Halobacterium salinarum* では FM1-43FX でのカウントが全くできなかった。これらの結果から、核酸を染色する YOYO-1 と細胞膜を染色する FM1-43FX では、同じサンプルを観察してもカウント

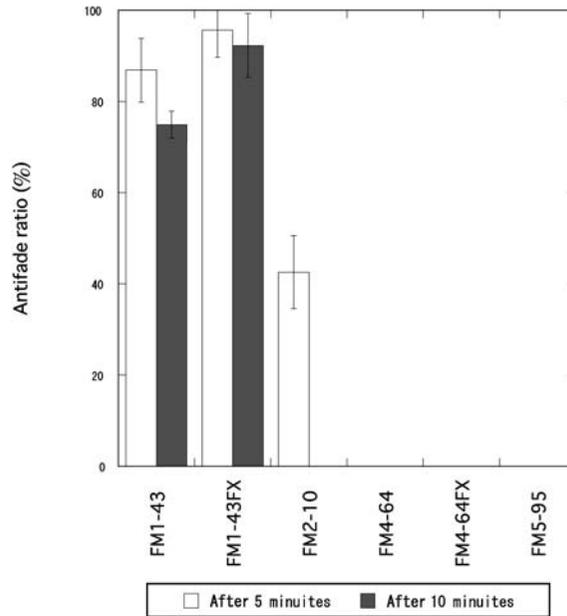


図 3 6種類の膜染色試薬の励起光照射から5分後、10分後の退色耐性率。エラーバーは5サンプルの標準偏差。

Fig. 3. Antifade ratio of six types of cell membrane dye after 5 and 10 minutes of excitation (light absorption). Error bar = one standard deviation.

数が異なる場合があることが示された。今回の観察では、培養株の内部に核酸は存在しないが細胞膜だけが存在している状態のものも多く、*Methylobacterium extorquens* と *Pseudomonas alcaligenes* では細胞膜だけの遺骸も計測していたため、若干多めに計測していたと考えられる。一方で、*Paenibacillus alginolyticus*, *Halobacterium salinarum* では明らかにFM1-43FXでは染色できていない細胞が多く含まれていたと考えられる。

一般的に、グラム陽性菌の細胞壁は一層の厚いペプチドグリカン層から構成されているのに対し、グラム陰性菌では何層かの薄いペプチドグリカン層の外側を、外膜と呼ばれるリポ多糖を含んだ脂質二重膜が覆っている。それに対し、アーキアの細胞壁はS層と呼ばれるタンパク質、糖タンパクなどで構成されている。*Paenibacillus alginolyticus*, *Halobacterium salinarum* で膜染色がされなかった理由は、これらの細胞壁の構造に起因している可能性があるが、すべてのグラム陰性菌、アーキアが膜染色されないわけではない。本研究では、グラム陰性菌の *Pseudomonas alcaligenes*, アーキアの *Methanosaeta concili* でも同様に計測を行ったが、FM1-43FXによる膜染色でのカウントは可能であったことから、個々の微生物の細胞壁の特性が染色を阻害している可能性がある。このことから、どのような種類の微生物が含まれているのか未知のアイスコア試料に対しては、すべての種を一様に染色することが

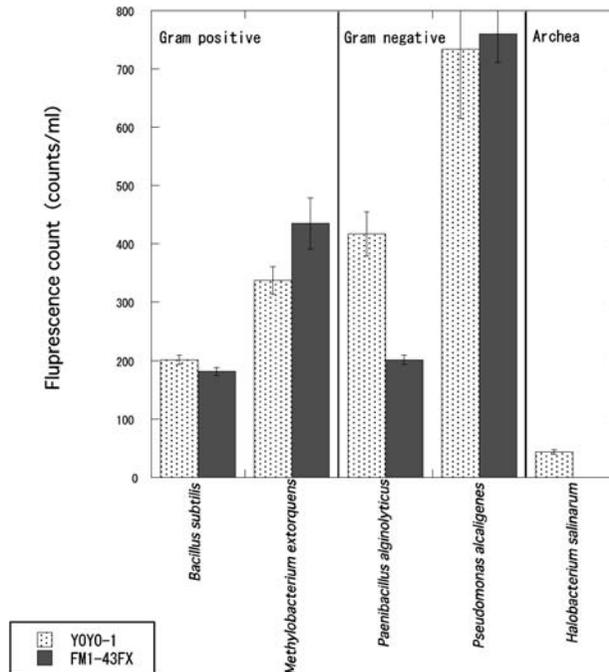


図 4 5 種類の培養菌株の核酸染色試薬 YOYO-1 と膜染色試薬 FMI-43FX でのカウント数の違い。エラーバーは 5 サンプルの標準偏差。

Fig. 4. Comparison of fluorescence count between YOYO-1 and FMI-43FX in gram positive and gram negative bacteria, and archea. Error bar = one standard deviation.

