

Ошкин Игорь Юрьевич

**МИКРОБНЫЕ АГЕНТЫ ОКИСЛЕНИЯ МЕТАНА В ХОЛОДНЫХ СИПАХ
ОСАДКОВ СЕВЕРНЫХ РЕК**

Специальность 03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в лаборатории микробиологии болотных экосистем Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель

доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
микробиологии болотных экосистем
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,
Дедыш Светлана Николаевна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории радиоактивных изотопов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина
Российской академии наук (ИБФМ РАН)
Хмеленина Валентина Николаевна

кандидат геолого-минералогических наук,
заведующая лабораторией криологии почв
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт физико-химических
и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП РАН)
Ривкина Елизавета Михайловна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Лимнологический институт Сибирского отделения РАН

Защита состоится 21 июня 2017 года в 11-00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке ИНМИ РАН по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Высокий интерес мирового научного сообщества к проблемам глобального потепления позволил за последние два десятилетия идентифицировать и достаточно детально охарактеризовать ряд крупнейших источников поступления парникового газа метана (CH_4) в атмосферу Земли (Conrad, 2009; Kirschke *et al.*, 2013). Из общего потока метана, оцениваемого ныне в $550\text{--}678 \text{ Тг г}^{-1}$, крупнейшим источником являются болотные экосистемы, продуцирующие $175\text{--}217 \text{ Тг CH}_4 \text{ г}^{-1}$ (Kirschke *et al.*, 2013; Ciais *et al.*, 2013). Вторыми по мощности являются геологические источники, эмиссия CH_4 из которых составляет около 50 Тг г^{-1} , потенциально достигая 80 Тг г^{-1} (Etiope *et al.*, 2008). Эти источники связаны с углеводородсодержащими осадочными бассейнами: природный газ выходит из них в атмосферу через вышележащую почву как повсеместно, так и по отдельным каналам, заканчивающимся макросипами (грязевыми вулканами и другими типами сипов) и микросипами.

Данные по распространению источников геологического метана на различных континентах остаются неполными. До последнего времени наибольшее внимание было уделено исследованию микросипов и грязевых вулканов в южных регионах, в том числе в Италии, Греции, Румынии, Азербайджане, Туркмении, о. Ява и Тайвань (Etiope *et al.*, 2004, 2006, 2007). Недавно, однако, фокус внимания сместился в северные регионы. Так, на Аляске в районе отступающих ледников и зон таяния вечной мерзлоты было обнаружено более 150000 выходов газа на поверхность (Walter Anthony *et al.*, 2012). Для этих сипов были характерны аномально высокие потоки термогенного метана (до $8 \text{ т CH}_4 \text{ сип}^{-1} \text{ д}^{-1}$). В Гренландии в зоне отступления ледового щита также были обнаружены многочисленные сипы, причем выделяющийся из них метан был биогенного происхождения (Walter Anthony *et al.*, 2012). Эти открытия показывают, что эмиссия из геологических источников имеет тенденцию к возрастанию вследствие таяния ледового щита, ледников и «вечной» мерзлоты в северных регионах (Stepanenko *et al.*, 2011; Etiope, 2012). Поскольку в России площади покрытых льдом нефтеносных и газоносных осадочных пород весьма велики, то здесь можно ожидать и значительные площади распространения сипов.

Микробные сообщества, формирующиеся в локусах наземных метановых сипов и снижающие эмиссию CH_4 из этих источников, изучены слабо. Наибольший объем информации был получен для микробных сообществ грязевых вулканов стран с теплым климатом (Yakimov *et al.*, 2002; Alain *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2012). Единственная работа по исследованию микробного сообщества холодного наземного сипа в Арктике была выполнена канадскими исследователями (Niederberger *et al.*, 2010). Объектом этого исследования, однако, был гиперсоленый сип, в котором отсутствовали бактериальные агенты окисления метана, и процесс окисления CH_4 осуществлялся археями группы ANME-1a. Таким образом, процессы микробного окисления метана, выделяющегося из пресноводных наземных сипов, остаются неизученными. Знания о метанотрофных бактериях, способных активно

функционировать в холодных местообитаниях, также весьма фрагментарны. На сегодняшний день описаны только два представителя облигатно психрофильных аэробных метанотрофов: выделенный из антарктического озера *Methylosphaera hansonii* (Bowman *et al.*, 1997) и выделенный из тундровой почвы *Methylobacter psychrophilus* (Omel'chenko *et al.*, 1996). Оба микроорганизма принадлежат к семейству *Methylococcaceae* класса *Gammaproteobacteria* (I тип метанотрофных бактерий). Число известных психротолерантных метанотрофов также ограничено. Среди них есть представители как I типа метанотрофов (*Methylobacter tundripaludum*, *Methylomonas scandinavica*), так и II типа метанотрофов, относящихся к классу *Alphaproteobacteria* (*Methylocystis rosea*, *Methylocella tundrae*). Оптимум роста этих микроорганизмов, однако, находится в интервале от 15 до 20 °С.

Объектом настоящего исследования являлись грязевые «микровулканы» или сипы (с диаметром жерла порядка первых сантиметров), которые были обнаружены в Западно-Сибирской средней тайге, в поймах небольших рек, являющихся притоками Оби и Иртыша недалеко от места их слияния (Glagolev *et al.*, 2011). Высокие концентрации доступного метана в локусах этих сипов создают благоприятные условия для активного развития метанотрофных микроорганизмов, однако низкие температуры (+3 - +5°С) выступают в роли селективного фактора, ограничивающего развитие хорошо изученных мезофильных метанотрофов. Настоящая работа, таким образом, была предпринята для оценки скоростей эмиссии CH₄ из метановых сипов Обско-Иртышской поймы и идентификации ключевых микробных агентов, ответственных за снижение потока метана из этих источников.

Цели и задачи исследования

Цель работы – исследование метанотрофных сообществ, развивающихся в холодных метановых сипах в долине реки Мухринской (Ханты-Мансийский А.О.) и идентификация ключевых микробных агентов, ответственных за окисление CH₄ в этих сообществах.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценка скоростей эмиссии CH₄ из метановых сипов в долине реки Мухринская и определение потенциальной активности окисления метана в образцах ила, отобранных в местах выхода метана на поверхность.
2. Определение численности и идентификация метанотрофных бактерий в иле сипов с помощью молекулярных подходов (флуоресцентная *in situ* гибридизация, ПЦР детекция и пиросеквенирование генов *pmoA*).
3. Получение накопительных культур психрофильных/психротолерантных метанотрофных сообществ, выделение репрезентативных культур метанотрофов, изучение их характеристик и способности к окислению метана при низких температурах.

Научная новизна и значимость работы

В поймах небольших рек, являющихся притоками Оби и Иртыша, выявлен ранее неучтенный и неисследованный источник поступления метана в атмосферу – холодные грязевые сипы. Впервые установлено, что выделяющийся из этих сипов метан имеет биологическое происхождение. Показано, что потоки метана из этих природных объектов на порядки превосходят его эмиссию с эквивалентных по площади участков болот зоны средней тайги. Полученные данные полевых измерений эмиссии CH_4 из таких грязевых сипов важны для корректировки знаний об источниках и масштабах эмиссии геологического метана в атмосферу.

Расширены представления о микробных агентах, ответственных за окисление выделяющегося из сипов CH_4 в условиях низких температур. Показано, что основным компонентом метанооксиляющих сообществ, формирующихся в локусах выхода газа на поверхность, являются метанотрофные бактерии I типа.

Описан и узаконен новый вид рода *Methylovulum* - *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., представители которого способны к окислению CH_4 при низких температурах. Типовой штамм нового вида депонирован в международных коллекциях микроорганизмов DSMZ и VKM.

Практическая значимость

Проведено картирование распространения метановых сипов с оценкой величин потоков CH_4 из них в долине реки Мухринской, Ханты-Мансийский А.О.

Получен ряд чистых культур метанотрофных бактерий, которые способны окислять CH_4 при низких температурах.

Существенно расширена база данных последовательностей генов *pmoA* метанотрофных бактерий, населяющих холодные местообитания. Совокупность полученных в настоящей работе последовательностей генов *pmoA* депонирована в GenBank.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах: 1) VIII молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 2012; 2) 10th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2014), Saint Petersburg, Russia, 2014; 3) XIX Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», Пущино, 2015; 4) 5 Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы», Москва, 2015.

Публикации

Материалы диссертации содержатся в 7 печатных работах: 3 экспериментальных статьях и 4 тезисах конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, глав, заключения и выводов, изложенных на 160 страницах, включая 9 таблиц, 19 рисунков и списка литературы из 272 наименований, из них 13 - на русском и 259 – на английском языке.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в лаборатории Микробиологии болотных экосистем Института микробиологии им С.Н. Виноградского РАН с 2011 по 2015 годы. Автор благодарит к.б.н. Глаголева М.В. (МГУ, Москва), под чьим руководством были проведены полевые исследования эмиссии метана. Автор выражает благодарность директору международного полевого стационара «Мухрино» Лапшиной Е.Д. и ее сотрудникам, Шныреву Н.А. и Филиппову И.В. (ЮГУ, Ханты-Мансийск), за помощь в исследованиях. Потенциальная активность окисления метана образцами ила сипов была определена зав. лаб. реликтовых микробных сообществ д.б.н. Н.В. Пименовым (ИНМИ РАН, Москва). Изотопный состав газа был проанализирован в лаборатории геохимии углерода ГЕОХИ РАН (Москва). Штамм *Methylocystis* sp. SB12 был выделен и предоставлен автору к.б.н. С.Э. Беловой (ИНМИ РАН, Москва), изолят Sph1 был выделен совместно с к.б.н. С.Э. Беловой. Исследования ультратонкого строения клеток метанотрофов были проведены к.б.н. Н.Е. Сузиной (ИБФМ РАН, Пущино). Определение содержания Г+Ц пар в ДНК проведены совместно с к.б.н. Е. Н. Детковой (ИНМИ РАН, Москва). Автор выражает глубокую признательность научному руководителю зав. лаб. микробиологии болотных экосистем д.б.н. С.Н. Дедыш, а также всему коллективу лаборатории за всестороннюю помощь и советы при выполнении работы.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 12-04-00768).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Район проведения исследований. Полевые исследования распространения грязевых сипов и интенсивности эмиссии метана проводили в августе-сентябре 2009-2010 гг. в долине реки Мухринской и ее притоков, стекающих в пойму Иртыша в районе международного полевого стационара «Мухрино», расположенного в зоне средней тайги Западной Сибири на левобережной террасе Иртыша в 30 км к юго-юго-западу от г. Ханты-Мансийска (60° 53 С.Ш., 68° 42 В.Д.).

