

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**  
**Федеральное государственное учреждение**  
**«Федеральный исследовательский центр**  
**«Фундаментальные основы биотехнологии»**  
**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского**

*На правах рукописи*

**Ошкин Игорь Юрьевич**

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

**Специальность 03.02.03 – микробиология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:**

**Д.б.н. С.Н. Дедыш**

Москва – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Часть 1. ВВЕДЕНИЕ</b>	6
Актуальность проблемы	6
Цель и задачи исследования	8
Научная новизна и значимость работы	9
Практическая значимость	10
Апробация работы	10
Публикации	11
Объем и структура	11
Место проведения работы и благодарности	11
<b>Часть 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	13
<b>Глава 1. Метан как важнейший парниковый газ</b>	13
1.1. Глобальный бюджет метана	13
1.2. Геологические источники метана	15
1.3. Метановые сипы холодных экосистем	17
<b>Глава 2. Характеристика метанотрофных бактерий и молекулярные методы их детекции</b>	22
2.1. Филогения и основные характеристики метанотрофных бактерий	22
2.2. Метаболизм метанотрофных бактерий	28
2.3. Молекулярные методы детекции метанотрофных бактерий	40
<b>Глава 3. Метанотрофы холодных экосистем</b>	61
3.1. Метанотрофные бактерии тундровых почв	61
3.2. Психрофильные метанотрофы Антарктиды	64

3.3. Метанотрофы в сибирской вечной мерзлоте	65
3.4. Метанотрофные бактерии в глубоко залегающих грунтовых водах Финно-Скандинавского шельфа	69
3.6. Метанотрофное сообщество метановых сипов в осадках озера Констэнс	70
3.7. Метанотрофное сообщество осадков арктических озер	72
<b>Часть 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	<b>75</b>
<b>Глава 4. Объекты и методы исследования</b>	<b>75</b>
4.1. Район проведения исследований	75
4.2. Измерение потоков газа из метановых сипов	75
4.3. Аналитические исследования	76
4.4. Отбор образцов для анализа	76
4.5. Определение метанооксиляющей активности	77
4.6. Определение численности метанотрофных бактерий	78
4.6.1. Процедура фиксации накопительных культур метанотрофных бактерий и образцов ила из метановых сипов	78
4.6.2. Процедура гибридизации фиксированных образцов культур метанотрофных бактерий с зондами	78
4.6.3. Процедура гибридизации фиксированных образцов ила	79
4.7. Оценка разнообразия метанотрофов	80
4.7.1. Экстракция тотальной ДНК из образцов ила	80
4.7.2. ПЦР-амплификация фрагментов гена <i>pmoA</i>	81
4.8. Обработка данных пиросеквенирования гена <i>pmoA</i>	82
4.9. Получение накопительных культур метанотрофов, анализ их состава, выделение изолятов в чистую культуру	83

4.10. Анализ ростовых характеристик изолятов в зависимости от температуры	85
4.11. Таксономическое описание нового штамма	85
4.11.1. ПЦР-амплификация филогенетических и функциональных генов	86
4.11.2. Филогенетический анализ	88
4.11.3. Методы изучения морфологических и физиологических характеристик	88
4.11.4. Электронная микроскопия	89
4.11.5. Анализ состава жирных кислот	90
4.11.6. Определение нуклеотидного состава ДНК	91
4.11.7. Фотодокументирование материалов и обработка данных	91
<b>Результаты и обсуждение</b>	92
<b>Глава 5. Распределение метановых сипов в долине реки Мухринской и полевые измерения потоков метана</b>	92
5.1. Картирование метановых сипов и определение их физико-химических характеристик	92
5.2. Полевые измерения потоков метана из метановых сипов	96
<b>Глава 6. Учет клеток метанотрофов в иле метановых сипов и оценка активности окисления метана</b>	97
6.1. Общее число и доля метанотрофных бактерий в метановых сипах	98
6.2. Потенциальная активность окисления метана образцами ила из сипов	99
<b>Глава 7. Молекулярная идентификация метанотрофов, развивающихся в локусах выхода метана, с помощью анализа генов <i>pmoA</i></b>	100
<b>Глава 8. Выделение метанотрофных представителей <i>Gamma</i>proteobacteria из ила метановых сипов</b>	107
8.1. Получение накопительных культур метанооксиляющих микроорганизмов	107

8.2	Изоляты метанотрофных бактерий и их ростовые характеристики	108
8.3.	Описание нового вида психротолерантных метанотрофов, <i>Methylovulum psychrotolerans</i>	112
8.4.	Уточненное описание рода <i>Methylovulum</i>	118
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	119
	<b>ВЫВОДЫ</b>	122
	<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	124
	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	125

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 ( $\text{CH}_4$ ) в атмосферу Земли (Conrad, 2009; Kirschke *et al.*, 2013). Из общего потока метана, оцениваемого ныне в 550-678 Тг  $\text{г}^{-1}$ , крупнейшим источником являются болотные экосистемы, продуцирующие 175-217 Тг  $\text{CH}_4 \text{ г}^{-1}$  (Kirschke *et al.*, 2013; Ciais *et al.*, 2013). Вторыми по мощности являются геологические источники, эмиссия  $\text{CH}_4$  из которых составляет около 50 Тг  $\text{г}^{-1}$ , потенциально достигая 80 Тг  $\text{г}^{-1}$  (Etiope *et al.*, 2008). Эти источники связаны с углеводородсодержащими седиментационными бассейнами: из подземных резервуаров природный газ выходит в атмосферу через вышележащую почву как повсеместно, так и по отдельным каналам, заканчивающимся макросипами (в частности, грязевыми вулканами) 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; Etiope *et al.*, 2007; Etiope *et al.*, 2009). 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 метана термогенного происхождения (до 8 т  $\text{CH}_4 \text{ сип}^{-1} \text{ д}^{-1}$ ).

В Гренландии в зоне отступления ледового щита также были обнаружены многочисленные сипы, однако 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  $\text{CH}_4$  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 гиперсолёный сип, в котором отсутствовали бактериальные агенты окисления метана, и процесс окисления  $\text{CH}_4$  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 *Gamma*proteobacteria (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 tundra*). 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 несколько лет назад 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 CH<sub>4</sub> 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 Мухринская (Ханты-Мансийский А.О.) и идентификация ключевых микробных агентов, ответственных за окисление CH<sub>4</sub> в этих сообществах.



Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценка скоростей эмиссии  $\text{CH}_4$  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 гибридизация *in situ*, 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  $\text{CH}_4$  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  $\text{CH}_4$  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  $\text{CH}_4$  при низких температурах. Типовой штамм нового вида депонирован в международных коллекциях микроорганизмов LMG и VKM.

### **Практическая значимость**

Проведено картирование распространения метановых сипов с оценкой величин потоков  $\text{CH}_4$  из них в долине реки Мухринская, Ханты-Мансийский А.О.

Получен ряд чистых культур метанотрофных бактерий, которые могут быть использованы в качестве биологических агентов окисления  $\text{CH}_4$  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. 10<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2014), Saint Petersburg, Russia, 2014.

3. 19 Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», Пущино, 2015.

4. Автотрофные микроорганизмы: 5 Всероссийский симпозиум с международным участием, Москва, 2015

### **Публикации**

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

### **Объём 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 (ФИЦ Биотехнологии 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).

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. МЕТАН КАК ВАЖНЕЙШИЙ ПАРНИКОВЫЙ ГАЗ.

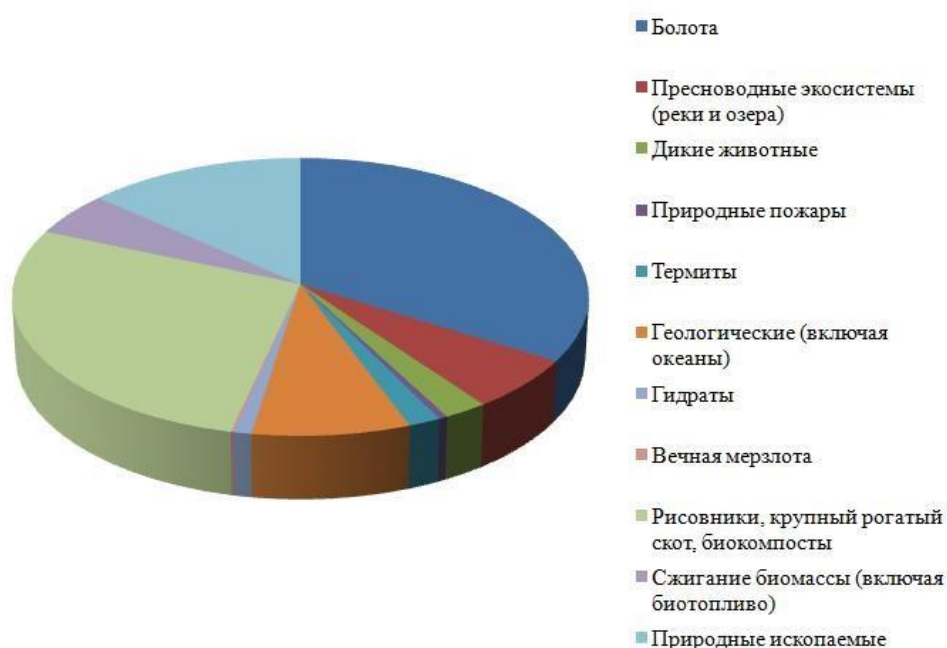
#### 1.1. Глобальный бюджет метана.

Пятая часть общего вклада парниковых газов в глобальное потепление принадлежит метану ( $\text{CH}_4$ ). По происхождению атмосферный  $\text{CH}_4$  может быть биогенным, термогенным или пирогенным. Биогенные источники  $\text{CH}_4$  включают производящих метан микроорганизмов (метаногенов), обитающих в анаэробных местообитаниях, таких как болота, рисовые чеки, пресноводные водоемы с низкой концентрацией растворенного кислорода, пищеварительная система жвачных животных и термитов, а также органические отходы (компосты, сточные отходы, свалки). Термогенный метан, формировавшийся на протяжении миллионов лет, относится к ископаемому топливу. Он попадает в атмосферу через природные образования, в частности наземные метановые сипы, морские сипы и грязевые вулканы, а также в результате разработок месторождений угля, нефти и природного газа. Пирогенный  $\text{CH}_4$  является продуктом неполного сжигания биомассы, ископаемого топлива и биотоплива, а также почвенного органического вещества во время лесных пожаров (Kirschke *et al.*, 2013).

С начала индустриальной эры атмосферная концентрация метана увеличилась в 2.5 раза (Ciais *et al.*, 2013). За устойчивым увеличением уровней атмосферного  $\text{CH}_4$  в 1980х последовало приостановление роста в 1990х с дальнейшей стабилизацией в период от 1999 до 2006. Однако с 2007 года концентрация  $\text{CH}_4$  снова начала расти,

что вызывало дисбаланс глобального бюджета метана (Kirschke *et al.*, 2013; Rigby *et al.*, 2008; Dlugogencky *et al.*, 2011).

На настоящий момент глобальная эмиссия метана в атмосферу по разным оценкам составляет от 550 до 678 Тг в год (Ciais *et al.*, 2013; Kirschke *et al.*, 2013). Вклады различных источников  $\text{CH}_4$  в глобальный бюджет этого газа продемонстрированы на рис. 1.



**Рис. 1.** Относительный вклад природных и антропогенных источников метана в общий баланс этого газа в атмосфере (основано на данных Kirschke *et al.*, 2013).

Болота являются самым крупным источником атмосферного метана. Их вклад составляет от 175 до 217 Тг  $\text{CH}_4 \text{ г}^{-1}$  (Ciais *et al.*, 2013; Kirschke *et al.*, 2013). Вторым по величине природным источником является геологический метан, эмиссия которого происходит из угольных пластов, месторождений природного газа и газовых гидратов. Другими природными источниками являются термиты, океаны, лесные пожары и дикие жвачные животные, чей вклад в эмиссию метана составляет  $\approx 40\text{-}50$

Tg CH<sub>4</sub> г<sup>-1</sup> (Dlugokencky *et al.*, 2011; Kirschke *et al.*, 2013). Антропогенные источники CH<sub>4</sub> включают рисовники, крупный рогатый скот, биокомпосты (200 Tg CH<sub>4</sub> г<sup>-1</sup>), сжигание биомассы (30 Tg CH<sub>4</sub> г<sup>-1</sup>) и добычу ископаемого топлива (96 Tg CH<sub>4</sub> г<sup>-1</sup>).

## 1.2. Геологические источники метана

По недавним оценкам эмиссия метана из геологических источников составляет более чем 50 Tg CH<sub>4</sub> г<sup>-1</sup>, потенциально достигая 80 Tg CH<sub>4</sub> г<sup>-1</sup>, что делает их вторыми по значимости природными источниками атмосферного метана (Etiope, 2008). Эмиссия геологического CH<sub>4</sub> бывает приурочена к видимым структурам, таким как разнообразные выходы газа на поверхность, богатые углекислым газом мофеты, бурлящие источники, или происходит с больших площадей через микровысачивания (микросипы)<sup>1</sup>(Etiope, Klusman, 2002). В осадочных бассейнах образование метана происходит вследствие биогенных и термогенных процессов. Биогенный метан является результатом разложения осадочного органического вещества бактериями и имеет, как правило, характерный показатель  $\delta^{13}C_{CH_4}$  в интервале от -55 до -88‰. На больших глубинах CH<sub>4</sub>, образованный за счет термического разрушения органического вещества или тяжелых углеводородов, имеет показатель  $\delta^{13}C_{CH_4}$  от -25 до -55‰.

Эмиссия метана из наземных экосистем происходит через высачивания<sup>2</sup>, к которым относится микросипы и наземные макросипы или грязевые вулканы. Микровысачивания или микросипы – это медленная и непрерывная утечка метана и легких алканов с глубины 2-5 км через почву на территории осадочных бассейнов, где

---

<sup>1</sup> в англоязычной литературе используется термин «microseepage»

<sup>2</sup> в англоязычной литературе используется термин «seepage»

происходит термическое разложение захороненного органического вещества. Потоки на территориях с микросипами варьируют от нескольких единиц до сотен  $\text{мг}^{-1} \text{м}^2 \text{д}^{-1}$ . Эти значения сравнимы с величинами потоков метана из затопленных экосистем с выраженными анаэробными процессами, которые, как правило, составляют 1-500  $\text{мг} \text{м}^{-2} \text{д}^{-1}$  (Batjes and Bridges, 1994; Сабреков и др., 2014). Баланс  $\text{CH}_4$ , выделяющегося из микросипов на территории различных осадочных бассейнов, представлен в таблице 1 (Etiope, Klusman, 2002).

Поглощение метана характерно для микросипов сухих почв и является следствием метанооксилюющей активности бактерий, которые помимо окисления  $\text{CH}_4$  из микровысачиваний, поглощают также атмосферный метан. Отрицательные значения в графе «баланс  $\text{CH}_4$ » показывают степень этого поглощения (таблица 1). Самые крупные выбросы метана в атмосферу происходят из макросипов, в особенности из грязевых вулканов. Эти конусовидные образования формируются в местах разломов в результате адвекции осадочного материала, содержащего водную и газовые фракции. Грязевые вулканы могут быть представлены как очень крупными структурами (до  $100 \text{ км}^2$ ), так и небольшими формами рельефа площадью в несколько десятков  $\text{м}^2$  (Dimitrov, 2002). В большинстве случаев газ из грязевых вулканов имеет термогенное происхождение (Альбов, 1971). В районах газовых и нефтяных месторождений Альпийско-Гималайского складчатого пояса, Тихого океана и Карибского складчатого пояса было обнаружено по крайней мере 700-800 грязевых вулканов. Наиболее детально изучены грязевые вулканы в Азербайджане, Туркменистане и Италии (Guliyev, Feizullayev, 1997; Dia *et al.*, 1999; Etiope, Milkov, 2004). Потоки метана из грязевых вулканов по современным оценкам составляют от 6 до 9  $\text{Мт} \text{г}^{-1}$  (Etiope, Milkov, 2004). Эмиссия из морских сипов по местным и



региональным оценкам составляет 103-106 т г<sup>-1</sup> с территорий общей площадью 105 км<sup>2</sup> (Judd *et al.*, 1997).

**Таблица 1. Баланс метана, выходящего через микросипы в разных осадочных бассейнах.**

Месторасположение	Баланс CH <sub>4</sub> , мг м <sup>-2</sup> д <sup>-1</sup>	Ссылка на публикацию
Denver-Julesburg basin (Colorado)	-41- 43.1	Klusman <i>et al.</i> (2000)
Music Mountain (Pennsylvania)	100 - 200	Duchscherer (1981)
Piceance (Colorado)	-6.0 - 3.1	Klusman <i>et al.</i> (2000)
Powder River (Wyoming)	-14.9 - 19.1	Klusman and Jakel (1998)
Railroad Valley (Nevada)	-6.1 - 4.8	Klusman and Jakel (1998)
S. Vincenzo la Costa mountain valley (Italy)	-3 - 600	Etioppe, Klusman, 2002

### **1.3 Метановые сипы холодных экосистем.**

В арктическом географическом поясе вечная мерзлота и ледниковые покровы изолируют большие резервуары геологического метана природных месторождений, угольных шахт и CH<sub>4</sub> в форме газовых гидратов (McGuire *et al.*, 2009). Механизмы, временные рамки и скорости эмиссии этого метана в атмосферу определены не в полной мере. Большая часть глубоко захороненного метана, образованного за счет

термического разложения органического вещества, мигрирует из исходной породы и накапливается под стратиграфическими или структурными препятствиями. Несколько авторов высказали предположение, что насыщенные льдом покрывающие породы создают непроницаемую ловушку для метана, мигрирующего из углеводородных резервуаров (Isaksen *et al.*, 2011; Lacroix, 1993). До недавнего времени наибольшее внимание было уделено изучению микросипов и грязевых вулканов в южных регионах. Однако совсем недавно на Аляске и Гренландии было обнаружено более 150000 метановых сипов (Walter Anthony *et al.*, 2012). При этом авторы выделяли два типа метановых сипов: поверхностные и те, что находятся под ледниковым покровом, - подледные. Поверхностные сипы определены как непрерывное образование, через которое происходит эмиссия «экосистемного» метана, сформированного относительно недавно. Они встречаются в неглубоководных озерах и болотных осадках, где  $\text{CH}_4$  продуцируется микробами посредством анаэробного разложения органического вещества. Также поверхностные сипы образуются в зонах протаивания в термокарстовых озерах, где возраст биологического метана, определенный радиоуглеродным методом, свидетельствует о деструкции органического вещества, депонированного в период плейстоцена. Подледные сипы высвобождают  $^{14}\text{CH}_4$ , который удерживался криосферным покровом и мог быть сформирован за счет биологических, термогенных или смешанных (биологических и термогенных) процессов в зоне осадочного бассейна, а также  $^{14}\text{CH}_4$ , являющийся продуктом разложения органики, захороненной в леднике и связанной с угольными пластами и резервуарами природного газа.

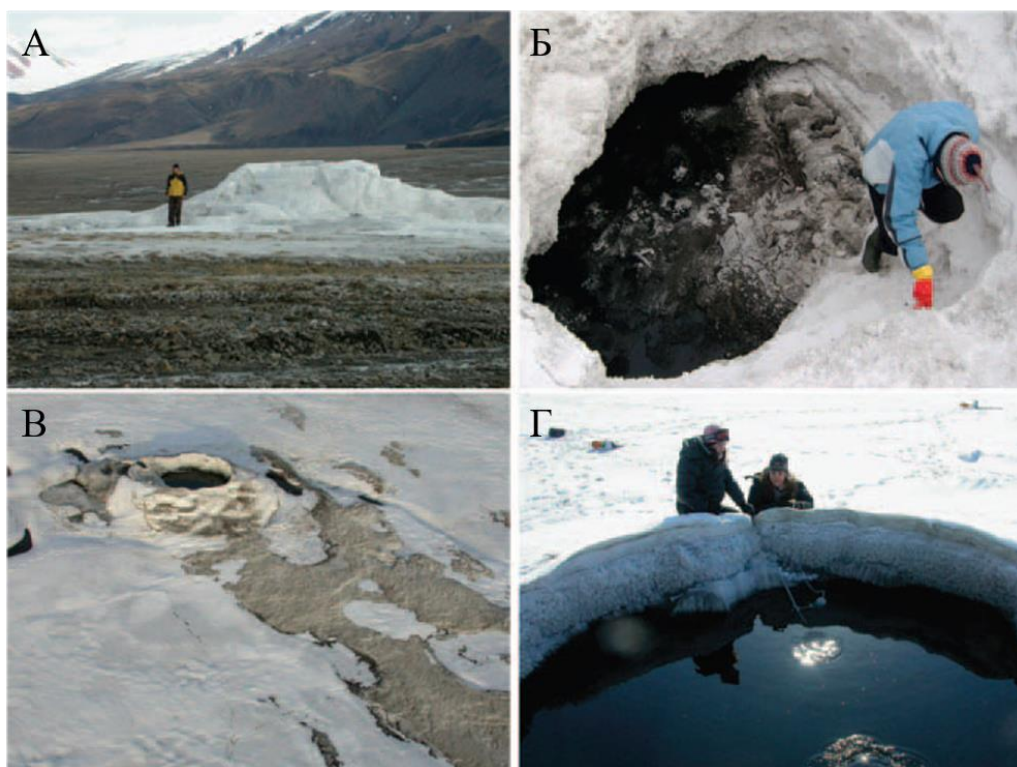
За счет эмиссии газа из поверхностных сипов во льду образовывались небольшие лунки (0.01 - 0.3 м<sup>2</sup>). Функционирование подледных сипов, потоки из которых

достигали аномально высоких значений, вызывало таяние льда разной толщины (0.2 – 2 м) на больших площадях (до 300 м<sup>2</sup>). Подледные сипы отличались от поверхностных чрезвычайно высокими объемами выходящего газа (до 141600 л сип<sup>-1</sup> д<sup>-1</sup>), пристрастным расположением, изотопным и геохимическим составом, который часто совпадал с таковым у метана угольных пластов и природного газа. Образованные в донных осадках потоками жидкости и газа кратеры<sup>3</sup> до 3 м в диаметре часто были индикаторами подледных сипов. Известно, что геологические сипы подобного размера встречаются на морском дне (Етіоре, 2009). В большинстве случаев метан из морских сипов полностью окисляется метанотрофными бактериями и не попадает в атмосферу (Reeburgh, 2007). Напротив, метан подледных сипов, концентрация которого в пузырьках газа достигает 99.5%, напрямую попадает в атмосферу через водную толщу неглубоких озер и рек. И подледные, и некоторые поверхностные сипы высвобождали метан с низким содержанием <sup>14</sup>С. Изотопный состав газа всех поверхностных сипов указывал на микробное происхождение. Геохимические характеристики и изотопный состав газа подледных сипов соответствовал термогенному СН<sub>4</sub> глубоких газовых скважин и углеводородных резервуаров на Аляске или образованному микроорганизмами метану угольных шахт. Потоки метана из поверхностных сипов составляли 0.75±0.12 Тг СН<sub>4</sub> г<sup>-1</sup>, из подледных макросипов - 0.08±0.01 Тг СН<sub>4</sub> г<sup>-1</sup> и из минисипов – 0.17±0.03 Тг СН<sub>4</sub> г<sup>-1</sup> (Walter Anthony *et al.*, 2012).

Другой тип метановых сипов был обнаружен в высоких широтах арктики в Канаде (Niederberger *et al.*, 2010). Он представлял собой конусовидную солевую туфовую структуру 2 м высотой и 4 м в диаметре с углублением по центру (Рис. 2).

---

<sup>3</sup> В англоязычной литературе для подобных объектов используется термин «rockmark»



**Рис. 2.** Метановый сип, обнаруженный высоких широтах арктики в Канаде. а) метановый сип летом; б) метановый сип, не заполненный жидкостью, в летний период; в) вид с воздуха в зимнее время; г) метановый сип, заполненный жидкостью в зимний период.

Мониторинг физико-химических характеристик, выполнявшийся на протяжении 3 лет, показал, что метановый сип является местообитанием с почти не изменяющейся температурой (от  $-4.7$  до  $-5.9$  °C), соленостью (22.1 – 26%), окислительно-восстановительным потенциалом (от  $-154$  до  $-187.4$  mV), концентрацией растворенного кислорода (0.1-0.2 р.р.м.) и сероводорода (0-50 р.р.м.). По результатам физико-химического анализа было установлено, что осадок и поверхностная вода метанового сипа в канадской арктике обладают следующими характеристиками: постоянная температура ниже 0 °C, около-нейтральные величины pH, гиперсоленость, восстановительные условия среды, низкие концентрации доступного кислорода (микроаэрофильные свойства) и растворенных веществ

(олиготрофные свойства). Газ, высвобождавшийся из метанового сипа, был представлен в основном метаном (около 50%) с постоянным изотопным составом в независимости от сезона или года отбора образцов. Низкое соотношение  $CH_4/C_{2+}$ , а также соотношения изотопов Н и С указывали на термогенное происхождение газа (Whiticar, 1999). Очень маленькая разница в показателе  $\delta^{13}C$  между растворенным неорганическим углеродом и  $CH_4$  и между  $\delta^2H$  значениями для  $CH_4$  и воды источника также являлась доказательством того, что углеводороды, высвобождающиеся из метанового сипа, образуются не за счет микробного метаногенеза.

Арктические экосистемы наиболее чувствительны к глобальному потеплению климата. По мере того как ледовая поверхность отступает, на освобожденных ото льда территориях усиливается поглощение тепла, что может стимулировать дальнейшее ускорения процесса. Таяние вечной мерзлоты и ледовых покровов приводит к высвобождению больших объемов метана, концентрация которого в атмосфере является одной из важнейших составляющих парникового эффекта. Однако эмиссия  $CH_4$  может быть снижена за счет метаболической активности метанотрофных бактерий. Особенности биологии метанотрофных бактерий и их роль в поглощении потоков метана рассмотрены ниже.

## ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИХ ДЕТЕКЦИИ.

### 2.1 Филогения и основные характеристики метанотрофных бактерий.

Метанотрофные бактерии являются уникальной группой микроорганизмов, способных использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. За окисление  $\text{CH}_4$  отвечает фермент метанмонооксигеназа (ММО), обнаруживаемый только у представителей метанотрофных бактерий и существующий в двух формах: мембранной (мММО) и растворимой (рММО).

Первый изолят метанотрофных бактерий, “*Bacillus methanicus*“ (позднее переименован в *Methylomonas methanica*) был выделен Зёнгенем в начале XX века (Söhngen, 1906). В последующие несколько десятилетий известное разнообразие метанотрофов оставалось очень низким и насчитывало лишь единицы культур. В 1970 году после масштабной работы по выделению и описанию более 100 изолятов была предложена первая классификация метанотрофных бактерий (Whittenbury *et al.*, 1970). Все описанные на тот момент метанотрофы (роды *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus* и *Methylocystis*) были разделены на 2 группы (I и II типы). Характеристиками, послужившими основой для дифференциации на два типа, были расположение внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) в виде стопок уплощенных везикул, заполняющих большую часть содержимого клетки и ориентированных перпендикулярно клеточной мембране (тип I), или расположение ВЦМ, ориентированных параллельно внешней мембране (тип II); ассимиляция углерода по рибулозомонофосфатному (тип I) или сериновому (тип II) пути; способность к азотфиксации; формирование покоящихся форм и преобладание

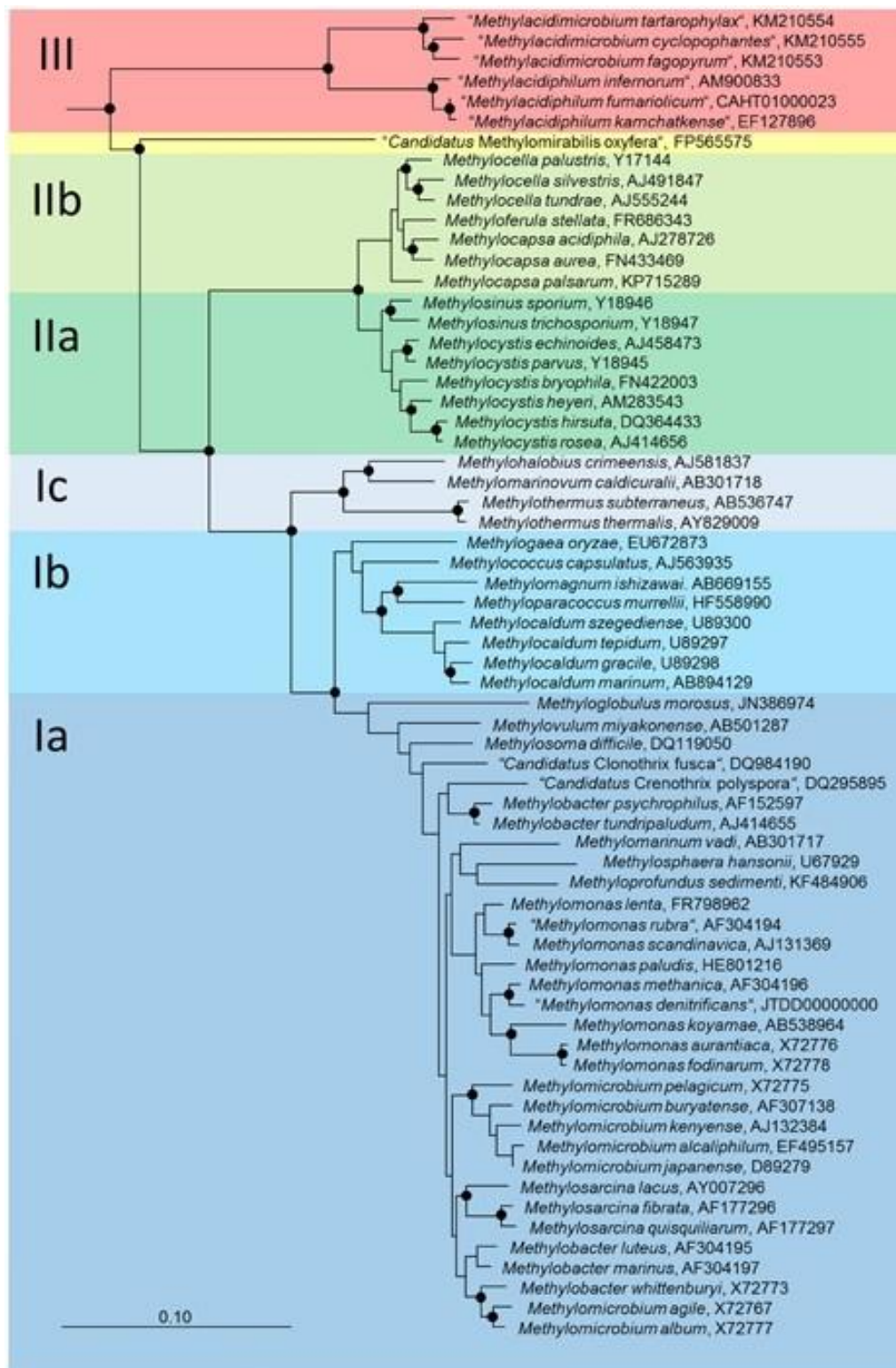
жирных кислот с 16 (тип I) или 18 (тип II) атомами углерода (Hanson and Hanson, 1996; Trotsenko and Murrell, 2008). К типу I были отнесены представители родов *Methylomonas*, *Methylococcus* и *Methylobacter*, типу II - *Methylosinus* и *Methylocystis*. Позднее, род *Methylococcus* был выделен в отдельный тип, тип X, на основании наличия рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы и способности к росту при высоких температурах (Hanson and Hanson, 1996; Bowman, 2006). Проведенный впоследствии сравнительный анализ гена 16S рРНК подтвердил верность сложившейся классификации и различное филогенетическое положение метанотрофов двух групп. Как было показано, метанотрофы типов I и X принадлежат к классу *Gamma*proteobacteria, а метанотрофы II типа – к классу *Alpha*proteobacteria.

