ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЭРОБНЫХ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРИБРЕЖНЫХ ОСАДКАХ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА

© 2020 г. Е. Н. Тихонова^{*a*, *}, И. Ю. Тарновецкий^{*a*}, Т. В. Малахова^{*b*}, М. Б. Гулин^{*b*}, А. Ю. Меркель^{*a*}, Н. В. Пименов^{*a*}

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, 119071 Россия ^bФедеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского" РАН, Севастополь, 299011 Россия *e-mail: katerina_inmi@mail.ru Поступила в редакцию 30.04.2020 г. После доработки 27.05.2020 г. Принята к публикации 05.06.2020 г.

Исследованы интенсивность процесса окисления метана и разнообразие метанокисляющих микроорганизмов в поверхностных слоях донных отложений в прибрежных районах Крымского полуострова Черного моря. На основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S pPHK выявлены организмы, относящиеся к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Methylococcales*. В местах непрерывного газовыделения доля метанотрофов в составе бактериального сообщества была высока (до 2.1% от общего количества прочтений), что позволяло выявлять их методом секвенирования нативных образцов. В местах непостоянных высачиваний, формирующихся в летне-осенний период, метанотрофы представляли минорный компонент сообщества, их детекция стала возможной лишь благодаря инкубированию осадков в среде с метаном. Низкая степень сходства по 16S pPHK с известными метанотрофами позволяет предположить, что отдельные организмы являются представителями новых таксонов видового и родового уровней.

Ключевые слова: метанокисляющие бактерии, высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК, накопительные культуры, метановые сипы, Черное море **DOI:** 10.31857/S002636562006018X

Метановые сипы, представляющие собой струйные или диффузные высачивания газа из морского дна, широко распространены в океанских экосистемах (Judd, Hovland, 2009). За последние десятилетия обнаружены тысячи новых полей газовых выделений в пределах континентальных окраин различных географических поясов. В большинстве случаев в составе углеводородных газов преобладает метан и его гомологи (Boetius, Wenzhöfer, 2013; Ruff et al., 2015). Уже более 100 лет известна специфическая группа микроорганизмов — метанотрофных бактерий, способных использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии (Bowman, 2006).

В глубоководных районах океана с низкой продуктивностью в зонах разгрузки метана формируются уникальные бентосные сообщества, основу трофической цепи которых составляют аэробные метанокисляющие бактерии и анаэробные метанотрофные археи (Sibuet, Olu, 1998; Levin, 2005; Knittel, Boetius, 2009; Ritt et al., 2011). За последние годы на основании данных метагеномного анализа собран достаточно обширный

массив данных по филогенетическому разнообразию микроорганизмов, формирующих микробные маты/обрастания на поверхности осадочных отложений в зонах газовых высачиваний. а также в толще подстилающих осадков (Ruff et al., 2015). Установлено, что в восстановленных осадочных отложениях морских водоемов процесс окисления метана происходит при участии консорциума метанотрофных архей и сульфатредуцирующих бактерий (Boetius et al., 2000; Knittel, Boetius, 2009), а в поверхностных окисленных осадках окисление метана обеспечивают аэробные метанотрофы порядка Methylococcales (Boetius, Wenzhofer, 2013; Ruff et al., 2015). Метан, выделяющийся из сипов, находящихся на глубинах 100 м и более, обычно не достигает поверхности, благодаря жизнедеятельности микробных сообществ в осадках и водной толще. Именно поэтому суммарный поток метана в атмосферу из глубоководных сипов и газонасыщенных осадков относительно невелик (McGinnis et al., 2006).

Мелководные сипы, напротив, в зависимости от глубины залегания и интенсивности высачива-

ний, составляют основную часть эмиссии метана с поверхности морских акваторий в атмосферу. При небольшой толщине водного столба и наличии кислорода аэробное окисление метана в верхних слоях осадка и на границе раздела осадок—вода может быть преобладающим процессом снижения потока метана (Vielstädte et al., 2017).

О составе и функционировании метанотрофных сообществ, населяющих экосистемы мелководных сипов, известно не так много. Показано, что, независимо от географического положения и геогидрохимических характеристик сипов, типичными представителями аэробных сообществ метанокисляющих бактерий (МОБ) являются представители Methylococcales (Ruff et al., 2015). Присутствие метанотрофов I типа в условиях низких концентраций кислорода объясняется рядом метаболических характеристик. Известно, что штамм Methylococcus NCIB 11083 может использовать запасные вешества в условиях кислородного голодания, получая достаточное количество энергии для синтеза белка в отсутствие метана (Roslev, King, 1995). Использование альтернативных акцепторов электронов, таких как нитрат, для осуществления окисления метана в бескислородных местах обитания показано для порядка Methylococcales (Costa et al., 2017; Martinez-Cruz et al., 2017).