Эмиссию CH_4 из сипов измеряли методом вытеснения газом воды из мерного цилиндра. На сип устанавливалась воронка, служившая уловителем выделяющегося газа. Поверх воронки помещался мерный цилиндр, заполненный водой. Газ, выходящий из сипа, вытеснял определенный объем воды из цилиндра, после чего шприцем отбиралась проба, а также устанавливалось время, за которое произошло вытеснение воды газом. Концентрацию CH_4 в пробах измеряли на хроматографе «Кристалл-5000» («Хроматек», Йошкар-Ола, Россия).

Аналитические исследования. Отбор проб воды для анализа осуществляли с глубины 0-5 см из 5 метановых сипов, расположенных на расстоянии 100-300 м друг от друга. Температурный профиль метанового сипа измеряли с помощью температурных датчиков (Termochron iButton DS 1921 и 1922, Dallas Semiconductor, США). Определение pH было выполнено на pH-метре SG-8 (Mettler Toledo, Швейцария) с погрешностью измерения 0.002. Электропроводность поверхностного слоя воды над сипами была определена на электрокондуктометре SG-7 (Mettler Toledo, Швейцария) с погрешностью измерения 0.5%. Концентрации ионов Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , F^- , Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} и Br^- в исходящих из метановых сипов потоках воды измеряли на ионном хроматографе (Metrohn, Швейцария). Концентрации CO_3^{2-} и HCO_3^- определяли титрованием с 0.05М раствором HCl.

Определение метанооксиляющей активности. Скорости окисления метана образцами илистых суспензий определяли радиоизотопным методом с использованием $^{14}\text{CH}_4$ при температуре инкубации 4°C.

Определение численности метанотрофных бактерий в образцах проводили с использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с 16S рНК-специфичными олигонуклеотидными зондами. Отобранные для анализа образцы или сипов фиксировали *in situ*, сразу после их отбора, путем добавления этанола (1:1, об.:об.) и впоследствии хранили при -20 °С. Анализ фиксированных образцов проводили с использованием процедуры, разработанной ранее для исследования образцов почвы и позволяющей избавиться от автофлуоресценции минеральных частиц (Bertaux *et al.*, 2007). Процедура основана на десорбции клеток микроорганизмов с почвенных частиц и последующем их концентрировании с

помощью дифференциального центрифугирования с раствором препарата Nycodenz («Gentaur», Бельгия). Полученную фракцию клеток осаждали на черных мембранных фильтрах с размером пор 0.2 мкм («Millipore», Германия), промывали PBS буфером (г/л, NaCl, 8.0; KCl, 0.2; Na₂HPO₄, 1.44; NaH₂PO₄, 0.2; pH 7.0), последовательно обезвоживали в градиенте концентраций этанола 50, 80 и 96% и высушивали. Анализ проводили с использованием СуЗ-меченых зондов M84+M705 и M450, специфичных для I и II типа метанотрофов, соответственно. Для подсчета клеток метанотрофов рода *Methylocella*, которые не детектируются вышеперечисленными зондами, были использованы зонды Mcell-1026, Mcellt-143 и Mcells-1024. Зонд EUB338-mix был применен для подсчета общего количества бактериальных клеток. После процедуры гибридизации фильтры докрашивали 1 мкМ раствором ДНК-специфичного красителя ДАФИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) в темноте в течение 10 мин, после чего промывали в стерильной воде и высушивали. Подсчет количества клеток был осуществлен на микроскопе Zeiss AxioPlan 2 (Zeiss, Германия), оборудованном фильтрами для СуЗ-меченых зондов и красителя ДАФИ.

Оценку разнообразия метанотрофов осуществляли с использованием выделенных из ила сипов образцов тотальной ДНК. Экстракцию ДНК проводили из 6 образцов ила (по 3 образца из 2-х исследованных сипов) весом по 0.5 г каждый с использованием набора "FastDNA SPIN kit for soil" (Biol 101, США) согласно рекомендациям изготовителя. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Оценку общего разнообразия метанотрофных бактерий в иле проводили путем ПЦР-амплификации фрагментов гена *pmoA*, кодирующего полипептид, несущий активный центр мембранной метанмонооксигеназы (ММО), для чего использовали два набора праймеров A189f/A682r и A189f/mb661r (Holmes *et al.*, 1995; Costello, Lidstrom, 1999). ПЦР-амплификацию проводили на термоциклере «Mastercycler gradient» (Eppendorf, Гамбург, Германия) при следующих условиях: начальная денатурация (5 мин при 96 °С) и 30 циклов, включающих отжиг праймеров (1 мин при 56 °С) и элонгацию (1 мин при 72 °С), а также завершающая элонгация в течение 5 мин при 72 °С. Ампликоны гена *pmoA* гена были получены в трех повторностях из каждого экстракта ДНК и очищены с использованием набора «Wizard SV gel and a PCR clean-up system» («Promega», Висконсин, США). Пиросевенирование ПЦР продуктов было выполнено в Max Planck Genome Centre, Кёльн, Германия с использованием технологии GS FLX Titanium.

Обработку данных осуществляли с помощью процедуры QIIME (<http://qiime.org/>) (Caporaso *et al.*, 2010).

Пул полученных последовательностей фрагментов генов *pmoA* был депонирован в ГенБанк под номером исследования SRP037754 со следующими номерами доступа: SRR1168458 и SRR1169858.

Получение накопительных культур метанотрофов и анализ их состава. Для получения накопительных культур метанотрофов 1 г ила сипов вносили во флаконы общим объемом 500 мл со 100 мл минеральной среды (состав указан ниже). В газовую фазу флаконов вводили метан до 10-20 об. % и инкубировали их либо в статических условиях при 4°C, либо на шейкере (120 об./мин) при 20°C в течение 2-3-х недель.

В работе было использовано два варианта сред. Первая среда имела следующий состав (г/л): NaNO_3 – 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.04; 1 % (об./об.) 100 мМ фосфатного буфера (pH 7.0); 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001) следующего состава (г/л): ЭДТА – 5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.2, $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, Na_2MoO_4 – 0.03. Вторая среда отличалась от первой повышенным содержанием нитрата (KNO_3 – 0.5 г/л), сульфата магния (0.4 г/л) и хлорида кальция (0.1 г/л).

Аликвоту (0.5 мл) полученных накопительных культур фиксировали 0.4% раствором формальдегида и использовали для идентификации метанотрофных бактерий с помощью метода FISH как описано выше.

Для получения изолятов метанотрофных бактерий использовали два подхода: 1) рассев на агаризованную минеральную среду с последующей инкубацией при 20 °C и 2) серийные разведения в жидкой среде. Флаконы инкубировали на качалке (120 об./мин) при 20 °C или в статических условиях при 4 °C. Для культивирования изолятов использовали ту же среду, что и для получения накопительных культур. Для получения чистой культуры штамма Sph1 использовали бедную минеральную среду следующего состава (мг/л): KH_2PO_4 – 16; KNO_3 – 16; NaCl – 20; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10; MgSO_4 – 16.

Идентификацию полученных изолятов проводили путем анализа последовательностей генов 16S рРНК и *pmoA*. ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК проводили с использованием универсальных для бактерий праймеров (Weisburg *et al.*, 1991), а генов *pmoA* – с использованием праймеров A189f/A682r (Holmes *et al.*, 1995).

Анализ ростовых характеристик изолятов в зависимости от температуры проводили путем прослеживания динамики их роста на жидкой минеральной среде с метаном в статических условиях при температурах 4, 10 и 20°C. Опыт проводили в трехкратной повторности. Динамику роста изолятов метанотрофов определяли путем измерения оптической плотности их культур на спектрофотометре Eppendorf Biophotometr AG при длине волны 600 нм.

Таксономическое описание штамма Sph1 проводили путем определения морфологических, физиологических и генотипических характеристик в соответствии с правилами Международного комитета по систематике бактерий. В качестве контрольного организма использовали культуру *Methylovulum miyakonense* DSM 23269^T.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Картирование сипов в долине реки Мухринской и полевые измерения потоков метана.

Множественные выходы газа на поверхность (сипы), представленные либо резервуарами с бурлящей водно-грязевой суспензией, либо конусообразными структурами, испускающими газовые, водные и грязевые потоки, были обнаружены в заболоченной пойме реки Мухринской, бассейн Иртыша. Подавляющее большинство (99%) сипов имели малые размеры (0.5 – 5 см в диаметре), однако некоторые из них достигали 1 м в диаметре (Рис. 1). Крупные сипы оставались активны и в зимний сезон (Рис. 1Б).



Рис. 1. Грязевые метановые сипы в заболоченной пойме реки Мухринской в летний (А) и зимний (Б) сезоны.

В общей сложности, в исследованном районе были обнаружены и нанесены на карту более 25000 сипов. Некоторые из них были представлены обособленно расположенными, единичными выходами газа, тогда как другие - группами, включающими до нескольких сотен сипов (Рис. 2).

Восходящие водные и грязевые потоки характеризовались около-нейтральными значениями pH (6.8-6.9), величинами электропроводности от 543 до 627 мкСм см⁻¹ и относительно высоким содержанием ионов Ca²⁺ (85.4 – 96.4 мг/л), Mg²⁺ (14.4 – 16.7 мг/л) и CO₃²⁻ (45.9– 75.2 мг/л)/HCO₃⁻ (1219.7– 1365.3 мг/л). Температура воды по профилю сипа варьировала от 3.5 до 5°C.

Выходящий из сипов газ состоял в основном из метана (70-99%) с $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ от -71.1 до -71.3 ‰. Полевые измерения эмиссии CH₄ были проведены для 28 случайно выбранных сипов (Рис. 2). В то время как потоки из большинства (90%) сипов не превышали 1.45 г CH₄ ч⁻¹, эмиссия из некоторых сипов достигала 5.54 г CH₄ ч⁻¹.