В последующие годы были открыты новые роды метанотрофов, и с появлением молекулярных методов был пересмотрен таксономический статус некоторых ранее описанных бактерий (Bowman *et al.*, 1993, 1995; Bodrossy *et al.*, 1997). За последнее десятилетие, оказавшееся наиболее продуктивным в плане поиска новых метанотрофных микроорганизмов, число известных родов и видов было удвоено (Knief, 2015). К настоящему времени описаны 18 родов аэробных метанотрофов из класса *Gamma*proteobacteria: *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylogaea*, *Methylohalobius*, *Methylomarinum*, *Methylosarcina*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*, *Methylovulum*, *Methylothermus*, *Methyloprofundus*, *Methyloglobulus*, *Methylomagnum*, *Methyloparacoccus*, *Methylomicrobium* и *Methylomarinovum* (Bodrossy *et al.*, 1997, 1999; Bowman *et al.*, 1993; Geymonat *et al.*, 2011; Heyer *et al.*, 2005; Hirayama *et al.*, 2013; Kalyuzhnaya *et al.*, 2005; Rahalkar *et al.*, 2007; Bowman *et al.*, 1997; Iguchi *et al.*, 2011; Tavormina *et al.*, 2015; Deutzmann *et al.*, 2014; Khalifa *et al.*, 2015; Hoefman *et al.*, 2014; Bowman *et al.*, 1995; Wise *et al.*,

2001; Hirayama *et al.*, 2014). К *Gammaproteobacteria* также принадлежат не полученные пока в чистых культурах нитчатые метанотрофные бактерии ‘*Candidatus Crenothrix polyspora*’ (Stoecker *et al.*, 2006) и ‘*Candidatus Clonothrix fusca*’ (Vigliotta *et al.*, 2007). В пределах класса *Alphaproteobacteria* описано 5 родов метанотрофных бактерий: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methyloferula* и *Methylocapsa* (Bowman *et al.*, 1993; Dedysh *et al.*, 2000; Vorobev *et al.*, 2011; Dedysh *et al.*, 2002) (Рис. 3).

Разнообразие известных метаноокисляющих бактерий значительно расширилось благодаря описанию метанотрофов из филы *Verrucomicrobia*. Об их выявлении было сообщено в трех независимо выполненных работах, опубликованных в 2007-2008 годах (Dunfield *et al.*, 2007; Pol *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008). Изоляты этих метанотрофов были получены из удаленных друг от друг геотермальных местообитаний в Новой Зеландии, Южной Италии и на Камчатке. Они обнаруживали высокое сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (>98%) и были описаны как новый род “*Methyloacidiphilum*” (Op den Camp *et al.*, 2009). Три новых изолята, полученных из вулканической почвы, было предложено описать в качестве нового рода “*Methylacidimicrobium*” в пределах семейства «*Methylacidiphilaceae*» (van Teeseling *et al.*, 2014). *Verrucomicrobia* являются наиболее термофильными из всех известных метанотрофов (оптимум роста при 55-60°C) и истинными ацидофилами (оптимум роста при pH 2.0-4.3) (Op den Camp *et al.*, 2009). Недавно выполненный молекулярный скрининг широкого спектра местообитаний показал, что эти термоацидофильные метанотрофы обитают только в геотермальных местообитаниях (Sharp *et al.*, 2014), хотя могут расти в более широком интервале температур (van Teeseling *et al.*, 2014).





**Рис. 3.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК известных метанотрофных бактерий. Цитировано по Knief, 2015.

В последние годы описание новых родов и видов поставило под сомнение критерии, на которых основано традиционное разделение метанотрофов на I и II типы. В то время как основной путь ассимиляции углерода по-прежнему является главной отличительной характеристикой, ряд других особенностей больше не являются исключительными для I или II типа (Knief, 2015):

1. Многие метанотрофные бактерии семейства *Beijerinckiaceae*, относящиеся к типу II, не имеют характерных ВЦМ. У некоторых вместо ВЦМ имеются везикулы, но только *Methylocapsa* обладает хорошо развитой системой мембран. Более того, у представителей родов *Methylocella* и *Methyloferula* отсутствует мембранная метанмонооксигеназа (Dedysh *et al.*, 2000, 2002, 2004, 2015; Dunfield *et al.*, 2003, 2010; Vorobev *et al.*, 2011).

2. Все метанотрофные представители *Beijerinckiaceae* не имеют характерных для II типа жирных кислот 18:1 $\omega$ 8c (Dedysh *et al.*, 2000, 2002, 2004, 2015; Dunfield *et al.*, 2003, 2010; Vorobev *et al.*, 2011). Аналогично, у *Methylosinus sporium* также отсутствуют эти жирные кислоты (Bodelier *et al.*, 2009).

3. *Methylocystis heyeri* (метанотроф II типа) содержит жирные кислоты 16:1 $\omega$ 8c, характерные для I типа метанотрофных бактерий (Dedysh *et al.*, 2007).

4. Представители *Methylothermaceae*, относящиеся к I типу метанотрофов, обладают жирными кислотами II типа метанотрофов: *Methylohalobius crimeensis*, *Methylothermus subterraneus*, а *Methylomarinovum caldicuralii* помимо основных жирных кислот содержит 18:1 $\omega$ 7c (Heyer *et al.*, 2005; Hirayama *et al.*, 2010, 2014). Четвертый член этого семейства - *Methylothermus thermalis* – содержит жирные кислоты 18:1 $\omega$ 9c, не обнаруживаемые в большом количестве ни в других представителях *Methylothermaceae*, ни в метанотрофах II типа.

5. Метанотрофы *Verrucomicrobia* выходят за рамки существующей классификации, поскольку у большинства из них отсутствуют внутрицитоплазматические мембраны (единственное исключение - "*Methylacidimicrobium fagopyrum*") и имеются нехарактерные жирные кислоты i14:0, a15:0 (Op den Camp *et al.*, 2009; van Teeseling *et al.*, 2014).

6. Азотфиксация, формирование покоящихся форм и температурный оптимум роста более не являются критериями для определения типовой принадлежности метанотрофных бактерий (Knief, 2015).

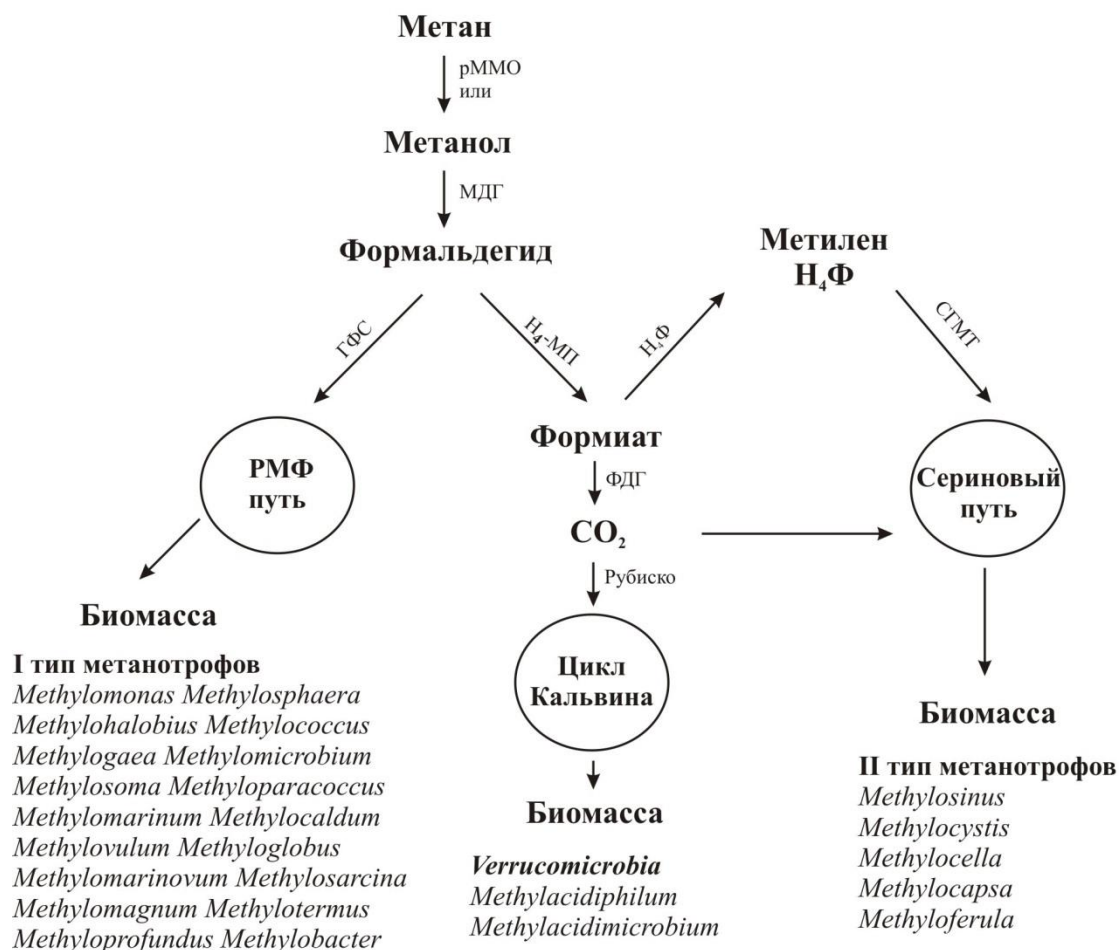
Учитывая вышеизложенные противоречия, первоначальная концепция деления метанотрофов на I и II тип недостаточно точно отражает существующее разнообразие метанотрофных бактерий (Op den Camp *et al.*, 2009; Semrau *et al.*, 2010). В настоящее время термины «тип I» и «тип II» используются как синонимы метанотрофов классов *Gamma*- и *Alphaproteobacteria*.

Метанотрофы *Alphaproteobacteria* недавно были разделены на две подгруппы: тип IIa (*Methylocystaceae*) и тип IIb (*Beijerinckiaceae*) (Deng *et al.*, 2013; Dumont *et al.*, 2014). Схожим образом метанотрофы *Gammaproteobacteria* часто разбиваются на 2 подгруппы: тип Ib, включающий *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylogaea* и *Methylothermaceae*, и тип Ia, в который входят остальные представители *Gammaproteobacteria* (Chen *et al.*, 2008; Deutzmann *et al.*, 2011; Dumont *et al.*, 2011; Siljanen *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2014). В некоторых из недавних исследований метанотрофные представители *Gammaproteobacteria* были разделены на три подгруппы - типы Ia, Ib, Ic (Рис. 3). В некоторых работах по исследованию разнообразия бактерий молекулярными методами тип Ic был дополнен последовательностями из некультивируемых кластеров (USC $\gamma$ , JR2, JR3, OPU1) и

последовательностями гена *amoA Nitrosococcus* (Lüke and Frenzel, 2011; Henneberger *et al.*, 2012; Dumont *et al.*, 2014). Такое разделение, однако, используется лишь для удобства анализа данных молекулярных исследований и не является общепринятым.

## **2.2 Метаболизм метанотрофных бактерий.**

Во всех известных на данный момент метанотрофах первичное окисление метана до метанола катализируется ферментом метанмонооксигеназой (Semrau *et al.*, 2010). Затем метанол окисляется до формальдегида, который может быть ассимилирован клеткой или окислен до формиата и впоследствии до диоксида углерода (Рис. 4). Фермент метанмонооксигеназа существует в двух формах: растворимой и мембран-связанной. Последняя имеется у всех изученных метанотрофов за исключением бактерий родов *Methylocella* и *Methyloferula* (Dedysh *et al.*, 2000; Vorobev *et al.*, 2011). Лишь немногие из изученных метанотрофов имеют обе формы фермента, причем присутствие рММО является штаммовым свойством этих бактерий. Причины ограниченного распространения рММО, возможно, связаны со специфической функцией фермента. рММО не является конститутивным ферментом, при этом единственным фактором, определяющим его активность в клетках, является соотношение содержания меди к биомассе. При высокой доле меди (>2.5 мкмоль/г клеток) синтезируется мембранная форма фермента – рММО, при низком – рММО (Троценко, Хмеленина, 2008).



**Рис. 4.** Общая схема метаболизма метанотрофных бактерий. Н<sub>4</sub>Ф, тетрагидрофолатный путь; Н<sub>4</sub>-МП, тетрагидрометаноптеринный путь, РМФ, рибулозимонофосфатный путь. Ключевые ферменты: мММО, мембранная метанмонооксигеназа; рММО, растворимая метанмонооксигеназа; МДГ, метанолдегидрогеназа; ГФС, гексулозо-6-фосфат синтаза; ФДГ, формиатдегидрогеназа; Рубиско, Рибулозо-1,5-бифосфат карбоксилаза; СГМТ: серингидроксиметилтрансфераза (Kalyuzhnaya *et al.*, 2015).

**Растворимая метанмонооксигеназа.** Растворимая метанмонооксигеназа (рММО) катализирует НАДФ(Н)- и O-зависимое окисление метана до метанола:  $\text{CH}_4 + \text{НАД(Ф)Н} + \text{H}^+ + \text{O}_2 = \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{НАД(Ф)} + \text{рММО}$ . Она состоит из трех

компонентов: гидроксилазы, редуктазы и регуляторного протеина с молекулярной структурой  $(\alpha\beta\gamma)_2$  (Colby *et al.*, 1977).  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы гидроксилазы имеют молекулярную массу 54, 42 и 22 кДа, соответственно. По результатам спектроскопического и рентгеноструктурного анализа было показано, что входящий в гидроксилазу полипептид массой 54 кДа содержит кластер с двумя атомами железа, соединенными кислородным мостиком (Semrau *et al.*, 2010). Этот кластер не только является носителем кислорода, но и выполняет каталитическую функцию (Trotsenko, Murrel, 2008). Редуктаза (MmoC) представляет собой Fe-S флавопротеин (38.5 кДа), при восстановлении которого происходит внутримолекулярный перенос электронов с НАДФ(Н) на  $Fe_2S_2$  центр. MmoB - это небольшой полипептид (16 кДа), в структуре которого нет ни атомов металла, ни простетических групп. Это регуляторный белок абсолютно незаменим для гидроксилазной активности в *Ms. capsulatis* Bath (Green and Dalton, 1985) и в *Ms. trichosporium* OB3b (Fox *et al.*, 1989). Реакция, катализируемая рММО, осуществляется по следующему механизму. Метан связывается с ферментом и, по-видимому, локализуется в гидрофобном кармане в растворимом состоянии, т.к. прямая связь  $CH_4$  и  $Fe^{3+}$  не была обнаружена. Затем один из атомов железа восстанавливается, и фермент приобретает смешанную валентность ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ). Последующее восстановление активного центра приводит к образованию пероксида водорода (Fox *et al.*, 1989; Woodland and Cammack, 1985). Гидроксил радикал, образующийся за счет разложения перекиси, присоединяет водород с образованием  $CH_3\bullet$  и  $H_2O$ . По другому сценарию за счет распада перекиси могут образоваться  $H_2O$  и  $O\bullet$ . Последний соединяется с водородом из молекулы метана.  $CH_3$ -радикал затем с участием Fe соединяется с  $OH\bullet$ , образуя метанол (Trotsenko and Murrel, 2008).

**Мембранная метанмонооксигеназа.** В связи с крайней нестабильностью мембранной метанмонооксигеназы она изучена хуже, чем рММО. Мембранная метанмонооксигеназа локализована во внутренних мембранных структурах (Anthony, 1982; Semrau *et al.*, 2010). Нескольким коллективам исследователей удалось выделить и охарактеризовать мММО *Ms. capsulatis* Bath (Kitmitto *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 1994; Smith and Dalton, 1989). Этот фермент представляет собой тример  $(\alpha\beta\gamma)_3$  и состоит из 3 субъединиц с молекулярной массой 45, 27 и 23 кДа. Активная мММО содержит 2 атома железа и около 15 атомов меди на молекулу фермента, что, однако, лишь частично подтверждено и требует дальнейших уточнений (Zahn, DiSpirito, 1996; Choi *et al.*, 2003; Lieberman, Rosenzweig, 2005). У мММО *Methylococcus capsulatis* Bath два металлсодержащих центра (моноядерный и биядерный Cu-центры) расположены в гидрофильных частях каждой субъединицы PmoB. Третий металлсодержащий центр (Zn) находится внутри мембраны (Lieberman, Rosenzweig, 2005). Для функционирования фермента необходим небольшой флуоресцентный хромопептид – метанобактин. По-видимому, функцией метанобактина или комплекса «метанобактин-Cu» является связывание различных металлов за пределами клетки (Choi *et al.*, 2005, 2006; DiSpirito *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004). Мембранная ММО *M. trichosporium* OV3b содержит 2 иона Cu на 100 кДА промотера. Биядерный Cu-содержащий центр схож с таковым у *M. capsulatis* Bath.

В хромосоме *Ms. capsulatis* Bath было обнаружено две копии кодирующего мММО генного кластера *pmoCAB* и дополнительная копия *pmoC* (Semrau *et al.*, 1995; Stolyar *et al.*, 1999, 2001). Сходная организация оперона *amoCAB*, кодирующего аммиакмонооксигеназу, была выявлена в нитрицифирующих бактериях. Сравнение генов *pmo* и *amo* указало на их эволюционное родство (Holmes *et al.*, 1995; Klotz and

Norton, 1998). Сравнительно недавно у ряда метанотрофов II типа было обнаружено два различных гена *pmoA*: «стандартный» *pmoA* или *pmoA1* и «новый» *pmoA* или *pmoA2* (Dunfield *et al.*, 2002; Tchawa Yimga *et al.*, 2003). Последний отсутствует у представителей родов *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylococcus* and *Methylocaldum* (Tchawa Yimga *et al.*, 2003). У *Methylocystis* sp. SC2 гены *pmoA1* и *pmoA2* являются составляющими генных кластеров *pmoCAB1* и *pmoCAB2*, которые обнаруживают низкое сходство на уровне ДНК (67.4-70.9%) и на уровне аминокислотных последовательностей (59.3-65.6%) (Ricke *et al.*, 2004). Ферменты, кодируемые генами *pmoCAB1* и *pmoCAB2*, обладают различным сродством к CH<sub>4</sub>. Экспрессия мММО1 имеет место при концентрациях метана выше 600 ppmv, в то время как мММО2 способна к окислению CH<sub>4</sub> даже при его атмосферной концентрации (Ваани, Liesack, 2008).

К настоящему моменту пока не удалось экспрессировать рекомбинантную мММО. Первые данные по трехмерной структуре белкового комплекса, окисляющего метан до формальдегида в *Mc. capsulatis* Bath, были получены с использованием криоэлектронной микроскопии. Была предложена модель, согласно которой цилиндрическая структура пары ферментов мММО-МДГ образована мММО-Н, а «верхушечный домен» представлен МДГ (Myronova *et al.*, 2006). Такая пространственная организация<sup>4</sup> комплекса из двух ферментов (мММО и МДГ) делает его более стабильным и способствует прямому электронному транспорту между составными частями комплекса, что приводит к более эффективному окислению CH<sub>4</sub> (Leak *et al.*, 1985).

---

<sup>4</sup> В англоязычной литературе используется термин «screw cap mechanism»



**Окисление метанола.** Метанол, образующийся из метана, в дальнейшем окисляется ферментом метанолдегидрогеназой (МДГ), находящемся в периплазматическом пространстве клетки. Простетической группой этого фермента является пирролохинолинхинон (ПХХ) (Trotsenko, Murrel, 2008). Молекулярная структура МДГ (MxaFI-МДГ) и механизмы реакции были детально изучены на примере грамотрицательных бактерий, использующих метанол в качестве субстрата (Anthony *et al.*, 1994, Anthony and Williams, 2003). МДГ имеет тетрамерную структуру  $\alpha_2\beta_2$ . Каждая  $\alpha$ -субъединица несет ион  $\text{Ca}^{2+}$  и одну молекулу ПХХ (Anthony, 2004). Функция  $\beta$ -субъединицы пока не выявлена, но поскольку она не образует хорошо различимого домена в молекуле фермента, предполагается, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы формируются из одной полипептидной последовательности. Гены, кодирующие большие субъединицы МДГ (*mxaF*), крайне консервативны как у метанотрофов, так и у метилотрофов (Bastien *et al.*, 1989, McDonald and Murrel, 1997).

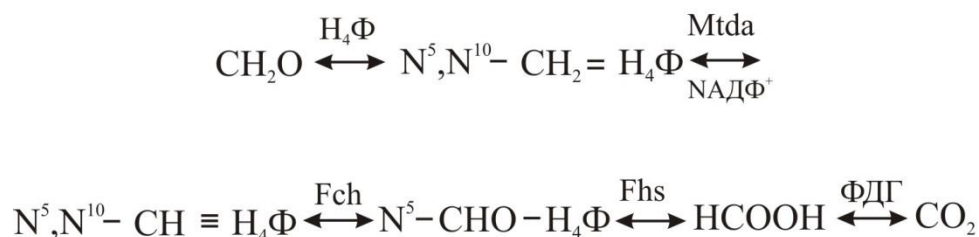
В результате работ по секвенированию геномов метилотрофных бактерий был обнаружен другой тип метанолдегидрогеназ, XoxF-МДГ, у которых, по-видимому, отсутствует малая субъединица и которые обнаруживают лишь 50% сходства нуклеотидной последовательности с геном *mxaF* (Chistoserdova and Lidstrom, 1997; Giovannoni *et al.* 2008; Kalyuzhnaya *et al.* 2008b). XoxF-МДГ, которые удалось получить в чистом виде, представлены гомодимерными белками, не имеющими малой субъединицы и содержащими в активном центре редкоземельные элементы семейства лантаноидов (лантан и церий). Наличие редкоземельных элементов может придавать XoxF-МДГ более высокую каталитическую активность. Более того, XoxF-МДГ способны окислять метанол до формиата, а не до формальдегида, как в случае с MxaFI-МДГ. В то время как структуры MxaFI- и XoxF-МДГ консервативны, в том

числе и в отношении связывания ПХХ, включение редкоземельных элементов требует наличия остатка аспартата рядом с каталитическим центром (Keltjens *et al.*, 2014).

**Окисление формальдегида.** Окисление формальдегида (НСОН) является важнейшей стадией в цепочке превращений метана до углекислого газа не только с точки зрения выделения энергии, но и поддержания внутриклеточной концентрации НСОН на нетоксичном уровне (Chistoserdova, 2011). Большая часть восстановительных эквивалентов, требуемых для образования  $\text{CO}_2$  из  $\text{CH}_4$ , формируется в процессе окисления формальдегида через формиат до углекислого газа. У метанотрофов есть несколько ферментов, ответственных за окисление НСОН. Эти ферменты разделены на две группы: НАДФ<sup>+</sup>-специфичные и цитохром-связанные. В свою очередь, НАДФ<sup>+</sup>-специфичные ферменты делятся на две группы в зависимости от таких вторичных кофакторов, как тиолы, тетрагидрофолаты (глутатион,  $\text{H}_4\text{F}$ ) или тетрагидрометаноптерин (Trotsenko, Murrel, 2008).

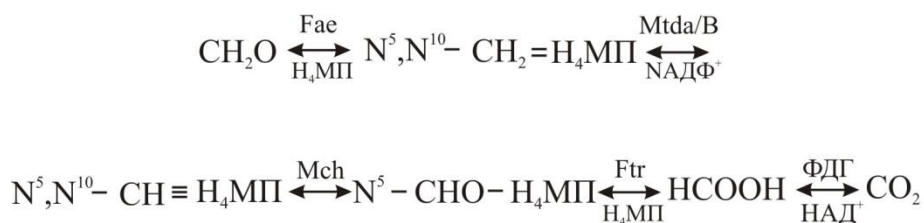
В *Ms. capsulatis* Bath, который был выращен при высоких концентрациях меди, необходимых для экспрессии мММО, формальдегид окислялся главным образом за счет цитохром-связанной формальдегиддегидрогеназы (ФДГ) (Zahn *et al.*, 2011). Фермент, специфичный для формальдегида, имеет ПХХ в качестве протетической группы и состоит из 4-х идентичных субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу 49.5 кДа.

Недавнее открытие показало, что метилотрофы используют птерины ( $\text{H}_4\text{F}$ /ТГФ и тетрагидрометаноптерин) в качестве кофакторов в процессе активации окисления формальдегида (Vorholt, 2002). Путь окисления НСОН через  $\text{H}_4\text{F}$  включает следующие реакции (Trotsenko, Murrel, 2008):



У метанотрофных бактерий II типа главная роль ферментов метаболического пути через ТГФ (ТГФ-путь) заключается в поддержании высокой концентрации соединения  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилен-ТГФ, которое является первичным акцептором формальдегида в сериновом пути ассимиляции углерода. Из-за обратимости реакции эти ферменты могут катализировать процесс как в сторону окисления, так и в сторону ассимиляции  $\text{НСООН}$  (Vorholt, 2002). У метанотрофов I типа функции ТГФ-пути пока не были определены. Предположительно,  $\text{C}_1$  производные этого пути используются в биосинтезе тимидина и пурина.

Реакции  $\text{H}_4\text{МП}$ -зависимого окисления формальдегида были впервые обнаружены в метаногенах и сульфатредуцирующих археях и считались характерными только для этих строгих анаэробов (Trotsenko, Murrel, 2008). Открытие  $\text{H}_4\text{МП}$ -зависимого окисления формальдегида аэробным метилотрофом *Methylobacterium extorquens* AM1 стало основанием для предположения об эволюционном родстве между аэробами и анаэробами (*Eubacteria* и *Archaea*) (Chistoserdova et al., 1998). Этот метаболический путь включает следующие реакции:



Наиболее высокие активности ферментов метаболического пути, метенил-Н<sub>4</sub>МП-циклогидролазы и НАД(Ф)-зависимой метенил-Н<sub>4</sub>МП-дегидрогеназы, были обнаружены в *Mt. capsulatis* Bath и других метанотрофах I и II типа (Vorholt *et al.*, 1999). Фермент, активирующий формальдегид (Fae), в *M. extorquens* и *Paracoccus denitrificans* ускоряет спонтанную реакцию конденсации HCOH и H<sub>4</sub>МП с образованием N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-метилен- H<sub>4</sub>МП (Vorholt *et al.*, 2000). Мутант Fae<sup>-</sup> был более чувствителен к формальдегиду и не рос на метаноле, что, прежде всего, говорит о важной роли этого фермента.

Окисление метилен-Н<sub>4</sub>МП до метенил-Н<sub>4</sub>МП катализируется двумя разными ферментами. НАД(Ф)<sup>+</sup>-специфичный фермент (MtdA) также катализирует обратимое дегидрирование метилен-ТГФ (Vorholt *et al.*, 1998). В то же время НАД(Ф)<sup>+</sup>-зависимая метилен-Н<sub>4</sub>МП-дегидрогеназа (MtdB), специфичная для метилен-Н<sub>4</sub>МП и не специфичная для метилен-ТГФ, катализирует необратимую реакцию (Hagemeyer *et al.*, 2000). Это соединение относят к новому классу ферментов, отличных от F<sub>420</sub> – зависимой метилен-Н<sub>4</sub>МП дегидрогеназы метаногенов и сульфатредуцирующих архей. Попытки получения жизнеспособных мутантов MtdA<sup>-</sup> закончились неудачей, что указывает на вовлечение этого фермента в центральный метаболизм (Hagemeyer *et al.*, 2000). В то же время мутанты MtdB<sup>-</sup> не росли на метаноле и были очень чувствительны к HCOH, но хорошо развивались на сукцинате. Было выдвинуто предположение, что MtdB взаимодействует с N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-метилен-Н<sub>4</sub>МП *in vivo*, в то время как MtdA представляет собой, главным образом, ТГФ-зависимый фермент. Доказательством этой гипотезе послужило расположение соответствующих генов: *mtdA* находится около *fchA*, кодирующего ТГФ-зависимую циклогидролазу, в то время как MtdB обнаруживается в кластере, кодирующем другие Н<sub>4</sub>МП-зависимые

ферменты. Несколько лет назад был открыт новый класс метилен-Н<sub>4</sub>МП-дегидрогеназы – MtdC (Vorholt *et al.*, 2005).

Метенил-Н<sub>4</sub>МП-карбогидролаза (Mch) катализирует конверсию метенил-Н<sub>4</sub>МП в N<sup>10</sup>-формил-Н<sub>4</sub>МП. Комплекс ферментов формилтрансфераза/гидролаза (FhcABCD) в метилотрофе *Methylobacterium extorquens* AM1 состоит из 4 разных компонентов и катализирует превращение N<sup>10</sup>-формил-Н<sub>4</sub>МП в формиат. Гены, кодирующие FhcABCD, расположены рядом и необходимы для микробного роста на метаноле (Chistoserdova *et al.*, 1998).

**Окисление формиата.** Эта реакция является конечной в цепочке окисления метана. НАД<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ) обнаруживается во всех известных метанотрофах (Четина, Троценко, 1981; Попов, Ламзин, 1994). В *Methylosinus trichosporium* OV3b состоит из полипептидов двух типов (54 и 106 кДа), которые могут объединены в ди- и тетрамеры ( $\alpha\beta$  и  $\alpha_2\beta_2$ ), из которых тетрамер с Mr 315 кДа, по-видимому, является преобладающим. Фермент содержит негемовое железо и не устойчивые к кислотам SH-группы. Метилотрофы кодируют несколько формиатдегидрогеназ. Например, *M. extorquens* обладают 4 разными ФДГ: W-, Mo-содержащей, цитохром-связанной и новой ФДГ4 (Laukel *et al.*, 2003; Chistoserdova *et al.*, 2004; Chistoserdova *et al.*, 2007). По-видимому, все эти типы ФДГ функционально активны. В организмах, окисляющих формальдегид через РМФ путь, окисление формиата считается не таким критическим для осуществления метилотрофии, и в соответствии с этим концентрации формиатдегидрогеназ остаются низкими (Anthony, 1992). Вклад альтернативных формиатдегидрогеназ был недавно исследован в РМФ пути метилотрофа *Methylobacillus flagellates*, который обладает формиатдегидрогеназами, гомологичными ФДГ2 и ФДГ4 у *M. extorquens*

(Hendrickson *et al.*, 2010). Эта работа показала, что окисление формиата является необходимым даже в случае наличия диссимиляторного РМФ пути, т.к. попытки получить мутанты, в которых отсутствовали бы обе ФДГ, не увенчались успехом. По всей видимости, ФДГ4 играет более важную роль, чем ФДГ2.

**Ассимиляция формальдегида.** Формальдегид, образуемый при окислении метана и метанола, усваивается клеткой с образованием соединений центрального метаболизма, которые затем используются для синтеза клеточных веществ (Anthony, 1991). Синтез многоуглеродных соединений осуществляется метанотрофными бактериями по 2 метаболическим путям: рибулозомонофосфатному (РМФ) и сериновому. В сериновом пути 2 молекулы формальдегида и 1 молекула  $\text{CO}_2$  образуют трехуглеродное соединение. В случае РМФ пути 3 молекулы формальдегида образуют трехуглеродное соединение, вовлекаемое затем в центральный метаболизм (Anthony, 1982). РМФ путь был впервые описан Quayle *et al.* (Johnson *et al.*, 1965; Kemp, Quayle, 1967; Strom *et al.*, 1974). В этом пути формальдегид объединяется с рибулозомонофосфатом по механизму альдольной конденсации с образованием гексулозо-6-фосфата. Реакция катализируется гексулозофосфатсинтазой (ГФС). Гексулозофосфатизомераза (ГФИ) превращает гексулозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат. Два вышеуказанных фермента используются в метаболизме одноуглеродных соединений только I типом метанотрофных бактерий и некоторыми другими метилотрофами, не способными к росту на метане. ГФС облигатного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* Bath представляет собой мембрансвязанный фермент большого размера (310 кДа) и гексамерной структуры, в то время как ферменты бактерий, не использующие  $\text{CH}_4$ , по-видимому, растворимы, имеют меньший размер (15.5-45.5 кДа), димерную или

мономерную структуры (Argman *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1988). Во второй стадии РМФ пути фруктозо-6-фосфат превращается в 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат, который затем расщепляется на пируват и глицеральдегид-3-фосфат. Глицеральдегидфосфат и фруктозо-6-фосфат вступают в несколько реакций, завершающихся регенерацией рибулозо-5-фосфата (Hanson, Hanson, 1996). Ферменты второй стадии РМФ пути обнаруживаются в гетеротрофных бактериях, использующих путь Энтнера-Дудорова для метаболизма глюкозы, а ферменты третьей стадии идентичны таковым у некоторых автотрофных бактерий. В связи с этим было сделано предположение, что РМФ путь является предшественником цикла Кальвина (Quayle, Ferenci, 1978; Whittenbury, 1981).

