

АНАЛИЗ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ ПРИБРЕЖНЫХ МЕТАНОВЫХ СИПОВ ПОЛУОСТРОВА ТАРХАНКУТ

© 2019 г. И. Ю. Тарновецкий^а, А. Ю. Меркель^б, Н. В. Пименов^{б, *}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^бИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: npimenov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.2019 г.

После доработки 24.06.2019 г.

Принята к публикации 25.06.2019 г.

С использованием основных субстратов метаногенеза проведены исследования культивируемых форм метаногенных архей прибрежных метановых сипов Черного моря в районе полуострова Тарханкут. Анализ последовательностей 16S рРНК показал, что рост классических метаногенных эвриархей наблюдался во всех накопительных культурах и отсутствовал в контрольных вариантах накопительных культур без добавления субстрата. При этом микробный состав накопительных культур из сипа отличался от накопительных культур фоновой точки. Наиболее многочисленными оказались археи родов *Methanolobus* (среда с метанолом и водородом), *Methanosarcina* (триметиламин и водород), *Methanococcoides* (триметиламин), *Methanococcus* (водород и углекислый газ). В накопительной культуре с ацетатом вероятнее всего происходил синтрофный рост гидрогенотрофных архей рода *Methanogenium* совместно с кластридиями и бактериями семейства *Thermotogaceae*. Относительно низкий процент сходства обнаруженных последовательностей гена 16S рРНК с ближайшими культивируемыми родственниками (94% сходства и ниже) говорит о принадлежности обнаруженного флотипа *Methanogenium* к новому виду. То же касается выявленного в культуре на триметилаmine и водороде флотипа *Methanosarcina* (97% и ниже сходства обнаруженных последовательностей гена 16S рРНК с ближайшими культивируемыми родственниками).

Ключевые слова: Черное море, метановый сип, донные осадки, метаногены, *Methanococcoides*, *Methanogenium*, *Methanolobus*

DOI: 10.1134/S0026365619060181

Угледородные газовыделения (метановые сипы) из морских осадков представляют собой одно из наиболее интересных геологических явлений, которое в последние десятилетия привлекает внимание многих исследователей. Места таких газовых высачиваний часто представляют собой оазисы жизни на морском дне, резко отличающиеся от окружающих донных осадков по физико-химическим и микробиологическим параметрам, а также по структуре бентосных сообществ (Bernardino et al., 2012). Высокое содержание метана способствует развитию аэробных метанотрофных бактерий, потребляющих кислород и образующих дополнительное органическое вещество, которое вовлекается в трофические цепи (Ding, Valentine, 2008). Интенсивные микробные процессы окисления метана и трансформации органического вещества сопровождаются резким снижением концентрации кислорода, который в районах метановых сипов проникает только в самые поверхностные слои осадочной толщи. Истощение кислорода и высокая активность первичных деструкторов приводят к активизации сульфатредуцирующих и метаногенных

микроорганизмов, играющих в морских осадочных отложениях ведущую роль в терминальной фазе разложения органического вещества (Каллистов и соавт., 2017).

В Черном море газовые сипы были открыты в конце восьмидесятых годов прошлого века (Полликарпов, Егоров, 1989). К настоящему времени исследованы метановые сипы, располагающиеся преимущественно на свале глубин северо-западного шельфа Черного моря, а также грязевые вулканы в глубоководной зоне (Michaelis et al., 2002; Пименов, Иванова, 2005). Недавно проведенные геоакустические исследования прибрежной зоны Крымского полуострова свидетельствуют о широком распространении мелководных метановых сипов на глубинах до 10 м (Егоров и соавт., 2011). Особый интерес представляют метановые газовыделения, обнаруженные более 30 лет назад в Каламитском заливе Черного моря вблизи побережья полуострова Тарханкут. Их исследования показали, что в местах газовых высачиваний максимальная глубина проникновения кислорода в толщу донных осадков не превышает нескольких миллиметров, а концентрация сероводорода в

подповерхностных осадках может достигать 3 мМ (Гулин и соавт., 2010). Ранее мы обнаружили, что основную часть метаногенного сообщества составляют археи семейств *Methanosarcinaceae* и *Methanomicrobiaceae* (Tarnovetskii et al., 2018). Поскольку метагеномные исследования с помощью высокопроизводительного секвенирования не всегда способны дать адекватную оценку метаболического потенциала микробного сообщества (Vigneron et al., 2015), совмещение культуральных методов исследования с молекулярными позволяет, на наш взгляд, более детально рассмотреть разнообразие метаногенов в прибрежных сипах полуострова Тарханкут.