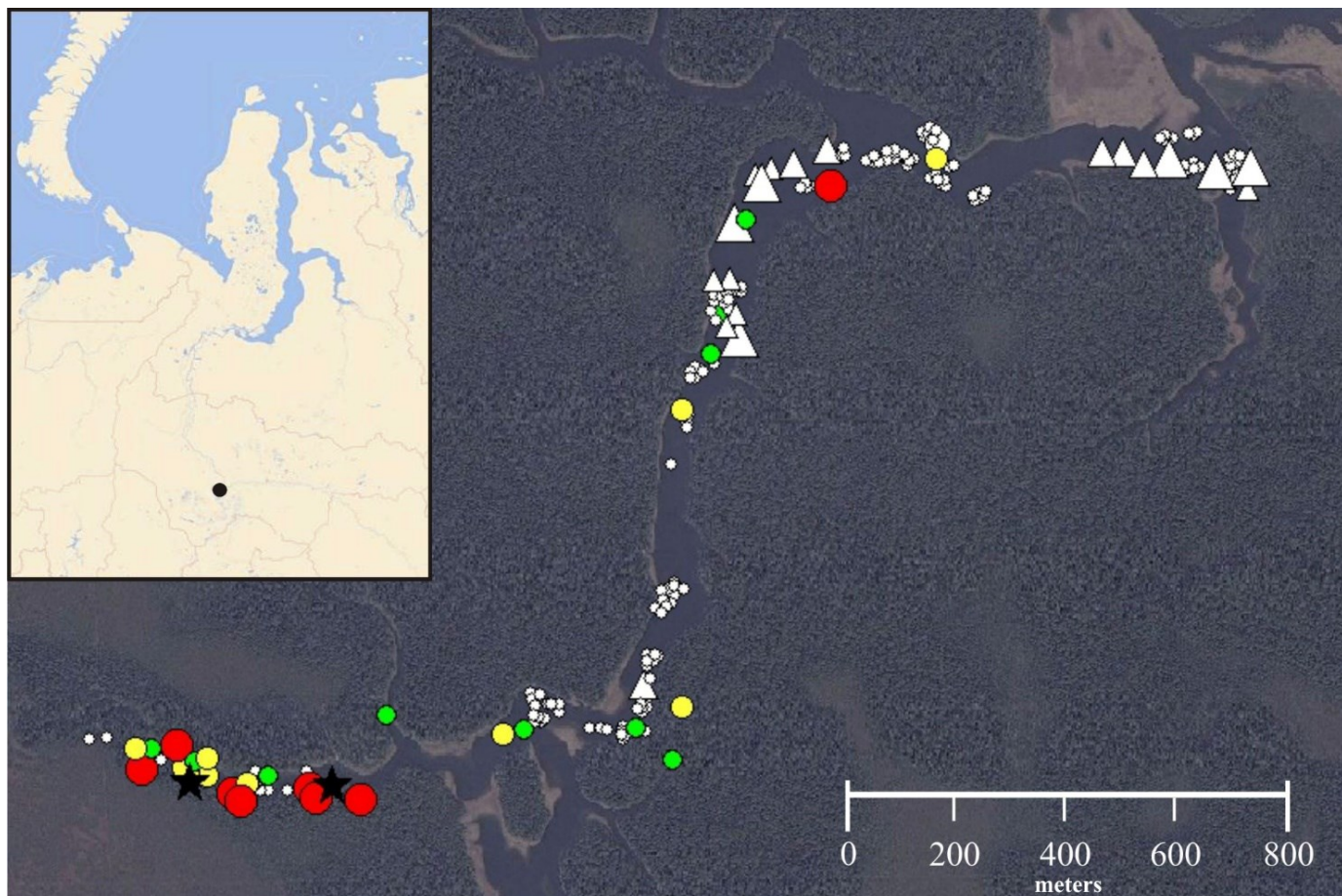


Рис. 2. Потоки метана и распределение сипов в долине реки Мухринская. Одиночные сипы обозначены кружками, а скопления сипов – треугольниками (большой треугольник, 1800 – 5000 сипов; средний треугольник, 150 – 500 сипов; маленький треугольник, 40 – 100 сипов). Цветными кружками обозначены сипы, для которых были определены величины эмиссии метана ($\text{г CH}_4 \text{ ч}^{-1}$): красный, 0.9 – 5.5; желтый, 0.4 – 0.5; зеленый, 0.05 – 0.16. Два грязевых метановых сипа, откуда были отобраны образцы ила для радиоизотопного и молекулярного анализа, обозначены черными звездами. Масштаб: 800 м. На вставке показано положение района исследований на карте России.

Образцы ила из двух метановых сипов, обозначенных черными звездочками на Рис.2, были использованы для измерения потенциальной активности окисления метана посредством инкубации с $^{14}\text{CH}_4$ при *in situ* температуре ($4\text{ }^\circ\text{C}$). Скорости окисления метана, определенные для образцов ила из двух сипов, были близкими и составляли 15.5 и $15.9 \text{ нмоль CH}_4 \text{ мл}^{-1} \text{ сут}^{-1}$.

2. Определение численности метанотрофных бактерий с помощью метода FISH.

Для анализа образцов ила сипов были использованы флуоресцентные олигонуклеотидные зонды M84+M705 и M450, обладающие специфичностью к метанотрофам I и II типов, соответственно. Подавляющее большинство выявленных этими зондами клеток принадлежали метанотрофам I типа. Они были представлены клетками различного размера и морфологии, встречающимися поодиночке или

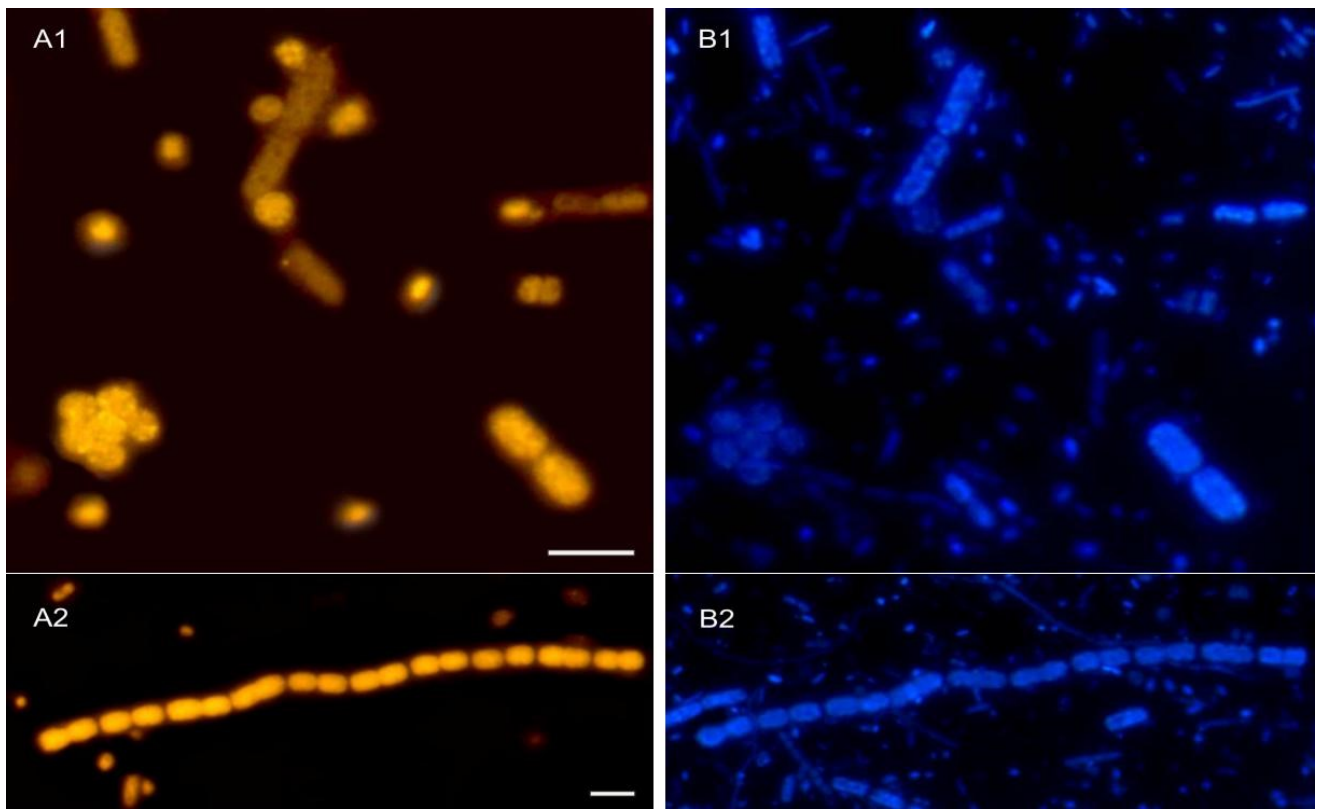


Рис. 3. Специфическая детекция клеток метанотрофов I типа методом FISH. (А) Флуоресцентная микрофотография гибридизации со смесью Cy3-меченых зондов M705+M84, выявляющих клетки метанотрофов I типа; (В) – окраска ДАФИ. Маркер – 5 мкм. Панели 1 и 2 отображает два разных поля зрения. Маркер, 5µm.

собранными в длинные цепочки и агрегаты (Рис. 3). Численность выявленных зондами метанотрофов I типа составляла $2.74 - 4.29 \times 10^7$ клеток g^{-1} ила (сухой вес) (Таблица 1). Значительно меньше целевых микроорганизмов - $2.84-11.70 \times 10^5$ клеток g^{-1} ила (сухой вес) - было обнаружено в исследуемых образцах гибридизацией с зондом M450, который является специфичным для группы *Methylosinus/Methylocystis* II типа метанотрофов.