В Черном море метановые сипы были обнаружены более 30 лет назад на свале глубин северо-западного шельфа Черного моря в интервале глубин 60-300 м (Егоров и соавт., 2011). На протяжении последних десятилетий карта распространения метановых сипов существенно расширилась и охватывает не только шельф и континентальный склон, но также и глубоководные районы. Микробные сообщества, формирующиеся в зонах струйных газовых выделений в анаэробную водную толщу континентального склона, достаточно подробно исследованы. Их основу составляют консорциумы метанотрофных архей кластеров ANME 1, ANME 2 и сульфатредуцирующих бактерий (Michaelis et al., 2002; Basen et al., 2011). В последние годы нами проведены исследования активности микробиологических процессов в осадочных отложениях полей метановых газовыделений, расположенных в прибрежных мелководных зонах Крымского полуострова (Малахова и соавт., 2015). Разгрузка газа в этих районах происходит в аэробную водную толщу, поэтому здесь основную барьерную функцию на пути выноса метана в водную толщу и атмосферу выполняют аэробные метанотрофные бактерии. Процессы аэробного окисления метана были измерены нами в поверхностных осадках района метановых сипов Севастопольской бухты (Пименов и соавт., 2013), бухты Ласпи (Малахова и соавт., 2015), а также в районе мыса Тарханкут (Tarnovetskii et al.,

2018). Методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК в поверхностном горизонте осадков из зоны высачивания метана выявлено присутствие метанотрофных бактерий (представлены семейством *Methylococcaceae* и составляют 0.13% от всех бактериальных последовательностей). Однако этих данных явно недостаточно, поскольку в прибрежной зоне Крымского полуострова обнаружены многочисленные поля метановых сипов, заметно отличающиеся как по интенсивности газовыделений, так и по активности микробных процессов и микробных сообществ, формирующихся в зонах газовых высачиваний.

В этой связи целью настоящей работы было выявление метанотрофных бактерий, обеспечивающих процессы аэробного окисления метана в зонах метановых сипов и газонасыщенных осадках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Донные осадки из различных районов метановых газопроявлений прибрежной зоны мелководных осадков Крымского полуострова были отобраны в августе 2018 г. с использованием водолазов (рис. 1). В табл. 1 представлены координаты точек пробоотбора, а также краткая характеристика полученных образцов осадков.

Измерение скорости окисления метана радиоизотопным методом. Немедленно после подъема на борт судна отбирали образцы донных осадков для измерения содержания и скорости окисления метана, а также для проведения молекулярнобиологического анализа и посевов на минеральную среду. Содержание метана в придонной воде и донных отложениях измеряли на газовом хроматографе Кристалл-2000 ("ЗАО СКБ Хроматэк", Россия) с пламенно-ионизационным детектором методом фазово-равновесной дегазации. Погрешность измерения не превышала 5%. Скорость окисления метана (MO) определяли радиоизотопным методом с¹⁴С-метаном, растворенным в дегазированной дистиллированной воде. В пробу осадка вносили 1 мкКи ¹⁴С-метана. Контролем служили пробы, фиксированные щелочью и выдержанные в холодильнике 6 ч до внесения меченого субстрата. После внесения меченого метана образцы донных осадков инкубировали в течение 1 сут при температуре, близкой к *in situ* $(17-23^{\circ}C)$. Дальнейшую обработку образцов проводили по методике, подробно описанной ранее (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006).

Определение состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Для анализа состава микробного сообщества методом высокопроизводительного секвенирования пробы донных осадков помещали в 2 мл пробирки и центрифугировали 5 мин



Рис. 1. Расположение зон отбора образцов.

при 14000 g. Супернатант сливали, к осадку добавляли раствор, содержащий 0.15 M NaCl и 0.1 M Na₂ЭДТА в соотношении 1 : 1. В таком виде образцы транспортировали в лабораторию при температуре 4—10°С. ДНК выделяли, используя механическое и химическое разрушение клеток по методике, описанной ранее (Пименов и соавт., 2018).