Главной целью настоящего исследования было изучить микробный потенциал газовых сипов полуострова Тарханкут, реализующийся в зависимости от присутствия разных субстратов метаногенеза в среде. Для этого были поставлены накопительные культуры с селективными условиями, стимулирующими развитие различных групп метаногенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. В работе были исследованы донные осадки из газовых сипов полуострова Тарханкут (45°35'54" N, 32°7'15" E), отобранные в мае 2016 года. Отбор проб производил водолаз с глубины 5 м при помощи пластиковых контейнеров. Для постановки накопительных культур отбирали поверхностный слой донных осадков (0–10 см). На берегу отобранные образцы осадков тщательно перемешивали и помещали в стеклянные флаконы на 250 мл без воздушной фазы, закрывали крышкой и в таком виде транспортировали в лабораторию.

Отбор проб производили в двух точках: в центре метанового сипа и в фоновой точке, которая располагалась приблизительно в 100 м от метанового сипа. В центре сипа осадки были представлены алеврито-пелитовыми илами с примесью песка и детритного материала, в фоновой точке – слабо заиленным песком. Воду для разведения проб отбирали над поверхностью сипа и фоновой точки с помощью батометра.

Постановка накопительных культур. Для развития культур 10 мл донных осадков как посевной материал и 10 мл воды помещали во флаконы объемом 60 мл. Флаконы закрывали пробкой из газонепроницаемой резины. Сразу после этого из флаконов откачивали воздушную фазу и заменяли ее азотом. Селективные условия для развития культур создавали, добавляя различные субстраты для метаногенеза: триметиламин (конечная концентрация 22.5 мМ), ацетат (15 мМ), смесь углекислого газа (85% газовой фазы) с водородом (15%), метанол (20 мМ) и водород (15%), триметиламин (22.5 мМ) и водород (15%). В контрольных вариантах не добавляли субстрат. Для проб из

обеих точек использовали одинаковый набор субстратов. Всего было поставлено 12 накопительных культур. Накопительные культуры инкубировали в термостате при температуре 20°C в течение 2 мес. О росте метаногенов судили по содержанию метана во флаконах. Метан измеряли на газовом хроматографе “Кристалл” после инкубации.

Определение филогенетического состава накопительных культур методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. ДНК выделяли как из посевной материала (проб донных осадков), так и накопительных культур через 2 мес. культивирования. Пробы или накопительные культуры тщательно перемешивали, отбирали 5 мл в чистую пробирку и центрифугировали 20 мин при 14000 g. Далее клетки осадка разрушали механическим и химическим методами (Lever et al., 2015). Для разрушения к осадку клеток добавляли гуанидин гидрохлорид и Тритон X-100 (до конечной концентрации 800 мМ и 0.5% соответственно) общим объемом 500 мкл и смесь стеклянных бус диаметром 425–600 мкм и 106 мкм общим объемом ~500 мкл. Полученную смесь гомогенизировали на Fast-Prep®-24 Instrument (“MP Biomedicals”, США) в течение 40 с на скорости 6 м/с и затем инкубировали 50 мин при 50°C. Далее проводили стандартную процедуру фенол-хлороформной экстракции и осаждения нуклеиновых кислот в изопропанол. Библиотеки последовательностей ДНК на основе V3–V4 региона гена 16S рРНК были получены в соответствии с ранее описанной методикой (Fadrosh et al., 2014). Для получения ампликонов использовали следующую систему праймеров: прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTXXX-XXXXXXXXX ZZZZ CCTAYGGGDBGCWSCAG-3'), состоящий, соответственно, из “5' Illumina Linker Sequence”, “Index 1”, “Heterogeneity Spacer” (Fadrosh et al., 2014) и Pro-mod-341F праймерной последовательности (Merkel et al., 2017); обратный праймер (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT XXX-XXXXXXXXX ZZZZ GACTACNVGGGTMTCTA-ATCC-3'), состоящий, соответственно из “3' Illumina Linker Sequence”, “Index 2”, “Heterogeneity Spacer” и Pro-mod-805R праймерной последовательности (Merkel et al., 2017). Полученные ампликоны разделяли в 2% агарозном геле с помощью электрофореза, вырезали из геля скальпелем и очищали при помощи набора Cleanup Standard (“Евроген”, Россия). Секвенирование проводили на системе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов, обеспечивающего длину прочтений 300 нуклеотидов с каждого конца ампликона. Демультимплексирование проводили при помощи соответствующих скриптов ПО QIIME версии 1.9.0 (Caporaso et al., 2010). Последующую обработку и анализ последовательностей также проводили в QIIME ver. 1.9.0. Полученные данные были пропущены через фильтр с минимальным