Попытки обнаружить клетки метанотрофов рода *Methylocella* с использованием зондов Mcell-1026, Mcellt-143и Mcells-1024 не увенчались успехом. Численность этих бактерий в образцах ила была ниже предела обнаружения (10^3 клеток g^{-1} сухого веса). Таким образом, 95.8-99.3% всех клеток метанотрофов, обнаруженных в иле сипов методом FISH, относились к I типу метанотрофов, тогда как метанотрофы II типа были немногочисленны. Общая численность метанотрофных бактерий в образцах ила составляла $2.86-4.32 \times 10^7$ клеток g^{-1} ила (сухой вес), что соответствовало 20.2-20.5% от всех бактериальных клеток, выявленных зондом EUB338-mix или 10.9-12.2% всех клеток, обнаруженных окраской ДАФИ (Таблица 1). Высокая численность и необычно большая доля метанотрофов в составе бактериального сообщества свидетельствует о том, что доступность метана является одним из главных факторов, определяющих структуру микробного сообщества в этих уникальных местообитаниях.

Таблица 1. Численность клеток, выявленных в иле метановых сипов зондами, специфичными для метанотрофных бактерий I и II типов.

№ сипа	Число клеток, выявленных различными олигонуклеотидными зондами (на г сухого веса)			Число клеток, выявленных окраской ДАФИ, $N \times 10^8$ на г сухого веса	% метанотрофов от общего числа клеток, выявленных окраской ДАФИ / % метанотрофов от числа клеток, выявленных EUB338-mix
	M84+M705, $N \times 10^7$ (I тип)	M450, $N \times 10^5$ (II тип)	EUB338-mix, $N \times 10^8$		
1	4.29 ± 0.10	2.84 ± 1.92	2.1 ± 1.4	3.98 ± 0.57	10.9 / 20.2
2	2.74 ± 0.18	11.70 ± 11.1	1.4 ± 3.4	2.33 ± 0.18	12.2 / 20.5

3. Молекулярная идентификация метанотрофов, развивающихся в локусах выхода метана, с помощью анализа генов *pmoA*.

Состав формирующегося в сипах метанотрофного сообщества был определен методом пиросеквенирования генов *pmoA*, кодирующих β -субъединицу мембранной метанмонооксигеназы, ключевого фермента, которым обладают почти все известные метанотрофы (за исключением представителей родов *Methylocella* и *Methyloferula*). В общей сложности, было получено 53828 фрагментов (~400 п.о.) последовательностей гена *pmoA* (27398 и 26430 для сипов №1 и №2, соответственно).

Результаты анализа полученного пула последовательностей *pmoA* представлены на Рис. 4. Как видно из диаграммы, картины разнообразия, полученные с применением двух различных обратных *pmoA*-специфичных праймеров, A682r и mb661r, имели некоторые отличия. Это обусловлено различиями в их специфичности. Праймер A682r обладает более широким спектром детекции и позволяет выявить потенциально новые группы метанотрофов, однако он специфичен не только к *pmoA*, но также к филогенетически близкому гену *amoA* (Holmes *et al.*, 1995). Праймер mb661r выявляет исключительно только последовательности *pmoA*, но обладает ограниченным потенциалом для выявления неизвестных групп метанотрофов. Общее разнообразие целевых генов, выявленное в сипах парой праймеров A189f/A682r, было выше такового, выявленного праймерами A189f/mb661r (Chao1 индексы 4602 и 1523, соответственно). Однако значительная доля (25-27%) последовательностей, полученных с использованием A189f/A682r из ила сипов, была представлена фрагментами гена *amoA* (Рис. 4).

Основные группы фрагментов *pmoA*, полученные из ила сипов с использованием праймеров A189f/A682r, были представлены последовательностями *Methylobacter-*

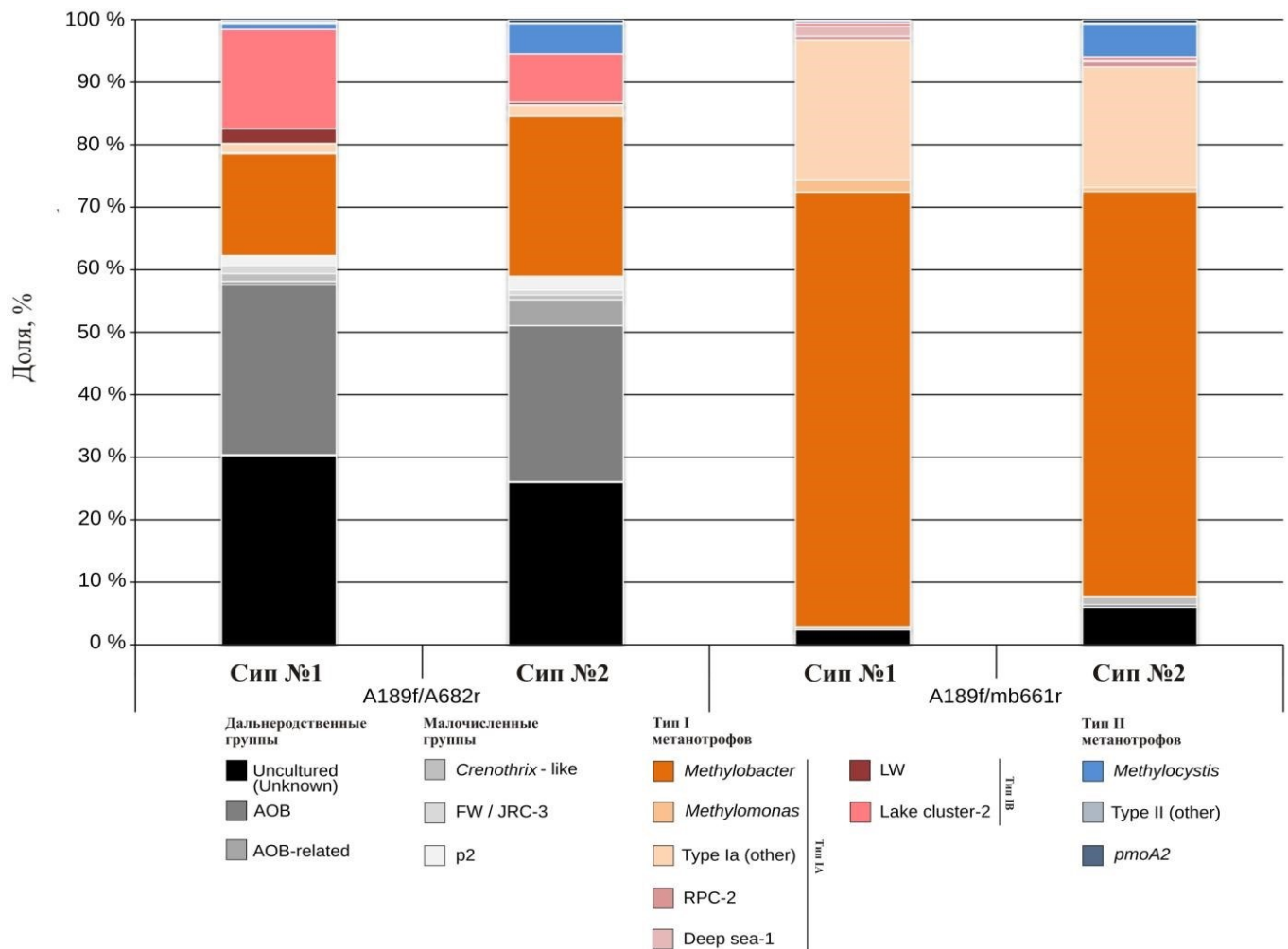


Рис. 4. Доля различных групп метанотрофов в иле метановых сипов по результатам высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена *pmoA*. АОВ – аммоний-окисляющие бактерии (Ammonia-Oxidizing Bacteria). Названия кластеров: RPC, rice paddy cluster; JRC, Japanese rice cluster; OSC, organic soil cluster; LW, Lake Washington cluster; FW, freshwater cluster; TUSC, tropical upland soil cluster; USC, upland soil cluster; JR, Jasper Ridge, CA; MOB, methane-oxidizing bacteria; AOB, ammonia-oxidizing bacteria.

подобных метанотрофов (16.4-25.6% от общего числа фрагментов *pmoA*), последовательностями представителей некультивируемой группы метанотрофов I типа Lake-cluster-2 (7.7-16.0%), а также последовательностями ряда других пока некультивируемых групп (24.1-30.4%), включающих *Crenothrix*-подобные метанотрофы.

В библиотеках фрагментов гена *pmoA*, полученных с использованием пары праймеров A189f/mb661r, преобладали последовательности представителей рода *Methylobacter* (64.8-69.5%), а также последовательности *pmoA*, представляющие другие роды метанотрофов I типа, такие как *Methylomonas*, *Methylovulum* и *Methylosoma* (19.3-22.4% от общего числа фрагментов *pmoA*) (Рис. 4).

Общей особенностью пула последовательностей, полученных с применением различных пар праймеров, была низкая доля ($\leq 5.5\%$ от общего числа последовательностей) фрагментов *pmoA* метанотрофов II типа, что полностью согласуется с результатами FISH-анализа (Таблица 1). Подавляющее большинство

этих последовательностей принадлежало представителям рода *Methylocystis*. Число фрагментов *pmoA* гена представителей родов *Methylosinus* и *Methylocapsa* было незначительным. Всего лишь 14 последовательностей представляли ген *pmoA2*, кодирующий мембранную ММО с высоким сродством к субстрату (Baani, Liesack, 2008). Очевидно, что обладание такой формой ММО не является необходимым для развития метанотрофов в сипах с высокой доступностью субстрата.

Поскольку пулы последовательностей *pmoA*, полученные из сипов №1 и №2, обладали сходным разнообразием, фрагменты, полученные с использованием либо A189f/A682r, либо A189f/mb661r, были объединены для последующего анализа. В результате этого анализа, 1850 и 771 операционных таксономических единиц (ОТЕ) при уровне сходства нуклеотидных последовательностей в 87% было выявлено в сипах с парами праймеров A189f/A682r и A189f/mb661r, соответственно. Наиболее многочисленные ОТЕ, выявленные обеими парами праймеров, обнаруживали сходство (87-96%) с последовательностями *pmoA* представителей рода *Methylobacter*, выделенными из холодных экосистем - *M. psychrophilus* и *M. tundripaludum*. Другие многочисленные группы фрагментов *pmoA* из сипов обнаруживали равный уровень сходства (82-85%) с последовательностями *pmoA* известных видов родов *Methylobacter*, *Methylovulum* и *Methylosoma* и, по всей видимости, представляли новые виды этих родов. Одна из наиболее многочисленных в иле сипов групп последовательностей принадлежала к филогенетически обособленной группе некультивируемых метанотрофов, Lake-cluster-2, типичным местообитанием которых являются озерные и речные осадки.