Библиотеки 16S рРНК получали с помощью двух последовательных ПЦР. Первая реакция была проведена с помощью готовой смеси KTNmix-HS ("Евроген", Россия). В ходе первой реакции амплифицировали V3–V4 участок 16S рРНК с использованием праймеров 341F/805R (Takahashi et al., 2014). Программа первой реакции была следующей: предварительная денатурация при 95°С 5 мин; 28 циклов (денатурация – 95°С 30 с, отжиг праймеров – 56°С 30 с, элонгация – 72°С 30 с); финальная элонгация — 72°С 5 мин. Полученные ампликоны были использованы в качестве матрицы для второй реакции с уникальными индексными праймерами Illumina (TruSeq). Для второй реакции использовали HS Taq полимеразу с 10× Taq Тигьо буфером ("Евроген", Россия). Программа была следующей: предварительная денатурация при 95°C 5 мин; 7 циклов (денатурация – 95°C 30 с, отжиг праймеров – 59°С 30 с, элонгация – 72°С 30 с); финальная элонгация – 72°С 5 мин. Обе реакции проводили на амплификаторе Т100 ("Bio-Rad", США).

Секвенирование проводили на системе MiSeq ("Illumina", США) с использованием набора реа-

гентов, обеспечивающего длину прочтения 300 нуклеотидов с каждого конца ампликона. Первичную обработку данных, формирование ОТЕ таблицы и анализ альфа разнообразия проводили в ПО Qiime версии 1.9.0 (Caporaso et al., 2010) по методике, описанной ранее (Пименов и соавт., 2018).

Построение филогенетического дерева на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S pPHK было проведено с использованием ПО IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) по алгоритму maximum likelihood и с применением ultrafast bootstrap (Minh et al., 2013) анализа. Полученные последовательности были депонированы в NCBI под номерами MT371238– MT371251.

Получение и анализ накопительных культур. Для получения накопительных культур метанотрофных бактерий использовали минеральную среду следующего состава: (г/л): $KNO_3 - 0.25$; $NH_4Cl - 0.25$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.4$; $CaCl_2 - 0.1$; NaCl - 4.0; $Na_2HPO_4 - 0.358$; $KH_2PO_4 - 0.13$. Микроэлементы 1 мл/л состава: (мг/100 мл): нитрилтриуксусная кислота (HTA) – 150; $MnSO_4 \cdot 2H_2O - 50$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 10$; $CoCl_2 - 10$; $ZnSO_4 - 10$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O - 1$; $AlK(SO_4)_2 - 1$; $H_3BO_3 - 1$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 1$; pH готовой среды составлял 6.8–7.2.

Во флаконы объемом 120 мл помещали 20 мл среды, 0.5 г образца осадка, герметично закрывали резиновой пробкой. В газовую фазу шприцом

· 1	•				
Место отбора пробы, горизонт, см, наименование образца	Координаты	Глубина, м	Краткая характеристика осадков	Содержание метана, мкмоль/л	Скорость окисления метана, мкмоль/дм ³ сут
Бухта Ласпи	44.420818° N;	2.5	Сип функционирует круглогодично,	0.8	0.12
(0—10 см), Laspi0-5; Laspi5-10	33.706990° E		осадки представлены слабо заиленным песком, окисленные до глубины 10 см	1.7	0.05
Мыс Тарханкут, сип (0-2 см), Thk0-2	45.355641° N; 32.730627° E	4.5	Алевропелиовый ил с примесью песка и детрита, газопроявление обычно происходит в летне-осенний период	1.79	0.26
Мыс Феофан, наилок (0–0.5 см), Feof1	44.5594° N; 33.4002° E	10	Газонасыщенные детритные отложения на дне скальной трещины, покрытые бактериальной пленкой, формируются в летний период	2.3	0.06
Херсонесская (Голубая) бухта, наилок (0–0.5 см), GB22	44.5647° N; 33.3993° E	5	Локальные темные пятна заиленного газонасыщенного песка, покрытые беловатой пленкой микробных обрастаний, газопроявление наблюдается в летне-осенний период	0.48	0.03
Мраморная бухта, наилок (0—0.5 см), 7k Mr	44.5008° N; 33.5143° E	6	Газонасыщенные детритные отложения с примесью крупнозерни- стого песка и мелкой гальки, покрытые бактериальной пленкой, формируются в летний период	3.47	0.53

Таблица 1. Характеристика осадков

добавляли 30% метана. Инкубировали статично при комнатной температуре в течение месяца.