可能な核酸染色の方が、膜染色よりも偏りが無く、適切であることが示された。そのため微生物の染色には YOYO-1 を選定し、以後の実験に用いた。

3.4. 鉍物混入による染色への影響

図 5 に、*Methylobacterium extorquens* 細胞懸濁液に黄砂、MARS-1A、モンモリロナイトを加えた時のブランク（鉍物を加えない細胞懸濁液）からのカウント率を示す。この結果、どの鉍物を入れた場合でも YOYO-1 濃度 1 倍（最終濃度 20 nM）では著しいカウント数の減少が見られた。しかし、YOYO-1 の濃度を 5 倍（最終濃度 100 nM）にすると、黄砂と MARS-1A に関してはブランクと同程度のカウント数が得られた。一方で、モンモリロナイトを加えたサンプルは濃度 1 倍、5 倍のいずれにおいても全く蛍光のシグナルを発せず、カウントすることができなかった。

蛍光染色試薬の鉍物などへの非特異的な染色は、海洋堆積物などの環境サンプルから報告されており (Morono *et al.*, 2009)、これらが微生物の発する蛍光シグナルと類似していると、識別が困難な場合がある。本研究では、非特異的な蛍光と微生物からの蛍光を区別するため

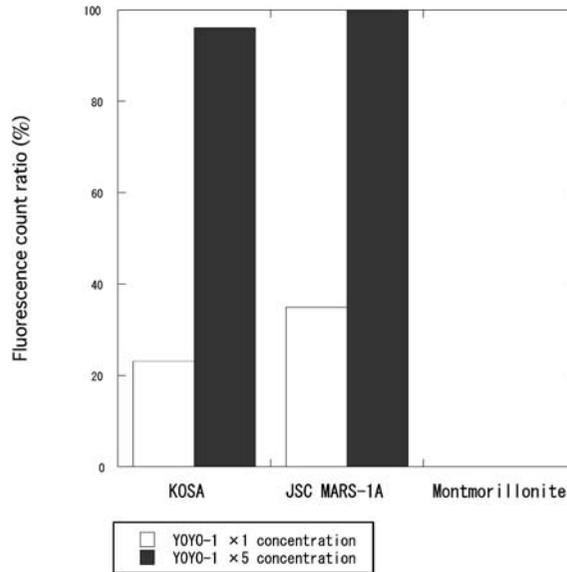


図 5 *Methylobacterium extorquens* 細胞懸濁液に 3 種類の鉱物を混入させた時の YOYO-1 濃度変化によるカウント率

Fig. 5. Fluorescence count ratio of *Methylobacterium extorquens* isolate with three types of mineral particles in two different concentrations of YOYO-1.

に約 510 nm 以上の蛍光をすべて透過させるロングパスフィルター (U-MNIB3) を使用したことから、鉱物と微生物の発する蛍光波長の違いを目視で識別することが可能となった。濃度 5 倍ではほとんどカウント数に変化がないことから、鉱物混入により引き起こされる可能性のあるカウント数の過大評価はほぼ影響していないと考えられ、用いた蛍光染色試薬とロングパスフィルターにより目視で正確な定量を行えることが示された。

また一方で、濃度 1 倍の条件では明らかにブランクよりもカウント数が少なく、過小評価していることが新たに判明した。蛍光染色試薬の濃度を濃くすると改善の傾向が見られ、このようなサンプルでは濃度の調整が効果的であることが示された。詳細は不明であるが、鉱物粒子の表面や内部に優先的に染色試薬が吸着され、溶液中に含まれる染色試薬の濃度が下がり、目的の微生物細胞を染色するのに必要な試薬濃度が十分でなかった可能性が考えられる。粘土鉱物は一般的に層状構造からなり、層間の空隙に小さな分子を取り込みやすい性質を持っている。本研究で用いたモンモリロナイトは、層状ケイ酸塩鉱物の一種であり、ケイ酸四面体層—アルミナ八面体層—ケイ酸四面体層の 3 層からなる結晶層が層状に積み重なる構造となっている。このため、表面積が大きくなり特に物質を吸着しやすい能力を持つ。本研究では、モンモリロナイトを加えたサンプルで、蛍光染色試薬濃度を濃くしても蛍光のシグナルを全く検出することができなかったことから、使用した蛍光染色試薬がモンモリロナ

イトの構造内に完全に吸着した可能性が考えられる。これらの事例から、鉍物が多く入っているサンプルにおいては、鉍物によるノイズの影響が出ない程度に蛍光染色試薬濃度の調整が必要であることが明らかとなった。特に、粘土鉍物を多く含む可能性のある氷床底面部の氷や、粘土質の土壌が多いサンプルでは注意をする必要がある。