качеством прочтения нуклеотида 30 и минимальной длиной прочтения 350 п.о. Проверку прочтений на химерность проводили с помощью скрипта `identify_chimeric_seqs.py` по алгоритму USEARCH версии 6.1544 (Edgar, 2010) и референсной базой прочтений 16S рPHK Silva 123 (Quast et al., 2013). Формирование таблицы ОТЕ производили с помощью скрипта `pick_open_reference_otus.py`. Последовательности группировали в ОТЕ с уровнем сходства 97% (Schloss, Handelsmann, 2006), используя алгоритм USEARCH версии 6.1544 (Edgar, 2010) и референсную базу прочтений 16S рPHK Silva 123 версии (Quast et al., 2013). Репрезентативные последовательности были выбраны с помощью метода UCLAST (Edgar, 2010). Анализ альфа разнообразия и построение кривых насыщения производили с помощью скрипта `core_diversity_analyses.py` для нормализованной выборки в 17000 прочтений на образец. Для более точного определения вида метаногенных архей был использован онлайн сервис Blast. Для подсчета характеристик альфа разнообразия ОТЕ таблица была нормализована с помощью скрипта QIIME методом CSS (cumulative sum scaling).

Полученные в работе массивы данных секвенирования депонированы в базе данных NCBI под номером PRJNA549749.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование метана. При посеве накопительных культур газовую фазу во флаконах заменяли на азот, поэтому можно считать, что начальное содержание метана в газовой фазе было равно нулю. Через 2 мес. культивирования в накопительных культурах содержание метана в газовой фазе составило от 8.74 до 64.7%. В контрольных вариантах (без добавления субстрата) метан был обнаружен в следовых количествах (фон – 0.03% и сип – 0.01%). Наибольшее содержание метана наблюдалось в накопительных культурах с добавлением метилированных соединений: 1) триметиламин – сип (33.3%), триметиламин – фон (14.8%), 2) триметиламин и водород – сип (64.7%), триметиламин и водород – фон (51.8%), 3) метанол и водород – фон (20.2%), метанол и водород – сип (30.4%). В экспериментах с добавлением субстратов ацетокластического и гидрогенотрофного метаногенеза метана было меньше. При культивировании на ацетате образование метана в пробе из сипа составило 8%, фона – 8.8%, на водороде и углекислом газе – 14.7 и 8.7% соответственно.

Молекулярный анализ состава микробного сообщества. В результате секвенирования была получена 427501 последовательность 16S рPHK со средней длиной 406 нуклеотидов. Покрытие разнообразия филотипов, рассчитанное с помощью метода Chao1 (Chao, 1984), варьировало от 55.7 до 99.8% в накопительных культурах из сипа и от 51.7 до 92.9% в культурах из фоновой точки. Индекс

разнообразия Шэннона варьировал от 3 до 9.5 (табл. 1).

Полученные прочтения были сгруппированы в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне сходства 97%. Всего было получено 10437 уникальных ОТЕ. В экспериментах с фоновой точкой большая часть последовательностей была отнесена к археям. Их относительное количество составило 49.6–85.5% (табл. 1). В накопительных культурах из сипа архей было меньше. Больше всего их было в культуре с триметиламином (76.5%). В остальных вариантах их относительная численность составила 19.2–36%. В посевном материале из сипа архей было всего 2.7% и менее 1% – из фоновой точки. В контрольных вариантах без добавления субстрата относительная численность архей составила 2.3% (сип) и 18.4% (фоновая точка).

Почти во всех экспериментах преобладали известные группы метаногенов филума *Euryarchaeota*. В накопительных культурах из донных осадков сипа большая часть прочтений была отнесена к следующим микроорганизмам (табл. 2): 1) водород и углекислый газ – некультивируемые кластридии (17.1 и 7.3%) и *Methanococcus* (7.3%); 2) ацетат – *Methanogenium* (27.7%); 3) триметиламин – *Methanococoides* (71.1%); 4) триметиламин и водород – филум *Gracilibacteria* (15.8%) и *Methanosarcina* (13.4%); 5) метанол – *Methanolobus* (19.5%). В посевном материале из сипа преобладали бактерии таксонов *Gelria* (8.2%), *Nocardioideis* (4.1%) и некультивируемые бактерии типа *Firmicutes* (5.3%), а в контрольном варианте без добавления субстрата – бактерии рода *Sulfurimonas* (70.5%).

Во всех накопительных культурах из фоновой точки, кроме вариантов (1) с метанолом и водородом, (2) с водородом и углекислым газом, преобладали археи рода *Methanococoides* (34.9–80.8%). В варианте с метанолом и водородом самым многочисленным был род *Methanolobus* (24.8%). В варианте с водородом и углекислым газом преобладали археи рода *Methanogenium* (49.4%). В посевном материале из фоновой точки преобладали бактерии таксонов *Defluviococcus* (16.5%), *Acidimicrobiales* OM1 clade (7.2%) и *Rhodospirillaceae* (6.3%). В контрольном варианте без добавления субстрата преобладали археи филума *Woesearchaeota* (10.5%); 14.4% прочтений не были отнесены ни к одному из известных таксонов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Образование метана во всех накопительных культурах опытных вариантов и его отсутствие в контрольных вариантах говорят о способности микробного сообщества к метаногенезу на широком спектре субстратов. При этом образование метана в природной среде лимитировано количеством субстрата. Самые высокие концентрации