Фрагменты *pmoA*, выявленные в иле сипов исключительно только парой праймеров A189f/A682r, включали последовательности гена *pmoA* *Crenothrix*-подобных метанотрофов и организмов некультивируемой группы LW (Lake Washington). Фрагменты *pmoA*, полученные с использованием исключительно пары праймеров A189f/mb661r, были представлены последовательностями *pmoA* *Methylovulum*- и *Methylomonas*-подобных метанотрофов, а также фрагментами *pmoA*, принадлежащими к группе некультивируемых метанотрофов Deep-sea-cluster-3. Наиболее многочисленные фрагменты *pmoA* метанотрофных бактерий II типа обнаруживали 97-99% сходства с фрагментами *pmoA* гена *Methylocystis hirsuta* и *Methylocystis rosea*.

Филогенетическое положение и численная представленность полученных в настоящем исследовании последовательностей *pmoA* отражены на Рис. 5.

ПЦР-тест на наличие *Verrucomicrobia*-подобных метанотрофов в холодных сибирских сипах дал отрицательный результат, что не противоречит логике, так как эти бактерии до сих пор были обнаружены только в термальных местообитаниях.

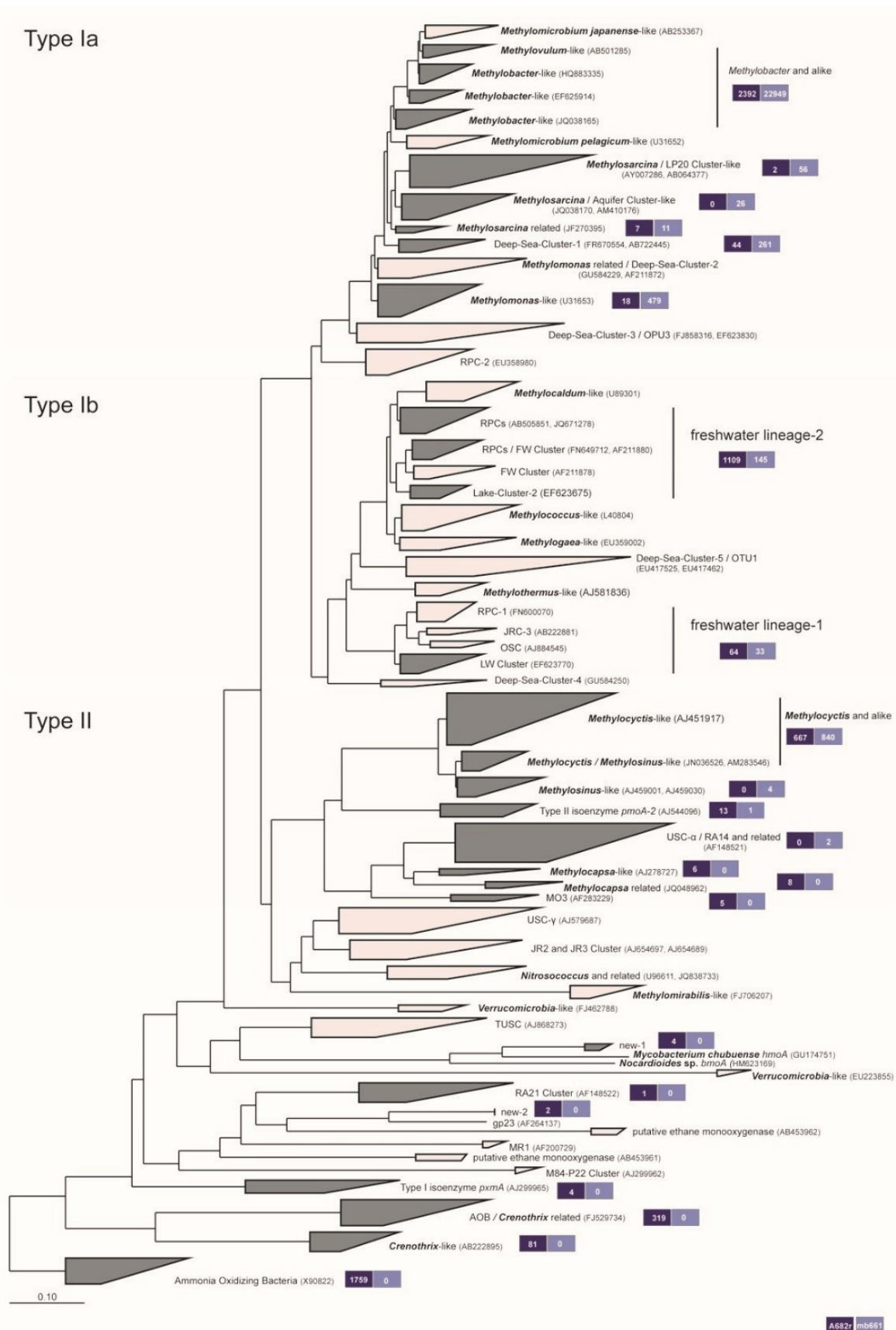


Рис. 5. Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа последовательностей *pmoA*. Кластеры, включающие полученные из сипов последовательности *pmoA*, обозначены темно-серым цветом. Справа, в закрашенных квадратах для каждого кластера показано число последовательностей, полученных с использованием праймеров A682r (темносиний) и mb661 (светло-синий). Алгоритм построения – «neighbor-joining». Маркер, 0.1 замена на одну аминокислотную позицию.

4. Получение накопительных культур метанокисляющих микроорганизмов.

Первым этапом в работе по выделению репрезентативных культур метанотрофных бактерий из ила сипов было получение накопительных культур этих микроорганизмов. Для этого образцы илистых суспензий были помещены во флаконы с минеральной средой и 20-30% метана в газовой фазе, которые были потом инкубированы при 4 и 20°C. Состав полученных накопительных культур был проанализирован с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации. Основным компонентом микробных сообществ, полученных в результате инкубации при 4°C, являлись метанотрофы I типа, клетки которых хорошо выявлялись гибридизацией с СуЗ-мечеными зондами M84 + M705 (Рис. 6). Доля клеток метанотрофов II типа, выявляемых зондом M450, была незначительной. В накопительных культурах, полученных в результате инкубации при 20°C, напротив, преобладали клетки метанотрофов II типа. Таким образом, состав полученных при 4°C накопительных культур более точно соответствовал результатам молекулярного анализа разнообразия метанотрофных бактерий в исходном иле.

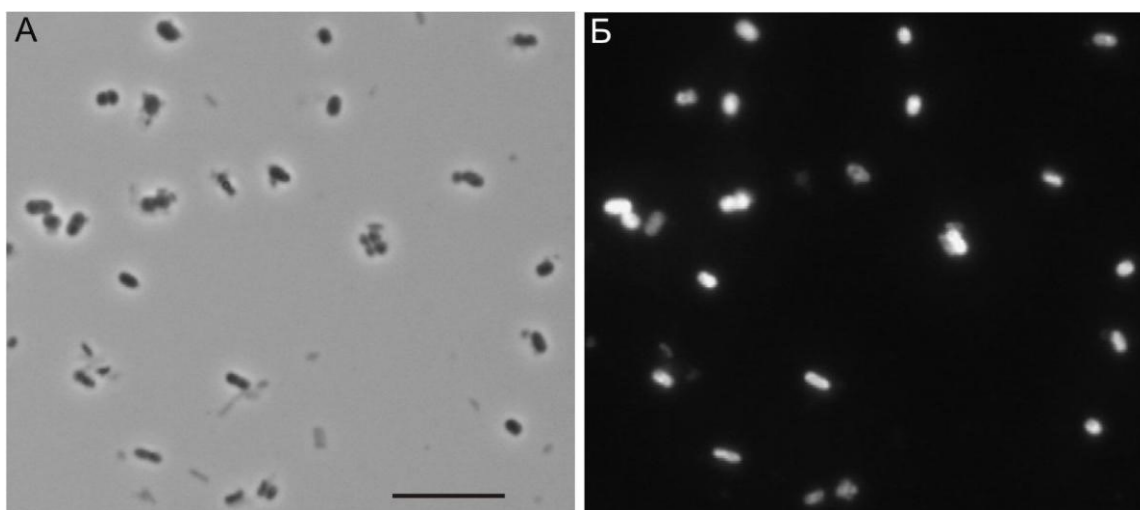


Рис. 6. Состав накопительных культур метанотрофных бактерий, полученных из ила сипов в условиях инкубации при 4°C. А – фазовый контраст; Б - флуоресцентная микрофотография гибридизации с СуЗ-мечеными зондами M84 + M705, специфичными для метанотрофов I типа. Маркер, 10 мкм.

5. Изоляты метанотрофных бактерий и их ростовые характеристики.

В результате работы по выделению чистых культур метанотрофных бактерий из исследуемых сипов было получено три изолята – штаммы CMS7, SB12 и Sph1. Штамм CMS7 был изолирован путем многократных серийных разведений в жидкой минеральной среде и инкубации в статических условиях при 4°C. Клетки этого штамма были представлены крупными (1-1.5 μm \times 2-4 μm), подвижными, непигментированными палочками, растущими гомогенно в жидкой среде, но не формирующими колонии на агаризованном аналоге этой среды. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма CMS7 показал 98% сходства с таковой у *Methylobacter tundripaludum*. Нуклеотидная последовательность

гена *pmoA* штамма CMS7 принадлежала к наиболее многочисленной группе фрагментов *pmoA*, выявленных в иле исследуемого сипа с помощью высокопроизводительного секвенирования (Рис. 5).