У метанотрофов II типа, относящимся к *Alphaproteobacteria*, ассимиляция формальдегида идет по сериновому пути (Hanson, Hanson, 1996). В первой реакции серинового пути, катализируемой серингидрокси-метилтрансферазой, формальдегид соединяется с глицином с образованием серина. Затем серин подвергается трансаминированию с участием гилоксилата в качестве акцептора аминогруппы с образованием гидроксипирувата и глицина. Гидроксипируват восстанавливается гидроксипируватредуктазой до глицерата. Глицераткиназа катализирует добавление фосфат группы АТФ с образованием 2-фосфоглицерата. Дальнейшие реакции превращения 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват, фиксации диоксида углерода, катализируемой фосфоенолпируваткарбоксилазой, и восстановления оксалоацетата до малата характерны для многих гетеротрофных бактерий (Hanson, Hanson, 1996). Во второй стадии метаболического пути ацетилкоэнзимА превращается в гилоксилат (Anthony, 1991).

Таким образом, у метанотрофных бактерий обнаруживаются уникальные ферменты, участвующие в процессах окисления метана и ассимиляции C1 соединений. К ним относят pММО, мММО, а также МДГ и цитохромы, необходимые для окисления метанола. Пять структурных генов кодируют белки pММО и два уникальных гена кодируют субъединицы МДГ. Некоторые из этих генов являются высоко консервативными (McDonald *et al.*, 1995; Murrel, 1992), что позволяет использовать их в качестве мишеней молекулярных исследований.

### **2.3 Молекулярные методы детекции метанотрофных бактерий.**

**Общие принципы исследования экологии метанотрофных бактерий молекулярными методами.** Классическим способом идентификации микроорганизмов является получение чистых культур с последующими физиологическими и биохимическими анализами. Однако культивируемые представители составляют лишь небольшую долю от всего существующего разнообразия *Bacteria* и *Archaea* (Amann *et al.*, 1995). Следовательно, определение ключевых представителей микробного сообщества возможно либо с помощью анализа популяции микроорганизмов непосредственно в среде их обитания (*in situ*), либо с помощью анализа ДНК (РНК), экстрагированной из исследуемого образца. Это достигается применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и использованием праймеров для филогенетических и функциональных генов, что позволяет детектировать метанотрофов непосредственно в природных образцах. Молекулярный анализ ключевых генов, кодирующих 16S рРНК, а также метанмонооксигеназу и метанолдегидрогеназу, может быть использован в обоих подходах для сравнения состава метанотрофной популяции *in situ* и тех представителей, которые растут в



лабораторных условиях в накопительных культурах. Основные молекулярные подходы, применяемые для исследования экологии метанотрофных бактерий, представлены на рис. 5.



**Рис. 5.** Молекулярные методы, используемые в исследованиях экологии метанотрофных бактерий. Цитировано по Дедыш, 2006 с небольшими видоизменениями.

**Методы детекции, основанные на идентификации гена 16S рРНК и функциональных генов.** Важнейшим условием для дизайна праймеров с целью детекции маркерных генов является наличие нуклеотидных последовательностей в доступных базах данных. Большая база данных собрана для гена 16S рРНК, поэтому

он является одним из наиболее часто используемых маркеров. Впервые, праймеры для специфической амплификации гена 16S рРНК метанотрофных/метилотрофных бактерий были применены в работах по исследованию филогении известных метанотрофов (Brusseau *et al.*, 1994; Tsien *et al.*, 1990). Недостатком этих праймеров оказалась их малая специфичность, так как они детектируют не только метанотрофов, но и метилотрофов. Первые праймеры, специфичные на уровне отдельных родов метанотрофов, детектировали представителей *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus* и *Methylosphaera* (Таблица 2) (Holmes *et al.*, 1995; Kalyuzhnaya *et al.*, 2002; Costello *et al.*, 1999). Позже были разработаны группо-специфичные праймеры для детекции метанотрофов I и II типа (Chen *et al.*, 2007).

**Таблица 2. Праймеры, используемые для детекции метанотрофных бактерий.**

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Ген	Ссылка	Целевая группа метанотрофов
Мб1007	САСТСТАСГАТСТСТСАСAG	16S рРНК	Holmes <i>et al.</i> , 1995	<i>Methylobacter</i> , <i>Methylomicrobium</i> , <i>Methylosarcina</i>
Мс1005	ССGСАТСТСТGCAGGAT			<i>Methylococcus</i> , <i>Methylobacter</i>

**Таблица 2. Продолжение.**

Mm1007	CACTCCGCTATCTCTAACAG	16S pPHK		<i>Methylomonas,</i> <i>Methylobacter</i>
Ms 1020	CCCTTGCGGAAGGAAGTC			<i>Methylosinus,</i> <i>Methylocystis</i>
Mh996r	CACTCTACTATCTCTAACGG		Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2002	<i>Methylosphaera</i>
Type IF	ATGCTTAACACATGCAAGTCG AACG		Chen <i>et al.</i> , 2007	Метанотрофы I типа
Type IR	CCACTGGTGTTCTTCMGAT			Метанотрофы II типа
Type IIF	GGGAMGATAATGACGGTACC WGGA			
Type IIR	GTCAARAGCTGGTAAGGTTC			
27f/MethT2 R	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG CATCTCTGRCSAYCATAACCGG		Eller <i>et al.</i> , 2001	Метанотрофы II типа
mmoXf882/ mmoXr1403	GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAGC/ TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCT CG	<i>mmoX</i> McDonald <i>et al.</i> , 1995	Метанотрофы I и II типа	

**Таблица 2. Продолжение.**

mmoX1/ mmoX2	CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGA AGCGCGT/GGCTCGACCTTGAACT TGGAGCCATACTCG	<i>mmoX</i>	Miguez <i>et al.</i> , 1997	Метанотрофы, обладающие растворимой MMO
536f/877r	CGCTGTGGAAGGGCATGAAGCG/ GCTCGACCTTGAACTTGGAGCC		Fuse <i>et al.</i> , 1998	
mmoXr901	TGGG TSAARACSTGGAACCGCT GGGT		Radajewski <i>et al.</i> , 2000	
A166f/ B1401r	ACCAAGGARCARTTCAAG/ TGGCACTCRTARCGCTC		Auman <i>et al.</i> , 2000	
534f/1393r	CCGCTGTGGAAGGGCATGAA/ CACTCGTAGCGCTCCGGCTC		Horz <i>et al.</i> , 2005	
mmoX206f/ mmoX886r	ATCGCBAARGAATAYGCSCG/ ACCCANGGCTCGACYTTGAA		Hutchens <i>et al.</i> , 2004	
A189f/ A682r	GGNGACTGGGACTTCTGG/ GAASGCNGAGAAGAASGC	<i>pmoA</i>	Holmes <i>et al.</i> , 1995	Все метанотрофы (кроме <i>Methylocella</i> и <i>Methyloferula</i> ) и некоторые нитрификаторы

**Таблица 2. Продолжение.**

mb661r	CCGGMGCAACGTCYTTACC	<i>pmoA</i>	Costello <i>et al.</i> , 1999	Все метанотрофы за исключением
A650r	ACGTCCTTACCGAAGGT		Bourne <i>et al.</i> , 2001	<i>Methylocella</i> и <i>Methyloferula</i>
V170f/V613b	GGATWGATTGGAAAGATMG/ GCAAARCTY CTCATYGTWCC		Sharp <i>et al.</i> , 2012	
<i>pmoA1f</i> , <i>pmoA2f</i> , <i>pmoA3f</i> , <i>pmoA4f</i>	CATCAGATGCTATTGGCTGG, CATCAGATGCTGACAGCCG, AAGGAGACTGGAGCTTCTGG, CAACTCTTTGCTGGAGACTGG		Erikstad <i>et al.</i> , 2011	Метанотрофы <i>Verrucomicrobia</i>
<i>pmoA1r</i> / <i>pmoA</i> , <i>pmoA3r</i> , <i>A4r</i>	CCTR TTCATCCACTGRCCAA, C CACTGCCAGAGATTGATTCC, CCGATTCAACCATTGTCCAAG			
A189b, <i>cmo182</i> , <i>cmo586</i> , <i>cmo682</i>	GGCGACTGGGACTTCTGG, TCACGTTGACGCCGATCC, GATGGGGATGGAGTATGTGC, TCGTTCTCCGCCGATTT		Luesken <i>et al.</i> , 2011	
NA638Rdeg, NA720R	RAATGTT CGRAGCGTVCCBC, TCCCCATCCACA CCCACCAG		Deutzmann, Schink, 2011	Метанотрофы NC10
NC10- 1043Rdeg, NC10- 202Fdeg	TCTCCRCGYTCCCTTGCG, RACCAAAGGRGGCGA GCG		Deutzmann, Schink, 2011	

**Таблица 2. Продолжение.**

mxaF1003f	GCGGCACCAACTGGGCTGGT	<i>mxaF</i>	McDonald <i>et al.</i> , 1996	Все грамотрицательные метилотрофы
mxaF1561r	GGGCAGCATGAAGGGCTCCCC			
mxaF769f	TGGGAGGGCGAYGCCTGGAA		Dedysh <i>et al.</i> , 2005	Метилотрофы, принадлежащие к <i>Alphaproteobacteria</i>
mxaF1690r	CCCGGCCARCCGCCGAC			
mxaF1555r	CATGAABGGCTCCCARTCCAT		Neufeld <i>et al.</i> , 2007	Все грамотрицательные метилотрофы

Установление последовательности гена 16S рРНК предоставляет ценную информацию о таксономической принадлежности метанотрофных бактерий в природных образцах, но, однако, имеет существенный недостаток, т.к. не позволяет выявлять метанотрофов неизвестных групп. Использование функциональных генов в качестве молекулярных маркеров способствует преодолению этого ограничения. Ген *mxaF*, кодирующий большую субъединицу метанолдегидрогеназы, первым из функциональных генов был использован исследователями в качестве генетического маркера (McDonald *et al.*, 1995). Метанолдегидрогеназа не является уникальным для метанотрофов ферментом, так как обнаруживается во всех грамотрицательных метилотрофных бактериях (McDonald *et al.*, 2008). Праймеры (f1003 и r1561) были

разработаны на основе нуклеотидных последовательностей всего трех метилотрофных бактерий (*Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium organophilum* и *Paracoccus denitrificans*), однако до сих пор успешно используются. Эти праймеры были впервые применены для исследования метанотрофного сообщества торфяных болот (McDonald, Murrel, 1997). Впоследствии, эти праймеры нашли свое применение во многих работах по изучению метанотрофных сообществ самых разнообразных местообитаний (Fjellbirkeland, 2001; Henckel *et al.*, 1999; Heyer, 2002). Альтернативные праймеры для амплификации гена *mxaF* были предложены позднее на основе данных анализа нуклеотидных последовательностей 14 метило- и метанотрофов (Neufeld *et al.*, 2007).

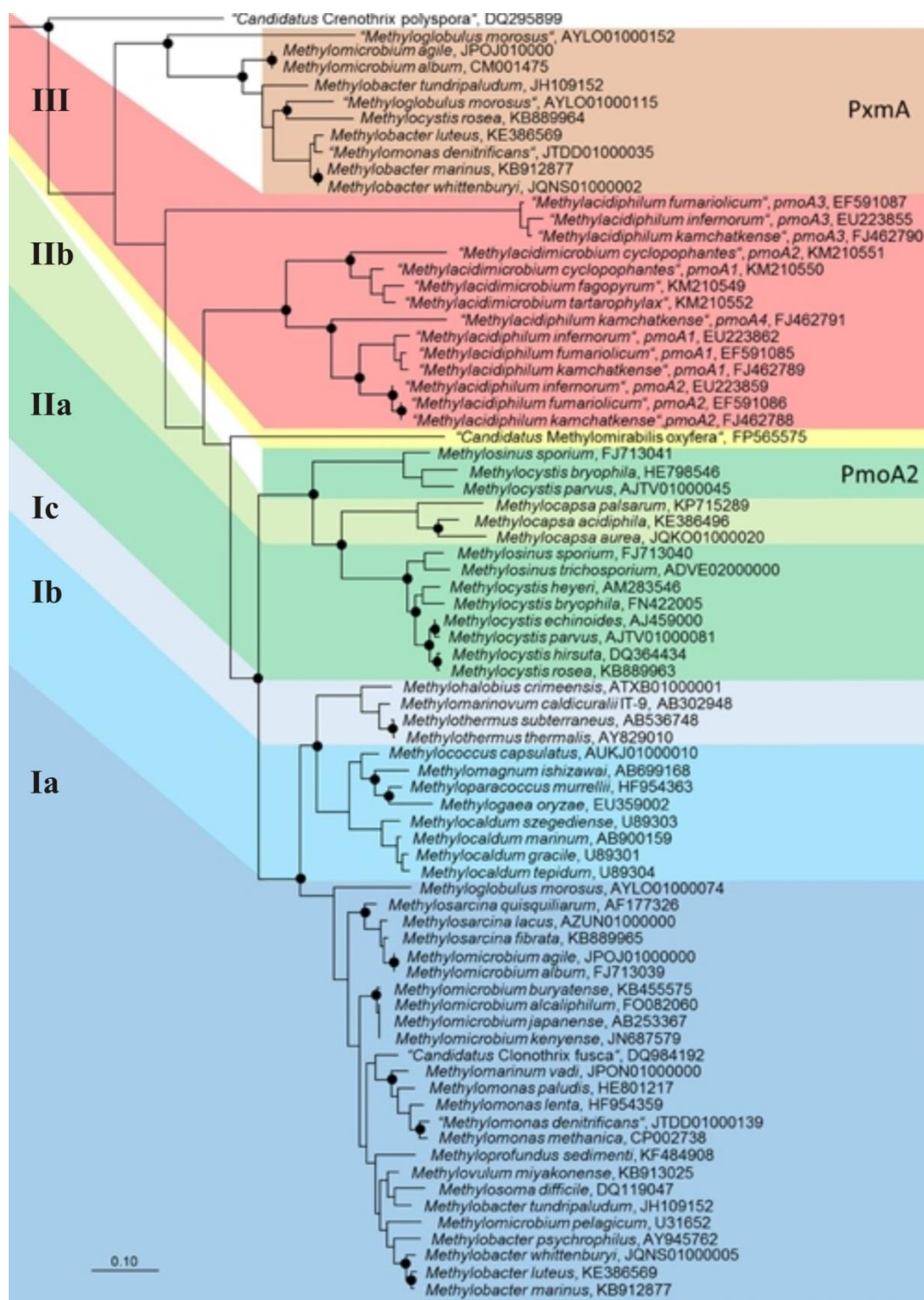
Другой мишенью в молекулярных исследованиях разнообразия метанотрофов являются гены, кодирующие рММО. На основе данных по нуклеотидным последовательностям *Methylococcus capsulatus* Bath и *Methylosinus trichosporium* OB3b были разработаны праймеры для 5 генов оперона *mmoXYZB* и *-C* (McDonald *et al.*, 1995). Дальнейшее секвенирование генных кластеров рММО способствовало появлению новых ПЦР-праймеров для амплификации гена *mmoX* (Таблица 2). Однако работы с применением этих праймеров выявили низкое разнообразие генов, кодирующих рММО, в природных образцах (Auman *et al.*, 2002; Auman *et al.*, 2002; Fuse *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2004; Horz *et al.*, 2001; Hutchens *et al.*, 2004; Miguez *et al.*, 1997; Shigematsu *et al.*, 1999). Возможными причинами могут быть как консервативность гена *mmoX*, так и ограниченная база данных последовательностей, кодирующих рММО (McDonald *et al.*, 2008). Только часть метанотрофов обладает геном *mmoX*, что является самым большим недостатком

использования праймеров для этого гена с целью идентификация метанотрофного сообщества.

Из функциональных генов наибольшее внимание было уделено детекции гена *pmoA*, который кодирует белок, несущий активный центр мембранной ММО. Гены *pmoA* имеются во всех известных метанотрофных бактериях за исключением представителей родов *Methylocella* и *Methyloferula*. Первыми праймерами, разработанными для амплификации фрагментов генов *pmoA*, были A189f и A682r (Таблица 2) (Holmes *et al.*, 1995). Филогения генов *pmoA* достаточно точно согласуется с филогенией гена 16S рРНК, поэтому секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей *pmoA* дает представление о разнообразии метанотрофов в природных местообитаниях (Рис. 6) (Kolb *et al.*, 2003; Knief *et al.*, 2015). Пара праймеров A189f/A682r, использованная во множестве исследований, успешно детектировала нуклеотидные последовательности *pmoA* метанотрофов неизвестных групп (Bourne *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 1999; Pacheco-Oliver *et al.*, 2002; Knief *et al.*, 2003), однако наряду с *pmoA* амплифицировала также и фрагменты филогенетически родственного гена *amoA* (Holmes *et al.*, 1995). В целях повышения специфичности, праймер A682r был позднее заменен на mb661r (Таблица 2) (Costello *et al.*, 1999). Mb661r, использованный в паре с A189f, демонстрировал большую специфичность к гену *pmoA* и не детектировал ген *amoA*. Этот праймер были использован в исследованиях метанотрофных сообществ пресноводных экосистем, глубоководных гидротермальных источников и холодных метановых сипов (Costello *et al.*, 1999; Nercessian *et al.*, 2005; Oshkin *et al.*, 2014). Способность ПЦР-праймеров амплифицировать ген *amoA* микроорганизмов, окисляющих аммоний, была исследована в работе Purkhold *et al.*, 2000. Схожее исследование было проведено,



чтобы оценить спектры детекции различных *pmoA*-специфичных праймеров (Boigne *et al.*, 2001). В этой работе был разработан еще один обратный праймер A650r, что



**Рис. 6.** Филогенетическая дендрограмма, показывающая взаимное расположение культивируемых штаммов метанотрофных бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *pmoA*. Цитировано по Knief, 2015.

дало возможность сравнить спектры детекции 3 пар праймеров (A189f/A682r, A189f/mb661r и A189f/A650r) в исследовании разнообразия метанотрофов в образцах почв Дании. Наибольшее разнообразие метанотрофов удалось выявить с использованием праймера mb661r. Преимуществом праймеров A682r и A650r, однако, является возможность выявления новых групп последовательностей гена *pmoA*, включая группу некультивируемых метанотрофов RA14, которую не удалось обнаружить с использованием mb661r. Поэтому в нескольких недавних исследованиях были использованы обе пары праймеров A189f/A682r и A189f/mb661r с целью расширения спектра детекции метанотрофных бактерий (Chen *et al.*, 2007; Kalyuzhnaya *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005; Oshkin *et al.*, 2014). Праймеры, разработанные для амплификации последовательностей *pmoA* метанотрофов филы *Proteobacteria*, не детектировали метанотрофов филы *Verrucomicrobia* (Dunfield *et al.*, 2007), что послужило причиной разработки праймеров, специфичных для нуклеотидных последовательностей гена *pmoA* представителей рода '*Methyloacidiphilum*' (Таблица 2) (Sharp *et al.*, 2012; Erikstad *et al.*, 2012). Стандартные ПЦР-праймеры также не подходят для амплификации гена *pmoA* метанотрофных бактерий "*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*" из недавно описанной филы NC10, которые осуществляют анаэробное окисление метана, поэтому для этой группы были специально разработаны новые праймеры - NA638Rdeg/NA720R, A189\_b/cmo682 (Deutzmann, Schink, 2011; Luesken *et al.*, 2011). Применение этих праймеров позволило выявить метанотрофных представителей филы NC10 из осадков озера Констэнс и осадков дренажных канав. Совсем недавно с помощью пары праймеров A189\_b/cmo682 был идентифицирован ген *pmoA* второго культивируемого представителя группы NC10 *Candidatus Methyloirabilis sinica* (He *et al.*, 2016).

**Определение численности метанотрофных бактерий *in situ*.** Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) применяется для идентификации и определения численности различных групп микроорганизмов, в том числе и метанотрофных бактерий. В основе этого метода лежит гибридизация фиксированных образцов нативного материала с 16S рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (Дедыш, 2006). FISH позволяет визуализировать микробные клетки и оценить особенности их локализации непосредственно в природной среде. Ограничениями этого метода являются невозможность обнаружения покоящихся форм микроорганизмов (в силу низкого содержания рРНК), потенциальный риск неспецифической детекции, а также недоучет клеток неизвестных микроорганизмов.

Флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные последовательности стали применяться для детекции единичных клеток микроорганизмов более 25 лет назад (DeLong *et al.*, 1988; Amann *et al.*, 1988). С тех пор перечень этих последовательностей, или зондов, предназначенных для обнаружения различных филогенетических групп микроорганизмов, растет год от года. Ряд FISH-зондов различного уровня специфичности (от видо- до родо- и группо-специфичных) был разработан и для метанотрофных бактерий (Таблица 3) (Дедыш, 2006). Различные участки молекулы 16S рРНК гибридизуются с зондами с разной эффективностью, что сказывается на яркости свечения, вызываемого при гибридизации целевого объекта с флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидами (Fuchs *et al.*, 1998). Поэтому в таблице 3 даны только те зонды, эффективность применения которых была экспериментально подтверждена, и для которых были оптимизированы условия гибридизации, обеспечивающие необходимую специфичность детекции (Дедыш, 2006). Изначально, зонды для

детекции метанотрофных бактерий применялись лишь для анализа смешанных и накопительных культур (Holmes *et al.*, 1995; Bourne *et al.*, 2000). Несколько зондов, специфичных для метанотрофов I и II типа, были разработаны и применены для детекции чистых культур *Methylococcus capsulatus*, *Methylomicrobium album*, *Methylobacter luteus*, *Methylosinus trichosporium*, *Methylosinus sporium*, *Methylocystis parvus* и метанотрофов почвы ризосферной зоны растения риса (Eller *et al.*, 2001). Зонды M84/M705 и M450 успешно детектировали метанотрофов I и II типа как в чистых культурах, так и в природных образцах (Таблица 3). В работе Eller *et al.*, (2001), однако, не оценивалось общее число метанотрофных бактерий. Первым количественным исследованием состава метанотрофной популяции с использованием метода FISH является анализ метанотрофов кислых сфагновых болот России (Dedysh *et al.*, 2001, 2003). Ацидофильные метанотрофы родов *Methylocella*, *Methylocapsa* и *Methylocystis*, относящихся к классу *Alphaproteobacteria* доминировали в кислых сфагновых торфах, в то время как число представителей *Gamma*proteobacteria было существенно ниже и не превышало 1% от общей численности метанотрофной популяции (Дедыш, 2006).

**Таблица 3. 16S рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды, разработанные для специфической детекции метанотрофных бактерий.**

Цитировано по Дедыш, 2006.

Зонд	Целевой организм	Нуклеотидная последовательность	Целевой участок 16S рРНК	Ссылка
MG-64	Метанотрофы I типа	CCGAAGGCCTRTTACCGTTC	64-83	Bourne <i>et al.</i> , 2000
MA-221	Все <i>Methylosinus</i> spp + некоторые <i>Methylocystis</i> spp.	GGACGCGGGCCGATCTTTCG	221-240	
MC-1029	<i>Methylococcus</i>	CCTGTGTCTTGGCTCCCGAA	1029-1048	
M-450	Метанотрофы II типа	ATCCAGGTACCGTCATTATC	450-470	Eller <i>et al.</i> , 2001
M-84, M-705	Метанотрофы I типа	CCACTCGTCAGCGCCCGA	84-103, 705-724	
Mcell-1026	<i>Methylocella palustris</i>	GTTCTCGCCACCCGAAGT	1026-1043	Dedysh <i>et al.</i> , 2001

**Таблица 3. Продолжение.**

Mcaps-1032	<i>Methylocapsa acidiphila</i>	CACCTGTGTCCCTGGCTC	1032-1049	
AcidM-181	<i>M. palustris</i> + <i>M. acidiphila</i>	TCTTTCTCCTTGCGGACG	181-198	
Mcells-1024	<i>Methylocella silvestris</i>	TCCGGCCAGCCTAACTGA	1024-1041	Дедыш, 2004
Mcellt-143	<i>Methylocella tundrae</i>	TTCCCCGAGTTGTTCCGA	143-160	
Msint-1268	<i>Methylosinus trichosporium</i>	TGGAGATTTGCTCCGGGT	1268-1285	Dedysh <i>et al.</i> , 2003
Msins-647	<i>Methylosinus sporium</i>	TCTCCCGGACTCTAGACC	647-664	
Mcyst-1432	Все <i>Methylocystis</i> spp.	CGGTTGGCGAAACGCCTT	1432-1449	
Mcyst-1261	Ацидофильные <i>Methylocystis</i>	TTGCTCGAGGTCGCCCTT	1261-1278	

**Метод стабильных изотопов.** Принцип метода стабильных изотопов основан на низком содержании  $^{13}\text{C}$  в природе ( $\approx 1\%$ ). Добавление  $^{13}\text{C}$ -меченого субстрата к природному образцу приводит к включению  $^{13}\text{C}$  в ДНК бактерий. Затем  $^{13}\text{C}$ -меченая ДНК может быть отделена от ДНК бактерий, которые не ассимилируют меченый субстрат методом градиентного центрифугирования в растворе CsCl (Dumont, Murrel, 2005; Friedrich, 2006). Аналогичным образом изотопная метка может быть включена в молекулу РНК. К тому же,  $^{13}\text{C}$  встраивается в молекулу РНК значительно быстрее, чем в ДНК (Lueders *et al.*, 2004; Manefield *et al.*, 2002, Whiteley *et al.*, 2006). Целью метода стабильных изотопов (stable isotope probing, SIP) является не только идентификация микроорганизма, но и определение его метаболической активности в условиях, приближенных к таковым *in situ* (Radajewski *et al.*, 2000; Dumont, Murrel, 2005).

Метод стабильных изотопов нашел свое применение во многих работах по исследованию функционально активных компонентов метанотрофных сообществ в природных образцах (Sebron *et al.*, 2007; Hutchens *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2002). В библиотеках гена 16S рРНК, составленных в этих работах на основе информации по  $^{12}\text{C}$ ДНК, насчитывалось небольшое число метанотрофных бактерий или же они вообще отсутствовали (Radajewski *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2002). Однако библиотеки гена 16S рРНК, составленные на основе информации по  $^{13}\text{C}$ ДНК, содержали большую долю нуклеотидных последовательностей метанотрофов (32-96% клонированных последовательностей) (Hutchens *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2002). Метод стабильных изотопов с использованием  $^{13}\text{C}$ -меченого метана имеет потенциал обнаружения последовательностей микроорганизмов, чья роль в окислении  $\text{CH}_4$  неизвестна. Метод стабильных изотопов был успешно применен в

исследованиях метанотрофных сообществ болотной почвы в Великобритании, содового озера в России и арктического озера на Аляске (Morris *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004; He *et al.*, 2014).

**Микрочипы.** Микрочипы представляют собой пластинки, на которые определенным образом нанесены молекулярные маркеры (олигонуклеотиды, фрагменты ДНК, белки, сахара) (Schrenzel *et al.*, 2009). Поскольку технология ДНК-микрочипов позволяет одновременно распознавать большое число генов, ее применяют в исследованиях состава микробных сообществ. С этой целью используют ДНК-микрочипы, включающие наборы олигонуклеотидов, которые обладают специфичностью на уровне штамма, вида, рода и более высоких таксонов (Bodrossy *et al.*, 2004). Первый микрочип для метанотрофов детектировал функциональные гены, вовлеченные в цикл азота и кодирующие нитритредуктазу (*nirS* и *nirK*), аммиакмонооксигеназу (*amoA*) и мММО (*pmoA*) (Wu *et al.*, 2001). В дальнейшем этот чип был усовершенствован и включал 174 нуклеотидных последовательностей, специфичных для АМО, 241 последовательность для мММО, 57 последовательностей для рММО (He *et al.*, 2007). В работе Bodrossy *et al.* (2003) ДНК-микрочип был специально разработан для анализа сообщества метанотрофных бактерий. Он состоял из 59 олигонуклеотидных последовательностей, разработанных на основе анализа генов *pmoA* всех известных на тот момент метанотрофов и генов *amoA* аммоний-окисляющих, нитрифицирующих бактерий. Потенциал *pmoA*-микрочипа был оценен на примере природных образцов. Результаты с высокой точностью согласовались с библиотеками клонов генов *pmoA*, полученных из тех же образцов. Микрочип был также применен при анализе метанотрофного сообщества почв свалок (Sebron *et al.*, 2007; Stralis-Pavese *et al.*, 2006). По результатам работы было установлено, что



представители II типа *Methylocystis* sp. и ранее не обнаруживавшийся в почвах свалок представитель I типа *Methylocaldum* sp. численно доминируют в метанотрофном сообществе этого местообитания (Wise *et al.*, 1999). Большим преимуществом применения ДНК-микрочипов является высокое разрешение и быстрота анализа. Один исследователь способен обрабатывать больше 40 образцов в неделю: от подготовки ДНК до получения результатов (McDonald *et al.*, 2008). Для сравнения, получение библиотек клонов для того же объема образцов может занимать месяцы. Микрочипы для гена *pmoA* охватывают все известные роды метанотрофных бактерий и большинство из них на уровне вида. Набор нуклеотидных последовательностей для микрочипов ограничивается известными последовательностями секвенированных генов, поэтому для развития этого метода важнейшее значение имеют данные библиотек клонов из природных образцов (McDonald *et al.*, 2008).

#### **Анализ метанотрофных бактерий методом пиросеквенирования гена *pmoA*.**

Появление технологий секвенирования «нового поколения» произвело революцию в области молекулярной экологии и обеспечило беспрецедентную глубину анализа образцов. Одна из таких технологий – пиросеквенирование – применяется с целью идентификации прокариот на основе анализа фрагментов их генов в самых разнообразных местообитаниях (Bates *et al.*, 2010; Hollister *et al.*, 2010; Serkebaeva *et al.*, 2013). Тем не менее, метод пиросеквенирования имеет ряд ограничений и недостатков (Lüke, Frenzel, 2011). Самой распространенной проблемой является наличие вставок и делеций нуклеотидов (Shendure, Ji, 2008). За счет этого разнообразие нуклеотидных последовательностей искусственно увеличивается. При анализе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих белок, вставки и пропуски нуклеотидов могут быть легко обнаружены, что является огромным

преимуществом пиросеквенирования функциональных генов, в частности *pmoA*. Вставки приводят к сдвигу рамки считывания, что быстро диагностируется при выравнивании аминокислотных последовательностей.

Одной из первых работ по пиросеквенированию гена *pmoA* стало исследование метанотрофного сообщества почв рисовых полей Италии и Китая (Lüke, Frenzel, 2011). В работе были использованы две пары праймеров, обеспечивающие наибольший спектр детекции известного разнообразия метанотрофов: A189f/mb661r и A189f/A682r. Авторами было получено более 12000 нуклеотидных последовательностей гена *pmoA*, длина которых превышала 400 п.н. Приблизительно 40% последовательностей были удалены из анализа, т.к. в них отчетливо обнаруживались сдвиги рамок считывания. Этот факт свидетельствует о высокой доле вставок, которые не удалось бы распознать в последовательностях гена 16S рРНК. При определении видов метанотрофных бактерий авторами применялся критерий, использованный в работе Degelmann *et al.*, 2010: 93% сходство транслированных нуклеотидных последовательностей генов *pmoA* соответствует сходству на уровне 97% для нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Все почвы характеризовались высоким разнообразием метанотрофов Ib типа, в частности кластеров с условными названиями «freshwater sediment 2» и «RPC-1». Помимо Ib типа наблюдалось высокое разнообразие представителей родов *Methylocystis* и *Methylosinus*. Напротив, Ia тип был представлен в основном *Methylomonas* и *Methylosarcina*. Более того, большая группа последовательностей занимала промежуточное положение между генами *pmoA* метанотрофов и *amoA* аммоний окисляющих микроорганизмов. Один из этих кластеров был ранее отнесен к последовательностям *pxmA*, т.к. физиологическая функция кодируемого им белка до

сих пор не определена (Tavormina *et al.*, 2011). В пуле данных было обнаружено значительное число последовательностей *pmoA2*, кодирующих второй тип мММО с высоким сродством к метану.