После инкубации отбирали аликвоты образца объемом 2 мл. Выделение тотальной ДНК и секвенирование фрагментов гена 16S рРНК производили аналогично описанной выше методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика сайтов исследования и активности окисления метана. Исследования проводились в прибрежных районах Крымского полуострова на мелководье, где глубина не превышала 10 м (рис. 1). Места отбора проб осадков были выбраны на основании предварительных данных, где ранее нами и коллегами из ФИЦ ИНБЮМ РАН постоянно или сезонно регистрировались газовые высачивания. Так, песчанистые осадки из бухты Ласпи (табл. 1) были отобраны непосредственно из точки непрерывного высачивания пузырьков газа. Осадки поля диффузного высачивания метана в районе мыса Тарханкут в период пробоотбора в августе 2018 г. характеризовались практически полным отсутствием окисленного слоя. Поверхность осадков была покрыта слабым беловатым налетом из нитчатых и одноклеточных

тионовых бактерий, развивающихся за счет подтока сероводорода из подстилающих восстановленных осадков с высокой интенсивностью сульфатредукции (Тарновецкий и соавт., 2019). Похожая структура осадков наблюдалась и в других исследованных районах газопроявлений (мыс Фиолент, бухты Херсонесская и Мраморная), где под слоем белесых бактериальных матов располагались сильно восстановленные детритные илы. Солержание метана в исследованных поверхностных осадках варьировало от 0.48 до 3.47 мкмоль/л. причем наибольшая концентрация наблюдалась в осадках бухты Мраморная, а наименьшая в бухте Херсонесская. Скорости окисления метана изменялись в диапазоне значений от 0.03 до 0.53 мкмоль/дм³ сут. Наибольшая интенсивность окисления метана наблюдалась в Мраморной бухте, наименьшая – в Херсонесской бухте (табл. 1).

Идентификация метанотрофов в нативных осадках. В результате секвенирования для нативных образцов было получено 1760—5369 последовательностей 16S рРНК со средней длиной 424 нуклеотида (табл. 2). Покрытие разнообразия филотипов, рассчитанное с помощью метода Chao1 (Chao, 1984), варьировало от 57.2 до 85.2%. Такое покрытие не позволяет нам с полной уверенно-

	_			
Образец	Число прочтений	Число ОТЕ	Chao1	Глубина покрытия, %
		Нативные образцы		
7k Mr	4051	953	1280	74.4
Feof1	5338	283	331	85.2
GB22	5595	551	789	69.7
Laspi0-5	3497	1006	1351.8	74.4
Laspi5-10	1760	715	968.0	73.8
Thk0-2	5369	1045	1825.2	57.2
	Н	акопительные культур	Ы	1
7k	38613	627	692.8	90.4
F1	5774	449	584.3	76.8
G22	30619	282	307.0	91.8
L0-5	18843	325	383.0	84.8
L5-10	21948	340	369.6	91.9
T0-2	16459	939	1002.7	93.6

Таблица 2. Результаты секвенирования и оценка альфа разнообразия

Таблица 3. Таксономическое разнообразие метанотрофов в образцах ила бухты Ласпи

Организм (№ в GenBank)	Число прочтений, отнесенное к ОТЕ		Ближайший культивируемый	Откуда изолирован	Сходство,
	Laspi0-5	Laspi5-10	родственник		70
Clone260 (MT371238)	28	10	Methylomonas methanica MC09 (CP002738.1)	Морская вода, Penarth, Великобритания	97.31
Clone 270 (MT371239)	18	0	<i>Methylococcaceae</i> bacterium изолят FA (KU896789.1)	Метановые сипы Тихоокеанского побережья Северной Америки	95.54
Clone 22680 (MT371242)	4	0	Methylomonas sp. GYJ3 (DQ149125.1)	Юменское нефтяное месторождение, Китай	92.54
Clone 1716 (MT371240)	3	0	Methylococcaceae bacterium SF-BR (AB453959.1)	Морская вода, Сан-Франциско, США	100
Clone 23996	3	10	Methylobacter marinus B-3087 (LT220840.1)	Ил эвтрофного озера, Украина	92.33
Clone 22944 (MT371243)	3	21	Methyloprofundus sedimenti WF1 (KF484906.1)	Морские глубоководные осадки у побережья Калифорнии, США	100
Clone 22337 (MT371241)	10	15	Methyloprofundus sedimenti WF1 (KF484906.1)	Морские глубоководные осадки у побережья Калифорнии, США	97.89

стью говорить о выявлении всех минорных групп микроорганизмов, но его достаточно для выявления доминирующих таксонов. Для накопительных культур было получено 132256 прочтений генов 16S рРНК, а покрытие составило 76.8—91.9%. Такого количества прочтений достаточно для подробной характеристики микробного сообщества (табл. 2).