Таблица 1. Образование метана, результаты секвенирования и оценка альфа разнообразия в накопительных культурах из образцов сипа и фоновой точки

Условия роста накопительных культур	Метан, %	Число прочтений	Число ОТЕ	Относительное количество архей, %	Shannon	Chao1	Насыщение, %
		ненормализованные библиотеки			библиотеки, нормализованные методом CSS		
		Сип					
Контроль (без субстрата)	0.0	17184	1776	2.3	4.62	3171	56.0
Триметиламин и водород	64.7	5590	465	19.2	5.94	795	58.5
Метанол и водород	30.4	28753	2484	27.5	8.22	3714	66.9
Водород и углекислый газ	14.8	7140	1085	16.2	6.94	1946	55.8
Ацетат	8.9	19269	1992	36	7.42	3019	66.0
Триметиламин	33.3	45684	2362	76.5	4.38	3713	63.6
Посевной материал	0.0	68528	2303	2.7	8.4	2306	99.9
Фоновая точка							
Контроль (без субстрата)	0.0	22288	2944	18.4	9.5	3808	77.3
Триметиламин и водород	51.8	26323	513	68.2	3.00	764	67.1
Метанол и водород	20.3	20248	1050	64.1	5.10	2028	51.8
Водород и углекислый газ	8.7	26124	560	49.6	4.02	759	73.8
Ацетат	8.1	29479	1839	69.2	5.25	3090	59.5
Триметиламин	14.8	35974	1536	85.5	2.57	2449	62.7
Посевной материал	0.0	74917	2717	0	8.32	2923	93.0

Таблица 2. Виды метаногенов, преобладающие в накопительных культурах из сипа и фоновой точки, развивающихся на разных типах субстратов

Субстрат	Преобладающий вид архей	Количество прочтений в преобладающей ОТЕ	Родство с ближайшим культивируемым родственником, %
Сип			
Водород и углекислый газ	<i>Methanococcus maripaludis</i>	517	100
Ацетат	<i>Methanogenium frigidum</i>	3526	94
	<i>Methanogenium marinum</i>	1446	99
ТМА	<i>Methanococcoides methylutens</i>	18221	100
	<i>Methanococcoides alaskense</i>	13167	100
ТМА и водород	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	279	97
	<i>Methanogenium marinum</i>	187	99
Метанол и водород	<i>Methanlobus oregonensis</i>	1542	100
	<i>Methanlobus oregonensis</i>	1402	99
Фоновая точка			
Водород и углекислый газ	<i>Methanogenium marinum</i>	11268	99
Ацетат	<i>Methanococcoides methylutens</i>	10265	100
	<i>Methanococcoides alaskense</i>	5778	100
ТМА	<i>Methanococcoides methylutens</i>	10265	99
ТМА и водород	<i>Methanococcoides methylutens</i>	15982	100
Метанол и водород	<i>Methanococcoides alaskense</i>	6357	100
	<i>Methanlobus taylorii</i>	1507	100
	<i>Methanlobus oregonensis</i>	836	98

метана были достигнуты на средах с добавлением триметиламина и метанола. Вероятнее всего, такие результаты связаны со стехиометрией и большей энергетической выгодой, получаемой метаногенами при росте на метилированных субстратах. Также это может свидетельствовать о преобладании метилотрофного пути метаногенеза в сообществе и объяснять низкие значения активностей, полученные нами ранее в экспериментах с мечеными углекислым газом и ацетатом (неопубликованные данные). Подавление ацетокластического и гидрогенотрофного метаногенеза могло возникнуть из-за развития сульфатредуцирующих бактерий. Однако во всех экспериментах относительная численность сульфатредуцирующих бактерий (2.3–9.3%) была ниже, чем метаногенных архей (15.9–82.5%). Поэтому можно прийти к заключению о том, что все субстраты были добавлены с большим избытком, и фактором конкуренции метаногенов с сульфатредукторами можно пренебречь.

С помощью анализа последовательностей гена 16S рРНК нам удалось выявить группы микроорганизмов, преобладающие на каждом типе субстрата. В большинстве случаев это были один или два рода классических метаногенов. При этом доминирующие микроорганизмы в сипе отличались от микроорганизмов в фоновой точке. Исключение составляли культуры с добавлением метанола и водорода. Такие результаты говорят о значительном отличии потенциала микробного сообщества сипа от сообщества фоновой точки.

В отличие от предыдущего исследования (Tagpovetskii et al., 2018), в настоящей работе были получены более длинные прочтения при секвенировании, покрывающие два переменных участка 16S рРНК. Такой подход позволил не только проанализировать состав сообществ на уровне рода, но и идентифицировать микроорганизмы накопительных культур на видовом уровне.