Другая работа была посвящена исследованию метанотрофного сообщества сфагновых мхов болот Голландии методами пиросеквенирования и микрочипирования (Kir *et al.*, 2011). Праймеры A189/A682r и A189/mb661r были применены для амплификации гена *pmoA* методом «nested»-ПЦР из ДНК, выделенной из образцов сфагнового мха. ПЦР-продукты были нанесены на микрочип, в результате чего было обнаружено высокое разнообразие метанотрофов из *Alpha*- и *Gamma*proteobacteria с наибольшей долей бактерий родов *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylocystis* и *Methylosinus* (Kir *et al.*, 2011). Неожиданным оказалось выявление представителей метанотрофов I типа, таких как *Methylomonas* и *Methylobacter*, т.к. ранее отмечалась их низкая численность в торфе сфагновых болот (Dedysh, 2002). Пары праймеров A189/mb661 и A189/A650 были использованы для амплификации гена *pmoA* и дальнейшего пиросеквенирования ПЦР-продукта. После анализа полученных в результате пиросеквенирования  $\approx 1,3 \times 10^5$  фрагментов, в их составе были выделены 3849 уникальные последовательности *pmoA* и *amoA*. Более половины фрагментов *pmoA* гена (58%) принадлежали представителям *Gamma*proteobacteria, подавляющая часть которых относилось к *Methylomonas* spp. На долю *Alphaproteobacteria* приходилось 40% последовательностей, причем почти все из них были близки к *Methylocystis* spp. Нанесенные на поверхность микрочипа нуклеотидные последовательности были размером от 17 до 26 нуклеотидов. Быстрый анализ этих последовательностей был выполнен при помощи поисковых запросов «BlastN» относительно всех 454-прочтений гена *pmoA*, что позволяло сравнить

данные двух использованных методов. Результаты микрочипирования и 454-пиросеквенирования оказались достаточно близки, но в то же время были обнаружены некоторые различия, связанные с использованием разных протоколов для ПЦР-амплификации *pmoA* генов.

В другой работе метанотрофное сообщество, обитающее в прудах-отстойниках на территории нефтяных песков в Канаде, было также исследовано методами микрочипирования и пиросеквенирования (Saidi-Mehrabad *et al.*, 2013). Для амплификации фрагментов гена *pmoA* использовались праймеры A189f/mb661r или A189f/mb682r. Многие роды метанотрофных бактерий (*Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Crenothrix*, *Methylosoma*, *Clonothrix*, *Methylosarcina*, *Methylovulum* – их объединяют в тип Ia) филогенетически очень близки, из-за чего сопоставление последовательностей генов *pmoA* и 16S рРНК этих организмов является трудной задачей. Поэтому последовательности из этой группы были объединены. Среди всех прочтений доля одной нуклеотидной последовательности составляла вплоть до 98%. Этот фрагмент гена *pmoA* относился к кластеру *Methylococcus/Methylocaldum* и обнаруживал <90% сходства с культивируемыми представителями метанотрофных бактерий. ДНК-микрочипирование было выполнено с двумя парами праймеров 189f/682r и 189f/661r. Анализ показал, что в образцах преобладали представители *Methylocaldum* и «Group 501» (кластер, относящийся к *Methylocaldum/Methylococcus*). Роды *Methylomonas* и *Methylobacter* обнаруживались во всех образцах. Последовательности *Methylosinus* и небольшое число последовательностей *Methylocystis* были детектированы только для образцов из одного и того же пруда. Анализы, примененные в этой работе, достаточно точно согласовались с точки зрения идентификации наиболее распространенных видов метанотрофных бактерий.

### **ГЛАВА 3. МЕТАНОТРОФЫ ХОЛОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ.**

Более 80% биосферы находится в условиях постоянно низких температур (Morita, 1990). Во многих холодных экосистемах, таких как, например, арктические озера или тундровые почвы, имеются источники атмосферного метана. Несмотря на низкие температуры, некоторые метанотрофные бактерии сохраняют способность к окислению  $\text{CH}_4$ . Их классифицируют на два типа: психрофилы, которые растут в интервале от 0 (или ниже 0) до 20 °C с оптимумом при 10-12 °C, и психротолеранты, растущие при 0 °C или ниже 0 °C, но способные к росту при 30-32 °C с оптимумом >20 °C (Trotsenko, Khmelenina, 2005). Для психрофилов характерна меньшая чувствительность метаболических процессов к пониженным температурам, большая эффективность функционирования ферментных систем и рибосом, более высокий уровень накопления и расхода эндогенных веществ, сохранение функциональных свойств мембран при низких температурах (Омельченко и др., 1993).

#### **3.1 Метанотрофные бактерии тундровых почв.**

В тундровых почвах содержится около 15% общего запаса биосферного углерода (Trotsenko, Khmelenina, 2005). Потепление климата способствует истощению углеродного резервуара вследствие процессов разложения органического вещества и поступления метана в атмосферу. Учитывая объемы захороненного углерода в тундровых экосистемах, эмиссия метана в атмосферу значительно усилит парниковый эффект, что может иметь глобальные последствия. В связи с этим, изучение бактериального окисления метана в тундровой зоне имеет важнейшее значение.

В результате экспериментов по определению активности окисления метана было установлено, что тундровая почва на острове Уналашка и Алеутских островах

поглощала метан при температуре 7 °С и при концентрациях  $\text{CH}_4$  как ниже, так и выше атмосферного уровня. Потребление метана составило  $2.7 \text{ мг м}^{-2}\text{д}^{-1}$ . Эти данные соотносятся с величинами, полученными для других почв ( $0.2\text{-}4.2 \text{ мг м}^{-2}\text{д}^{-1}$ ) (Whalen, Reeburgh, 1990). Было доказано, что потребление метана тундровой почвой является следствием окислительной активности микроорганизмов, способных окислять  $\text{CH}_4$  при концентрациях в 10 раз ниже атмосферной.

В дальнейшем было проведено исследование активности окисления метана и видового состава метанотрофного сообщества разных тундровых почв с использованием радиоизотопного и иммунофлуоресцентного метода (Vecherskaya *et al.*, 1993). Микробное окисление  $\text{CH}_4$  наблюдалось во всех горизонтах сезонно-талых слоев вплоть до вечной мерзлоты. Наибольшая активность была зафиксирована в покрытом водой поверхностном слое переувлажненных почв и пропитанной влагой моховой растительности. По данным лабораторных экспериментов вплоть до 40% внесенного  $^{14}\text{CH}_4$  конвертировалось в  $^{14}\text{CO}_2$ , микробную биомассу и органические метаболиты. Методом иммунофлуоресцентного анализа во всех образцах были обнаружены как представители метанотрофных бактерий I типа (*Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*), так и II типа (*Methylocystis*, *Methylosinus*). Число метанотрофных бактерий составило  $0.1 - 22.9 \times 10^6$  клеток на г почвы. Доля метанотрофов варьировала от 1 до 23% от общего числа бактерий. В этой работе, таким образом, было выявлено широкое разнообразие метанотрофных бактерий в тундровых почвах.

Микроорганизмы тундровых почв обитают в условиях низких температур, низких значений pH, низкого содержания минеральных веществ и длительное время находятся в замороженном состоянии. Высокий уровень воды вследствие плохого

дренажа приводит порой к анаэробным условиям. Такие экстремальные факторы могут стимулировать развитие микроорганизмов, устойчивых ко многим неблагоприятным воздействиям окружающей среды (Trotsenko, Khmelenina, 2005). Из заболоченной почвы тундры была выделена чистая культура первого психрофильного метанотрофа – *Methylobacter psychrophilus* (Омельченко и др., 1996; Турова и др., 1999). Он был представлен грамотрицательными кокками и диплококками, рос оптимально при 5-10 °С и не был способен к росту выше 20 °С. Другой представитель рода *Methylobacter* – *Methylobacter tundripaludum* – был выделен из болотистой почвы арктической тундры на Шпицбергене (Wartianen *et al.*, 2006). Он представлен клетками палочковидной формы и является психротолерантным организмом, растущим в интервале от 10 до 30 °С с оптимумом при 23 °С.

Исследование микробного сообщества тундровых почв канадской Арктики методом ПЦР-анализа природных образцов и накопительных культур выявило ранее неизвестных метанотрофных бактерий, обладающих растворимой формой ММО (рММО) (Pacheco-Oliver *et al.*, 2002; Trotsenko, Khmelenina, 2005). Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК, полученные в этом исследовании, обнаруживали отдаленное сходство с таковыми у метанотрофов родов *Methylosinus* и *Methylocystis*. Представители рода *Methylosinus* были детектированы в арктических почвах, метанотрофное сообщество которых было исследовано методом электрофореза в градиенте денатурирующего геля (DGGE) (Wartiainen *et al.*, 2003). Представители *Methylobacter* и *Methylosinus* населяли природные образцы почвы и накопительные культуры, полученные при 10 и 20 °С. Гены 16S рРНК известных метанотрофных бактерий, а также *pmoA* и *mtoX* гены были идентифицированы в почвах северной тайги и тундры (Kalyuzhnaya *et al.*, 1999). Скорость окисления метана образцами этих

почв была наивысшей при температуре инкубации +15 °С, что указывало на преобладание психрофильных и психротолерантных метанотрофов. Несколько типов психротолерантных метанотрофных сообществ были обнаружены в арктической тундре в России (Берестовская и др., 2002). Сообщества метанотрофных бактерий, выделенных из образцов более глубоких участков почвенного профиля, были способны к более активному окислению метана при 5 °С. В зависимости от температуры и рН метанотрофы занимали разные экологические ниши. Типы клеток, морфологически схожие с *Methylobacter psychrophilus*, преобладали при рН 5-7 и температуре 5-15 °С, в то время как при рН 4-6 и температуре 10-15 °С доминировали биполярные клетки, схожие с *Methylocella palustris*. Третий тип клеток метанотрофных бактерий, способный к росту при 5-10 °С и рН 5-7, представлял собой новую метанотрофную бактерию с крупными коккоидными клетками.

### **3.2 Психрофильные метанотрофы Антарктиды.**

Протекание процессов микробного образования и окисления метана было зарегистрировано в донных осадках и в водной толще постоянно покрытых льдом озер в оазисе Бангера в восточной Антарктиде (Galchenko, 1994). Метан, образующийся в анаэробных осадках, мгновенно окислялся метанотрофными бактериями и, следовательно, не накапливался подо льдом. Количество метанотрофов, определенное иммунофлуоресцентным методом, составило от 2.2 до  $52.0 \times 10^3$  клеток на мл. При этом доля метанотрофов от общего числа бактерий составила 2.5-4.8%, что в 2-4 раза меньше, чем в озерах умеренных широт и морских бассейнах.



Психрофильные метанотрофы были обнаружены в образовавшихся в восточной Антарктиде 8000-10000 лет назад меромиктических озерах Эйс и Бертон (Bowman *et al.*, 1997). Одними из важных характеристик, отличавшими эти озера друг от друга, были соленость, окислительно-восстановительный потенциал и температура. Озеро Эйс постоянно покрыто льдом и не подвержено изменениям. В зоне хемоклина этого озера (10-11м в глубину) соленость составляет 30‰, достигая 37-42‰ в анаэробной зоне (12-24м в глубину). Число метанотрофных бактерий в зоне хемоклина озер Эйс и Бертон было на три порядка ниже, чем количество метанотрофов, обнаруженное в озерах оазиса Бангера (Гальченко, 1994; Bowman *et al.*, 1997). Популяция метанотрофов в осадке прибрежной зоны была в 4-10 раз больше, чем в хемоклине озера Эйс. В целом, метанотрофы составляли небольшую долю (0.1-1%) от общего микробного населения исследованных меромиктических озер.

Из антарктических озер было выделено 8 штаммов метанотрофных бактерий, которые были описаны в качестве нового вида *Methylosphaera hansonii*. Клетки *Methylosphaera hansonii* были представлены неподвижными крупными кокками, не образующими покоящихся форм и ассимилирующими углерод по рибулозомонофосфатному пути. Штаммы были способны к фиксации атмосферного N<sub>2</sub>. В составе жирных кислот преобладали 16:1 $\omega$ 8с, 16:1 $\omega$ 6с, 16:1 $\omega$ 7с и 16:0. Изоляты были способны к росту при 0 °С, имели оптимум при 10-13 °С, не росли выше 21 °С и, таким образом, являлись облигатными психрофилами.

### **3.3 Метанотрофы в сибирской вечной мерзлоте.**

Вечная мерзлота встречается на 20% общей территории суши всего земного шара (Trotsenko, Khmelenina, 2005). Промерзшие породы северных регионов содержат

большое количество жизнеспособных микроорганизмов. Общее количество бактерий, обнаруженных в породах разного возраста, структуры и состава, варьировало от  $10^7$  до  $10^9$  клеток на г сухого веса, что соответствует минимальному числу микроорганизмов, детектируемых во всех известных наземных местообитаниях (Vorobyova *et al.*, 1997).

В дальнейшем было показано, что микроорганизмы сохраняют метаболическую активность в интервале температур от  $-5$  до  $-20$  °C в результате того, что вода, связанная с почвенными частицами, остается в жидком состоянии. Время удвоения микробной популяции в образцах сибирской вечной мерзлоты, измеренное при  $-20$  °C на основе добавления  $^{14}\text{C}$ -меченного ацетата и последующего его включения в липиды, составило 160 дней (Rivkina *et al.*, 2000).

Существование жизнеспособных метанотрофных бактерий в сибирской вечной мерзлоте было доказано с использованием радиозотопного и молекулярных методов (Хмеленина и др., 2001). Образование  $^{14}\text{CO}_2$  из  $^{14}\text{CH}_4$  было обнаружено при  $5$  °C в образцах, взятых из верхнего пограничного слоя (0.4 м глубиной, возрастом до 1000 лет) и глубоко залегающих слоев вечной мерзлоты (2-50 м глубиной, возрастом в 10000-100000 лет). В 4 из 15 исследованных образцах  $^{14}\text{CH}_4$  включался в кислотоустойчивые продукты метаболизма, что являлось индикатором процесса ассимиляции метана. Несколько образцов окисляло метан при  $-5$  °C, и скорости окисления были иногда выше, чем при  $+5$  °C. Активность окисления  $\text{CH}_4$  образцами вечной мерзлоты голоценового слоя, замороженного около 1000 лет назад и подвергавшегося температурным колебаниям, была наиболее ярко выражена во время инкубации при  $5$  °C. Напротив, образцы плейстоценового слоя, находящегося в замороженном состоянии около 1 миллиона лет при постоянной температуре  $-10$  °C,

окисляли метан при -10, -5, -1.5 и +10 °С, но были наиболее активны при +25 °С. Эти результаты говорят о хорошей выживаемости мезофильных метанотрофов при постоянной отрицательной температуре и, главным образом, психрофилов и психротолерантов в условиях длительных колебаниях температуры.

Методами ПЦР было показано, что метанотрофное сообщество в вечной мерзлоте Колымской низменности возрастом 1000-100000 лет могло состоять из представителей *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylosinus/Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylosphaera*, *Methylococcus* и *Methylocaldum* (Хмеленина и др., 2001). Кроме того, 16S рРНК гены, специфичные для *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylococcus* и *Methylocella*, были обнаружены в тотальной ДНК, экстрагированной из образцов вечной мерзлоты возрастом до 3 миллионов лет. Высказываются предположения, что образование цист, экзоспор или дополнительных гликопротеиновых поверхностных слоев (S-слоев) многими метанотрофами способствует их выживаемости. В общей сложности эти открытия подкрепляют гипотезу, что даже после долгого пребывания в вечной мерзлоте (от 1000 лет до 1.8-3 миллионов лет) метанотрофы способны окислять и ассимилировать метан не только при положительных, но и отрицательных температурах (Trotsenko, Khmelenina, 2005).

Исследования метанотрофного сообщества вечной мерзлоты в дельте реки Лена было направлено на изучение потенциальной активности окисления метана в зависимости от температуры, численности и распределения метанотрофов I и II типа (Liebner, Wagner, 2007). В глубоких областях активного слоя, где температура всегда ниже 2 °С, максимум активности окисления метана был зафиксирован при 4 °С, что свидетельствовало о преобладании психрофильных метанотрофов ближе к верхней

границе вечной мерзлоты. Напротив, метанотрофное сообщество верхних горизонтов почвы, проявляющее максимальную активность окисления метана при 21 °С, вероятно, было представлено психротолерантами или мезофилами и психротолерантами.

Общее число метанотрофов оказалось максимальным по периметру полигональных элементов ландшафта - от  $1 \times 10^8$  (6 и 11 см по профилю) до  $3 \times 10^6$  (32-38 см по профилю) клеток на г сухого веса почвенных образцов. В пойме реки Лены было обнаружено от  $5 \times 10^7$  (0 и 5 см по профилю) до  $8 \times 10^6$  (40-52 см по профилю) клеток на г сухого веса почвенных образцов.

Метанотрофные бактерии I типа преобладали по всему профилю, но их численность сильно менялась с глубиной. Наоборот, метанотрофы II типа были обильно представлены во всем активном профиле и преобладали над метанотрофами I типа на границе с вечной мерзлотой. Не было обнаружено никакой взаимосвязи между распределением метанотрофов I и II типа и температурой *in situ*. Однако существовала устойчивая взаимосвязь между распределением метанотрофов I и II типа и концентрацией метана *in situ*, которая варьировала от 50 нмоль на г в верхнем слое почвы до 140 нмоль на г ближе к границе вечной мерзлоты.

В дальнейшем образцы, отобранные из верхнего и нижнего слоя почвы дельты реки Лены, были исследованы при помощи метода ДГГЭ и анализа библиотек клонов по генам 16S и *pmoA* с целью определения влияния градиентов температуры и концентрации метана по почвенному профилю на разнообразие метанотрофного сообщества (Liebner *et al.*, 2008). Общее разнообразие метанотрофов было ограничено представителями I типа *Methylobacter* и *Methylosarcina*. На основе анализа генов 16S рРНК и *pmoA* было выявлено два новых кластера метанотрофных бактерий, к

которым относилось большинство полученных нуклеотидных последовательностей. Представители этих кластеров были филогенетически близки к *Methylobacter psychrophilus* и *Methylobacter tundripaludum*. Схожее разнообразие было выявлено для обеих глубин, т.к., по-видимому, оно не подвержено влиянию экстремальных геохимических и физических градиентов.

### **3.4 Метанотрофные бактерии в глубоко залегающих грунтовых водах Финно-Скандинавского шельфа.**

Глубоко залегающие грунтовые воды в северных странах имеют постоянно низкую температуру (Trotsenko, Khmelenina, 2005). Активная микробная популяция была обнаружена в грунтовых водах магматических пород (Pedersen, Ekendahl, 1990; Ekendahl *et al.*, 1994). Общее число бактерий в этих местообитаниях варьировало от  $10^3$  до  $10^7$  клеток на мл грунтовой воды (Pedersen *et al.*, 1996a). Метан, содержащийся в этих глубоко залегающих грунтовых водах, в какие-то моменты при концентрации вплоть до 1 мМ может являться основным источником органического углерода (Kotelnikova, Pedersen, 1997). Микробное происхождение было установлено для  $\text{CH}_4$  в породах Канадского и Фенноскандинавского щита (Sherwood Lollar *et al.*, 1993). На основе анализа генов, кодирующих рММО, мММО и МДГ, методом ПЦР в глубоко залегающих водоносных горизонтах в Швеции были обнаружены представители родов *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylobacter* и *Methylomicrobium* (Kalyuzhnaya *et al.*, 1999). В дальнейшем накопительные культуры психротолерантных метанотрофов были получены с использованием образцов грунтовых и прудовых вод. В результате был выделен и описан новый метанотроф *Methylomonas scandinavica*, растущий в интервале от 5 до 30 °С с оптимумом при 15 °С. Это стало первым сообщением о

существовании психротолерантных метанотрофов в бескислородных подземных местообитаниях. *Methylomonas scandinavica* представлен одиночными или собирающимися в цепочки грамотрицательными палочками и относится к I типу метанотрофных бактерий. В 1 мл воды было выявлено от  $10^2$  до  $8 \times 10^4$  клеток метанотрофных бактерий. Следовательно, метанотрофы существуют в глубоко залегающих водносных горизонтах магматических пород и, по-видимому, занимают особую эконишу в этих местообитаниях – ассимилируют метан и снабжают доступным углеродом и факторами роста (вероятно метанолом, формальдегидом, формиатом, диоксидом углерода, витаминами и аминокислотами) других членов микробного сообщества (Trotsenko, Khmelenina, 2005).

### **3.5 Метанотрофное сообщество метановых сипов в осадках озера Констэнс.**

В юго-восточной части озера Констэнс на донной поверхности встречаются сотни кратеров диаметром до 8 м и глубиной 0.5-1.5 м. Примерно каждый второй такой кратер является источником биогенного метана. Исследование активности и разнообразия метанотрофного сообщества осадков на поверхности подобных кратеров и за их пределами было проведено в работе Deutzmann *et al.*, 2011. Образцы озерных осадков были отобраны с глубины 82 и 12 м при температуре *in situ* 4 и 12 °С. Максимальные скорости окисления метана были зарегистрированы в осадках кратеров прибрежной зоны озера ( $627 \text{ нмоль мл}^{-1} \text{ ч}^{-1}$  и  $831 \text{ нмоль мл}^{-1} \text{ ч}^{-1}$ ). Анализ библиотек клонов выявил большое разнообразие метанотрофов I типа. Большинство клонов относилось к роду *Methylobacter*. Представители *Methylosarcina/Methylochromium* были обнаружены во всех образцах, в то время как метанотрофы II типа отсутствовали. Большинство клонированных

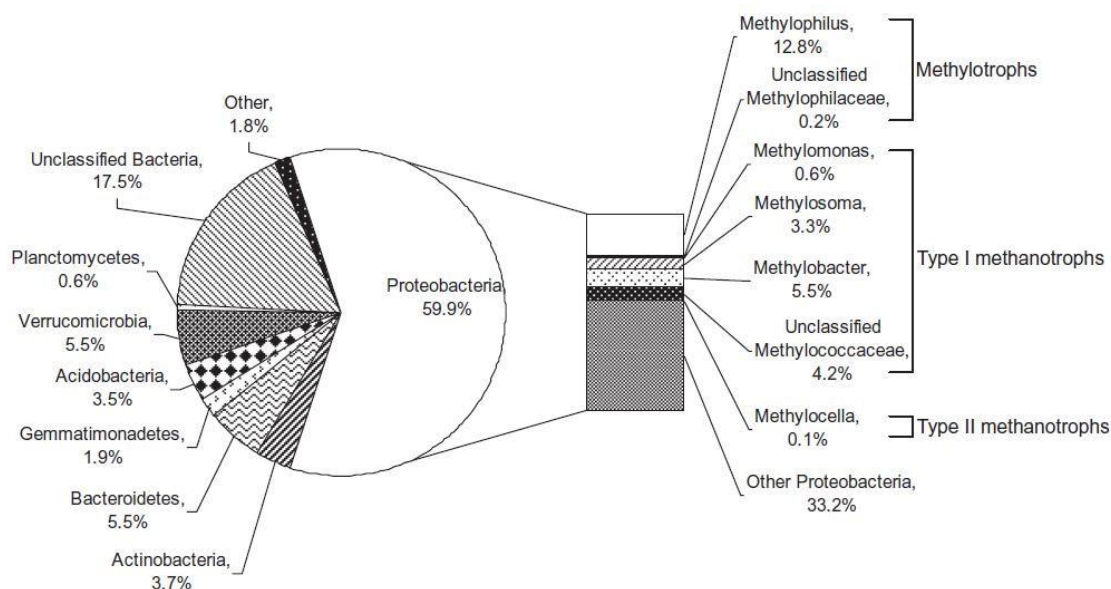
последовательностей, полученных из осадков глубинных кратеров, и все клоны, полученные из осадка за их пределами, принадлежали к Ia типу метанотрофных бактерий. Большинство клонов, полученных из прибрежного осадка, разделялось на две группы. Первая из них относилось к роду *Methylobacter*, но нуклеотидные последовательности этой группы были отличны от таковых из других образцов и, помимо этого, не было обнаружено ни одной близкой последовательности (93% идентичности на нуклеотидном уровне и 97% идентичности на уровне аминокислотных остатков) в базе данных NCBI. Наибольшим сходством обладали клоны, выделенные из глубинного осадка озера Вашингтон в Сиэтле, США, (номер доступа в Genbank - DQ067074) или клоны из озера Финляндии (номер доступа в Genbank - FN597117). Вторая группа принадлежит к Ib типу метанотрофных бактерий. Она была обнаружена только в образцах прибрежных осадков и принадлежит к кластеру, в котором отсутствуют культивируемые бактерии. Наиболее близкая последовательность была выделена из почвы рисового поля в Китае (номер доступа в Genbank - AM910094). На основе 90% сходства (соответствует идентичности на уровне 97% для гена 16S рРНК) клоны были объединены в группы из 7, 12, 12 и 10 различных видов для прибрежных кратеров и осадков и глубинных кратеров, и осадков, соответственно. Общее разнообразие было рассчитано на основе индекса  $chaol$ . Согласно этому расчету было детектировано от 19 до 37% общего числа метанотрофных бактерий. Численность метанотрофных бактерий была оценена методом количественной ПЦР. В образцах осадка из прибрежных кратеров количество метанотрофов было значительно выше, чем в других образцах ( $1.1 - 2.5 \times 10^9$  клеток на г). В глубинных образцах из кратеров и осадка вокруг кратеров было обнаружено  $1.0 \times 10^8$  и  $7.3 \times 10^8$  клеток на г, соответственно.

### 3.7 Метанотрофное сообщество осадков арктических озер.

Арктические озера выделяют  $24.2 \pm 10.5$  Тг  $\text{CH}_4$  в год, что составляет около 2-6% всего глобального потока метана в атмосферу (Walter *et al.*, 2006). Важнейшим процессом, снижающим потоки метана в атмосферу, служит его аэробное окисление на границе водной толщи и осадка. Одна из первых работ по определению скорости окисления  $\text{CH}_4$  и идентификации ключевых микроорганизмов, вовлеченных в этот процесс, была выполнена He с коллегами (He *et al.*, 2012).

Потенциальная активность окисления  $\text{CH}_4$  при 4 °C составила  $1.59 \pm 0.12$  мкмоль на г для поверхностного слоя осадка (0-1 см) и менее, чем 0.4 мкмоль на г для образцов из слоя 1-3 см. Более высокая скорость окисления метана в поверхностном слое объясняется резким градиентом концентрации кислорода по профилю осадка. Активная часть популяции метанотрофных бактерий в образцах определялась методом стабильных изотопов (He *et al.*, 2012). В общем и целом, из тяжелой фракции ДНК ( $^{13}\text{C}$ -ДНК) было получено 96 клонов. Почти половина (48%) от общего числа клонированных последовательностей относилось к филе *Proteobacteria*, из них 11% относилось к семейству *Methylococcaceae*, включая *Methylobacter*, *Methylosoma* и некультивируемых представителей *Methylococcaceae*. Один клон был на 96% идентичен некультивируемому представителю *Methylocystaceae* (AM936283). Помимо *Proteobacteria*, в библиотеке клонов из  $^{13}\text{C}$ -ДНК присутствовали представители групп *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochetes* и *Planctomycetes*. Более глубокий анализ был осуществлен с использованием пиросеквенирования тяжелых фракций ДНК. После контроля качества пула данных осталось 1759 последовательностей со средней длиной 331 п.н. Из них 59.9% принадлежали *Proteobacteria* (Рис. 7).





**Рис. 7.** Распределение групп микроорганизмов, обитающих в поверхностном слое осадка арктического озера, на основе анализа гена 16S рРНК (He *et al.*, 2012).

Среди *Proteobacteria* 13.6% относилось к I типу метанотрофов, преимущественно к *Methylobacter* и *Methylosoma*. Остальная часть метанотрофов I типа (4.2%) была представлена неклассифицированными представителями семейства *Methylococcaceae*. Представители II типа почти отсутствовали в тяжелых фракциях ДНК ( $^{13}\text{C}$ -ДНК) – 1 из 1759 последовательность принадлежала роду *Methylocella*. Анализ функциональных генов *pmoA* и *mmoX* в  $^{13}\text{C}$ -ДНК показал, что основная роль в окислении метана при низких температурах принадлежала представителям *Methylococcaceae*. Это хорошо согласуется с результатами пиросеквенирования и с составом библиотек клонов, полученных из образцов осадка. Попытки амплифицировать ген *mmoX* парами праймеров *mmoX206F/mmoX886R*, *mmoXf882/mmoXr1403* и *mmoX1/mmoX2* не увенчались успехом.

Таким образом, к настоящему времени достоверно установлено, что метанотрофные бактерии населяют холодные экосистемы, находясь при этом в

метаболически активном состоянии. Результаты молекулярных исследований свидетельствуют о том, что в большинстве из этих экосистем доминируют метанотрофные бактерии I типа, главным образом роды *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylovulum*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*. Численность метанотрофных бактерий в холодных экосистемах варьирует от  $10^3$  в антарктических озерах до  $10^9$  в сибирской вечной мерзлоте и осадках пресноводных озер. Несмотря на обильное разнообразие метанотрофных бактерий в разнообразных холодных местообитаниях на сегодняшний день описаны только два представителя облигатно психрофильных аэробных метанотрофов: выделенный из антарктического озера *Methylosphaera hansonii* и выделенный из тундровой почвы *Methylobacter psychrophilus*. Число известных психротолерантных метанотрофов также остается ограниченным. Среди них есть представители как I типа метанотрофов (*Methylobacter tundripaludum*, *Methylomonas scandinavica*), так и II типа метанотрофов (*Methylocystis rosea*, *Methylocella tundra*).

Настоящая работа была предпринята с целью изучения метанотрофных сообществ холодных метановых сипов и поиску психротолерантных метанотрофов, развивающихся в локусах метановых сипов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

#### 4.1. Район проведения исследований.

Полевые исследования распространения грязевых сипов и интенсивности эмиссии из них 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.). Это труднодоступный и фактически ненаселенный район сибирской тайги со средней годовой температурой -1.1°С и годовым количеством осадков - 596 мм рт. ст. Обско-Иртышская пойма в районе исследований представлена преимущественно долгопоемными лугами с многочисленными водоемами и протоками, которые во второй половине мая заполняются водой в результате подпора со стороны Оби и Иртыша. При этом заливаются и долины стекающих в них малых рек и ручьев. После падения уровня воды в Оби и Иртыше, вода из долин ручьев уходит, что приводит к быстрому развитию луговой растительности и формированию водяноосоковых (*Carex aquatilis*) лугов и пойменных осоковых болот (Таран и др., 2004).

#### 4.2. Измерение потоков газа из метановых сипов.

Эмиссию  $\text{CH}_4$  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  $\text{CH}_4$  в пробах измеряли на хроматографе «Кристалл-5000» («Хроматек», Йошкар-Ола, Россия).

#### **4.3. Аналитические исследования.**

Отбор проб воды для анализа осуществляли с глубины 0-5 см из 5 метановых сипов, расположенных на расстоянии 100-300м друг от друга. Температурный профиль метанового сипа был измерен при помощи 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  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{Br}^-$  в восходящих потоках воды были измерены на ионном хроматографе (Metrohn, Швейцария). Концентрации  $\text{CO}_3^{2-}$  и  $\text{HCO}_3^-$  были определены титрованием с 0.05М раствором HCl.