Метанокисляющие бактерии были обнаружены в осадках, отобранных в бухте Ласпи (осадок 0-5 и 5-10 см). Последовательности, полученные в ходе секвенирования, принадлежали представителям *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* (табл. 3).

Таксономическое разнообразие метанотрофов было выше в верхних слоях осадка, где выявлены представители *Methylococcaceae*, отнесенные в 7 ОТЕ. Их доля составляла 2.7% от общего числа прочтений всех прокариот. В осадке более глубоких слоев (5–10 см) метанотрофные бактерии также были представлены *Methylococcaceae*, одна-



Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S pPHK и отображающее положение выявленных в ходе данного исследования ОТЕ. Дерево построено с использованием ПО IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) по алгоритму maximum likelihood и с применением ultrafast bootstrap (Minh et al., 2013) анализа (1000 повторов, процентные значения указаны в местах ветвления, значения ниже 70% не показаны).

ко их разнообразие было ниже – 4 ОТЕ, составлявшие 1.7%.

Анализ накопительных культур. Секвенирование и филогенетический анализ первичных накопительных культур после инкубирования в среде с метаном показали большее разнообразие метанокисляющих бактерий (рис. 2).

Для накопительных культур из бухты Ласпи (L0-5 и L5-10) было показано присутствие метанотрофов родов *Methylobacter* (36.2% от общего числа прочтений всех прокариот) и *Methylomonas* (23.5% от общего числа прочтений). Большое количество ОТЕ (8 ОТЕ, 12.5% прочтений для накопительной культуры L0-5 и 13.1% прочтений для накопительной культуры L5-10) принадлежало метанотрофу *Methylicorpusculum oleiharenae* XLMV4 (сходство до 97.65% по 16S pPHK). Представители рода *Methyloprofundus* обнаружены не были (в отличие от данных секвенирования нативных образцов). В накопительной культуре T0-2, полученной из образца, отобранного в районе сипа (Тарханкут, осадки 0–2 см) обнаружены метанотрофы, относящиеся к родам *Methylobacter* и *Methylomonas*.

В накопительной культуре из образца 7к (осадок из Мраморной бухты) показано наличие последовательностей, относящихся, по крайней мере, к 4 организмам, близкородственным родам *Methylobacter*, *Methylicorpusculum*.

В накопительной культуре G22 (Херсонесская, Голубая бухта) детектирован метанотроф, ближайшим организмом для которого является *Methylococcus* sp. LS7-MC (90.16% идентичности по 16S pPHK), выделенный из осадков термального источника рифтовой долины (Эфиопия).

В накопительных культурах, полученных из образцов, отобранных вблизи мыса Феофан (осадки и обрастания), также показано присутствие разных метанотрофов, ближайшими филогенетическими родственниками для которых являлись роды *Methylobacter* (98.82–99.53% идентичности по 16S pPHK), *Methylomonas* (98.88–100%) и *Methylicorpusculum* (97.66%).

ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании процесса микробного окисления метана мы ограничивались только верхними окисленными и слабовосстановленными горизонтами осадочной толщи, где возможно протекание аэробного окисления метана при участии метанотрофных бактерий. Активность метанокисления (МО) была выявлена нами во всех исследованных осадках, однако скорости процесса были достаточно низкими. Прежде всего, следует отметить песчанистые осадки бухты Ласпи с низким содержанием тонкодисперсной фракции органического вещества. Здесь невысокие скорости МО могут быть следствием значительной потери метана при отборе образцов. В детритных отложениях остальных исследованных районов газообразный метан удерживался значительно лучше, поэтому полученные нами данные интенсивности МО в этих осадках более достоверны.

Секвенирование последовательностей гена 16S рРНК нативных образцов выявило присутствие представителей аэробных метанокисляющих бактерий только в поверхностных осадках, отобранных непосредственно из активного метанового сипа в бухте Ласпи. На наш взгляд это не случайно, поскольку метановые высачивания происходят в бухте Ласпи на протяжении всего года и, несмотря, на значительный промыв песчанистых отложений, позволяют метанотрофным микроорганизмам стабильно функционировать независимо от климатических и гидрологических факторов. В образцах из бухты Ласпи доля ОТЕ метанотрофов составила 2.1% в верх-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 89 № 6 2020

нем и 1.7% в подповерхностном горизонтах осадка соответственно.