4. ま と め

これまで、アイスコアや氷床下湖の凍結水中における微生物の染色には SYBR Green I (Karl *et al.*, 1999), SYBR Gold (Christner *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2008), Live/Dead BacLight bacteria viability kit (SYTO9 and PI) (D'Elia *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008) などが使用されてきた。しかし、本研究の結果から細胞数が少なく、鉍物粒子などを多く含むアイスコアサンプルから蛍光顕微鏡を用いて高感度で微生物を検出するためには、核酸染色試薬 YOYO-1 と退色防止試薬 EverBrite の組み合わせが、さまざまな膜構造をもった微生物を染色でき、かつ鉍物を混入した場合にもより正確に定量が可能であることが示された。

また、鉍物が多く混入した場合、蛍光染色試薬濃度の低下によるカウント数の過小評価を引き起こす恐れがあるため、サンプルに含まれる粒子の濃度に合わせて蛍光染色試薬の濃度を一般的なプロトコルよりも高く調整することが効果的であると考えられた。

本研究では、蛍光顕微鏡を用いた肉眼での直接計測法を用いたが、この方法には観察者によってカウントのばらつきなどが生じる問題があり、より客観的に解析するためには顕微鏡画像の画像解析法が好ましい場合もある。本研究では、すべての条件において共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, オリンパス製) と画像解析法を用いたカウントも行っていた。微生物から発せられる蛍光のスペクトルのピーク部分のみをスポット的 (数 nm ~ 数十 nm の範囲) に検出し、微生物の発するシグナルと鉍物による非特異的なシグナルの明確な区別が可能であったが、鉍物の一部分から発せられるノイズを完全に除去することは困難で、カウント数を過大評価する傾向があった。そのため、画像解析法はアイスコア試料のような微生物量がきわめて少ない試料を対象とした研究には適さないことが明らかとなった。しかし一方で、培養株や細胞濃度の高いサンプルにおいては十分に適用可能な手法であり、直接観察法よりも客観的なデータが得られると考えられる。

謝 辞

染色条件の検討で使用した立山積雪中の黄砂層は、立山積雪研究会の実施する積雪断面調査のピット断面から採取させていただきました。ピット掘削に参加された皆様に感謝致します。顕微鏡観察でご支援をいただきました。新領域融合研究センターの米村恵子さんに深く感謝致します。この研究は、科学研究費補助金 (「グリーンランド深層氷床コアから見た過去 15 万年の温暖化とその影響評価」基盤研究 (S), 研究代表者: 東久美子), 新領域融合研

究センターの新領域融合プロジェクト研究（「地球環境変動と地球生命システム学の構築」研究代表者：本山秀明）の一環として実施致しました。

文 献

- Abyzov, S.S., Mitskevich, I.N. and Poglazova, M.N. (1998): Microflora of the deep glacier horizons of central Antarctica. *Microbiology*, **67**, 451–458.
- Christner, B.C., Mikucki, J.A., Foreman, C.M., Denson, J. and Prisco, J.C. (2005): Glacial ice cores: A model system for developing extraterrestrial decontamination protocols. *Icarus*, **174**, 572–584.
- D'Elia, T., Veerapaneni, R. and Rogers, S.O. (2008): Isolation of microbes from Lake Vostok accretion ice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4962–4965.
- Fujii, Y., Kohno, M., Matoba, S., Motoyama, H. and Watanabe, O. (2003): A 320 k-year record of microparticles in the Dome Fuji, Antarctica ice core measured by laser-light scattering. *Mem. Natl Inst. Polar Res.*, **57**, 46–62.
- Karl, D.M., Bird, D.F., Björkman, K., Houlihan, T., Shackelford, R. and Tupas, L. (1999): Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. *Science*, **286**, 2144, doi: 10.1126/science.286.5447.2144.
- Miteva, V., Teacher, C., Sowers, T. and Brenchley, J. (2009): Comparison of the microbial diversity at different depths of the GISP2 Greenland ice core in relationship to deposition climates. *Environ. Microbiol.*, **11**, 640–656, doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01835.x
- Morono, Y., Terada, T., Masui, N. and Inagaki, F. (2009): Discriminative detection and enumeration of microbial life in marine subsurface sediments. *The ISME J.*, **3**, 503–511.
- Revel-Rolland, M., De Deckker, P., Delmonte, B. and Hesse, P.P. (2006): Eastern Australia: A possible source of dust in East Antarctica interglacial ice. *Earth. Planet. Sc. Lett.*, **249**, 1–13.
- Watanabe, O., Jouzel, J., Johnsen, S., Parrenin, F. and Shoji, H. and Yoshida, N. (2003): Homogeneous climate variability across East Antarctica over the past three glacial cycles. *Nature*, **422**, 509–512, doi: 10.1038/nature01525.
- Zhang, X.F., Yao, T.D., Tian, L.D., Xu, S.J. and An, L.Z. (2008): Phylogenetic and physiological diversity of bacteria isolated from Puruogangri ice core. *Microb. Ecol.*, **55**, 476–488, doi: 10.1007/s00248-007-9293-3.