Второй изолят метанотрофных бактерий, штамм SB12, был получен путем посева суспензии накопительной культуры на агаризованную минеральную среду, с последующей инкубацией при 20°C. Клетки этого изолята представляли собой неподвижные короткие изогнутые палочки или коккоиды (0.8-1.5 $\mu\text{m} \times 1-2.5 \mu\text{m}$), формирующие мелкие (1-2 мм в диаметре) розово-пигментированные колонии. Последовательность фрагмента гена *pmoA* штамма SB12 была идентична таковой у *Methylocystis rosea*. Последовательности генов 16S рПНК этих двух метанотрофов были также высоко сходны (99%).

Полученные изоляты открывали возможность сравнения ростовых характеристик метанотрофов двух различных филогенетических групп, выделенных из одного местообитания, в зависимости от температуры. Для этого была прослежена динамика роста *Methylobacter* sp. CMS7 и *Methylocystis* sp. SB12 на жидкой минеральной среде с метаном при трех различных температурах инкубации: 4, 10 и 20°C (Рис. 7). Наиболее активный рост *Methylobacter* sp. CMS7 имел место при 4 и 10°C, причем удельные скорости роста метанотрофа при этих двух температурах были практически одинаковы. *Methylocystis* sp. SB12, хотя и был способен к медленному росту при 4°C, обнаруживал явное предпочтение к развитию при 20°C, что свойственно и другим представителям рода *Methylocystis*.

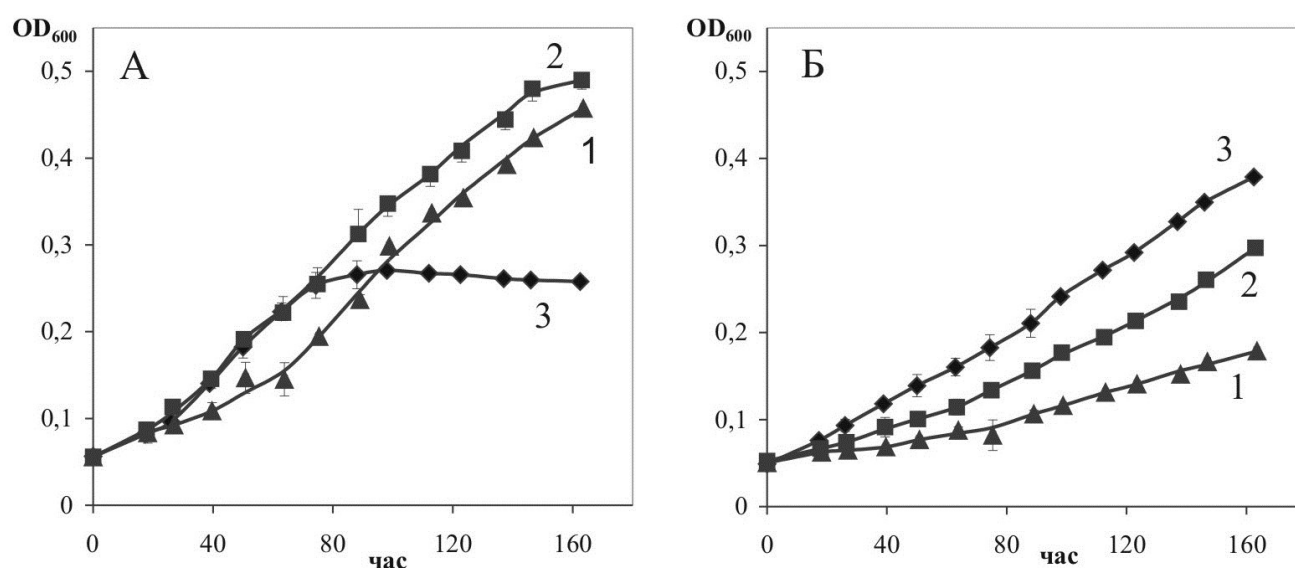


Рис. 7. Динамика роста изолированных из ила сипов *Methylobacter* sp. CMS7 (А) и *Methylocystis* sp. SB12 (Б) на жидкой минеральной среде с метаном в условиях инкубации при 4°C (1), 10°C (2) и 20°C (3).

Третий изолят метанотрофных бактерий, штамм Sph1, был получен в условиях культивирования при 9°C, путем многократных серийных разведений в жидкой минеральной среде. Клетки штамма Sph1 представляли собой неподвижные

грамотрицательные кокки, одиночные или двойные, покрытые хорошо развитой слизистой капсулой (Рис 8А). Размер клеток достигал 4.0 - 6.0 мкм в диаметре. Клетки размножались бинарным делением и содержали хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) I типа (Рис. 8Б).

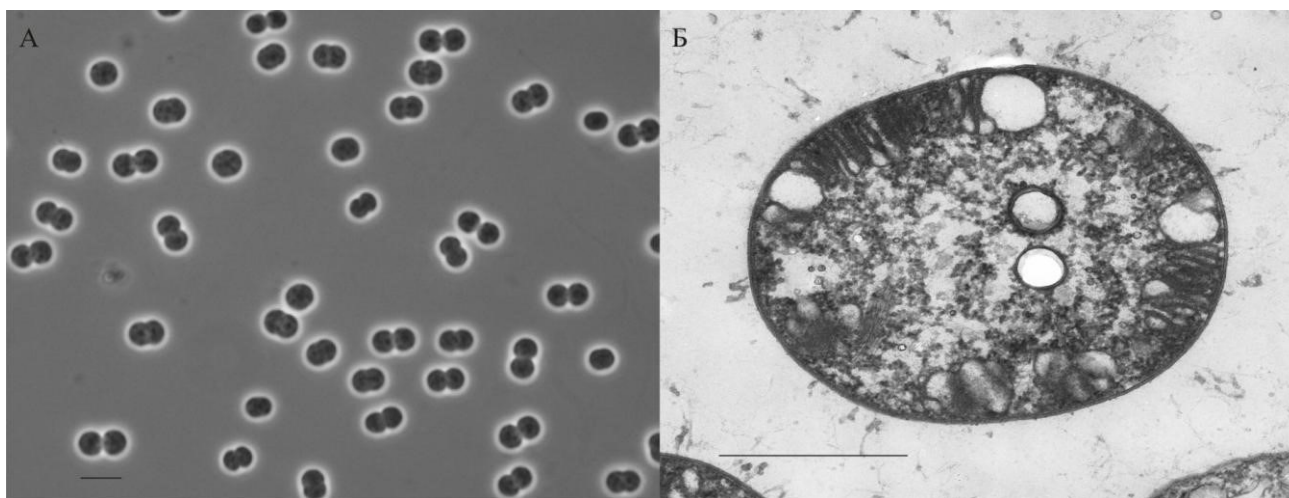


Рис. 8. Морфология и ультратонкое строение клеток штамма SB1. (А) Фазово-контрастная фотография клеток в экспоненциальной фазе роста. Маркер – 5 мкм; (Б) Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, демонстрирующая расположение внутрицитоплазматических мембран, характерное для метанотрофов I типа. Маркер – 1 мкм.

Идентификация этого метанотрофа путем определения и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показала его отдаленное родство (95% сходства последовательностей) с единственным ныне известным представителем рода *Methylovulum*, *Methylovulum miyakonense* (Рис. 9).

Фрагмент *pmoA* гена штамма Sph1 обнаруживал 90% идентичности нуклеотидных последовательностей с аналогичным фрагментом *pmoA* гена *Methylovulum miyakonense* (Рис. 10), а также представлял одну из наиболее многочисленных групп фрагментов *pmoA*, выявленных в иле сипов с помощью высокопроизводительного пиросеквенирования.

Так как результаты анализа генов 16S рРНК и *pmoA* свидетельствовали о принадлежности штамма Sph1 к новому таксону метанотрофных бактерий, и так как этот микроорганизм представлял одну из наиболее многочисленных групп метанотрофов, выявленных в сипах с помощью молекулярного анализа, штамм Sph1 был выбран объектом дальнейшего, более детального исследования физиологии и таксономической принадлежности этого организма. На агаризованной среде штамм Sph1 формировал крупные (3-5 мм), округлые, гладкие, слизистые колонии бледно-розового цвета. Рост в жидких средах был гомогенный, без формирования поверхностной пленки. Предпочтительным ростовым субстратом штамма Sph1 являлся метан. Удельная скорость роста штамма Sph1 на CH_4 составляла 0.04-0.06 ч⁻¹. Помимо метана, этот изолят был способен к росту на метаноле. Роста на

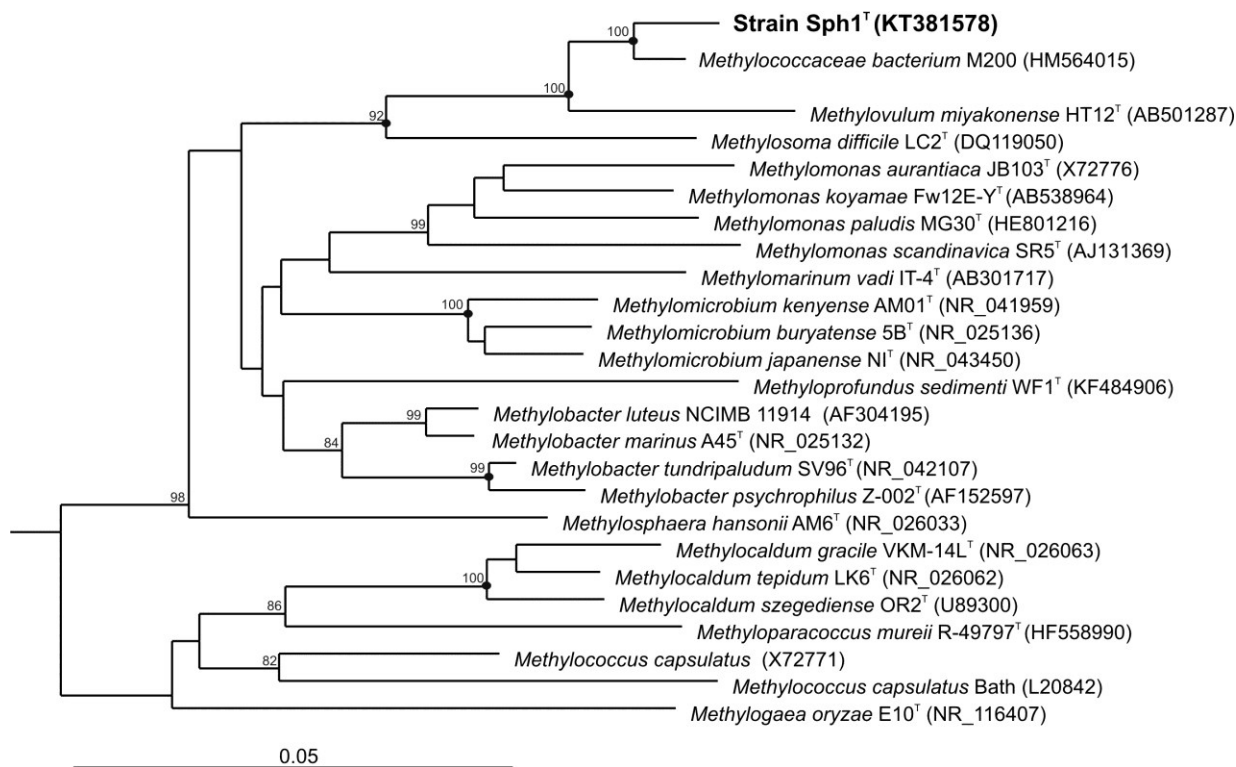


Рис. 9. Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК, показывающая филогенетическое положение штамма Sph1 относительно других метанотрофных представителей класса *Gammaproteobacteria*. В качестве внешней группы использованы нуклеотидные последовательности генов 16S рНК метанотрофов II типа. Алгоритм построения – «neighbor-joining». Маркер, 0.1 замена на нуклеотидную позицию