#### **4.4. Отбор образцов для анализа.**

Для идентификации метанотрофных бактерий, развивающихся в местах выхода газа на поверхность, использовали образцы ила, отобранные в пойме реки Мухринской в сентябре 2009 г из двух метановых сипов, которые располагались на расстоянии 300м друг от друга ( $60^\circ 53,358'$  С.Ш.,  $68^\circ 42,486'$  В.Д). Часть отобранного ила была использована в качестве инокулята для получения накопительной культуры

метанотрофных бактерий и измерения потенциальной активности окисления метана *in situ*, тогда как другая его часть была заморожена при -20 °С для проведения молекулярных анализов.

#### **4.5. Определение метанооксиляющей активности.**

Концентрацию метана в образцах измеряли методом анализа газовой фазы (Egorov, Ivanov, 1998). Скорости окисления метана определяли радиоизотопным методом с использованием  $^{14}\text{C}\text{H}_4$ , растворенного в дегазированной дистиллированной воде. Из образцов ила посредством шприцев на 5мл со срезанным кончиком отбирали пробы по 3 мл каждая. Открытый конец впоследствии плотно закрывали резиновой пробкой. Меченый субстрат вводили через резиновую пробку. Образцы инкубировали в темноте при температуре *in situ* (4°C) в течение 24 ч, затем были зафиксированы в 0.5 мл 2М раствора КОН и доставлены в лабораторию для изотопного анализа. Предварительно кислотность образцов была доведена до pH 2 соляной кислотой (HCl), после чего выделившийся  $\text{CO}_2$  растворяли в жидкости, содержащей 2-фенилэтиламин. Органическое вещество было полностью окислено по персульфатному методу (Русанов и др., 1998) и после чего выделившийся углекислый газ был также введен в сцинтилляционную жидкость. Обе порции  $\text{CO}_2$  в сцинтилляционной жидкости были объединены. Радиоактивность измеряли на RackBeta сцинтилляционном счетчике (ЛКВ, Швеция). Скорости окисления метана рассчитывали на основе уравнения  $I = r \times C / R \times T$ , где  $I$  – скорость окисления,  $r$  – радиоактивность образовавшегося продукта,  $C$  – концентрация растворенного метана в образце,  $R$  – общая радиоактивность добавленного  $^{14}\text{C}\text{-CH}_4$ ,  $T$  – время инкубации.

Образцы, фиксированные КОН и хранившиеся в течение 2 часов перед инъекцией меченых субстратов, использовали в качестве контроля.

#### **4.6. Определение численности метанотрофных бактерий.**

Детекцию и подсчет целевых организмов проводили с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с 16S рРНК-специфичными олигонуклеотидными зондами.

##### **4.6.1. Процедура фиксация накопительных культур метанотрофных бактерий и образцов ила из метановых сипов.**

Культуру клеток осаждали центрифугированием при 8000 об/мин в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в 0.5 мл фосфатного буфера (NaCl – 8.0 г, KCl – 0.2 г, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1.44 г, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.2 г, H<sub>2</sub>O – 1 л, pH 7.0). К полученной суспензии добавляли 1.5 мл раствора формальдегида (4%) в фосфатном буфере и инкубировали в течение 1.5 часов. Образец осаждали центрифугированием (8000 об/мин в течение 5 минут) и дважды промывали фосфатным буфером. Фиксированные образцы ресуспендировали в смеси 100% этанола и фосфатного буфера (1:1, об:об) и до анализа хранили при -20°C. Процедуру фиксации образцов ила осуществляли посредством добавления этанола (1:1 V/V) к образцам *in situ* сразу после отбора проб, которые затем были доставлены в лабораторию и хранились при -20 °С.

##### **4.6.2. Процедура гибридизации фиксированных образцов культур метанотрофных бактерий с зондами.**

1-5 мкм суспензии фиксированных образцов наносили на обработанные в 0.1% растворе желатина предметные стекла с окошками, разделенными тефлоновым покрытием. Препараты выдерживали 24 часа при комнатной температуре для лучшего связывания клеток со стеклом. Стекла с нанесенными образцами последовательно обрабатывали растворами этанола (50%, 80%, 100%), оставляя по 3 мин в каждом. Для гибридизации использовали зонды M84/M705 и M450, специфичные для I и II метанотрофов, соответственно (Eller *et al.*, 2001). Гибридизацию препаратов с зондами проводили в соответствии с методикой Stahl и Amann (1991) при температуре 46°C. После завершения процедуры гибридизации препараты в течение 10 минут докрашивали 1 мкМ раствором универсального, ДНК-специфичного флуоресцентного красителя – ДАФИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол), промывали дистиллированной водой и высушивали.

#### **4.6.3. Процедура гибридизации фиксированных образцов ила.**

Анализ фиксированных образцов проводили с использованием процедуры, разработанной ранее для исследования образцов почвы и позволяющей избавиться от автофлуоресценции минеральных частиц (Bertaux *et al.*, 2007). К 1.5 мл зафиксированного образца добавляли 7 мг поливинилполипирролидона (ПВП) и Na<sub>2</sub>-ЭДТА до концентрации 5мМ. Эппендорфы качали в горизонтальном положении со скоростью 250 об/мин в течение 20 мин. После чего их оставляли в вертикальном положении без качания, позволяя осесть крупным частицам. Супернатант (1 мл) перемещали в новый 2 мл эппендорф на 1 мл слой раствора препарата «Nycodenz» («Gentaug», Бельгия). Образцы центрифугировали при 16438g в течение 30 мин при 18°C, после чего 1.8 мл раствора было отобрано в новый эппендорф. Затем образцы

были перемешаны на вортексе и профильтрованы через черные мембранные фильтры диаметром 47 мм с размером пор 0.2 мкм («Millipore», Германия). После чего фильтры были промыты 4 мл PBS буфера (г/л, NaCl, 8.0; KCl, 0.2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.44; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2; pH 7.0). Для того чтобы предотвратить повреждение черных фильтров, они были помещены на подложку из нитроцеллюлозных мембранных фильтров (размер пор 0.45 мкм, диаметр 47 мм, «Millipore», Германия). В конечном итоге фильтры последовательно выдерживались в течение 6 мин в каждой из чашек Петри, покрытых фильтровальной бумагой, пропитанной этанолом с концентрацией 50, 80 и 96 %. Затем фильтры были высушены на воздухе и помещены на предметное стекло. FISH анализ был выполнен с использованием Су3-меченых зондов M84/M705 и M450, специфичных для I и II типа метанотрофов, соответственно. Для подсчета клеток *Methylocella*-подобных метанотрофов, которые не детектируются M84/M705 и M450, были использованы зонды Mcell-1026, Mcellt-143 и Mcells-1024 (Dedysh, 2009). Зонд EUB338-mix был применен для подсчета общего количества бактериальных клеток. После процедуры гибридизации фильтры вымачивали в 1 мкм растворе ДНК-специфичного красителя ДАФИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) в темноте в течение 7 мин, после чего промывали в стерильной воде и высушивали на воздухе. Подсчет количества клеток был осуществлен на микроскопе Zeiss Axioplan 2 («Zeiss», Йена, Германия), оборудованном фильтрами для Су3-меченных зондов и фильтрами для красителя ДАФИ.

#### **4.7. Оценка разнообразия метанотрофов.**

##### **4.7.1. Экстракция тотальной ДНК из образцов ила.**



Определение разнообразия метанотрофов проводили на выделенных образцах 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).

#### **4.7.2. ПЦР-амплификация фрагментов гена *pmoA*.**

Оценку общего разнообразия метанотрофных бактерий в иле проводили путем ПЦР-амплификации фрагментов гена *pmoA*, кодирующего полипептид, несущий активный центр мембраной ММО для чего использовали два набора праймеров A189f/A682r и A189f/mb661r (Holmes *et al.*, 1995; Costello, Lidstrom, 1999). Проверку продуктов ПЦР осуществляли путём их электрофореза в 1.2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией продуктов реакции с помощью УФ-трансиллюминатора. Праймер A189f включал адаптер «454-A» для пиросеквенирования и специфичную для каждого образца последовательность «barcode», в то время как оба обратных праймера включали адаптер «454-B». ПЦР-амплификацию проводили на термоциклере «Mastercycler gradient» (Eppendorf, Гамбург, Германия) при следующих условиях: начальная денатурация (5 мин при 96°C) и 30 циклов, включающих отжиг праймеров (1 мин при 56°C) и элонгацию (1 мин при 72°C), а также завершающая элонгация в течение 5 мин при 72°C. Пиросеквенирование ПЦР-продуктов было выполнено в геномном центре Института Макса Планка (Кёльн, Германия) с использованием технологии GS FLX Titanium. Так как пары праймеров A189r/A682r и A189f/mb661r не

детектируют метанотрофов из филы *Verrucomicrobia* (Op den Camp *et al.*, 2009), был проведен дополнительный анализ с использованием праймеров V170f/V631b, специфичных для *pmoA* гена представителей рода *Methylacidiphilum* (Sharp *et al.*, 2012).

#### **4.8. Обработка данных пиросеквенирования гена *pmoA*.**

Полученные в результате пиросеквенирования последовательности были подвергнуты контролю качества на базе онлайн инструмента «Prinseq» (Schmieder, Edwards, 2011) со следующими заданными параметрами: минимальная длина последовательности – 200 п.н., минимальный средний показатель качества – 20, максимально допустимая частота встречаемости N – 1%, удаление всех символов помимо ATGC, обрезка концов (с 3' конца) с показателем качества меньше 10, граничное значение низкого уровня (энтропия – 7). Дальнейшую обработку данных осуществляли с помощью процедуры QIIME (<http://qiime.org/>) (Caporaso *et al.*, 2010). Операционные таксономические единицы (ОТЕ) были выбраны на основе 87% сходства нуклеотидных последовательностей, что приблизительно соответствует 97% сходству по гену 16S РНК (Degelmann *et al.*, 2010). Разбиение на таксономические группы было выполнено на основе репрезентативных последовательностей индивидуальных ОТЕ с использованием базы данных *pmoA* гена (Deng *et al.*, 2013). Альфа-разнообразие и равномерность<sup>5</sup> были оценены путем определения индексов Шэннона, Симпсона и Chao1 (Chao, 1984; Shannon, 1948; Simpson, 1949). Последовательности, относящиеся к *pmoA* гену (кодирующему аммиакмонооксигеназу) были сгруппированы и подвергнуты кластерному анализу с

---

<sup>5</sup> В англоязычной литературе используются термины alpha diversity и evenness

использованием «UPARSE» и «USEARCH» с порогом различия 0.05 (Edgar, 2013; Edgar, 2010). Репрезентативные сиквенсы были случайным образом выбраны из пула ОТЕ и, используя BLASTX, подвергнуты таксономическому сравнению с последовательностями в базе данных NCBI (Altschul *et al.*, 1997; Pruitt *et al.*, 1995). Последовательности с уровнем сходства более чем 95% считались пригодными для дальнейшего анализа. Последовательности с ошибками, приводящими к сдвигу рамки считывания, и последовательности длиной менее 134 аминокислот были удалены из массива данных. Впоследствии последовательности были добавлены к большому пулу ранее опубликованных последовательностей генов *pmoA* и *amoA* (Lüke and Frenzel, 2011). Группа из 184 последовательностей, покрывающая разнообразие в отобранных образцах, вместе с 5010 последовательностями *pmoA/amoA* гена были взяты для детального построения дендрограммы. Последняя была построена с использованием программного пакета ARB (Ludwig *et al.*, 2004) методом «neighbor-joining» на основе 126 аминокислотных последовательностей с использованием поправки Кимуры (Kimura correction). Пул полученных последовательностей фрагментов генов *pmoA* был депонирован в ГенБанк под номером исследования SRP037754 со следующими номерами доступа: SRR1168458 и SRR1169858.

#### **4.9. Получение накопительных культур метанотрофов, анализ их состава, выделение изолятов в чистую культуру.**

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):  $\text{NaNO}_3$  – 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,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  – 0.03. Вторая среда отличалась от первой повышенным содержанием нитрата ( $\text{KNO}_3$  – 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 и 2) серийные разведения в жидкой среде. В первом случае, осуществляли рассев полученных накопительных культур на агаризованную среду с последующей инкубацией в течение 4-5 недель при 20°C в эксикаторах с 20-30% метана в газовой фазе. Формирующиеся на среде колонии анализировали с использованием фазово-контрастной микроскопии и отсеивали на чашки с аналогичной средой. Для очистки культуры делали до 10 последовательных пассажей изолированных колоний на агаризованной среде. В случае использования серийных разведений, 1 мл суспензии клеток накопительной культуры последовательно разводили в 5-кратной пропорции в сывороточных флаконах общим объемом 35 мл с объемом среды 5 мл. Флаконы герметично закрывали, вводили метан шприцем с фильтром до 25%  $\text{CH}_4$  в газовой фазе и инкубировали на качалке (120 об/мин) при 20 °C или в статических условиях при 4 °C. Культуру,

выросшую во флаконе с наибольшим разведением, микроскопировали и подвергали последующему рассеву. Процедуру повторяли до получения культуры, состоящей из морфологически одинаковых клеток. 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):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 16;  $\text{KNO}_3$  – 16;  $\text{NaCl}$  – 20;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 10;  $\text{MgSO}_4$  – 16; 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001).

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* – праймеров A189f/A682r (Holmes *et al.*, 1995).

#### **4.10. Анализ ростовых характеристик изолятов в зависимости от температуры.**

Анализ ростовых характеристик изолятов 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.

#### **4.11. Таксономическое описание нового штамма.**

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<sup>T</sup>.

#### **4.11.1. ПЦР-амплификация филогенетических и функциональных генов исследуемой культуры.**

Экстракты ДНК, полученные из чистой культуры метанотрофной бактерии, использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В данном исследовании проводили амплификацию фрагментов следующих филогенетических и функциональных генов метанотрофов (Таблица 4): а) гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров (размер продукта около 1450 пар нуклеотидов) (Weisburg *et al.*, 1991); б) гена *pmoA*, кодирующего полипептид, несущий активный центр мембранной метанмонооксигеназы (мММО), размером около 550 пар оснований (Holmes *et al.*, 1995); в) гена *mmoX*, кодирующего  $\alpha$ -субчастицу растворимой ММО (Auman *et al.*, 2000). Экстракт ДНК, полученный из чистой культуры метанотрофа *Methylovulum miyakonense* DSM 23269<sup>T</sup>, был использован в качестве положительного контроля. Проверку продуктов осуществляли путем электрофореза в 1.2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией продуктов амплификации с помощью УФ-трансиллюминатора. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали 1kb DNA Ladder (Promega). Проверку продуктов осуществляли путем электрофореза в 1.2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией продуктов амплификации с помощью УФ-трансиллюминатора. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали 1kb DNA Ladder (Promega).

**Таблица 4. Праймеры, использованные в работе для ПЦР-амплификации филогенетических и функциональных генов метанотрофных бактерий.**

Ген-мишень	Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Ссылка
16S рРНК	9f	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
	1492r	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	
<i>pmoA</i>	A189f	GGNGACTGGGACTTCTGG	Holmes <i>et al.</i> , 1995
	A682r	GAASGCNGAGAAGAASGC	
<i>mmoX</i>	A166f	ACCAAGGARCARTTCAAG	Auman <i>et al.</i> , 2000;
	B1401r	TGGCACTCRTARCGCTC	
	mmoX1	CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGT	Miguez <i>et al.</i> , 1997;
	mmoX2	GGCTCGACCTTGAAGCTTGGAGCCATACTCG	
	mmoX206f	ATCGCBAARGAATAYGCSCG	Hutchens <i>et al.</i> , 2004
mmoX886r	ACCCANGGCTCGACYTTGAA		
<i>mxaF</i>	mxaF1003f	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT	McDonald, Murrell, 1997
	mxaF1561r	GGGCAGCATGAAGGGCTCCC	
<i>nifH</i>	F1	TAYGGNAARGGNGGNATYGGNAARTC	Булыгина и др., 2002; Zehr, MReynolds, 1989
	nifHr	ADNGCCATCATYCTNCC	

#### **4.11.2. Филогенетический анализ.**

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы SeqMan (Laser Gene 7.0; DNA Star Package). Сравнение полученных последовательностей с таковыми в базе данных GenBank осуществляли с использованием программы Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета ARB (<http://www.arb-home.de>). Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывали с использованием программного пакета Phylip с помощью “bootstrap”-анализа путем построения 1000 альтернативных деревьев.

#### **4.11.3. Методы изучения морфологических и физиологических характеристик.**

Размеры и морфология вегетативных клеток были определены в начале, середине и конце экспоненциальной и стационарной фаз роста. Определение ростового диапазона и оптимума pH культур проводили с использованием жидкой среды NMS ( $\text{KNO}_3$  – 1 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1 г/л;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.2 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.272 г/л;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 0.717 г/л; 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001)) и метана в газовой фазе, соотнося удельную скорость роста с регистрируемым значением pH. Варьирование pH среды осуществляли путем смешивания 0.1 М растворов  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  без изменения ионной силы. Отношение культур к температуре и солености определяли на основе оценки их роста в диапазоне температур от 2 до 37 и концентраций NaCl в среде от 0 до 2.5%. Рост культур оценивали путем измерения оптической плотности на биофотометре Eppendorf Biophotometer AG при длине волны 600 нм. Для



определения спектра субстратов, используемых изолятами в качестве источников углерода и энергии, оценивали рост на жидкой среде NMS со следующими соединениями (в концентрации 0.1%): этанол, формальдегид, формамид, формиат, метиламин, глюкоза, сукроза, галактоза, лактоза, фруктоза, цитрат, сукцинат, пируват, ацетат и триптон. Оценку роста на метаноле осуществляли в диапазоне концентраций от 0.01 до 6 об. %.

Использование различных соединений в качестве источников азота проверяли на среде NMS, замещая нитрат следующими соединениями (в концентрации 0.05%):  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , мочевины, формамид, метиламин, глутаминовая кислота, глутамат, глицин, аланин, аспарагиновая кислота, лизин, аргинин, гистидин, пептон, триптон, триптофан, метионин, треонин, дрожжевой экстракт и казаминовые кислоты. Для проверки способности культур к фиксации атмосферного азота использовали безазотистую среду. Рост оценивали после 3 недель роста при комнатной температуре в статических условиях.

#### **4.11.4. Электронная микроскопия.**

Исследования ультратонкого строения клеток новых изолятов были проведены совместно с к.б.н. Сузиной Н.Е. (ИБФМ РАН, Пущино). Для анализа использовали клетки, отобранные в середине экспоненциальной фазы роста культур. Клетки осаждали центрифугированием и отмывали от среды 0.05M какодилатным буфером (рН 7.2). Осадок клеток фиксировали в течение 2 часов в 2% растворе глутарового альдегида при 4°C и затем, после трехкратной отмывки в какодилатном буфере, дофиксировали в течение 12 часов в 1% растворе  $\text{OsO}_4$  в том же буфере при 4°C. Материал обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, завершая

процесс обезвоживания двумя сменами ацетона по 15 минут. Полученный материал заключали в смолу в ЭПОН-812. Срезы изготавливали на микротоме LKB-4800, контрастировали 2% раствором уранил-ацетата в 70% растворе этанола в течение 39-45 мин. при 37°C и дополнительно окрашивали цитратом свинца (Reynolds, 1963) при 20°C. Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100В.

**4.11.5. Анализ состава жирных кислот.** Исследуемые штаммы выращивали на среде NMS. Биомассу центрифугировали, замораживали при -70°C и подвергали лиофильному высушиванию. Анализ состава жирных кислот был выполнен в лаборатории проф. Sinninghe Damsté (Royal Netherlands Institute for Sea Research, Нидерланды). Лиофилизированные клетки гидролизovali 1 N 5% HCl в метаноле в течение 3 ч. Лизат титровали 2 N KOH-метанол (MeOH) (1:1, об./об.) до pH 4. После добавления воды до конечного соотношения H<sub>2</sub>O-MeOH 1:1 лизат трижды экстрагировали с использованием дихлорметана (ДХМ). Фракции ДХМ были собраны и высушены в присутствии сульфата натрия. Полученный экстракт был метилирован реакцией с diazometаном и разделен на активированной колонке из Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на полярную и неполярную фракции с применением соответственно ДХМ и ДХМ-MeOH в качестве растворителей. Полярная фракция была растворена в гексан-2-пропаноле (99:1, об.:об.), фильтрована через политетрафлюороэтиленовый фильтр с размером пор 0.45 мкм и анализирована методом жидкостной хроматографии.

**4.11.6. Определение нуклеотидного состава ДНК.** Определение нуклеотидного состава ДНК новых изолятов было выполнено совместно с к.б.н. Детковой Е.Н. (ИНМИ РАН). Нуклеотидный состав ДНК определяли методом термической

денатурации на спектрофотометре Pye Unicam SP1800 (Великобритания) при скорости нагрева 0.5 град/мин. Содержание суммы нуклеотидных оснований Г+Ц рассчитывали по уравнению Оуэна (Owen *et al.*, 1969): Г+Ц (мол. %) =  $(2.08 \times E_{пл}) - 106.4$ , где  $T_{пл}$  – температура плавления. В качестве стандарта использовали ДНК *E.coli* штамм К-12.

**4.11.7. Фотодокументирование материалов и обработка данных.** Фотографии накопительных культур и новых изолятов были получены с помощью микроскопа Zeiss AxioPlan 2 и цифровой фотокамеры Zeiss с матрицей 6 Мпкс, с использованием программного пакета AxioVision v. 4.2. Статистические анализы выполнены при помощи программного пакета MS Excel 2003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

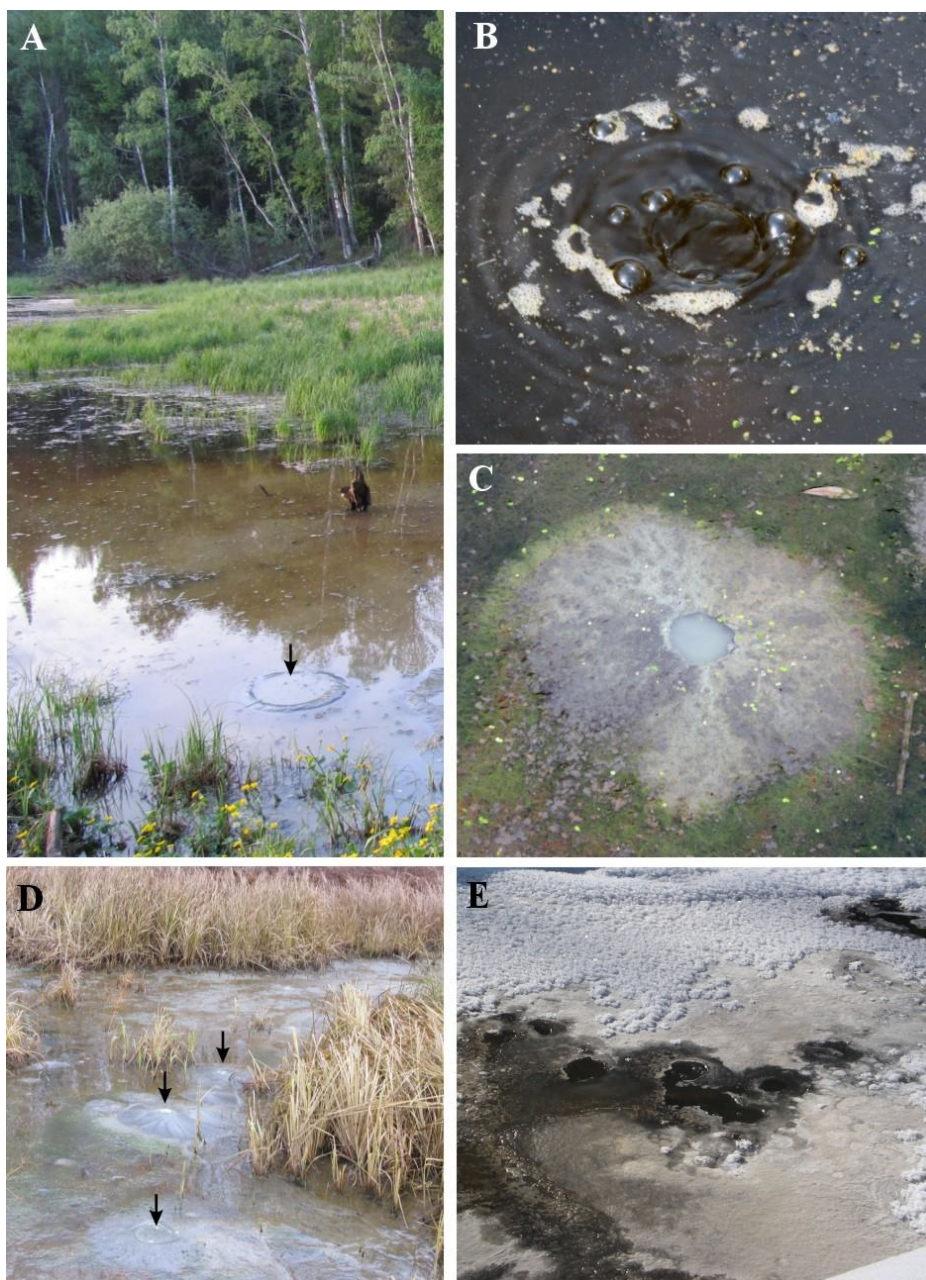
### ГЛАВА 5. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАНОВЫХ СИПОВ В ДОЛИНЕ РЕКИ МУХРИНСКОЙ И ПОЛЕВЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ПОТОКОВ МЕТАНА.

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 (Рис. 8).

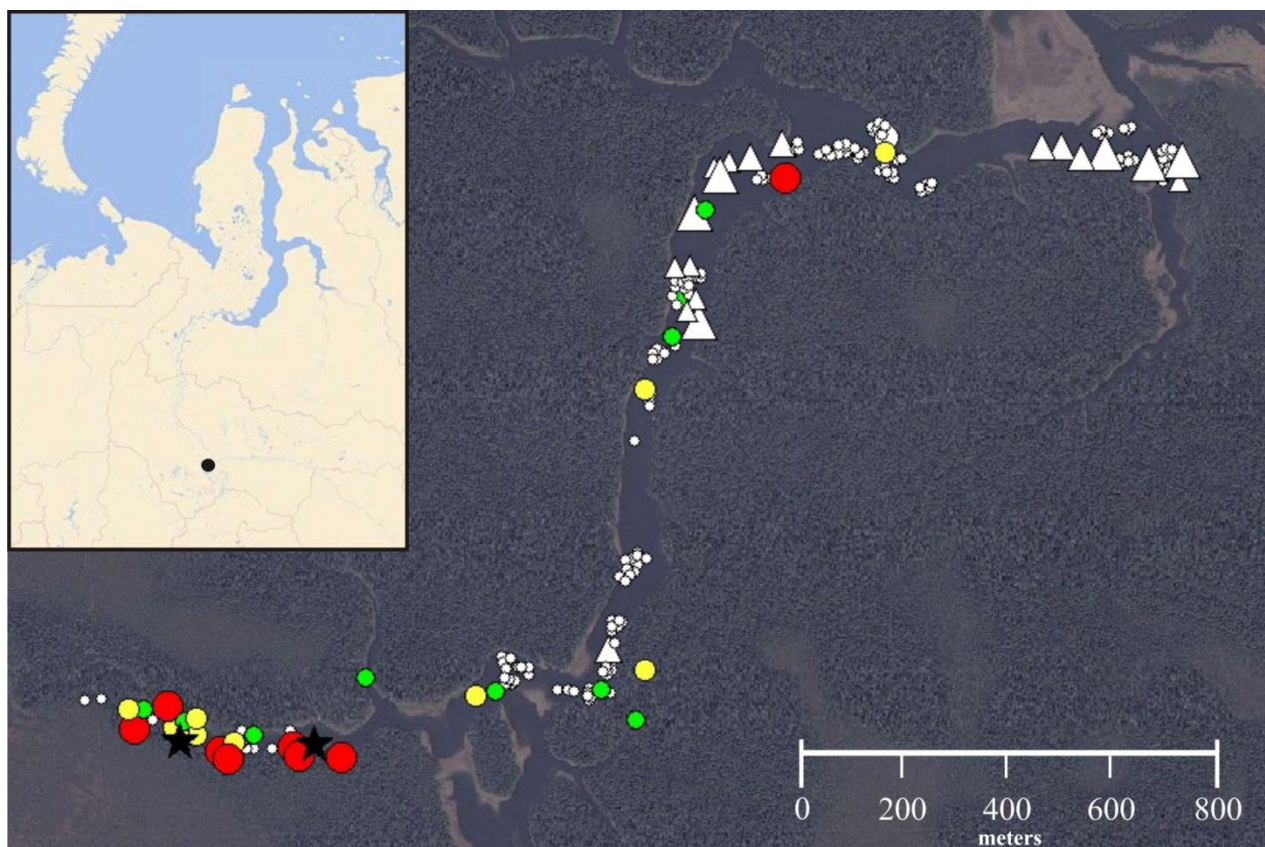
#### 5.1. Картирование метановых сипов и определение их физико-химических характеристик.

В общей сложности, в исследованном районе было обнаружено и нанесено 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. 9).

Восходящие водные и грязевые потоки характеризовались около-нейтральными значениями pH (6.8-6.9), величинами электропроводности от 543 до 627 мкСм см<sup>-1</sup> и относительно высоким содержанием ионов Ca<sup>2+</sup> (85.4 – 96.4 мг/л), Mg<sup>2+</sup> (14.4 – 16.7 мг/л) и CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (45.9– 75.2 мг/л)/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1219.7– 1365.3 мг/л) (Таблица 5). Температура воды по профилю сипа варьировала от 3.5 до 5°C.



**Рис. 8.** Грязевые метановые сипы в заболоченной пойме реки Мухринской в летний (А), (В); одиночный сип (С), скопление крупных сипов (D); метановые сипы, не замерзающие в зимнее время (Е). Подавляющее большинство (99%) сипов имели малые размеры (0.5 – 5 см в диаметре), однако некоторые из них достигали 1 м в диаметре (Рис. 8С). Крупные сипы оставались активны и в зимний сезон (Рис. 8Е).



**Рис. 9.** Потоки метана и распределение сипов в долине реки Мухринской. 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.