В накопительной культуре образца сипа, развивающейся с ацетатом, преобладали последовательности рода *Methanogenium*. Ближайшими культивируемыми организмами по анализируемому участку гена 16S рРНК оказались виды *M. frigidum* и *M. marinum*, которые относятся к гидрогенотрофным психрофильным метаногенам (Franzman et al., 1997; Chong et al., 2002). Следует отметить, что родство с *M. frigidum* было отдаленным (94% сходства, табл. 2). Скорее всего, обнаруженный нами филотип является новым видом. Это интересный результат, поскольку на данный момент известны только два рода метаногенов, способных производить метан из ацетата, — *Methanosaeta* и *Methanosarcina* (Lyu, Liu 2018). Ацетат также может быть окислен бактериями до углекислого газа и водорода. Сам по себе этот процесс не приносит энергии. Однако при потреблении водорода метаногенами равновесие смещается, и реакция становится энергетически выгодной (Hattori,

2008). Известны несколько групп бактерий, участвующих в синтрофном окислении ацетата: представители филумов *Firmicutes* (*Thermacetogenium*, *Clostridium*, *Thermotoga*, *Candidatus Contubernalis*, *Candidatus Syntrophonatronum* и *Syntrophaceticus*) и *Proteobacteria* (*Desulfomicrobium*, *Geobacter*) (Hattori, 2008; Westerholm et al., 2010; Kimura et al., 2013; Li et al., 2018; Timmers et al., 2018). В нашем эксперименте в культуре, развивающейся на ацетате, среди бактерий не было ярко выраженного доминанта. Наибольшая относительная численность отмечена для представителей таксонов *Thermotogaceae* (3.5%), GoM-GC232-4463-Bac (порядок *Clostridiales*, 6.2%), livecontrolB21 (порядок *Clostridiales*, 2.1%), *Rhodobacteraceae* (3.5%) и *Desulfobacter* (3.9%). Скорее всего, в накопительной культуре из сипа типичные гидрогенотрофные археи производят метан в синтрофной ассоциации с ацетат-окисляющими бактериальными партнерами. Ими вполне могут быть клостридии. Всего на порядок *Clostridiales* приходится 14% прочтений. Бактерии семейства *Thermotogaceae* тоже могут участвовать в этом процессе. Ранее было показано, что *Thermotogaceae* и гидрогенотрофные метаногены преобладают в накопительных культурах, способных утилизировать длинноцепочечные алканы и ацетат (Cheng et al., 2013; Li et al., 2018).

Остается непонятным активный рост *Methanococcoides methylutens* и *M. alaskense* в культурах, развивающихся на ацетате, в фоновой точке. Этот род архей относится к облигатным метилотрофным метаногенам. Не известно ни одного вида *Methanococcoides*, способного использовать ацетат для продуцирования метана. Представителей этого рода в значительных количествах обнаруживают в морских экосистемах, в том числе в метановых сипах (Lanoil et al., 2005; Omeregie et al., 2009; Roussel et al., 2009; Lin et al., 2010; Lazar et al., 2011; Vigneron et al., 2014). Как правило, для их детекции даже не нужно предварительное культивирование в селективных условиях (Orphan et al., 2001; Pachiadaki et al., 2011). Способность использовать метилированные субстраты помогает этим метаногенам активно развиваться при высоких концентрациях сульфата и не испытывать конкурентного давления со стороны сульфатредукторов. Исследования показывают, что триметиламин является доступным субстратом в морских экосистемах. В донных осадках он может образовываться из лигнина, пектина, бетаина, холина и триметиламин-N-оксида (ТМАО). Бетаин и ТМАО встречаются у многих морских организмов в качестве осмолитов. Способность превращать глицин и бетаин в триметиламин была показана для некоторых сульфатредуцирующих дельтапротеобактерий: представителей родов *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfuromonas* (Hayward, Stadtman, 1959; Fiebig, Gottschalk, 1983; Heijthuijsen, Hansen, 1989). Некоторые представители *Methanococcoides* способны

производить метан из холина и бетаина без бактериального партнера (Watkins et al., 2014; L'Haridon et al., 2014).

В накопительной культуре из сипа с триметиламином и водородом образовалось большое количество метана (33%). Часть прочтений в этом эксперименте была отнесена к роду *Methanosarcina* (13.2%), способному производить метан по гидрогенотрофному, ацетокластическому и метилотрофному путям. Но преобладающим организмом оказались бактерии филума *Gracilibacteria* (15.8%). Первый геном *Gracilibacteria* был получен при секвенировании единичных клеток из гидротермальных источников (Rinke et al., 2013). Позднее были получены еще два генома *Gracilibacteria* из ротовой полости человека. Представители этого филума оказались способны сбраживать глюкозу до ацетата и являются ауксотрофами по многим аминокислотам (Espinoza et al., 2018). Роль *Gracilibacteria* в образовании метана остается неизвестной. В нашем эксперименте почти все прочтения (886 из 908) принадлежали одной ОТЕ, при этом в посевном материале численность *Gracilibacteria* оказалась ниже уровня детекции (0 прочтений). Это говорит о высоком давлении селективных условий и высокой специализации организмов.