Микроорганизмы, обнаруженные нами в пробах нативных осадков в бухте Ласпи, являются типичными представителями морских экосистем. Согласно Lüke, Frenzel (2011), последовательности, детектируемые в морских экосистемах, группируются в 5 больших кластеров, называемых "Deep-Sea clusters" 1-5, и включают метанотрофов I типа. Данные группы представлены в основном некультивируемыми организмами, которые участвуют в окислении метана как в толще воды, так и в донных отложениях (Hayashi et al., 2007; Li et al., 2014). Кластер "Deep-Sea" 1 представлен родом Methyloprofundus, в котором на данный момент лишь один вид удалось культивировать в лабораторных условиях (Tavormina et al., 2014). Для этой группы характерно образование эндосимбиотических связей с мидиями Bathymodiolus (Pasulka et al., 2017). В нашем исследовании 39% всех ОТЕ метанотрофов из осадка бухты Ласпи относились к роду Methyloprofundus – последовательности ОТU22944 имели 100% сходства с Methyloprofundus sedimenti WF1, а для группы ОТU22337 сходство с некультивируемым *Methylo*profundus sp. составляло 98.12%. В то же время, в накопительных культурах эти организмы детектированы не были.

"Deep-Sea" 2 формирует единый филогенетический кластер с организмами родов *Methylomonas* и *Methylomarinum* (Knief, 2015). В нашем исследовании этот кластер представлен организмами *Methylomonas* sp., составлявшими наибольшее количество ОТЕ. Степени родства с культивируемыми метанотрофами были невысокими и составляли 92.5–97.3%.

В верхнем слое осадка обнаружены организмы, близкие метанотрофам, детектируемым в аэробных зонах осадков и водной толщи, в то время как нижний слой (5–10 см) содержал метанотрофы, более устойчивые к низким концентрациям кислорода и обитающие в анаэробных слоях пресноводных экосистем или глубоководных морских осадках (табл. 3).

После инкубирования образцов на среде с метаном были дополнительно выявлены представители родов *Methylobacter* и *Methylicorpusculum*. Ближайшие к ним организмы приурочены к пресноводным осадкам. Род *Methylicorpusculum* описан в 2020 г. и включает 1 вид — *Methylicorpusculum oleiharenae* XLMV4. Это аэробная метанокисляющая бактерия, выделенная из окисленного поверхностного слоя нефтеносных песков (Альберта, Канада). Организм наиболее близок к *Methylobacter marinus* A45^T (97.2% идентичности по последовательности гена 16S рРНК).

Структура аэробных метанотрофных сообществ Черного моря рассматривается в работах

Schubert et al. Отбор образцов производили на северо-востоке Черного моря в районе Крымского полуострова с глубин 76-2088 м в районах струйных газовыделений и диффузных просачиваний. В аэробной водной толще методом FISH было показано, что доля метанотрофных бактерий составляет от 0.2 до 13.6% от всех бактерий. Самые высокие показатели были обнаружены в районах глубоководных сипов (12.9%) и мелководных участках (13.6%). 90% клеток метанотрофов относились к I типу (Durisch-Kaiser et al., 2005). Также были исследованы глубоководные области западной части центрального бассейна Черного моря. Использование real-time ПЦР с последующим разделением ампликонов методом ДГГЭ и филогенетическим анализом позволило выявить присутствие метанотрофов І типа, ближайшими родственниками для которых были представители рода Methylomonas и некультивируемые Gam*maproteobacteria*. (Schubert et al., 2006). Несмотря на некоторые отличия, общая структура метанотрофного сообщества, описанная в этих работах, не противоречит результатам нашего исследования.

В поверхностных песках в зоне разгрузки мелководных метановых сипов вблизи острова Эльба (Средиземное море) методом пиросеквенирования были выявлены ключевые организмы процесса — *Methylococcaceae*, которые составляли отдельную группу организмов, представляющую, вероятно, новый род, наиболее близкий к *Methylomonas* (Taubert et al., 2019).

Метанотрофное сообщество других исследованных нами поверхностных осадков районов газопроявления существенно отличалось от бухты Ласпи. Связано это, в первую очередь, с принципиально другой литологической структурой осадка и характером протекания в них биогеохимических и микробиологических процессов. Высокая концентрация детрита приводит к активизации в теплое время года процессов деструкции органического вещества, в том числе сульфатредукции, как терминальной фазы разложения ОВ. Устойчивый поток сероводорода приводит к практически полному исчезновению окисленного слоя в осадках и формированию на поверхности осадочных отложений бактериальных обрастаний/матов, основу которых составляют сероокисляющие бактерии разных таксономических групп (Брюханов и соавт., 2018; Пименов и соавт., 2018). Такие условия практически полного отсутствия кислорода в условиях градиентного подтока сероводорода не являются оптимальными для развития метанотрофных бактерий, что вполне согласуется с результатами наших исследований. В поверхностном слое газонасыщенных осадков Херсонесской, Мраморной бухт и м. Феофан метанотрофные бактерии являлись минорным компонентом (менее 1%), что не позволяло достоверно детектировать их в нативных образцах осадочных отложений.