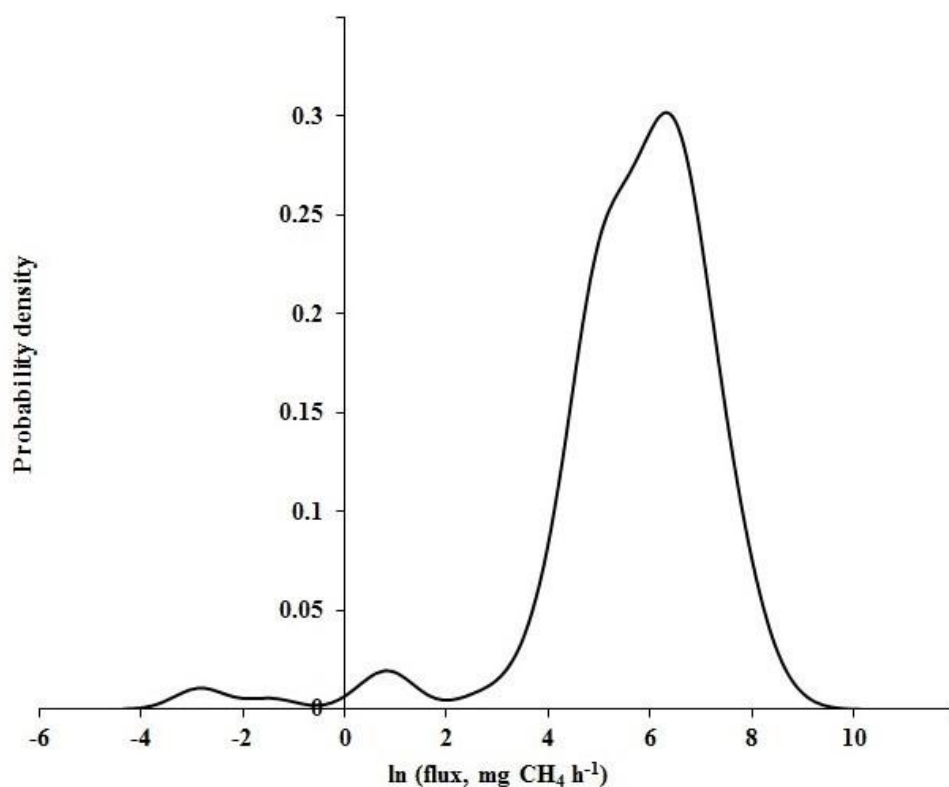
**Таблица 5. Химический состав проб воды, отобранных из нескольких метановых сипов.**

Концентрация, мг л <sup>-1</sup>																
№ Сипа															ЕС (мкСм / см)	
	Li	Na	NH <sub>4</sub>	K	Mg	Ca	F	Cl	NO <sub>3</sub>	SO <sub>4</sub>	CO <sub>3</sub>	HCO <sub>3</sub>	pH			
1	0.030	± 4.65	± 8.18	± 2.90	± 14.51	± 85.42	± 0.39	± 0.69	± 0	± 0.89	± 63.75	± 1306.82	± 6.90	± 627		
	0.060	0.34	0.67	0.69	0.51	5.94	0.60	0.08		0.07						
2	0.005	± 8.90	± 5.29	± 8.58	± 14.41	± 94.52	± 0.08	± 0.53	± 0.04	± 0.20	± 0	± 0	± 6.81	± 598		
	0.016	0.19	0.49	1.61	1.23	6.77	0.03	0.15	0.12	0.64						
3	0.006	± 6.42	± 7.17	± 2.86	± 16.68	± 96.38	± 0.07	± 0.78	± 0	± 0	± 45.98	± 1365.26	± 6.84	± 618		
	0.018	0.28	0.17	0.70	±0.75	1.43	0.01	0.13								
4	0.005	± 4.89	± 8.39	± 3.18	± 16.76	± 91.55	± 0.28	± 0.99	± 0	± 0.39	± 57.48	± 1352.51	± 6.91	± 575		
	0.017	0.25	0.82	0.47	0.87	2.13	0.66	0.08		0.62						
5	0.014	± 4.71	± 6.94	± 2.10	± 16.29	± 87.18	± 0.08	± 0.431	± 0	± 0.64	± 75.24	± 1219.702	± 6.82	± 543		
	0.023	0.18	0.43	0.44	1.14	16.16	0.03	0.005		0.04						



## 5.2. Полевые измерения потоков метана из метановых сипов.

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  $\text{CH}_4$  были проведены для 28 случайно выбранных сипов (Рис. 10). В то время как потоки из большинства (90%) сипов не превышали  $1.45 \text{ г CH}_4 \text{ ч}^{-1}$ , эмиссия из некоторых сипов достигала  $5.54 \text{ г CH}_4 \text{ ч}^{-1}$  (Рис. 10).



**Рис. 10.** Распределение плотности вероятности потоков  $\text{CH}_4$  из метановых сипов.

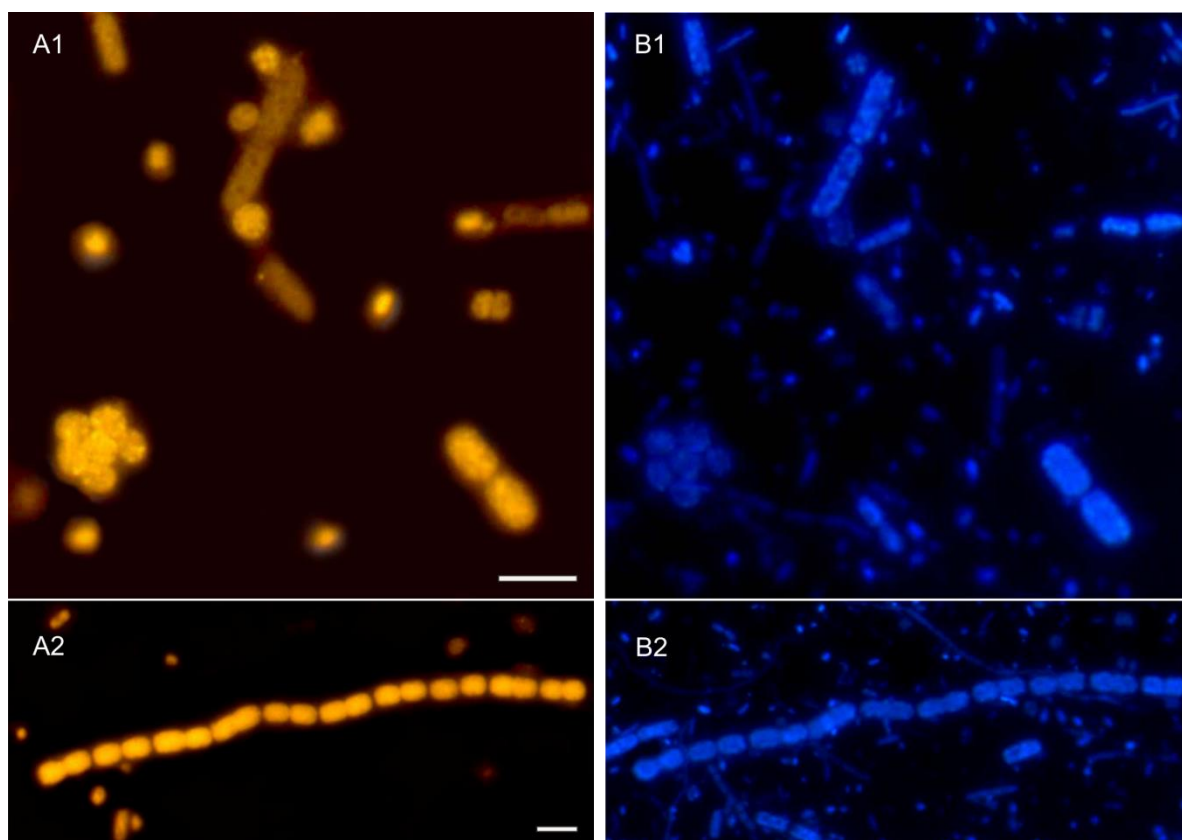
График построен по данным измерений потоков метана из 149 метановых сипов на основе метода, описанного в работе Bowman, Azzalini, 1997. Функция плотностей вероятности применена для расчета случайных величин. Вероятность (P) случайной переменной X определяется по формуле:

$$\int_{x_1}^{x_2} f(x) dx = P(x_1 < X < x_2)$$
, где  $f(x)$  – функция плотности вероятности; X – случайная переменная, значение которой определяется в интервале от  $x_1$  до  $x_2$ .



## ГЛАВА 6. УЧЕТ КЛЕТОК МЕТАНОТРОФОВ В ИЛЕ МЕТАНОВЫХ СИПОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОКИСЛЕНИЯ МЕТАНА.

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 собранными в длинные цепочки и агрегаты (Рис. 11).



**Рис. 11.** Специфическая детекция клеток метанотрофов I типа методом FISH. (A) Флуоресцентная микрофотография гибридизации со смесью  $^{32}\text{S}$ -меченых зондов M705+M84, выявляющих клетки метанотрофов I типа; (B) – окраска ДАФИ. Панели 1 и 2 отображает два разных поля зрения. Маркер – 5  $\mu\text{m}$ .

### 6.1. Общее число и доля метанотрофных бактерий в метановых сипах.

Численность выявленных зондами метанотрофов I типа составляла  $2.74 - 4.29 \times 10^7$  клеток  $\text{г}^{-1}$  ила (сухой вес) (Таблица 6). Значительно меньше целевых микроорганизмов -  $2.84 - 11.70 \times 10^5$  клеток  $\text{г}^{-1}$  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-143 и Mcells-1024 не увенчались успехом. Численность этих бактерий в образцах ила была ниже предела обнаружения ( $10^3$  клеток  $\text{г}^{-1}$  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  $\text{г}^{-1}$  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 6). 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 6. 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	$4.29 \pm 0.10$	$2.84 \pm 1.92$	$2.1 \pm 1.4$	$3.98 \pm 0.57$	10.9 / 20.2
2	$2.74 \pm 0.18$	$11.70 \pm 11.1$	$1.4 \pm 3.4$	$2.33 \pm 0.18$	12.2 / 20.5

### 6.2. Потенциальная активность окисления метана образцами ила из сипов.

Образцы ила из двух метановых сипов, обозначенных черными звездочками на рис. 9, были взяты для измерения потенциальной активности окисления метана посредством инкубации с  $^{14}\text{CH}_4$  при температуре *in situ* (4 °C). Скорости окисления метана, определенные для образцов ила из двух сипов, были близкими и составляли 15.5 и 15.9 нмоль  $\text{CH}_4$  мл $^{-1}$  сут $^{-1}$ .

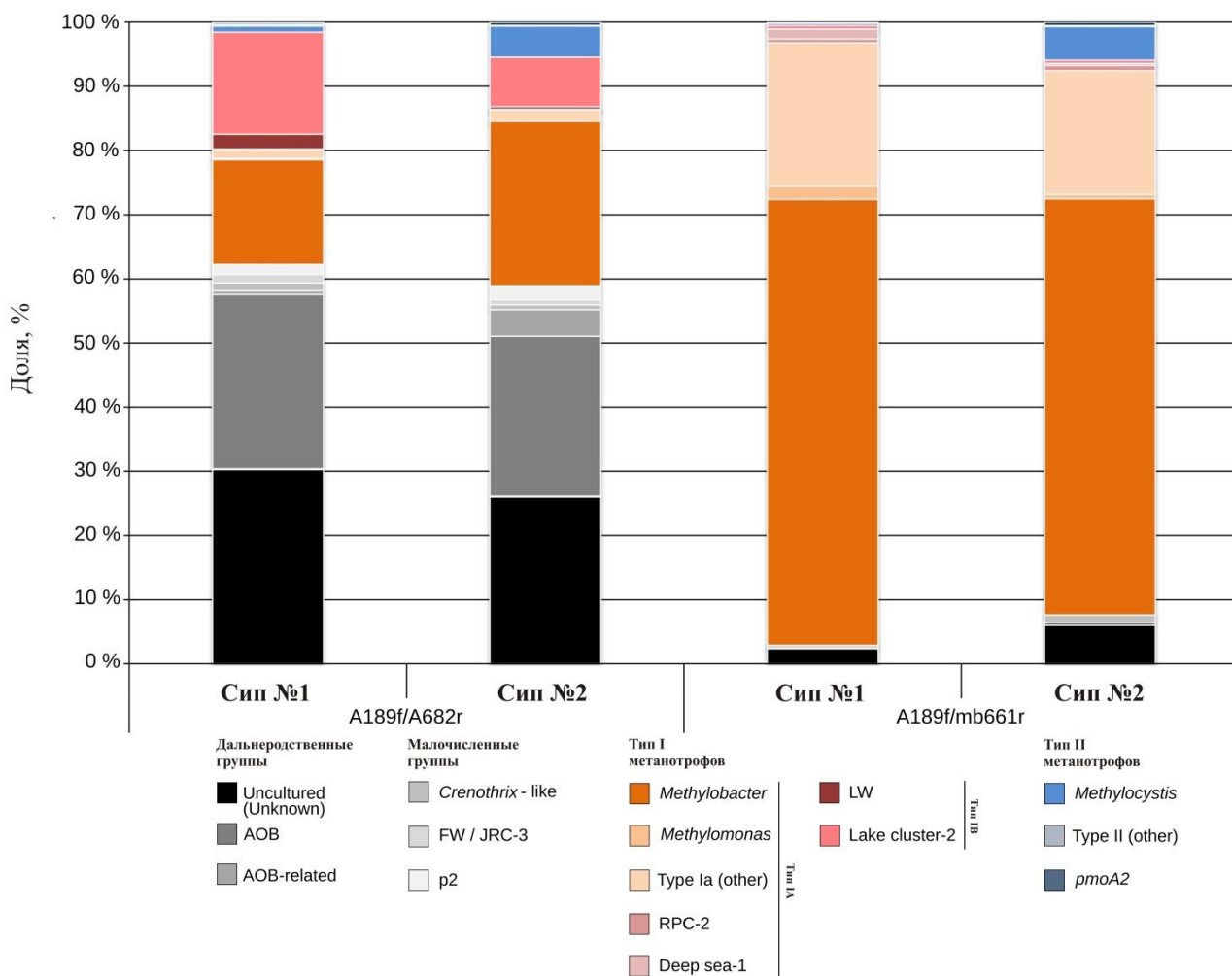
## ГЛАВА 7. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАНОТРОФОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ В ЛОКУСАХ ВЫХОДА МЕТАНА, С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ГЕНОВ *pmoA*.

Состав формирующегося в сипах метанотрофного сообщества был определен методом пиросеквенирования гена *pmoA*, кодирующего  $\beta$ -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 *pmoA* гена (27398 и 26430 для сипов №1 и №2, соответственно).

Результаты анализа полученного пула последовательностей *pmoA* представлены на рис. 12. 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 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, обнаруженного праймерами A189f/mb661r (Chao1 индексы 4602 и 1523, соответственно). Однако значительная доля (25-27%) последовательностей, полученных с использованием A189f/A682r, была представлена фрагментами гена *amoA* (Рис. 12). Эти последовательности гена *amoA* не были использованы в последующем анализе, однако информация по их филогенетическому родству с

известными представителями бактерий приведена в таблице 7. Основные группы фрагментов гена *pmoA*, полученные из ила сипов с использованием праймеров A189f/A682r, были представлены последовательностями *Methylobacter*-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. 12). 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 6). 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 успешного развития метанотрофов в сипах с высокой доступностью субстрата.



**Рис. 12.** Доля различных групп метанотрофов в иле метановых сипов по результатам высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена *pmoA*. АОВ – аммиак-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.

**Таблица 7. Таксономическое разнообразие последовательностей *amoA* гена.**

Объединение ОТЕ было выполнено на уровне 87% сходства нуклеотидных последовательностей (Degelman *et al.*, 2010). В общей сложности было идентифицировано 170 ОТЕ. Для ОТЕ, доля которых превышала 1%, была определена таксономическая принадлежность с помощью поиска (BLASTX) (Altschul *et al.*, 1997) репрезентативных последовательностей в базе данных NCBI (Pruitt *et al.*, 2005) с заданным пороговым значением сходства на уровне 95%.

<b>ОТЕ</b>	<b>Относительная численность, %</b>	<b>Микроорганизм с наибольшим сходством по <i>amoA</i> гену с данной ОТЕ</b>
АОВ_OTU_139	23.67	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_143	10.11	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_1	7.97	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_118	7.55	Unknown (uncultured)
АОВ_OTU_2	6.47	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_69	6.45	Unknown (uncultured)
АОВ_OTU_158	6.10	Unknown (uncultured)
АОВ_OTU_71	2.94	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_4	2.85	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_19	2.23	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_7	2.10	<i>Nitrosomonas</i> sp.
АОВ_OTU_3	2.01	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_11	1.88	<i>Nitrospira</i> sp.
АОВ_OTU_6	1.72	<i>Nitrospira</i> sp.

**Таблица 7. Продолжение.**

АОВ_OTU_5	1.61	<i>Nitrosospira</i> sp.
АОВ_OTU_13	1.33	Unknown (uncultured)
АОВ_OTU_104	1.30	<i>Nitrosospira</i> sp.
АОВ_OTU_140	1.30	Unknown (uncultured)
АОВ_OTU_161	1.10	<i>Nitrosospira</i> sp.
АОВ_OTU_24	1.06	<i>Nitrosospira</i> sp.
АОВ_OTU_9	1.06	<i>Nitrosospira</i> sp.
АОВ_OTU_8	1.04	Unknown (uncultured)
АОВ_OTU_84	1.04	<i>Nitrosospira</i> sp.

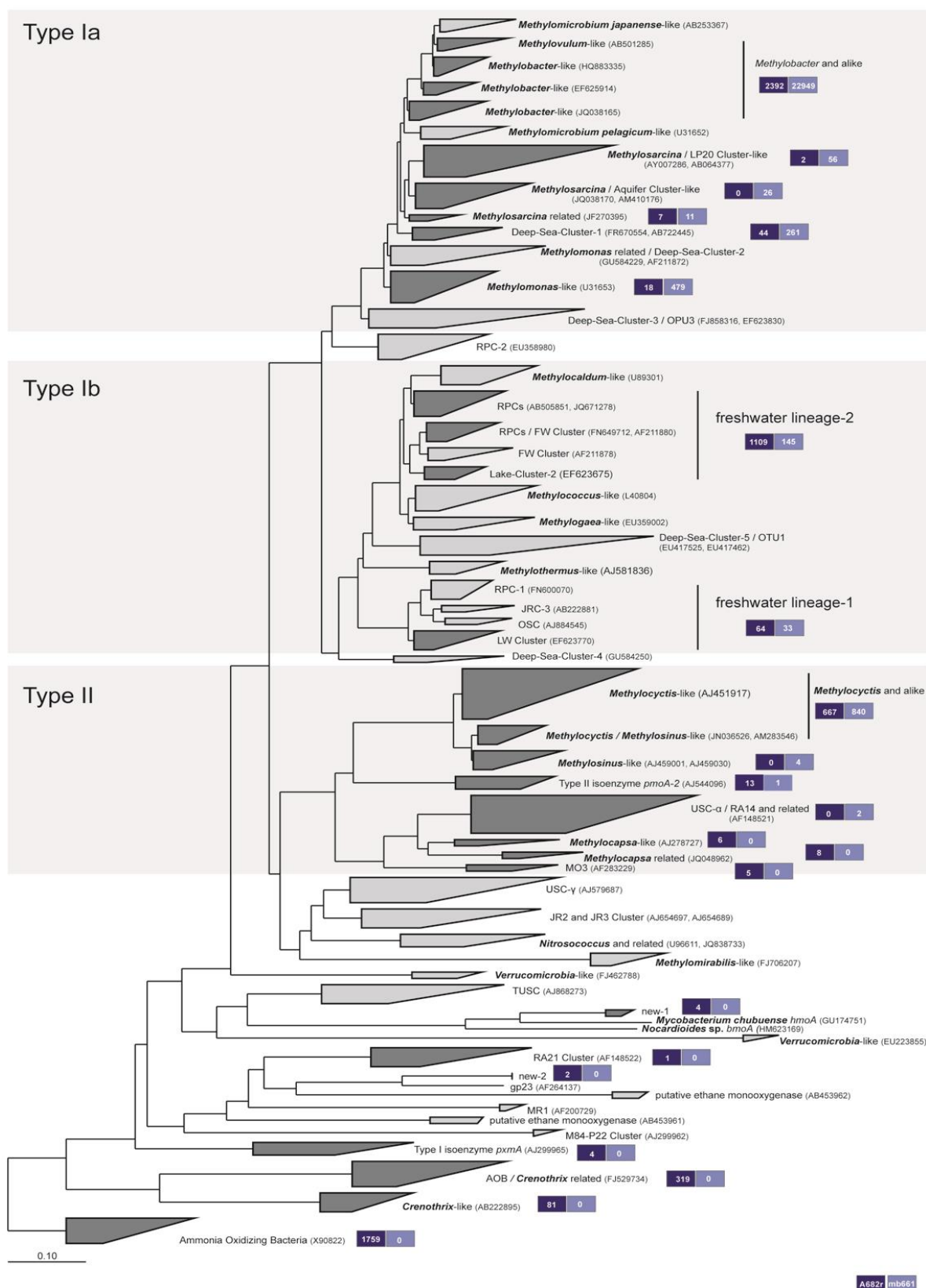
Поскольку пулы последовательностей *rpoA*, полученные из сипов №1 и №2, обладали сходным разнообразием, фрагменты, полученные с использованием либо A189f /A682r, либо A189f/mb661r, были объединены для последующего анализа. В результате этого анализа 1850 и 771 операционных таксономических единиц (ОТЕ) 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 *rpoA* представителей рода *Methylobacter*, выделенными из холодных экосистем - *M. psychrophilus* и *M. tundripaludum*. Другие многочисленные группы фрагментов *rpoA* из сипов обнаруживали равный уровень сходства (82-85%) с последовательностями *rpoA* 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 *pmoA* гена *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 количество полученных в настоящем исследовании последовательностей *pmoA* показаны на Рис. 13. 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.

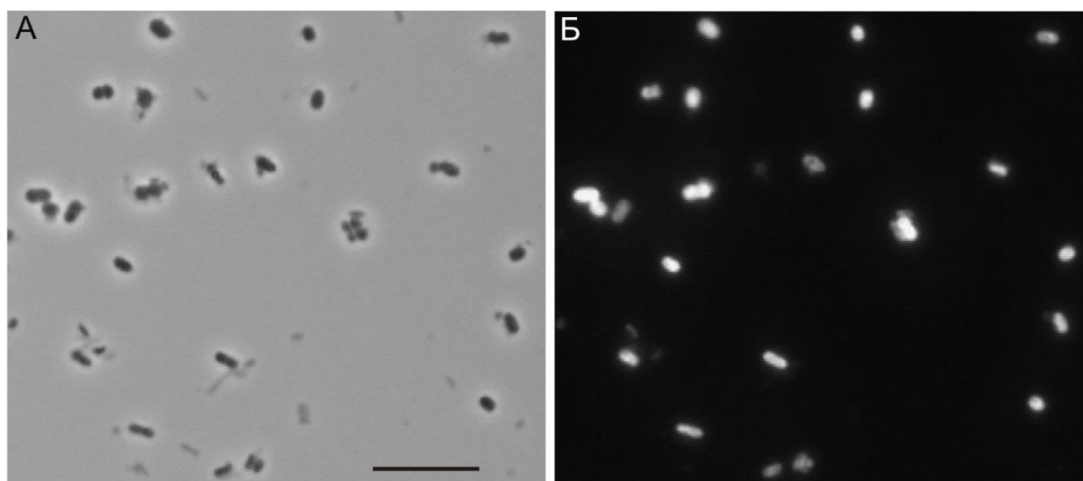


**Рис. 13.** Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа последовательностей гена *pmoA*. Кластеры, включающие полученные из сипов последовательности гена *pmoA*, обозначены темно-серым цветом. Справа, в закрашенных квадратах для каждого кластера показано число последовательностей, полученных с использованием праймеров A682r (темно-синий) и mb661 (светло-синий). Маркер, 0.1 замена на одну аминокислотную позицию.

## ГЛАВА 8. ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТАНОТРОФНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *GAMMAPROTEOBACTERIA* ИЗ ИЛА МЕТАНОВЫХ СИПОВ.

### 8.1. Получение накопительных культур метаноокисляющих 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 с дальнейшей инкубацией при 4 и 20°C. Состав полученных накопительных культур был проанализирован с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. Основным компонентом микробных сообществ, полученных в результате инкубации при 4°C, являлись метанотрофы I типа, клетки которых хорошо выявлялись гибридизацией с Су3-мечеными зондами M84 + M705 (Рис. 14). 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. 14.** Состав накопительных культур метанотрофных бактерий, полученных из ила сипов в условиях инкубации при 4°C. А – фазовый контраст; Б - флуоресцентная микрофотография гибридизации с Cy3-мечеными зондами M84 + M705, специфичными для метанотрофов I типа. Маркер, 10 μm.

## 8.2 Изоляты метанотрофных бактерий и их ростовые характеристики.

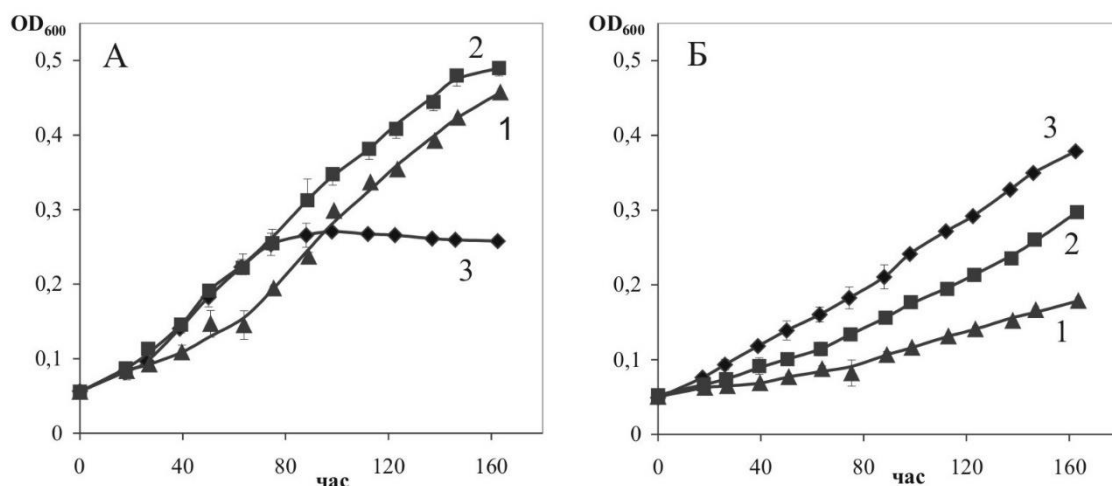
В результате работы по выделению чистых культур метанотрофных бактерий из исследуемых сипов было получено три изолята – штаммы CMS7, SB12 и Sph1.

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 × 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 рНК 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. 13).

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 рРНК этих двух метанотрофов были также высоко сходны (99%).

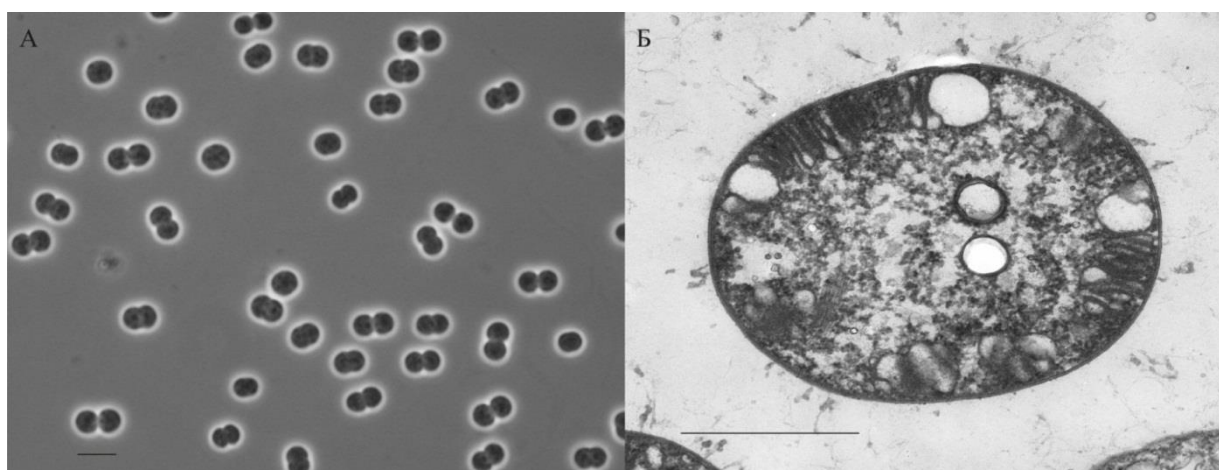
Полученные изоляты открывали возможность сравнения ростовых характеристик метанотрофов двух различных филогенетических групп, выделенных из одного местообитания, в зависимости от температуры. Для этого была прослежена динамика роста *Methylobacter* sp. CMS7 и *Methylocystis* sp. SB12 на жидкой минеральной среде с метаном при трех различных температурах инкубации: 4, 10 и 20°C (Рис. 15). 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*.

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 грамтрицательные кокки, одиночные или двойные, покрытые хорошо развитой слизистой капсулой (Рис. 16А). Размер клеток достигал 4.0 - 6.0 мкм в диаметре.



**Рис. 15.** 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).

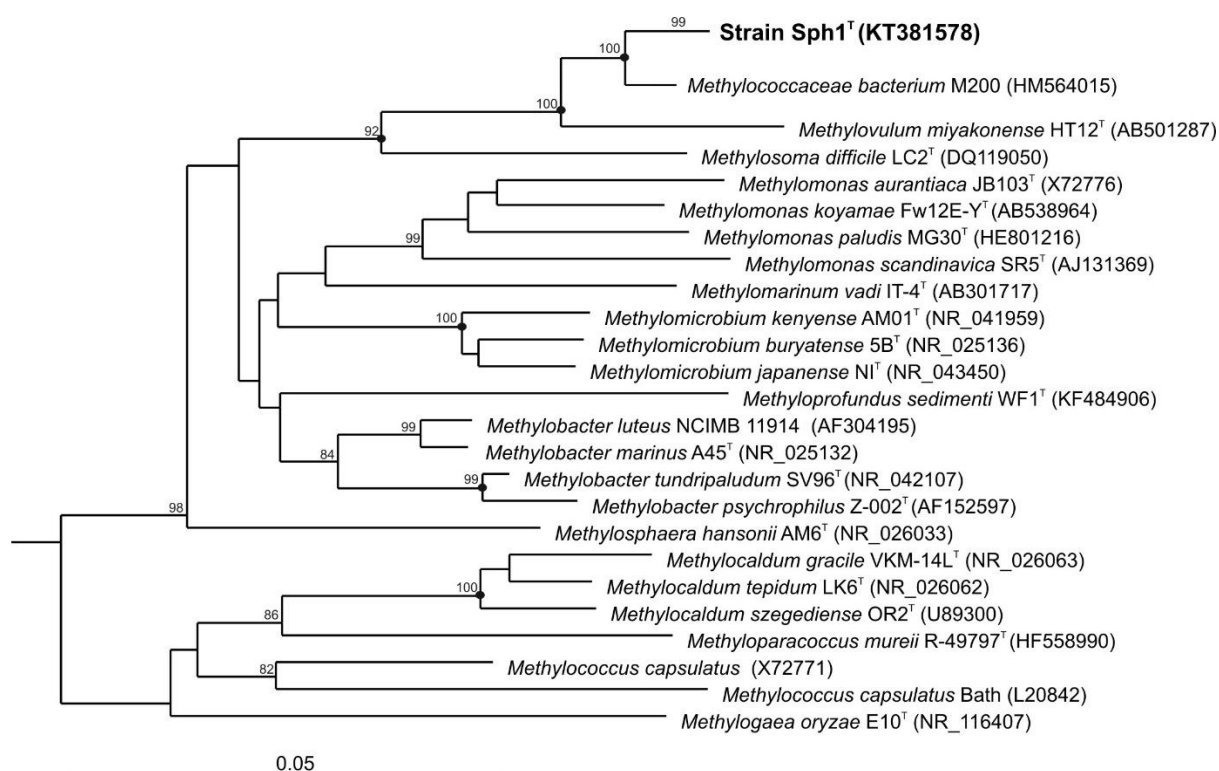
Клетки размножались бинарным делением и содержали хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) I типа (Рис 16Б).