По сравнению с метилотрофными, гидрогенотрофные метаногены были менее разнообразны. В культурах из проб, взятых в сипе и в фоновой точке, на среде с углекислым газом и водородом преобладали ОТЕ архей *Methanococcus maripaludis* (сип) и *Methanogenium marinum* (фоновая точка). Оба рода включают типичных гидрогенотрофных метаногенов, способных производить метан, используя водород или формиат и углекислый газ. *M. maripaludis* является мезофильным микроорганизмом и впервые был выделен из солончаков (Jones et al., 1983). В обогащенных органическим веществом донных осадках Тарханкута источником водорода могут служить многочисленные гетеротрофные микроорганизмы, обнаруженные нами ранее (Tarnovetskii et al., 2018). Возможно, метаногенез по гидрогенотрофному пути протекает в подповерхностных горизонтах, где наблюдается истощение сульфата. В накопительной культуре из сипа также многочисленными оказались некультивируемые кластридии (livecontrolB21 и vadinBB60 group), однако об их физиологии на данный момент ничего не известно.

В контрольном варианте (без внесения субстрата) в культуре из метанового сипа наибольшая относительная численность отмечена у бактерий рода *Sulfurimonas* и архей филума *Woesearchaeota*. Бактерии рода *Sulfurimonas* изначально считались патогенами человека и животных. С приходом в микробную экологию молекулярных методов эти микроорганизмы стали обнаруживаться в гидротермальных источниках, морских и наземных экосистемах. Сейчас известно четыре культивируемых вида *Sulfurimonas* (Han, Pernier, 2015).

По последовательности 16S рРНК бактерия, обнаруженная в нашем эксперименте, не похожа ни на один из них. Уровень сходства с ближайшим культивируемым родственником составляет всего 96%. Представители рода *Sulfurimonas* способны использовать соединения серы в качестве донора электронов. Такой тип метаболизма вполне вероятен для микроорганизмов донных осадков сипа.

Филум *Woesearchaeota* относят к некультивируемому археям из суперфилума DPANN. В результате метагеномных исследований показано, что это филогенетически очень разнообразная группа архей. Предположительно, они являются гетеротрофами и развиваются в анаэробных условиях. Возможно, некоторые представители филума *Woesearchaeota* могут вступать в синтрофные отношения с метаногенами, снабжая их ацетатом и водородом (Castelle et al., 2015; Liu et al., 2018).

Таким образом, в ходе проведенных исследований показан высокий потенциал метаногенного сообщества прибрежных метановых сипов полуострова Тарханкут. При этом микробный состав донных осадков сипа сильно отличался от состава осадков фоновой точки. В накопительных культурах, развивавшихся из изучаемых образцов, присутствовали метаногены, способные образовывать метан по гидрогенотрофному и метилотрофному пути. Образование метана из ацетата, скорее всего, проходит по гидрогенотрофному пути благодаря синтрофии метаногенов с бактериями порядка *Clostridiales* и семейства *Thermotogaceae*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят коллектив лаборатории микробной биотехнологии биологического факультета МГУ за помощь в постановке анаэробных накопительных культур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась из средств проекта РФФИ 17-04-00023 и Министерства науки и высшего образования РФ. Анализ результатов высокопроизводительного секвенирования был выполнен из средств гранта РФФИ 17-74-30025.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гулин М.Б., Тимофеев В.А., Бондаренко Л.В. Зообентос в микробиотопах метановых сипов шельфовой зоны крымского побережья // Системы контроля окружающей среды. 2010. № 14. С. 225–229.