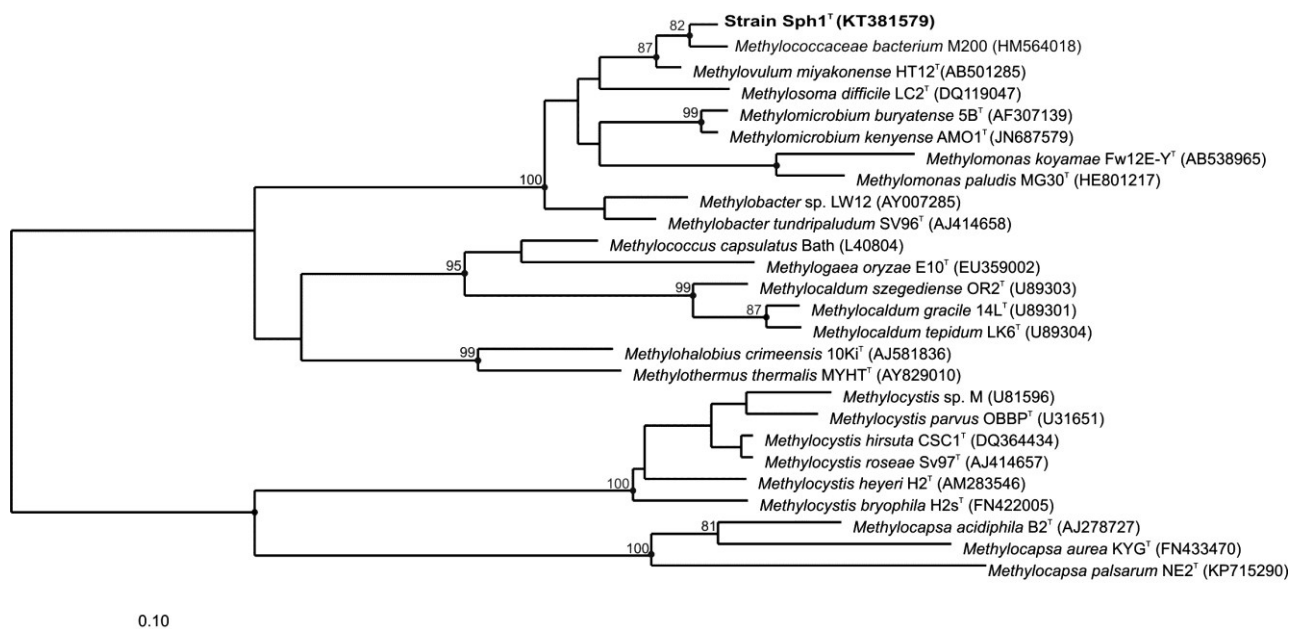


Рис. 10. Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов гена *pmoA*, показывающая филогенетическое положение штамма Sph1 относительно других метанотрофных представителей класса *Gammaproteobacteria*. Алгоритм построения – «neighbor-joining». Маркер, 0.1 замена на аминокислотную позицию.

полиуглеродных субстратах выявлено не было, т.е. штамм Sph1 являлся облигатным метанотрофом. В качестве источников азота штамм Sph1 использовал нитрат, аммоний и казаминовые кислоты, но не был способен к росту на средах без источника связанного азота. Рост наблюдался в диапазоне pH 5.2 - 8.1, с оптимумом при 6.2 - 6.8, что характеризует этот изолят как нейтрофильный микроорганизм.

По результатам анализа динамики роста штамма Sph1 при разных температурах были рассчитаны удельные скорости роста и построена кривая зависимости скорости роста от температуры (рис. 11). Она свидетельствует о том, что штамм Sph1 – психротолерантный мезофил, растущий в диапазоне температур от 2°C до 32°C с оптимумом при 20-25°C. Примечательно, что штамм Sph1 был способен к достаточно активному росту в диапазоне температур 4-15°C, что свидетельствует о его способности развиваться в холодных экосистемах.

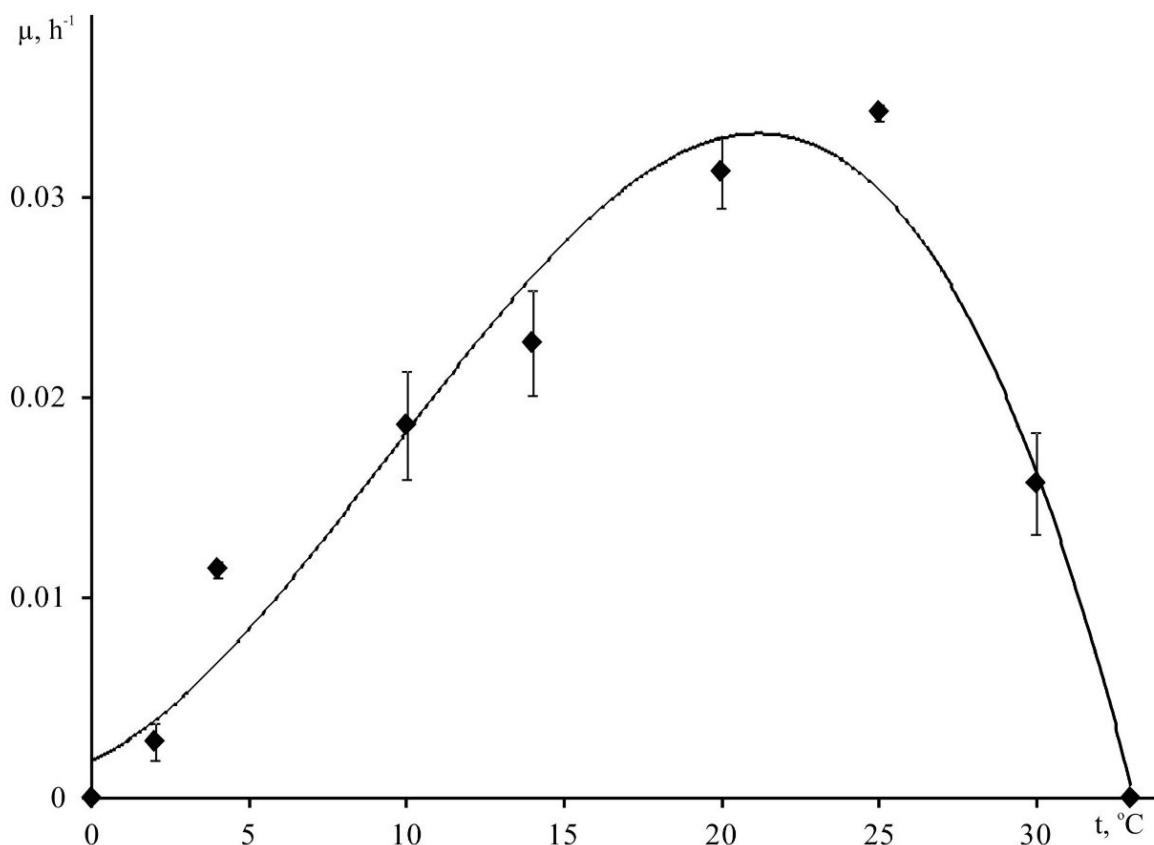


Рис. 11. Зависимость удельной скорости роста штамма Sph1 от температуры культивирования.

Совокупность полученных в настоящей работе характеристик штамма Sph1 свидетельствовала о его отличии от ранее описанного представителя рода *Methylovulum*, *Methylovulum miyakonense* (Iguchi *et al.*, 2011). От последнего изолят из метанового сипа отличался размером и морфологией клеток, пигментацией, отсутствием растворимой формы ММО, более высоким содержанием пар Г+Ц в ДНК, способностью к росту в более широком диапазоне pH и смещенным в сторону низких температур оптимумом роста (Таблица 2). На основании этих отличий было

предложено отнести штамм Sph1^T к новому виду рода *Methylovulum* – ‘*Methylovulum psychrotolerans*’ sp. nov.

Таблица 2. Основные дифференцирующие характеристики штамма Sph1^T и *Methylovulum miyakonense*.

Характеристика	Штамм Sph1 ^T	<i>Methylovulum miyakonense</i> ^a
Морфология	Кокки	Овоиды
Размер клеток (мкм)	4.0-6.0	1.5-2.5×1.0-2.0
Пигментация колоний	Розовые	Бледно-коричневые
Наличие растворимой ММО	-	+
Диапазон температур (°C)	2 - 32	5-34
Оптimum температур (°C)	20 - 25	24-32
Диапазон pH Оптimum	5.2 - 8.1 (6.2 - 6.8)	6-7.5 (6.5)
Содержание Г+Ц в ДНК (моль %)	51.4	49.3

^a-данные Iguchi *et al.*, 2011.