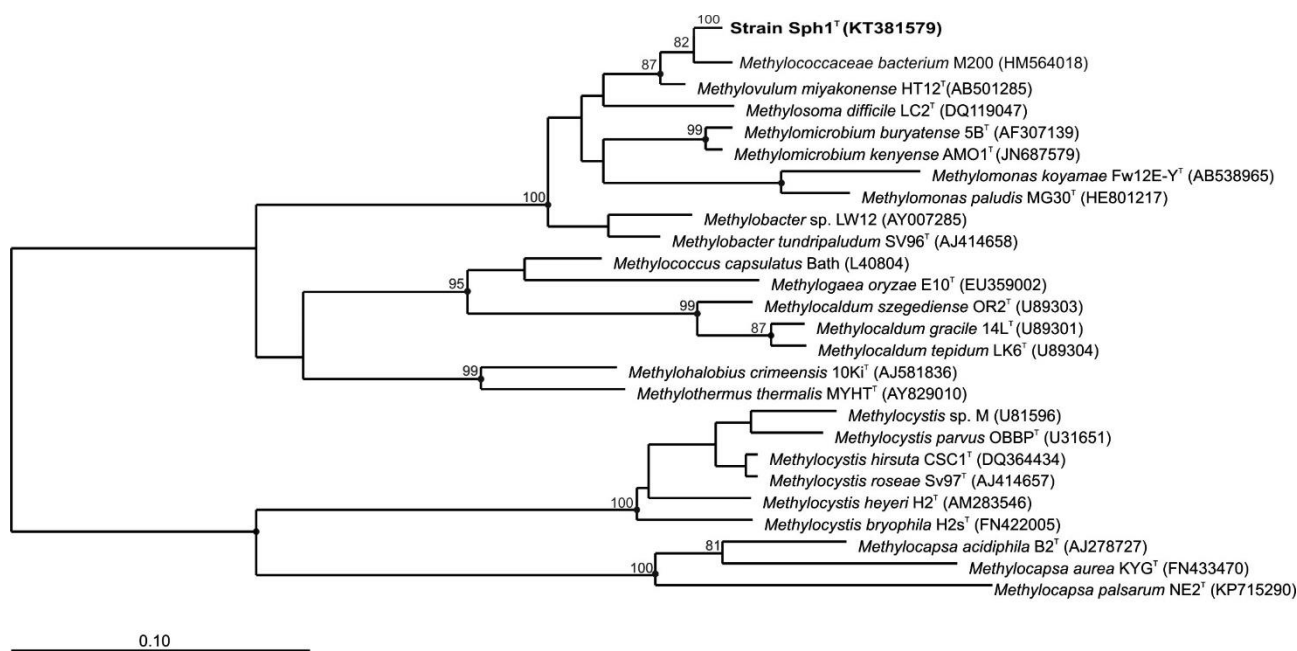
**Рис. 16.** Морфология и ультратонкое строение клеток штамма *Methylovulum psychrotolerans* Sph1. (А) Фазово-контрастная фотография клеток в экспоненциальной фазе роста. Маркер – 5 мкм; (Б) Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, демонстрирующая расположение внутрицитоплазматических 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. 17).

Фрагмент гена *pmoA* штамма Sph1 обнаруживал 90% идентичности нуклеотидных последовательностей с аналогичным фрагментом гена *pmoA* *Methylovulum miyakonense* (Рис. 18), а также представлял одну из наиболее многочисленных групп фрагментов *pmoA*, выявленных в иле сипов с помощью высокопроизводительного пиросеквенирования.



**Рис. 17.** Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение штамма Sph1 относительно других метанотрофных представителей класса *Gammaproteobacteria*. Алгоритм построения - «neighbor-joining». В качестве внешней группы использованы нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК метанотрофов II типа. Маркер, 0.1 замена на нуклеотидную позицию.



**Рис. 18.** Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов гена *pmoA*, показывающая филогенетическое положение штамма Sph1 относительно других метанотрофных представителей класса *Gamma*proteobacteria. Алгоритм построения - «neighbor-joining». Маркер, 0.1 замена на аминокислотную позицию.

### 8.3. Описание нового вида психротолерантных метанотрофов, *Methylovulum psychrotolerans*.

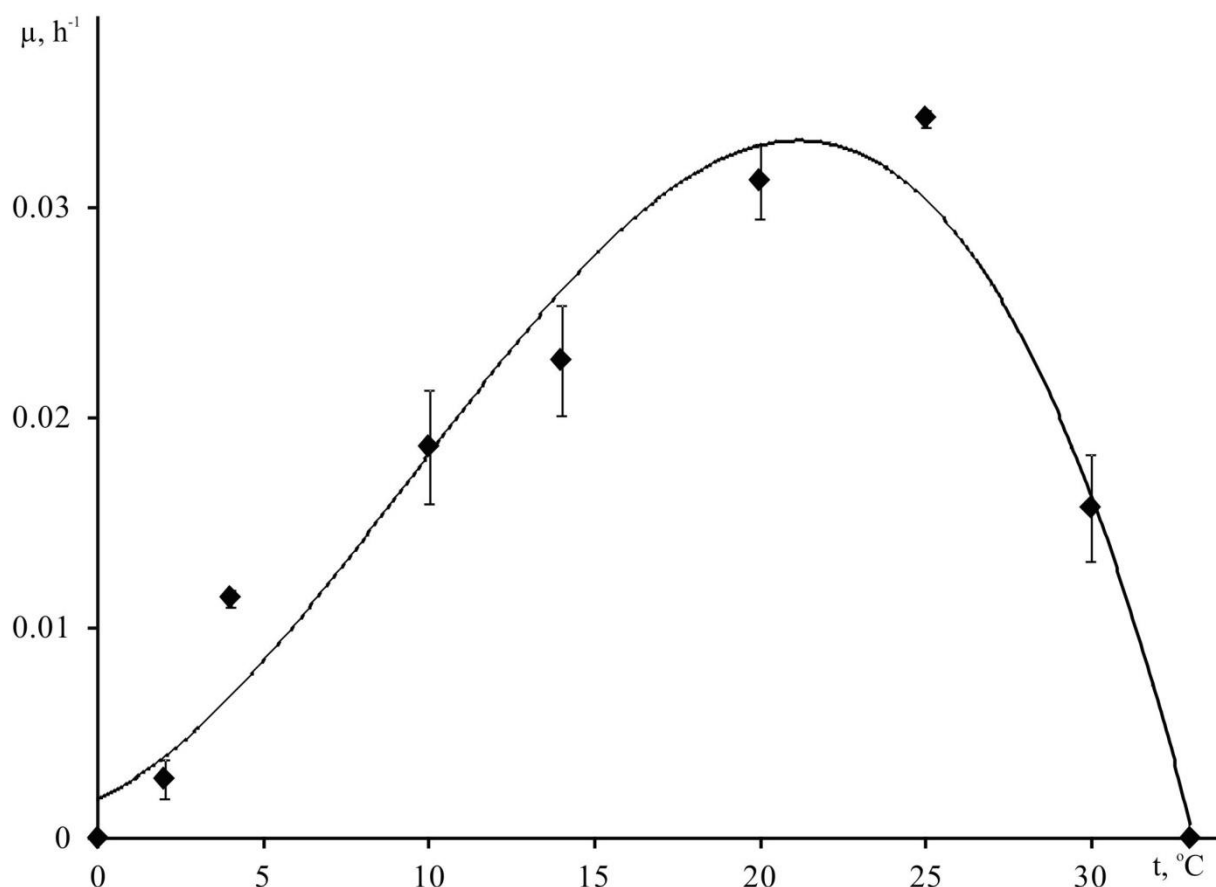
Так как результаты анализа генов 16S рРНК и *pmoA* свидетельствовали о принадлежности штамма Sph1 к новому таксону метанотрофных бактерий, и так как этот микроорганизм представлял одну из наиболее многочисленных групп метанотрофов, выявленных в сипах с помощью молекулярного анализа, штамм Sph1 был выбран 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<sub>4</sub> составляла 0.04-0.06 ч<sup>-1</sup>. Помимо метана, этот изолят был способен к росту на метаноле. Роста на 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. 19). 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. Попытки амплифицировать ген *mmoX*, кодирующий субъединицу рММО, с применением известных на данный момент специфичных праймеров (Auman *et al.*, 2000; McDonald *et al.*, 2001; Miguez *et al.*, 1997; Hutchens *et al.*, 2004) не увенчались успехом. Для штамма Sph1<sup>T</sup> в присутствии положительного контроля *Methylovulum miyakonense* HT12<sup>T</sup> был проведен колориметрический тест, основанный на реакции нафталина и рММО (Graham *et al.*, 1992).



**Рис. 19.** Зависимость удельной скорости роста штамма Sph1 от температуры культивирования.

Присутствие рММО не было подтверждено. Содержание G+C в ДНК составило 51.4 мол. %. В составе жирных кислот преобладали C<sub>16:1ω5</sub>, C<sub>16:1ω7</sub>, C<sub>16:1ω8</sub>, C<sub>16:0</sub> и C<sub>14:0</sub> (Таблица 8). Такая картина характерна для метанотрофов I типа (Bowman *et al.*, 1991; Bowman *et al.*, 1993). Примечательно, что состав жирных кислот в клетках штамма *M. miyakonense* DSM 23269<sup>T</sup> был схож с таковым у штамма Sph1<sup>T</sup>. Эти результаты противоречили таковым, приведенным в оригинальном описании данного метанотрофа (Iguchi *et al.*, 2011). В последнем утверждалось отсутствие у *M. miyakonense* жирных кислот C<sub>16:1</sub>, а C<sub>16:0</sub> и C<sub>14:0</sub> отмечались как две преобладающие жирные кислоты. С целью проверки этих данных была определена

частичная последовательность ( $\approx 700$  п.н.) гена 16S рРНК штамма, полученного из коллекции DSMZ и подтверждена ее идентичность с аналогичной последовательностью *M. miyakonense* HT12<sup>T</sup>, депонированного в ГенБанке под номером доступа AB501287. Впоследствии анализ на состав жирных кислот был повторен с подтверждением данных, представленных в Таблице 8.

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 рН и смещенным в сторону низких температур оптимумом роста (Таблица 9). На основании этих отличий было предложено отнести штамм Sph1<sup>T</sup> к новому виду рода *Methylovulum* – ‘*Methylovulum psychrotolerans*’ sp. nov.

Таблица 8. Состав жирных кислот (в процентах от общего количества) штамма Sph1<sup>T</sup> в сравнении с *M. miyakonense* DSM 23269<sup>T</sup>. Основные жирные кислоты выделены жирным шрифтом.

Жирные кислоты	Штамм Sph1 <sup>T</sup>	<i>Methylovulum miyakonense</i> DSM 23269 <sup>T</sup>
C <sub>14:1</sub> ω7c	0.7	-
C <sub>14:0</sub>	<b>9.3</b>	<b>7.0</b>
C <sub>16:1</sub> ω8c	<b>25.3</b>	<b>19.2</b>
C <sub>16:1</sub> ω7c	<b>28.7</b>	<b>36.1</b>
C <sub>16:1</sub> ω6c	6.2	6.1
C <sub>16:1</sub> ω5c	<b>17.9</b>	<b>15.3</b>
C <sub>16:0</sub>	<b>6.3</b>	<b>12.1</b>
C <sub>18:1</sub> ω9	-	-
βОН-C <sub>16:0</sub>	4.6	3.5

**Таблица 9. Основные дифференцирующие характеристики штамма Sph1 и *Methylovulum miyakonense*.**

Характеристика	Штамм Sph1	<i>Methylovulum miyakonense</i> <sup>a</sup>
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 (°С)	2 - 32	5-34
Оптimum температур (°С)	20 - 25	24-32
Диапазон pH	5.2 - 8.1	6-7.5
Оптimum	(6.2 - 6.8)	(6.5)
Содержание Г+Ц в ДНК (моль %)	51.4	49.3

<sup>a</sup>-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 оптимумом – 20 - 25°C, и в диапазоне рН 5.2 - 8.1, с оптимумом при 6.2 - 6.8. Источники азота – нитрат, аммоний и казаминовые кислоты. Не способны к фиксации N<sub>2</sub>. NaCl подавляет рост в концентрациях выше 0.1%. Основные жирные кислоты - C<sub>16:1</sub>ω5, C<sub>16:1</sub>ω7, C<sub>16:1</sub>ω8, C<sub>16:0</sub> и C<sub>14:0</sub>.

Типовой штамм Sph1<sup>T</sup> изолирован из образца ила метанового сипа №1, река Мухринская, Ханты-Мансийский А.О., Западная Сибирь (60.888390° С.Ш., 68.701555° В.Д.). Штамм депонирован в международных коллекциях микроорганизмов LMG и ВКМ (=LMG29227T=VKMB-3018T).

#### **8.4. Уточненное описание рода *Methylovulum*.**

Метанотрофные бактерии рода *Methylovulum* грамотрицательные аэробы, неподвижны, представлены кокками или короткими палочками и обладают развитой сетью внутрицитоплазматических мембран, характерной для метанотрофов I типа. Не образуют цист. Рост наблюдается только на метане и метаноле. Окисление метана осуществляется мембранной метанмонооксигеназой. Наличие растворимой формы этого фермента зависит от принадлежности к виду в пределах рода *Methylovulum*. Одноуглеродные соединения ассимилируются через рибулозомонофосфатный путь. Метанотрофы *Methylovulum* рода обладают мезофильными и психротолерантными свойствами. Рост некоторых представителей рода может быть стимулирован факторами роста. Главные жирные кислоты - C<sub>16:1</sub>ω5c, nC<sub>16:1</sub>ω6c, C<sub>16:1</sub>ω8c, nC<sub>16:1</sub> ω7c, C<sub>16:0</sub> и C<sub>14:0</sub>. Содержание G+C: 50.7–51.9 мол%. С точки зрения филогении является членом семейства *Methylococcaceae* и класса *Gamma proteobacteria*. Типовой вид - *Methylovulum miyakonense*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метановые сипы, исследованные в данной работе, по величине потока выделяемого  $\text{CH}_4$  (16 г  $\text{CH}_4$  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 Мухринская. 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  $\text{CH}_4$  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  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{SO}_4^{2-}$  в восходящих потоках воды сипов были малы или ниже предела детекции. Такой состав воды исключает возможность осуществления  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  или  $\text{SO}_4^{2-}$ -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  $\text{CH}_4$ . Доказательством этому служили достаточно высокие скорости окисления метана, измеренные в образцах ила при температуре *in situ* (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 гибридизации *in situ* 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; Но *et al.*, 2013). Исследованные в настоящей работе метановые сипы как раз являют собой пример холодной экосистемы с высокой доступностью CH<sub>4</sub>.

Состав сообщества аэробных метанотрофов, снижающих потоки метана из сибирских сипов, оказался близок таковому, обнаруженному 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 гибридизации *in situ* выявило  $2.8-4.3 \times 10^7$  клеток метанотрофов  $\text{г}^{-1}$  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 *Gammaproteobacteria*, 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°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°C и являющихся типичным компонентом метанотрофных сообществ холодных пресноводных экосистем.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГФС – гексулозо-6-фосфат синтаза;

МДГ – метанолдегидрогеназа;

ММО – метанмонооксигеназа;

рММО – растворимая метанмонооксигеназа;

мММО – мембранная метанмонооксигеназа;

ПХХ – пирролохинолинхинон;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РМФ – рибулозомонофосфатный путь;

СГМТ – серингидроксиметилтрансфераза;

ТГФ – тетрагидрофолат;

ФДГ – формиатдегидрогеназа;

Н<sub>4</sub>МП – тетрагидрометанооптерин;

Н<sub>4</sub>F – тетрагидрофолатный путь.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берестовская Ю.Ю., Васильева Л.В., Честных О.В., Заварзин Г.А. Метанотрофы психрофильного микробного сообщества заполярной тундры России // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 538-544.
2. Гальченко В.Ф. Сульфатредукция, метанобразование и метаноокисление в различных водоемах Оазиса Бангер Хиллс, Антарктида // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 683-698.
3. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии // М.: ГЕОС. 2001. 500с.
4. Дедыш С.Н. Ацидофильные метанотрофные бактерии // Труды Института Микробиологии РАН. 2004. Т. 12. С. 109-125.
5. Дедыш С.Н. Исследование экологии метанотрофных бактерий с использованием молекулярных подходов // Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского / Ред. Гальченко В.Ф. М.: Наука. 2006. Т. 13. С. 192-224. Микробиологии РАН. 2004. Т. 12. С. 109-125.
6. Омельченко М.В., Васильева Л.В., Заварзин Г.А., Савельева Н.Д., Лысенко А.М., Митюшина Л.Л. Новый психрофильный метанотроф рода *Methylobacter* // Микробиология. 1996. Т. 65. №3. С.384-389.
7. Русанов И.И., Саввичев А.С., Юсупов С.К., Пименов Н.В., Иванов М.В. Образование экзометаболитов в процессе микробного окисления метана в морских экосистемах // Микробиология. 1998. Т. 67(5). С. 710-717.
8. Сабреков А.Ф., Глаголев М.В., Клепцова И.Е., Мачида Т., Максюттов Ш.Ш. Эмиссия метана из болотных комплексов тайги Западной Сибири // Почвоведение. 2014. № 1. С. 58-70

9. Таран Г.С., Седельникова Н.В., Писаренко О.Ю., Голомолзин В.В. Флора и растительность Елизаровского государственного заказника (нижняя Обь) // Новосибирск: Наука. 2004. С. 212.
10. Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. 2008. С. 206.
11. Турова Т.П., Омельченко М.В., Фегединг К.В., Васильева Л.В. Филогенетическое положение *Methylobacter psychrophilus* sp.nov // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 568-570.
12. Хмеленина В.Н., Макутина В.А., Калюжная М.Г., Ривкина Е.М., Гиличинский Д.А., Троценко Ю.А. Обнаружение жизнеспособных метанотрофных бактерий в многолетнемерзлых осадочных породах Северовосточной Сибири // Докл. РАН. 2002. Т. 384. С. 283–285.
13. Четина Е.В. и Троценко Ю.А. Внутриклеточная локализация ферментов окисления C1-соединений у облигатных метанотрофов // Микробиология. 1981. Т. 50. С.446-452.
14. Alain K., Holler T., Musat F., Elvert M., Treude T., Krüger M. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 574 –590.
15. Al'bov S.V. The Kerch-Taman hydrogeochemical and mud volcano region // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1971. V. 197. P. 175 – 177.
16. Altschul S.F., Madden T.L., Schaeffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. V. 25. P. 3389–3402.

17. Anthony C. The biochemistry of Methylotrophs // Academic Press, New York. 1982.
18. Anthony C. Assimilation of carbon by methylotrophs // Biotechnology. 1991. V. 18. P. 79-109.
19. Anthony C., Ghosh M., Blake C.C.F. The structure and function of methanol dehydrogenases and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinine // Biochem. J. 1994. V. 304. P. 5-674.
20. Anthony C., Williams P. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase // Biochem. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. P. 18-23.
21. Anthony C. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 428(1). P. 2-9.
22. Arfman N., Bystrykh L., Govorukhina N. I., Dijkhuizen L. 3-Hexulose-6-phosphate synthase from the thermotolerant methylotroph *Bacillus* sp. C2 // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 391–397.
23. Auman A.J., Lidstrom M.E. Analysis of sMMO-containing type I methanotrophs in Lake Washington sediment // Environ. Microbiol. 2002. V. 4. P. 517-524.
24. Auman A.J., Stolyar S., Costello A.M., Lidstrom M.E. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 5259-5266.
25. Baani M., Liesack W. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2 // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2008. V. 22. P. 3-8.

26. Baker P.W., Futamata H., Harayama S., Watanabe K. Molecular diversity of pMMO and sMMO in a TCE-contaminated aquifer during bioremediation // FEMS Microbiol. Ecol. 2001. V. 38. P. 161-167.
27. Bastien C., Machlin S., Zhang Y., Donaldson K., Hanson R.S. Organization of Genes Required for the Oxidation of Methanol to Formaldehyde in Three Type II Methylophiles // Appl Environ Microbiol. 1989. V. 55(12). P. 24-30.
28. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // ISME J. 2011. V. 5(5). P. 8-17.
29. Batjes N.H., Bridges E.M. Potential emissions of radiatively active gases from soil to atmosphere with special reference to methane: development of a global database (WISE) // Journal of Geophysical Research: Atmospheres. 1994. V. 99 (D8), P. 16479-16489.
30. Behnke A., Engel M., Christen R., Nebel M., Klein R.R., Stoeck T. Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 340-349.
31. Bodelier P. L., Gillisen M. J., Hordijk K., Damsté J. S., Rijpstra W. I., Geenevasen J. A., Dunfield P. A reanalysis of phospholipid fatty acids as ecological biomarkers for methanotrophic bacteria // ISME J. 2009. V. 3. P. 606-617.
32. Bodrossy L., Holmes E.M., Holmes A.J., Kovács K.L., Murrell J.C. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. // Arch. Microbiol. 1997. V. 168. P. 493-503.



33. Bodrossy L., Kovacs K.L., McDonald I.R., Murrell J.C. A novel thermophilic methane-oxidising *g*-Proteobacterium // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 170. P. 335-341.
34. Bodrossy L., Sessitsch A. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. P. 245-254.
35. Bodrossy L., Stralis-Pavese N., Konrad-Köszler M., Weilharter A., Reichenauer T. G., Schöfer D., Sessitsch A. mRNA-based parallel detection of active methanotroph populations by use of a diagnostic microarray // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 1672-1676.
36. Borjesson G., Sundh I., Tunlid A., Frostegard A., Svenson B. H. Microbial oxidation of CH<sub>4</sub> at high partial pressures in an organic landfill cover soil under different moisture regimes // FEMS Microbiol. Ecol. 1998. V. 26. P. 207-217.
37. Bourne D.G., Holmes A.J., Iversen N., Murrell J.C. Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 2000. V. 1. P. 29-38.
38. Bourne D.G., McDonald I.R., Murrell J.C. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 3802-3809.
39. Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // Int. J. Syst. Bacteriol. 1993. V. 43. P. 735-753.
40. Bowman J.P., Sly L.I., Stackebrandt E. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 182-185.

41. Bowman A.W. and Azzalini A. Applied Smoothing Techniques for Data Analysis // Oxford, Oxford University Press. 1997.
42. Bowman J.P., McCammon S.A., Skerratt J.H. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes // Microbiology. 1997. V. 143. P. 1451-1459.
43. Brusseau G.A., Bulygina E.S., Hanson R.S. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 626-636.
44. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 5-6.
45. Cebren A., Bodrossy L., Stralis-pavese M., Singer A.C., Thompson I.P., Prosser J.I., Murrell J.C. Nutrient amendments in soil DNA stable isotope probing experiments reduce the observed methanotroph diversity // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 798-807.
46. Chang Y.H., Cheng T.W., Lai W.J., Tsai W.Y., Sun C.H., Lin L.H., Wang P.L. Microbial methane cycling in a terrestrial mud volcano in eastern Taiwan // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 895–908.
47. Chao A. Nonparametric estimate of the number of classes in a population // Scand. J. Stat. V. 11. P. 265–270.

48. Chen Y., Dumont M.G., Cebon A., Murrell J.C. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 2855-2869.
49. Chen Y., Dumont M.G., McNamara N.P., Chamberlain P.M., Bodrossy L., Stralis-Pavese N., Murrell J.C. Diversity of the active methanotrophic community in acidic peatlands as assessed by mRNA and SIP-PLFA analyses // *Environ. Microbiol.* 2008. V. 10. P. 446-459.
50. Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1 // *Microbiology.* 1997. V. 143. P. 1729–1736.
51. Chistoserdova L., Vorholt J.A., Thauer R.K., Lidstrom M.E. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea // *Science.* 1998. V. 281(5373). P. 99-102.
52. Chistoserdova L., Jenkins C., Kalyuzhnaya M.G., Marx C.J., Lapidus A., Vorholt J.A., Staley J.T., Lidstrom M.E. The enigmatic planctomycetes may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. P. 1234–1241.
53. Chistoserdova L., Laukel M., Portais J.C., Vorholt J.A., Lidstrom M.E. Multiple formate dehydrogenase enzymes in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1 are dispensable for growth on methanol // *J Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 22–28.
54. Chistoserdova L., Crowther G.J., Vorholt J.A., Skovran E., Portais J.C., Lidstrom M.E. Identification of a fourth formate dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and confirmation of the essential role of formate oxidation in methylotrophy // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 9076–9081.

55. Chistoserdova L. Modularity of methylo-trophy, revisited // *Environ Microbiol.* 2011. V. 13(10). P. 2603-22.
56. Choi D.W., Kunz R.C., Boyd E.S., Semrau J.D., Antholine W.E., Han J.I., Zahn J.A., Boyd J.M., de la Mora A.M., DiSpirito A.A. The membrane-associated methane monooxygenase pMMO and pMMO-NADH:quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* Bath // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 5755-5764.
57. Choi D.W., Antholine W.A., Do Y.S., Semrau J.D., Kisting C.J., Kunz R.C., Campbell D., Rao V., Hartsel S.C., DiSpirito A.A. Effect of methanobactin on methane oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase in *Methylococcus capsulatus* Bath // *Microbiology.* 2005. V. 151. P. 3417–3426.
58. Choi D.W., Zea C.J., Do Y.S., Semrau J.D., Antholine W.E., Hargrove M.S., Pohl N.L., Boyd E.S., Geesey G.G., Hartsel S.C., Shafe P.H., McEllistrem M.T., Kisting C.J., Campbell D., Rao V., De la Mora A.M., DiSpirito A.A. Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu(I)-, and Cu(II)-binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Biochemistry.* 2006. V. 45. P. 1442–1453.
59. Ciais P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., Chhabra A., DeFries R., Galloway J., Heimann M., Jones C., Le Quéré C., Myneni R.B., Piao S., Thornton P. Carbon and other biogeochemical cycles // *Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 2013. P 465–570.
60. Colby J., Stirling D.I., Dalton H. The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) // *Biochem J.* 1977. V. 165. P. 395–402.

61. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // Environ. Microbiol. Rep. 2009. V. 1. №5. P. 285-292.
62. Costello A.M., Lidstrom M.E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 5066-5074.
63. Dedysh S.N., Panikov N.S., Tiedje J.M. Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 922-929.
64. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Bares A.M., Panikov N.S., Tiedje J.M. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 955-969.
65. Dedysh S.N., Derakshani M., Liesack W. Detection and enumeration of methanotrophs in acidic sphagnum peat by 16S rRNA fluorescence *in situ* hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4850-4857.
66. Dedysh S.N., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Liesack W., Tiedje J.M. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from sphagnum bog // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 251-261.
67. Dedysh S.N., Dunfield P.F., Derakshani M., Stubner S., Heyer J., Liesack W. Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly

developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes // FEMS Microbiol. Ecol. 2003. V. 43. P. 299-308.

68. Dedysh S.N., Berestovskaya Y.Y., Vasylieva L.V., Belova S.E., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Liesack W., Zavarzin G.A. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic peatlands of tundra // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 151-156.

69. Dedysh S.N., Belova S.E., Bodelier P.L., Smirnova K.V., Khmelenina V.N., Chidthaisong A., Trotsenko Y.A., Liesack W., Dunfield P.F. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing 'signature' fatty acids of type I methanotrophs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 57. P. 472–479.

70. Dedysh S.N. Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: molecular and cultivation-based studies // Microbiology. 2009. V. 78. P. 655-669.

71. Dedysh S.N., Didriksen A., Danilova O.V., Belova S.E., Liebner S., Svenning M.M. *Methylocapsa palsarum* sp. nov., a methanotrophic bacterium from a Sub-Arctic discontinuous permafrost ecosystem // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 65. P. 3618–3624.

72. Degelmann D.M., Borken W., Drake H.L., Kolb S. Different atmospheric methane-oxidizing communities in European beech and Norway spruce soils // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 3228–3235.

73. Deng Y., Cui X., Lüke C., Dumont M.G. Aerobic methanotroph diversity in Rigangqiao peatlands on the Qinghai-Tibetan Plateau // Environ. Microbiol. 2013. V. 5. P. 566–574.

74. Deutzmann J.S., Schink B. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake // Applied and Environmental Microbiology. 2011. V. 77(13). P. 4429–4436.

75. Deutzmann J.S., Wörner S., Schink B. Activity and diversity of methanotrophic bacteria at methane seeps in eastern Lake Constance sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 2573–2581.
76. Deutzmann J.S., Hoppert M., Schink B. Characterization and phylogeny of a novel methanotroph, *Methyloglobulus morosus* gen. nov., spec. nov // *Syst. Appl. Microbiol.* 2014. V. 37. P. 5-9.
77. Dia A.N., Castrec M., Boulegue J., Comeau P. (1999). Trinidad mud volcanoes: where do the expelled fluids come from? // *Geochim. Cosm. Acta.* V. 63, 7/8. P. 1023–1038
78. Dimitrov L. Mud volcanoes: the most important pathway for degassing deeply buried sediments // *Earth Sci. Rev.* V. 59. P. 49 –76.
79. DiSpirito A.A., Zahn J.A., Graham D.W., Kim H.J., Larive C.K., Derrick T.S., Cox C.D., Taylor A. Copper-binding compounds from *Methylosinus trichosporium* OB3b // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 3606-3613.
80. Dlugokencky E.J., Nisbet E.G., Fisher R., Lowry D. Global atmospheric methane: budget, changes and dangers // *Philos. Trans. R. Soc. A.* 2011. V. 369. P. 2058 – 2072.
81. Dumont M.G., Murrell J.C. Stable isotope probing: linking microbial identity to function // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3. P. 499-504.
82. Dumont M.G., Pommerenke B., Casper P., Conrad R. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 1153–1167.
83. Dumont M.G., Lüke C., Deng Y. C., Frenzel P. Classification of *pmoA* amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5:e34.

84. Dunfield P.F., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A. Dedysh S.N. *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1231-1239.
85. Dunfield P.F., Tchawa Yimga M., Dedysh S.N., Berger U., Liesack W., Heyer J. Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel pmoA-like gene // FEMS. Microbiol. Ecol. 2002. V. 41. P. 17-26.
86. Dunfield P.F., Yuryev A., Senin P., Smirnova A.V., Stott M.B., Hou S., Ly B., Saw J.H., Zhou Z., Ren Y., Wang J., Mountain B.W., Crowe M.A., Weatherby T.M., Bodelier P.L., Liesack W., Feng L., Wang L., Alam M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia* // Nature. 2007. V. 6. P. 879-882.
87. Dunfield P.F., Belova S.E., Vorob'ev A.V., Cornish S.L., and Dedysh S.N. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2659–2664.
88. Duchscherer W. Nongasometric geochemical prospecting for hydrocarbons with case histories // Oil Gas J. 1981. V. 19. P. 312–327.
89. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
90. Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nat. Methods V. 10. P. 996–998.
91. Egorov A.V., Ivanov M.K. Hydrocarbon gases in sediments and mud breccia from the central and eastern part of the Mediterranean Ridge // Geo-Mar Lett. V. 18. P. 127–138.



92. Ekendahl S., Arlinger J., Ståhl F., Pedersen K. Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy // *Microbiology*. 1994. V. 140. P. 75-83.
93. Eller G., Stubner S., Frenzel P. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridization // *FEMS Microbiology Letters*. 2001. V. 198. P. 91–97.
94. Erikstad H. A., Jensen S., Keen T. J., Birkeland N. K. Differential expression of particulate methane monooxygenase genes in the verrucomicrobial methanotroph “*Methylophilum kamchatkense*” Kam1 // *Extremophiles*. 2012. V. 16(3). P. 405–409.
95. Etiope G., Klusman R.W. Geological emissions of methane to the atmosphere // *Chemosphere*. 2002. V. 49. P. 777–789.
96. Etiope G. GEM— geological emissions of methane, the missing source in the atmospheric methane budget // 2004. *Atmos. Environ.* V. 38. P. 3099 – 3100.
97. Etiope G., Milkov A.V. A new estimate of global methane flux from onshore and shallow submarine mud volcanoes to the atmosphere // *Environmental Geology*. V. 46 (8). P. 997-1002
98. Etiope G., Martinelli G., Caracausi A., Italiano F. Methane seeps and mud volcanoes in Italy: gas origin, fractionation and emission to the atmosphere // *Geophysical Research Letters*. 2007. V. 34 (14).
99. Etiope G., Lassey K.R., Klusman R.W., Boschi E. Reappraisal of the fossil methane budget and related emission from geologic // *Geophysical Research Letters*. 2008. V. 35 (9).

100. G Etiope Natural emissions of methane from geological seepage in Europe // Atmospheric Environment. 2009. V. 43 (7). P. 1430-1443
101. Etiope G., Feyzullayev A., Baciú C.L. 2009. Terrestrial methane seeps and mud volcanoes: a global perspective of gas origin // Mar. Petrol. Geol. 2009. V. 26. P. 333–344.
102. Etiope G. Methane uncovered // Nat. Geosci. 2012. V. 5. P. 373–374.
103. Fjellbirkeland A., Torsvik V., Ovreas L. Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxnF*, and 16S rDNA sequences // Antonie van Leeuwenhoek. 2001. V. 79. P. 209-217.
104. Fox B.G., Froland J.E., Dege J., Lipscomb J.D. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Purification and properties of a three-component system with high specific activity from a type II methanotroph // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 10023-10033.
105. Friedrich M.W. Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. V. 17. P. 59-66.
106. Fuse H., Ohta M., Takimura O., Murakami K., Inoue H., Yamaoka Y., Oclarit J.M., Omori T. Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine *Methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V. 62. P. 1925-1931.
107. Geymonat E., Ferrando L., Tarlera S.E. *Methylogaea oryzae* gen. nov., sp. nov., a mesophilic methanotroph isolated from a rice paddy field // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2568-2572.
108. Glagolev M, Kleptsova I, Filippov I, Maksyutov S, Machida T. Regional methane emission from West Siberia mire landscapes // Environ. Res. Lett. 2011. V. 6. №4.