Измеренные скорости окисления метана в таких осадках могут быть следствием анаэробного окисления метана, осуществляемого консорциумом метанотрофных архей и сульфатредуцирующих бактерий. Для обнаружения жизнеспособных компонентов метанотрофного сообщества нами были созданы селективные условия для развития данной группы бактерий в лабораторных условиях на специфической минеральной среде. Молекулярно-биологический анализ подтвердил присутствие метанотрофов, относящихся к Gammaproteobacteria семейства Methylococcaceae, во всех накопительных культурах (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что обнаруженные метанотрофы были близки к метанотрофным бактериям, обитающим в пресноводных экосистемах. В частности, выявленные нами микроорганизмы были филогенетически близки к представителям Methylococcaceae (Rahalkar et al., 2008), широко распространенных в водной толще и донных осадках Боденского озера (Германия), а также в осадках озера Вашингтон (США) (Beck et al., 2013).

Обнаружение метанотрофных бактерий, филогенетически близких к метанотрофам континентальных пресных озер в прибрежных мелководных осадках Крымского полуострова, может быть следствием особенностей геологической структуры подстилающих пород в зонах метановых газопроявлений. Ранее мы уже отмечали, что локальные пятна газонасыщенных осадков и их сезонное проявление может быть результатом разгрузки пресноводных подземных вод (Малахова и соавт., 2015; Пименов и соавт., 2018). Обнаружение "пресноводных" меатанотрофов свидетельствует в пользу этого предположения.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были проанализированы осадки, отобранные в районах мелководных газовых сипов и диффузных высачиваний метана. Более высокое разнообразие сообщества метанотрофных бактерий наблюдалось в б. Ласпи, где происходит постоянное высачивание пузырькового газа. В остальных исследованных районах, где в летне-осенний период аэробные метанотрофные бактерии составляют минорную долю сообщества, их выявление оказалось возможным исключительно с использование культуральных методов с последующим секвенированием и филогенетическим анализом накопительных культур.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН В.П. Чекалову и Е.А. Ивановой за помощь в организации и проведении экспедиционных работ, а также отбора образцов донных осадков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 17-04-00023, а также из средств госбюджета ФИЦ Биотехнологии РАН и ФИЦ ИнБЮМ РАН (АААА-А18-118020890090-2; АААА-А18-118021490093-4).

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.

ВКЛАД АВТОРОВ

Подбор площадок для проведения исследований, проведение отбора и описание образцов проведен Т.В. Малаховой и М.Б. Гулиным. Измерение скоростей окисления метана проведено Н.В. Пименовым и И.Ю. Тарновецким. Выделение ДНК из нативных образцов и накопительных культур, а также секвенирвание гена 16S рРНК выполнено И.Ю. Тарновецким. Накопительные культуры получены Е.Н. Тихоновой. Филогенетическое дерево построено А.Ю. Меркелем. Текст статьи написан Н.В. Пименовым, Е.Н. Тихоновой и И.Ю. Тарновецким. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Брюханов А.Л., Власова М.А., Малахова Т.В., Перевалова А.А., Пименов Н.В. Филогенетическое разнообразие бактерий цикла серы в донных осадках Херсонесской бухты // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 279–290.

Bryukhanov A.L., Vlasova M.A., Perevalova A.A., Pimenov N.V., Malakhova T.V. Phylogenetic diversity of the sulfur cycle bacteria in the bottom sediments of the Chersonesus Bay // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 372–381.

Егоров В.Н., Артемов Ю.Г., Гулин С.Б. Метановые сипы в Черном море: средообразущая и экологическая роль / Под ред. Поликарпова Г.Г. Севастополь: НПЦ "ЭКОСИ-Гидрофизика", 2011. 405 с.

Малахова Т.В., Канапацкий Т.А., Егоров В.Н., Малахова Л.В., Артёмов Ю.Г., Евтушенко Д.Б., Гулин С.Б., Пименов Н.В. Микробные процессы и генезис струйных метановых газовыделений прибрежных районов Крымского полуострова // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 743–752.