- Егоров В.Н., Артемов Ю.Г., Гулин С.Б. Метановые сипы в Черном море: средообразующая и экологическая роль. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. 365 с.
- Калустова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 661–683.
- Kallistova A.Yu., Merkel A.Yu., Tamovetskii I.Yu., Pimenov N.V. Methane Formation and Oxidation by Prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.
- Пименов Н.В., Иванова А.Е. Анаэробное окисление метана и сульфатредукция в бактериальных матах на каралловидных карбонатных постройках в Черном море // Микробиология. 2005. Т. 74. № 3. С. 420–429.
- Pimenov N.V., Ivanova A.E. Anaerobic methane oxidation and sulfate reduction in bacterial mats on coral-like carbonate structures in the Black Sea // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 362–370.
- Поликарпов Г.Г., Егоров В.Н., Нежданов А.И. и др. Явление активного газовыделения из поднятий на свале глубин западной части Черного моря // Докл. АН УССР. 1989. № 12. С. 13–15.
- Bernardino A.F., Levin L.A., Thurber A.R., Smith C.R. Comparative composition, diversity and trophic ecology of sediment macrofauna at vents, seeps and organic falls // PLoS One. 2012. V. 7. P. e33515.
- 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., Huttenhower 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., Yatsunenkov T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.
- Castelle C.J., Wrighton K.C., Thomas B.C., Hug L.A., Brown C.T., Wilkins M.J., Frischkorn K.R., Tringe S.G., Singh A., Markillie L.M., Taylor R.C., Williams K.H., Banfield J.F. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. 690–701.
- Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population // Scand. J. Statistics. 1984. V. 11. P. 265–270.
- Cheng L., Rui J., Li Q., Zhang H., Lu Y. Enrichment and dynamics of novel syntrophs in a methanogenic hexadecane-degrading culture from a Chinese oilfield // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 83. P. 757–766.
- Chong S.C., Liu Y., Cummins M., Valentine D.L., Boone D.R. *Methanogenium marinum* sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization // Antonie Van Leeuwenhoek. 2002. V. 81. P. 263–270.
- Ding H., Valentine D. Methanotrophic bacteria occupy benthic microbial mats in shallow marine hydrocarbon seeps, Coal Oil Point, California // J. Geophys. Res. 2008. V. 113. № G1. P. G01015.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinform. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Espinoza J.L., Harkins D.M., Torralba M., Gomez A., Highlander S.K., Jones M.B., Leong P., Saffery R., Bockmann M., Kuelbs C., Inman J.M., Hughes T., Craig J.M., Nelson K.E., Dupont C.L. Supragingival plaque microbiome ecology and functional potential in the context of health and disease // MBio. 2018. V. 9. e01631-18.
- Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. 2014. V. 2. № 1. P. 6.
- Fiebig K., Gottschalk G. Methanogenesis from choline by a coculture of *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcina barkeri* // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 45. P. 161–168.
- Franzmann P.D., Liu Y., Balkwill D.L., Aldrich H.C., Conway de Macario E., Boone D.R. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 1068–1072.
- Han Y., Perner M. The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Article 989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00989>
- Hattori S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments // Microbes Environ. 2008. V. 23. P. 118–127.
- Hayward H.R., Stadtman T.C. Anaerobic degradation of choline. I. Fermentation of choline by an anaerobic, cytochrome-producing bacterium, *Vibrio cholonicus* n. sp. // J. Bacteriol. 1959. V. 78. P. 557–561.
- Hedlund B.P., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K., Rinke C., Woyke T. Impact of single-cell genomics and metagenomics on the emerging view of extremophile “microbial dark matter” // Extremophiles. 2014. V. 18. P. 865–875.
- Heijthuisen J.H.F.G., Hansen T.A. Betaine fermentation and oxidation by marine *Desulfuromonas* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. P. 965–969.
- Jones W.J., Paynter M.J.B., Gupta R. Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment // Arch. Microbiol. 1983. V. 135. P. 91–97.
- Kimura Z., Okabe S. Acetate oxidation by syntrophic association between *Geobacter sulfurreducens* and a hydrogen-utilizing exoelectrogen // ISME J. 2013. V. 7. P. 1472–1482.
- L'Haridon S., Chalopin M., Colombo D., Toffin L. *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 1978–1983.
- Lanoil B.D., La Duc M.T., Wright M., Kastner M., Nealson K.H., Bartlett D. Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 54. P. 167–177.
- Lazar C.S., Parkes R.J., Cragg B.A., L'Haridon S., Toffin L. Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 2078–2091.
- Lever M.A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A.B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B.B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 476.
- Li D., Ran Y., Chen L., Cao Q., Li Z., Liu X. Instability diagnosis and syntrophic acetate oxidation during thermophilic digestion of vegetable waste // Water Res. 2018. V. 139. P. 263–271.
- Lin Y.-S., Biddle J.F., Lipp J.S., Orcutt B.N., Holler T., Teske A., Hinrichs K.-U. Effect of storage conditions on archaeal and bacterial communities in subsurface marine sediments // Geomicrobiol. J. 2010. V. 27. P. 261–272.
- Liu X., Li M., Castelle C.J., Probst A.J., Zhou Z., Pan J., Liu Y., Banfield J.F., Gu J.D. Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineage-