Характеристика *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov. (psy.chro.to 'le.rans. Gr. adj. *psychros* – холодный; L. pres. part. *tolerans* терпимый; N.L. part. adj. *psychrotolerans* холодоустойчивый).

Клетки представляют собой неподвижные кокки диаметром 4.0-6.0 мкм, одиночные или в парах, покрытые хорошо развитой слизистой капсулой. Размножаются бинарным делением. Клетки содержат ВЦМ I типа. На агаризованной среде формируют крупные округлые слизистые колонии розового цвета. Метан и метанол – единственные используемые субстраты. Метанол используется в концентрации не выше 5% (об./об.), при оптimumе 0.7% (об./об.). Способны расти в диапазоне температур от 2 до 32°C с оптimumом – 20 - 25°C, и в диапазоне pH 5.2 - 8.1, с оптimumом при 6.2 - 6.8. Источники азота – нитрат, аммоний и казаминовые кислоты. Не способны к фиксации N₂. NaCl подавляет рост в концентрациях выше 0.1%. Основные жирные кислоты - C_{16:1}ω5, C_{16:1}ω7, C_{16:1}ω8, C_{16:0} и C_{14:0}. Типовой штамм Sph1^T изолирован из образца ила метанового сипа в пойме реки Мухринской, Ханты-Мансийский А.О., Западная Сибирь (60.888390° С.Ш., 68.701555° В.Д.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метановые сипы, исследованные в данной работе, по величине потока, выделяемого CH_4 (16 г CH_4 в день в среднем на один сип) и по своей морфологии, отличаются как от микросипов, так и от макросипов. Эти природные объекты широко распространены в заболоченной пойме реки Мухринской. Большинство сипов остаются затопленными во время весенне-летнего периода, вследствие чего их трудно, а во многих случаях невозможно выявить. Несмотря на то, что наши полевые исследования были проведены после падения уровня воды, общее число сипов в русле реки, скорее всего, осталось недооцененным.

Легкий изотопный состав углерода CH_4 свидетельствует о его микробном происхождении, что не характерно для метана из геологических источников. Этот факт позволяет предположить, что метан, выделяющийся из сипов Западной Сибири, образован в результате разложения органического вещества в осадочных бассейнах, расположенных в местах отступления вечной мерзлоты.

Концентрации NO_2^- , NO_3^- и SO_4^{2-} в восходящих потоках воды сипов были малы или ниже предела детекции. Такой состав воды исключает возможность осуществления $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ или SO_4^{2-} -зависимого анаэробного окисления метана (Knittel & Voetius, 2009; Ettwig *et al.*, 2010) и предполагает, что основной вклад в снижение потоков метана из сипов вносят аэробные процессы окисления метана. Как подтвердили настоящие исследования, локусы выхода газа на поверхность были обильно населены аэробными метанотрофными бактериями, активно окисляющими CH_4 . Доказательством этому служили достаточно высокие скорости окисления метана, измеренные в образцах ила при *in situ* температуре (4 °C), а также высокая численность метанотрофов, выявленных гибридизацией с флуоресцентными зондами. Высокая численность и необычно большая доля метанотрофов в составе бактериального сообщества (около 20%) свидетельствуют о том, что доступность метана является одним из главных факторов, определяющих структуру микробного сообщества в этих уникальных местообитаниях. Интенсивная флуоресценция связавшихся с зондами клеток метанотрофов является косвенным свидетельством высокого содержания рибосом в этих микроорганизмах и, соответственно, их активного метаболического статуса. Согласно результатам флуоресцентной *in situ* гибридизации в образцах ила из метановых сипов доминировали метанотрофы I типа, составляя 96-99% общего числа выявленных метанотрофных бактерий. Эти данные были подтверждены результатами пиросеквенирования фрагментов *pmoA* генов, поскольку только 0.5-5% общего числа полученных последовательностей обнаруживали сходство с последовательностями *pmoA* метанотрофов II типа. Численное преобладание метанотрофов I типа характерно, главным образом, для холодных пресноводных местообитаний (Deutzmann *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2013) и вечной мерзлоты (Liebner & Wagner, 2007; Liebner *et al.*, 2009). Помимо этого, метанотрофы I типа считаются индикаторами местообитаний с высокой доступностью метана (Krause *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013). Исследованные в настоящей

работе метановые сипы как раз являют собой пример холодной экосистемы с высокой доступностью CH_4 .

Состав сообщества аэробных метанотрофов, снижающих потоки метана из сибирских сипов, оказался близок таковым, обнаруженным ранее в осадках разнообразных бореальных и арктических пресноводных озер (Rahalkar & Schink, 2007; Rahalkar *et al.*, 2009; Deutzmann *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012). Все эти местообитания характеризуются преобладанием *Methylobacter*- и *Methylovulum*-подобных организмов, а также метанотрофов из пока некультивируемых групп, таких, например, как Lake-cluster-2. По-видимому, эти метанотрофы являются главными агентами окисления метана в холодных пресноводных экосистемах.

В ходе работы из ила сипов было получено 3 изолята метанотрофных бактерий. Два из них, штаммы CM7 и Sph1, являются представителями метанотрофов I типа. Они были выделены в чистую культуру в условиях культивирования при 4-9°C, что еще раз подтверждает конкурентное преимущество метанотрофов I типа при низких температурах. Последовательности генов *pmoA* штаммов CM7 и Sph1 представляли наиболее многочисленные группы фрагментов *pmoA*, выявленные в иле сипов в результате молекулярного анализа. Один из этих метанотрофов, штамм Sph1, был детально охарактеризован и описан в качестве представителя нового вида рода *Methylovulum*, *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov. Это описание вносит коррективы в представления о физиологии метанотрофов рода *Methylovulum*, которые были ранее охарактеризованы в качестве мезофильных микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. В долине реки Мухринской (бассейн Иртыша, Ханты-Мансийский А.О.) выявлен ранее неучтенный и неисследованный источник поступления метана в атмосферу – холодные грязевые сипы. Потоки метана из большинства (90%) выявленных сипов не превышали $1.45 \text{ г CH}_4 \text{ ч}^{-1}$, однако в отдельных локусах достигали $5.54 \text{ г CH}_4 \text{ ч}^{-1}$. Величина $\delta^{13}\text{C}$ метана варьировала от -71.1 до -71.3% , свидетельствуя о его биогенном происхождении.

2. Несмотря на низкие температуры ($0-5^\circ\text{C}$), в локусах выхода метана на поверхность были зафиксированы достаточно высокие скорости его окисления ($15.5-15.9 \text{ нмоль CH}_4 \text{ мл}^{-1} \text{ сут}^{-1}$). Применение флуоресцентной *in situ* гибридизации выявило $2.8-4.3 \times 10^7$ клеток метанотрофов г^{-1} сухого ила, что составило около 20% всех бактерий.

3. В целях детальной идентификации метанотрофных популяций, из ила сипов было получено и проанализировано более 53 тыс. фрагментов гена *pmoA*, кодирующего мембранную метанмонооксигеназу. Подавляющее большинство (95.0-99.5%) этих последовательностей принадлежали метанотрофным *Gamma*proteobacteria, среди которых наиболее многочисленны были представители родов *Methylobacter*, *Methylovulum* и *Methylosoma*, а также ряд новых метанотрофов, принадлежащих к пока неописанным таксонам.

4. Из ила холодных метановых сипов получены три изолята метанотрофных бактерий – штаммы CMS7, SB1 и Sph1. Штаммы CMS7 и SB1 идентифицированы как представители родов *Methylobacter* и *Methylocystis*, соответственно. Сравнение ростовых характеристик показало более активный рост *Methylobacter* sp. CMS7 в диапазоне температур $4-10^\circ\text{C}$, а *Methylocystis* sp. SB12 – при 20°C . Идентификация штамма Sph1 позволила классифицировать его как представителя нового вида рода *Methylovulum*.

5. Описан новый вид нейтрофильных, психротолерантных метанотрофных бактерий - *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., способных к активному росту в диапазоне температур $4-15^\circ\text{C}$ и являющихся типичным компонентом метанотрофных сообществ холодных пресноводных экосистем.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи

1. Белова С. Э., **Ошкин И. Ю.**, Глаголев М. В., Лапшина Д. Е., Максютков Ш. Ш., Дедыш С. Н. 2013. Метанотрофные бактерии грязевых микровулканов в поймах северных рек. *Микробиология*, т. 82, № 6, с. 732–740.

2. **Oshkin I.Y.**, Wegner C.E., Lüke C, Glagolev MV, Filippov IV, Pimenov NV, Liesack W, Dedysh SN. 2014. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold. methane seeps in floodplains of West Siberian rivers. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 80(19), p. 5944-5954.

3. **Oshkin I.Y.**, Belova S.E., Danilova O.V., Miroshnikov K.K., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damste J.S., Liesack W., Dedysh S.N. 2016. *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., a neutrophilic methanotroph from low-temperature terrestrial environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 66(6), p. 2417-2423.

Тезисы конференций

1. **Ошкин И.Ю.**, Белова С.Э. Метанотрофные бактерии – обитатели холодных метановых сипов в поймах северных рек. *Материалы VIII молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии»*. Москва, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. 29-31.10.2012. МАКС Пресс, Москва. С. 87.

2. **Oshkin I.Y.**, Wegner C.E., Lüke C., Glagolev M.V., Filippov I.V., Pimenov N.V., Liesack W., Dedysh S.N. Methanotrophic community attenuating CH₄ fluxes from cold methane seeps in floodplains of West Siberian rivers. 10th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2014), Saint Petersburg, Russia, 2014.

3. **Ошкин И.Ю.** Характеристика метанотрофных бактерий, выделенных из холодных метановых сипов Западной Сибири. *Материалы 19-й Международной Пушчинской школы конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»*. Пушкино, Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Пушкино. 20-24.04.2015.

4. Мирошников К.К., Белова С.Э., **Ошкин И.Ю.**, Колотилова Н.Н., Дедыш С.Н. Молекулярная идентификация метанотрофных бактерий, выделенных из метановых сипов пойм северных рек. *Сборник «Автотрофные микроорганизмы: 5 Всероссийский симпозиум с международным участием»*. Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, 21-24.12.2015 г. МАКС Пресс, Москва.