109. Giovannoni S.J., Hayakawa D.H., Tripp H.J., Stingl U., Givan S.A., Cho J.C., Oh H.M., Kitner J.B., Vergin K.L., Rappé M.S. The small genome of an abundant coastal ocean methylotroph // *Environ Microbiol.* 2008. V. 10. P. 1771–1782.
110. Green J., Dalton H. Protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 15795-15801.
111. Guckert J.B., Ringelberg D.B., White D.C., Hanson R.S., Bratina B.J. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the *Proteobacteria* // *J. Gen. Microbiol.* 1991. V. 137. P. 2631-2641.
112. Guliyev I.S., Feyzullayev A.A. All about mud volcanoes // Nafta Press. 1997. P. 52.
113. Hakemian A.S., Kondapalli K.C., Telser J., Hoffman B.M., Stemmler T.L., Rosenzweig A. C. The metal centers of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 6793-6801.
114. Hagemeyer C.H., Chistoserdova L., Lidstrom M.E., Thauer R.K., Vorholt J.A. Characterization of a second methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 67(12). P. 2-9.
115. Han J.I., Semrau J. D. Quantification of gene expression in methanotrophs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction // *Environ. Microbiol.* 2004. V. 6. P. 388-399.
116. Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // *Microbiol. Rev.* 1996. V.60. № 2. P. 439-471.
117. He R., Wooller M.J., Pohlman J.W., Catranis C., Quensen J., Tiedje J.M., Leigh M.B. Identification of functionally active aerobic methanotrophs in sediments from an arctic lake using stable isotope probing // *Environ. Microbiol.* V. 14. P. 1403–1419.

118. He Z., Gentry T. J., Schadt C. W., Wu L., Liebich J., Chong S. C., Huang Z., Wu W., Gu B., Jardine P., Criddle C., Zhou J. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological, and environmental processes // ISME J. 2007. V. 1. P. 67-77.
119. He Z., Cai C., Wang J., Xu X., Zheng P., Jetten M., Hu B. A novel denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony // Sci. Rep. 2016.V. 6.
120. Henckel T., Friedrich M., Conrad R. 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1980-1990.
121. Hendrickson E.L., Beck D.A.C., Wang T., Lidstrom M.E., Hackett M., Chistoserdova L. The expressed genome of *Methylobacillus flagellatus* defined through comprehensive proteomics and new insights into methylotrophy // J Bacteriol. V. 192. P. 4859–4867.
122. Henneberger R., Lüke C., Mosberger L., Schroth M.H. Structure and function of methanotrophic communities in a landfill-cover soil // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 81. P. 52–65.
123. Heyer J., Berger U., Hardt M., Dunfield P.F. *Methylohalobius crimeensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, methanotrophic bacterium isolated from hypersaline lakes of Crimea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 1817-1826.
124. Heyer J., Galchenko V.F., Dunfield P.F. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments // Microbiology. 2002. V. 148. P. 2831-2846.

125. Hirayama H., Suzuki Y., Abe M., Miyazaki M., Makita H., Inagaki F., Uematsu K., Takai K. *Methylothermus subterraneus* sp. nov., a moderately thermophilic methanotrophic bacterium from a terrestrial subsurface hot aquifer in Japan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 61. P. 2646–2653.
126. Hirayama H., Fuse H., Abe M., Miyazaki M., Nakamura T., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylomarinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 1073-1082.
127. Hirayama H., Abe M., Miyazaki M., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylomarinovum caldicuralii* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family *Methylothermaceae* fam. nov // Int J Syst Evol Microbiol. 2014. V. 64. P. 89-99 .
128. Hoefman S., van der Ha D., Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Y., Boon N., Vandamme P., Heylen K., De Vos P. *Methyloparacoccus murrellii* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from pond water // Int J Syst Evol Microbiol. 2014. V. 64. P. 0-7.
129. Hollister E.B., Engledow A.S., Hammett A.J.M., Provin T.L., Wilkinson H.H., Gentry T.J. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments // ISME J. V. 4(6). P. 829–838.
130. Holmes A.J., Costello A., Lidstrom M.E., Murrell J.C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonium monooxygenase may be evolutionarily related // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 132. P. 203-208.
131. Holmes A.J., Roslev P., McDonald I.R., Iversen N., Henriksen K., Murrell J.C. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 3312-3318.

132. Horz H.P., Rich V., Avrahami S., Bohannon B.J.M. Methane oxidizing bacteria in a California upland grassland soil: diversity and response to simulated global change // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 2642-2652.
133. Huse S. M., Welch D. M., Morrison H. G., Sogin M. L. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 1889–1898.
134. Hutchens E., Radajewski S., Dumont M.G., McDonald I.R., Murrell J.C. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable-isotope probing // *Environ. Microbiol.* 2004. V. 6. P. 111-120.
135. Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Y. *Methylovulum miyakonense* gen. nov., sp. nov., a type I methanotroph isolated from forest soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 810-815.
136. Isaksen I.S.A., Gauss M., Myhre G., Walter Anthony K.M., Ruppel C. Strong atmospheric chemistry feedback to climate warming from Arctic methane emissions // *Glob. Biogeochem. Cycles.* 2002. V. 25, GB2002.
137. Islam T., Jensen S., Reigstad L.J., Larsen O., Birkeland N.K. Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum// *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2008. V. 8. P. 300-304.
138. Johnson P.A., Quayle J.R. Microbial growth on C1 compounds. Synthesis of cell constituents by methane- and methanol-grown *Pseudomonas methanica* // *Biochem. J.* 1965 V. P. 59-67.
139. Jenkins B.D., Steward G.F., Short S.M., Ward B.B., Zehr J.P, Steward J.F. Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 1767-1776.

140. Johnson P.A., Quayle J.R. Microbial growth on C1 compounds. Synthesis of cell constituents by methane- and methanol-grown *Pseudomonas methanica* // Biochem. J. 1965 V. P. 59-67.
141. Judd A.G., Croker P., Tizzard L., Voisey C. Extensive methane-derived authigenic carbonates in the Irish Sea // Geo-Marine Letters. 2007. V. 27. P. 259–268
142. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V.N., Kotelnikova S., Holmquist L., Pedersen K., Trotsenko Y.A. *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden // Syst. Appl. Microbiol. 1999. V. 22. P. 565-572.
143. Kalyuzhnaya M.G., Stolyar S.M., Auman A.J., Lara J.C., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. *Methylosarcina lacus* sp. nov., a methanotroph from Lake Washington, Seattle, USA // Internat. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 2345-2350.
144. Kalyuzhnaya M.G., Lapidus A., Ivanova N., Copeland A.C., McHardy A.C., Szeto E., Salamov A., Grigoriev I.V., Suciú D., Levine S.R., Markowitz V.M., Rigoutsos I., Tringe S.G., Bruce D.C., Richardson P.M., Lidstrom M.E., Chistoserdova L // High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 1029–1034.
145. Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // Metab. Eng. 2015. V. 29. P. 142-52.
146. Kato N., Miyamoto N., Shimaó M., Sakazawa C. 1988. 3-Hexulose phosphate synthase from a new facultative methylotroph, *Mycobacterium gastri* NB19 // Agric. Biol. Chem. 1988. V. 52 P. 659–2661.

147. Keltjens J.T., Pol A., Reimann J., Op den Camp H.J.M. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 6163–6183.
148. Kemp M.B., Quayle J.R. Microbial growth on C1 compounds. Uptake of [<sup>14</sup>C]formaldehyde and [<sup>14</sup>C]formate by methane-grown *Pseudomonas methanica* and determination of the hexose labelling pattern after brief incubation with [<sup>14</sup>C]methanol // *Biochem J.* 1967. V. 102. P. 94–102.
149. Khalifa A., Lee C.G., Ogiso T., Ueno C., Dianou D., Demachi T., Katayama A., Asakawa S. *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov., a mesophilic type I methanotroph isolated from rice rhizosphere // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 3527–3534.
150. Kirschke S., Bousquet P., Ciais P., Saunois M., Canadell J.G., Dlugokencky E.J., Bergamaschi P., Bergmann D., Blake D.R., Bruhwiler L., Cameron-Smith P., Castaldi S., Chevallier F., Feng L., Fraser A., Heimann M., Hodson E.L., Houweling S., Josse B., Fraser P.J., Paul B., Krummel P.B., Lamarque J-F., Langenfelds R.L., Quéré C.L., Naik V., O'Doherty S., Palmer P.I., Pison I., Plummer D., Poulter B., Prinn R.G., Rigby M., Ringeval B., Santini M., Schmidt M., Shindell D.T., Simpson I.J., Spahni R., Steele L.P., Strode S.A., Sudo K., Szopa S., van der Werf G.R., Voulgarakis A., van Weele M., Ray F., Weiss R.F., Williams J.E., Zeng G. Three decades of global methane sources and sinks // *Nat. Geosci.* 2013. V. 6. P. 813–823.
151. Kim H.J., Graham D.W., DiSpirito A.A., Alterman M.A., Galeva N., Larive C.K., Asunskis D., Sherwood P.M. Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria // *Science.* 2004. V.10. P. 1612-1615.



152. Kip N., Dutilh B.E., Pan Y., Bodrossy L., Neveling K., Kwint M.P., Jetten M.S., Op den Camp H.J. Ultra-deep pyrosequencing of *pmoA* amplicons confirms the prevalence of *Methylomonas* and *Methylocystis* in Sphagnum mosses from a Dutch peat bog // *Env. Microb. Rep.* 2011a. V. 3. P. 667-673.
153. Kitmitto A., Myronova N., Basu P., Dalton H. Characterization and structural analysis of an active particulate methane monooxygenase trimer from *Methylococcus capsulatus* (Bath) // *Biochemistry.* 2005. V. 44(33). P. 54-65.
154. Klotz M.G., Norton J.M. Multiple copies of ammonia monooxygenase (*amo*) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure // *Fems. Microbial. Lett.* V. 132. P. 303-311.
155. Klusman R.W., Leopold M.E., LeRoy M.P. Seasonal variation in methane fluxes from sedimentary basins to the atmosphere: Results from chamber measurements and modeling of transport from deep sources // *J. Geophys. Res.* 2000a. V. 105D. P. 24 661–24 670.
156. Klusman R.W., Jakel M.E. Natural microseepage of methane to the atmosphere from the Denver-Julesburg basin, Colorado, USA // *J. Geophys. Res.* 1998. V.103D. 28 042–28 045.
157. Knief C., Kolb S., Bodelier P.L.E., Lipski A., Dunfield P.F. The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 321-333.
158. Knief C., Lipski A., Dunfield P.F. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 6703-6714.
159. Kolb S., Horn M.A. Microbial CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O Consumption in Acidic Wetlands // *Front Microbiol.* 2012. V. 3(78).

160. Kolb S., Knief K., Stubner S., Conrad R. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 2423-2429.
161. Kolb S., Knief C., Dunfield P.F., Conrad R. Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 1150-1161.
162. Kotelnikova S.V., Pedersen K. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Aspo Hard Rock Laboratory // FEMS Microbiol. Ecol. 1998. V. 26. P. 121–134.
163. Kotelnikova S.V., Macario A.J.A., Pedersen K. *Methanobacterium subterraneum*, sp. nov., a new alkalophilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater // Int. J. Syst. Bacteriol. 1998. V. 48. P. 57-67.
164. Krause S., Van Bodegom P. M., Cornwell W. K., Bodelier P. L. E. Weak phylogenetic signal in physiological traits of methane-oxidizing bacteria // J. Evol. Biol. 2014. V. 27. P. 1240–1247.
165. Kubota K., Ohashi A., Imachi H., Harada H. Visualization of mcr mRNA in a methanogen by fluorescence *in situ* hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH) // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 66. P. 521-528.
166. Lacroix A.V. Unaccounted for sources of fossil and isotopically-enriched methane and their contribution to the emissions inventory // Chemosphere. 1993. V. 26. P. 507-557.

167. Laukel M., Chistoserdova L., Lidstrom M.E., Vorholt J.A. The tungsten-containing formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1: purification and properties // Eur J Biochem. 2003. V.270. P. 325–333.

168. Leak D.J., Stanley S.H., Dalton H. implication of the nature of methane monooxygenase on carbon assimilation in methanotrophs. In “In Microbial Gas Metabolism, Mechanistic, Metabolic and Biotechnological aspects” (R.K. Poole and C.S. Dow, eds) // Academic Press, London. 1985. P. 201-208.

169. Lieberman R.L., Rosenzweig A.C. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane // Nature. 2005. V. 434. P. 177-182.

170. Liebner S., Wagner D. Abundance, distribution and potential activity of methane oxidizing bacteria in permafrost soils from the Lena Delta, Siberia // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 107–117.

171. Liebner S., Rublack K., Stuehrmann T., Wagner D. Diversity of aerobic methanotrophic bacteria in a permafrost active layer soil of the Lena Delta, Siberia // Microb. Ecol. 2009. V. 57. P. 25–35.

172. Lin J.L., Joye S.B., Scholten J.C.M., Schäfer H., McDonald I.R., Murrell J.C. Analysis of methane monooxygenase genes in Mono Lake suggests that increased methane oxidation activity may correlate with a change in methanotroph community structure // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 6458-6462.

173. Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüssmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T.,

Bode A., Schleifer K.H. ARB: a software environment for sequence data // Nucleic. Acids. Res. 2004. V. 32. P. 1363-1371.

174. Lueders T., Manefield M., Friedrich M.W. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients // Environ. Microbiol. 2004. V. 6. P. 73-78.

175. Lueders T., Wagner B., Claus P., Friedrich M.W. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methyloph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil // Environ. Microbiol. V. 6. P. 60-72.

176. Luesken F.A., Zhu B., van Alen T.A., Butler M.K., Diaz M.R., Song B., Op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M., Ettwig K.F. *pmoA* primers for detection of anaerobic methanotrophs // Appl. Environ. Microbiology. 2011. V. 77(11). P. 3877–3880.

177. Lüke C., Frenzel P. The potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 6305–6309.

178. Manefield M., Whiteley A.S., Griffiths R.I., Bailey M.J. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 5367-5373.

179. McDonald I.R., Kenna E.M., Murrell J.C. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR// Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 116–121.

180. McDonald I.R., Bodrossy L., Chen Y., Murrell J.C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs // Appl Environ Microbiol. 2008. V. 74. P. 1305-1315.

181. McDonald I.R., Murrell J.C. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs // Appl. Environ. Microbiol. 1997a. V. 63. P. 3218-3224.
182. McDonald I.R., Murrell J.C. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs // FEMS Microbiol. Lett. 1997b. V. 156. P. 205-210.
183. Miguez C.B., Bourque D., Sealy J.A., Greer C.W., Groleau D. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the polymerase chain reaction (PCR) // Microb. Ecol. 1997. V. 33. P. 21-31.
184. Morita, R.J. Low-temperature environments // Academic Press, San Diego, second ed. Encyclopedia of Microbiology. V. 1. P. 93-98.
185. Morris S.A., Radajewski S., Willison T.W., Murrell J.C. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 1446-1453.
186. Murrell J. C., McGowan V., Cardy D. L. N. Detection of methylotrophic bacteria in natural samples by molecular probing techniques // Chemosphere. 1992. V. 26. P. 1-11.
187. Murrell J.C., McDonald J.R., Bourne D.G. Molecular methods for the study of methanotroph ecology // FEMS Microbiology Ecology. V. 27. P. 103-114.
188. Myronova N., Kitmitto A., Collins R.F., Miyaji A., Dalton H. Three-dimensional structure determination of a protein supercomplex that oxidizes methane to formaldehyde in *Methylococcus capsulatus* (Bath) // Biochemistry. 2006. V. 45(39). P. 5-14.
189. Neufeld J.D., Schafer H., Cox M.J., Boden R., McDonald I.R., Murrell J.C. Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp. and novel Gammaproteobacteria in marine methanol and methylamine metabolism // ISME J. 2007. V. 1. P. 480-491.

190. Nercessian O., Bienvenu N., Moreira D., Prieur D., Jeanthon C. Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs, and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. P. 118-132.
191. Nguyen H.H., Shiemke A.K., Jacobs S.J., Hales B.J., Lidstrom M.E., Chan S.I. The nature of the copper ions in the membranes containing the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14995-15005.
192. Nichols P.D., Guckert J.B., White D.C. Determination of monounsaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts // *J. Microbiol. Methods.* 1986. V. 5. P. 49–55.
193. Nichols D.S., Nichols P.D., McMeekin T.A. A new n-C31:9 hydrocarbon from Antarctic bacteria // *FEMS Microbiol Lett.* 1995. V. 125. P. 281-286.
194. Niederberger T.D., Perreault N.N., Tille S., Lollar B.S., Lacrampe-Couloume G., Andersen D., Greer C.W., Pollard W., Whyte L.G. Microbial characterization of a subzero, hypersaline methane seep in the Canadian High Arctic // *ISME J.* 2010. V. 4. P.1326 –1339.
195. Omel'chenko M.V., Vasil'eva L.V., Zavarzin G.A., Savel'eva N.D., Lysenko A.M., Miytushina L.L., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A. A novel psychrophilic methanotroph of the genus *Methylobacter* // *Microbiology.* 1996. V. 65. P. 339 –343.
196. Op den Camp H.J.M., Islam T., Stott M.B., Harhangi H.R., Hynes A., Schouten S., Jetten M.S.M., Birkeland N-K., Pol A., Dunfield P.F. Minireview: Environmental, genomic, and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia* // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1. P. 293-306.

197. Oshkin I.Y., Wegner C.E., Lüke C., Glagolev M.V., Filippov I.V., Pimenov N.V., Liesack W., Dedysh S.N. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold methane seeps in floodplains of West Siberian rivers // *Appl Environ Microbiol.* Vol. 80. P. 5944-5954.
198. Pacheco-Oliver M., McDonald I.R., Groleau D., Murrell J.C., Miguez C.B. Detection of methanotrophs with highly divergent *pmoA* genes from Arctic soils // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 209. P. 313-319.
199. Pedersen K., Ekendahl S. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden // *Microb. Ecol.* 1990. V. 20. P. 37-52.
200. Pedersen K. Investigation of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste // *Can. J. Microbiol.* 1996. V. 42. P. 382–391
201. Pol A., Heijmans K., Harhangi H.R., Tedesco D., Jetten M.S., Op den Camp H.J. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species // *Nature.* 2007. V. 6. P. 874-878.
202. Popov V.O., Lamzin V.S. NAD(+)-dependent formate dehydrogenase // *Biochem J.* 1994. V. 301. P. 25-43.
203. Pruitt K.D., Tatusova T., Maglott D.R. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins // *Nucleic Acids Res.* V. 33. P. 501–504.
204. Quayle J. R., Ferenci T. Evolutionary aspects of autotrophy // *Microbiol. Rev.* 1978. V. 42. P. 251–273.

205. Quince C., Lanzén A., Curtis T.P., Davenport R.J., Hall N., Head I.M., Read L.F., Sloan W.T. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data // *Nat. Methods*. 2009. V. 6. P. 639–641.
206. Radajewski S., Ineson P., Parekh N.R., Murrell J.C. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology // *Nature*. 2000. V. 403. P. 646-649.
207. Radajewski S., Webster G., Reay D.S., Morris S.A., Ineson P., Nedwell D.B., Prosser J.I., Murrell J.C. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology*. V. 148. P. 2331–23
208. Rahalkar M., Bussmann I., Schink B. *Methylosoma difficile* gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 1073-1080.
209. Reeburgh W. S. Oceanic methane biogeochemistry // *Chem. Rev.* V. 107. P. 486-513.
210. Ricke P., Erkel C., Kube M., Reinhardt R., Liesack W. Comparative analysis of the conventional and novel *pmo* (particulate methane monooxygenase) operons from *Methylocystis strain SC2* // *Appl Environ Microbiol.* 2004. V. 5. P. 55-63.
211. Rigby M., Prinn R.G., Fraser P.J., Simmonds P.G., Langenfelds R.L., Huang J., Cunnold D.M., Steele L.P., Krummel P.B., Weiss R.F., O’Doherty S., Salameh P.K., Wang H.J., Harth C.M., Mühle J., Porter L.W. Renewed growth of atmospheric methane // *Geophys. Res. Lett.* 2008. V. 35
212. Rivkina E., Friedmann E.I, Gilichinsky D. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 3230–3233.
213. Saidi-Mehrabad A., He Z., Tamas I., Sharp C.E., Brady A.L., Rochman F.F., Bodrossy L., Abell G.C.J., Penner T., Dong X., Sensen C.W., Dunfield P.F. Methanotrophic



bacteria in oilsands tailings ponds of northern Alberta // *The ISME Journal*. 2000. V. 7. P. 908–921.

214. Schrenzel J., Kostic T., Bodrossy L., Francois P. Introduction to Microarray-Based Detection Methods, in *Detection of Highly Dangerous Pathogens: Microarray Methods for BSL 3 and BSL 4 Agents* (eds T. Kostic, P. Butaye and J. Schrenzel) // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2009. doi: 10.1002/9783527626687.ch1

215. Semrau J.D., Chistoserdov A., Lebron J., Costello A., Davagnino J., Kenna E., Holmes A.J., Finch R. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 3071-3079.

216. Semrau J.D., DiSpirito A.A., Yoon S. Methanotrophs and copper // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. P. 496-531.

217. Serkebaeva Y. M., Kim Y., Liesack W., Dedysh S. N. Pyrosequencing-Based Assessment of the Bacteria Diversity in Surface and Subsurface Peat Layers of a Northern Wetland, with Focus on Poorly Studied Phyla and Candidate Divisions // *PLoS ONE*. V. 8(5). P. 1–14.

218. Siljanen H.M. P., Saari A., Krause S., Lensu A., Abell G. C. J., Bodrossy L., Bodelier P.L., Martikainen P.J. Hydrology is reflected in the functioning and community composition of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal lake // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011. V. 75. P. 430–445.

219. Simpson E. Measurement of diversity // *Nature*. 1949. V. 163. P. 688.

220. Sinninghe Damste J.S., Strous M., Rijpstra W.I., Hopmans E.C., Geenevasen J.A., van Duin A.C., van Niftrik L.A., Jetten M.S. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane // *Nature*. 2002. V. 419. P. 708-712.

221. Smith S.M., Balasubramanian R., Rosenzweig A.C. Metal reconstitution of particulate methane monooxygenase and heterologous expression of the pmoB subunit // *Methods Enzymol.* 2011. V. 495. P. 195-210.
222. Shannon C.E. A mathematical theory of communication // *Bell Syst. Tech. J.* 1948. V. 27. P. 379–423.
223. Sharp C.E., Stott M.B., Dunfield P.F. Detection of autotrophic verrucomicrobial methanotrophs in a geothermal environment using stable isotope probing // *Frontiers in Microbiology.* 2012. V. 3. P. 1–9.
224. Sharp C.E., Smirnova A.V., Graham J.M., Stott M.B., Khadka R., Moore T.R., Grasby S.E., Strack M., Dunfield P.F. Distribution and diversity of *Verrucomicrobia* methanotrophs in geothermal and acidic environments // *Environmental Microbiology.* 2014. V. 16(6). P. 1867–1878.
225. Shendure J., Ji H.L. Next-generation DNA sequencing // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1135–1145.
226. Sherwood Lollar B., Frape S.K., Fritz P., Macko S.A., Welhan J.A., Blomqvist R., Lahermo P.W. Evidence for bacterially generated hydrocarbon gas in Canadian shield and Fennoscandian shield rocks // *Geochim. Cosmochim.* 1993. V. 57. P. 5073–5085.
227. Shigematsu T., Hanada S., Eguchi M., Kamagata Y., Kanagawa T., Kurane R. Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during *in situ* bioremediation // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 5198-5206.
228. Schmieder R., Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets // *Bioinformatics.* V. 27. P. 863–864.

229. Smith D.D., Dalton H. Solubilisation of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) // Eur J Biochem. 1989. V. 182. P. 667-71.
230. Snaidr J., Amann R., Huber I., Ludwig W., Schleifer K.-H. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 2884-2896.
231. Sundh I., Borga P., Nilsson M., Svensson B. H. Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids // FEMS Microbiol. Ecol. 1995. V. 18. P. 103-112.
232. Sundh I., Börjesson G., Tunlid A. Methane oxidation and phospholipid fatty acid composition in a podzolic soil profile // Soil Biol. Biochem. 2000. V. 32. P.1025-1028.
233. Söhngen N.L. Über bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebrauchen // Parasitenkd. Infectionskr. 1906. V. 15. P. 513-517.
234. Stahl D.A., Amann R. Development and application of nucleic acid probes // In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. 1991. Wiley, New York, N.Y. P. 205-248.
235. Stepanenko V.M., Machul'skaya E.E., Glagolev M.V., Lykossov V.N. Numerical modeling of methane emissions from lakes in the permafrost zone // Izvestiya Atmos. Ocean. Phys. 2011.V. 47. P. 252–264
236. Stoecker K., Bendinger B., Schöning B., Nielsen P.H., Nielsen J.L., Baranyi C., Toenshoff E.R., Daims H., Wagner M. Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 7. P. 2363-2367.

237. Stolyar S., Costello A.M., Peeples T.L., Lidstrom M.E. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. // Microbiology. 1999. V. 145. P. 1235-1244.
238. Stolyar S., Franke M., Lidstrom M.E. Expression of individual copies of *Methylococcus capsulatus* Bath particulate methane monooxygenase copies // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 1810–1812.
239. Stralis-Pavese N., Bodrossy L., Reichenauer T. G., Weilharter A., Sessitsch A. 2006. 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidizing bacteria: assessment, critical evaluation of methodology performance, and application for landfill site cover soils // Appl. Soil Ecol. 2006. V. 31. P. 251-266.
240. Strom T., Ferency T., Quayle J.R. The carbon assimilation pathway of *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium* (OB3b) // Biochem. J. 2013. V. 144. P. 465-476.
241. Tavormina P.L., Orphan V.J., Kalyuzhnaya M.G., Jetten M.S.M., Klotz M.G. A novel family of functional operons encoding methane/ammonia monooxygenase-related proteins in gammaproteobacterial methanotrophs // Environ. Microbiol. 2011. V. 3. P. 91–100.
242. Tavormina P. L., Hatzenpichler R., McGlynn S., Chadwick G., Dawson K.S., Cannon S. A., Orphan V. J. *Methyloprofundus sediment* gen. nov., sp. nov., an obligate methanotroph from ocean sediment belonging to the 'deep sea-1' clade of marine methanotrophs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 251-259.
243. Tchawa Yimiga M., Dunfield P.F., Ricke P., Heyer J., Liesack W. Wide distribution of a novel *pmoA*-like gene copy among type II methanotrophs, and its

expression in *Methylocystis strain SC2* // Appl Environ Microbiol. 2003. V. 69(9). P. 593-602.

244. Theisen A.R., Ali M.H., Radajewski S., Dumont M.G., Dunfield P.F., McDonald I.R., Dedysh S.N., Miguez C.B., Murrell J.C. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2 // Mol. Microbiol. 2005. V. 58. P. 682–692.

245. Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N. Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems // FEMS Microbiol Ecol. 2005. V. 53. P. 15-26.

246. Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy // Advances in Applied Microbiology. V. 63. P. 183-229.

247. Tsien H.C., Bratina B.J., Tsuji K., Hanson R.S. Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 2858-2865.

248. van Teeseling M.C.F., Pol A., Harhangi H.R., Van Der Zwart S., Jetten M.S.M., Den Camp H.J.M.O. Expanding the verrucomicrobial methanotrophic world: description of three novel species of *Methylacidimicrobium* gen. nov // Appl Environ Microbiol. 2014. V. 80. P. 6782–6791.

249. Vecherskaya M.S., Galchenko V.F., Sokolova E.N., Samarkin, V.A. Activity and species composition of aerobic methanotrophic communities in tundra soils // Curr. Microbiol. 1993. V. 27. P. 181–184.

250. Vigliotta G., Nutricati E., Carata E., Tredici S.M., De Stefano M., Pontieri P., Massardo D.R., Prati M.V., De Bellis L., Alifano P. *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic gamma-proteobacterium // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V.73. P. 3556-3565.

251. Vorholt J.A., Chistoserdova L., Lidstrom M.E., Thauer R.K. The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 // J Bacteriol. 1998. V. 80(20). P. 1-6.
252. Vorholt J.A., Chistoserdova L., Stolyar S.M., Thauer R.K., Lidstrom M.E. Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases // J Bacteriol. 1999. V. 81(18). P. 0-7.
253. Vorholt J.A., Marx C.J., Lidstrom M.E., Thauer R.K. Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol // J Bacteriol. 2000. V. 82(23). P. 45-50.
254. Vorholt J.A. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria // Arch Microbiol. 2002. V. 178. P. 239–249.
255. Vorobev A.V., Baani M., Doronina N.V., Brady A.L., Liesack W., Dunfield P.F., Dedysh S.N. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2456-2463.
256. Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M., Minkovskaya N., Mamukelashvili A., Zalinova, N., Gilichinsky D., Rivkina E., Vishnivetskaya T. The deep cold biosphere: facts and hypothesis // FEMS Microbiol. Rev. 1997. V. 20. P. 277–290.
257. Walter K.M., Zimov S.A., Chanton J.P., Verbyla D., Chapin F.S., III. Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming // Nature. 2006. V. 44. P. 71–75.

258. Walter Anthony K.M., Anthony P., Grosse G., Chanton J. Geologic methane seeps along boundaries of Arctic permafrost thaw and melting glaciers // Nat. Geosci. 2012. V. 5. P. 419 – 426.
259. Warttinen I., Hestens A.G., Svenning M.M. Methanotrophic diversity in high arctic wetlands on the islands of Svalbard (Norway) – denaturing gel electrophoresis analysis of soil DNA and enrichment cultures // Can. J. Microbiol. 2003. V. 49. P. 602–612.
260. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697-703.
261. Whalen S.C. and Reeburgh W.S. Consumption of atmospheric methane by tundra soils // Nature. 1990. V. 346. P. 160–162.
262. Whiteley A.S., Manefield M., Lueders T. Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. V. 17. P. 67-71.
263. Whitticar M.J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // Chem Geol. 1999. V. 161. P. 291–314.
264. Whittenbury R., Phillips K.C., Wilkinson J.G. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria // J. Gen. Microbiol. 1970. V. 61. P. 205–218
265. Whittenbury R., Dalton H., Eccleston M., Reed H.L. The different types of methane oxidizing bacteria and some of their more unusual properties // Proc.Int.Sympos. Microbial Growth on C1 Compounds. 1975. P. 1-9.
266. Whittenbury R. The interrelationship of autotrophy and methylotrophy as seen in *Methylococcus capsulatus* (Bath). In H. Dalton (ed.), Microbial growth on C1 compounds // Heyden, London. 1981. p. 181–190.

267. Wise M.G., McArthur J.V., Shimkets L.J. *Methanotroph diversity* in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 4889-4897.
268. Woodland M.P. and Cammack R. Electron spin resonance properties of component A of the soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath), in *Microbial Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects* (Poole, R.K. and Dow, C.S., Eds.) // Academic Press, New York. P. 209-213.
269. Wu L., Thompson D. K., Li G., Hurt R. A., Tiedje J. M., Zhou J. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 5780-5790.
270. Yakimov M.M., Giuliano L., Crisafi E., Chernikova T., Timmis K.N., Golyshin P.N. Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy) // *Environ. Microbiol.* 2002. V. 4. P. 249 –256.
271. Zahn J.A., DiSpirito A.A. Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 1018-1029.
272. Zehr J.P., McReynolds L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. P. 2522-2526.