- es // *Microbiome*. 2018. V. 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0488-2>
- Lyu Z., Liu Y. Diversity and taxonomy of methanogens // *Biogenesis of hydrocarbons* / Eds. Stams J.M., Sousa D. New York: Springer Int. Publishing, 2018. P. 1–59.
- Merkel A.Y., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Y., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // *Extremophiles*. 2017. V. 21. P. 307–317.
- Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel V., Blumenberg M., Knittel K., Gieseke A., Peterknecht K., Pape T., Boetius A., Amann R., Jørgensen B.B., Widdel F., Peckmann J., Pimenov N.V., Gulin M.B. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane // *Science*. V. 297. P. 1013–1015.
- Omeregje E.O., Niemann H., Mastalerz V., de Lange G.J., Stadnitskaia A., Mascle J., Foucher J.-P., Boetius A. Microbial methane oxidation and sulfate reduction at cold seeps of the deep Eastern Mediterranean Sea // *Mar. Geol.* 2009. V. 261. P. 114–127.
- Orphan V.J., Hinrichs K.U., Ussler W., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P., Hayes J.M., Delong E.F. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments // *Appl. Environ Microbiol.* 2001. V. 67. P. 1922–1934.
- Pachiadaki M.G., Kallionaki A., Dahlmann A., De Lange G.J., Kormas K.A. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano // *Microb. Ecol.* 2011. V. 62. P. 655–668.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. Database iss. P. D590–D596.
- Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A., Ivanova N.N., Anderson I.J., Cheng J.F., Darling A., Malfatti S., Swan B.K., Gies E.A., Dodsworth J.A., Hedlund B.P., Tsiamis G., Sievert S.M., Liu W.T., Eisen J.A., Hallam S.J., Kyrpides N.C., Stepanauskas R., Rubin E.M., Hugenholtz P., Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter // *Nature*. 2013. V. 499. P. 431–437.
- Roussel E.G., Sauvadet A.-L., Allard J., Chaduteau C., Richard P., Bonavita M.-A.C., Chaumillon E. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France) // *Geomicrobiol.* 2009. V. 26. P. 31–43.
- Schloss P.D., Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil // *PLoS Comput. Biol.* 2006. V. 2. P. 92. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092>
- Tarnovetskii I.Y., Merkel A.Y., Kanapatskiy T.A., Ivanova E.A., Gulin M.B., Toshchakov S., Pimenov N.V. Decoupling between sulfate reduction and the anaerobic oxidation of methane in the shallow methane seep of the Black Sea // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny235>
- Timmers P.H.A., Vavourakis C.D., Kleerebezem R., Sinninghe Damsté J.S., Muyzer G., Stams A.J.M., Sorokin D.Y., Plugge C.M. Metabolism and occurrence of methanogenic and sulfate-reducing syntrophic acetate oxidizing communities in haloalkaline environments // *Front. Microbiol.* 2019. V. 9. Article 3039.
- Vigneron A., Cruaud P., Roussel E.G., Pignet P., Caprais J.C., Callac N., Ciobanu M.C., Godfroy A., Cragg B.A., Parkes R.J., Van Nostrand J.D., He Z., Zhou J., Toffin L. Phylogenetic and functional diversity of microbial communities associated with subsurface sediments of the Sonora Margin, Guaymas Basin // *PLoS One*. 2014. V. 9. e104427.
- Vigneron A., L'Haridon S., Godfroy A., Roussel E.G., Cragg B.A., Parkes R.J., Toffin L. Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the sonora margin cold seeps // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 3451–3459.
- Watkins A.J., Roussel E.G., Parkes R.J., Sass H. Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococoides* spp.) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 289–293.
- Westerholm M., Roos S., Schnürer A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter // *FEMS Microbiol. Lett.* 2010. V. 309. P. 100–104.

Analysis of Cultured Methanogenic Archaea from the Tarkhankut Peninsula Coastal Methane Seeps

I. Yu. Tarnovetskii¹, A. Yu. Merkel², and N. V. Pimenov^{2, *}

¹Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: npimenov@mail.ru

Received May 7, 2019; revised June 24, 2019; accepted June 25, 2019

Abstract—The major substrates for methanogenesis were used for investigation of cultured methanogenic archaea from coastal methane seeps near the Tarkhankut Peninsula, Black Sea. Analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed that growth of the classical methanogenic *Euryarchaeota* occurred in all enrichments but was absent in the controls without the substrates. Enrichments from the seep differed in microbial composition from those from the background point. The most numerous archaea belonged to the genera *Methanobolus* (medium with methanol and hydrogen), *Methanosarcina* (trimethylamine and hydrogen), *Methanococoides* (trimethylamine), and *Methanococcus* (hydrogen and CO₂). Syntrophic growth of hydrogenotrophic archaea of the genus *Methanogenium* with clostridia and members of the family *Thermotogaceae* probably occurred in enrichments with acetate. Relatively low similarity of the recovered 16S rRNA gene sequences with the closest cultured relatives (94% and lower) indicated that the *Methanogenium* phylotype belonged to a new species. The same was true for the *Methanosarcina* phylotype revealed in the culture with trimethylamine and hydrogen (97% and less similarity of the 16S rRNA gene sequences to those of the closest cultured relatives).

Keywords: Black Sea, methane seep, bottom sediments, methanogens, *Methanococoides*, *Methanogenium*, *Methanobolus*