Malakhova T.V., Egorov V.N., Malakhova L.V., Artemov Y.G., Evtushenko D.B., Gulin S.B., Kanapatskii T.A., Pimenov N.V. Microbial processes and genesis of methane gas jets in the coastal areas of the Crimean Peninsula // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 838–845.

Пименов Н.В., Егоров В.Н., Канапацкий Т.А., Малахова Т.В., Артемов Ю. Г., Сигалевич П.А., Малахова Л.В. Микробные процессы круговорота метана и сульфат-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 89 № 6 2020

редукция в осадках акватории Севастопольских бухт // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 614–624.

Pimenov N.V., Kanapatskii T.A., Sigalevich P.A., Egorov V.N., Malakhova T.V., Artemov Y.G., Malakhova L.V. Sulfate reduction and microbial processes of the methane cycle in the sediments of the Sevastopol Bay // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 618–627.

Пименов Н.В., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Малахова Т.В., Самылина О.С., Канапацкий Т.А., Тихонова Е.Н., Власова М.А. Структура микробных матов в прибрежных районах Мраморной бухты // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 561–572.

Pimenov N.V., Merkel A.Y., Samylina O.S., Kanapatskii T.A., Tikhonova E.N., Vlasova M.A., Tarnovetskii I.Y., Malakhova T.V. Structure of microbial mats in the Mramornaya Bay (Crimea) coastal areas // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 681–691.

Тарновецкий И.Ю., Меркель А.Ю., Пименов Н.В. Анализ культивируемых форм метаногенных архей прибрежных метановых сипов полуострова Тарханкут // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 665–672.

Basen M., Krüger M., Milucka J., Kuever J., Kahnt J., Grundmann O., Meyerdierks A., Widdel F., Shima S. Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 1370–1379.

Beck D.A.C., Kalyuzhnaya M.G., Malfatti S., Tringe S.G., Glavina del Rio T., Ivanova N., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae* // PeerJ. 2013. V. 1. e23.

Boetius A., Revenschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Armann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // Nature. 2000. V. 407. P. 623–626.

Boetius A., Wenzhofer F. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps // Nature Geosci. 2013. V. 6. P. 725–734.

Bowman J. The methanotrophs – the families *Methylococ-caceae* and *Methylocystaceae* // Prokaryotes. New York: Springer, 2006. V. 5. P. 266–289.

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. 335–336.

Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population // Scand. J. Statistics. 1984. V. 11. P. 265–270.

Costa R.B., Okada D.Y., Martins T.H., Foresti E. Aerobic methanotrophs grew under anoxic conditions and supported a diverse heterotrophic bacterial community // Environ. Eng. Sci. 2017. V. 35. P. 804–814.

Durisch-Kaiser E., Klauser L., Wehrli B., Schubert C. Evidence of intense Archaeal and Bacterial methanotrophic activity in the Black Sea water column // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 8099–8106.

Hayashi T., Obata H., Gamo T., Samo Y., Naganuma T. Distribution and phylogenetic characteristics of the genes encoding enzymes relevant to methane oxidation in oxygen minimum zones of the eastern Pacific Ocean // Res. Environ. Sci. 2007. V. 1. P. 275–284.

Judd A., Hovland M. Seabed Fluid Flow: The Impact on Geology, Biology and the Marine Environment. Cambridge University Press, 2009. 408 p.

Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1346.

Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 311–334.

Levin L.A. Ecology of cold seep sediments: interactions of fauna with flow, chemistry and microbes // Oceanogr. Mar. Biol. 2005. V. 43. P. 1–46.

Li M., Jain S., Baker B.J., Taylor C., Dick G.J. Novel hydrocarbon monooxygenase genes in the metatranscriptome of a natural deep-sea hydrocarbon plume // Environ. Microbiol. 2014. V. 16. P. 60–71.

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

Martinez-Cruz K., Leewis M.-C., Herriott I.C., Sepulveda-Jauregui A., Anthony K.W., Thalasso F., Leigh M.B. Anaerobic oxidation of methane by aerobic methanotrophs in sub-Arctic lake sediments // Sci. Total Environ. 2017. V. 607–608. P. 23–31.

McGinnis D.F., Greinert J., Artemov Y., Beaubien S.E., Wüest A. Fate of rising methane bubbles in stratified waters: how much methane reaches the atmosphere? // J. Geophys. Res-Oceans. 2006. V. 111. P. 1–15.

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 fuelled by anaerobic oxidation of methane // Science. 2002. V. 297. P. 1013–1015.

Minh B.Q., Nguyen M.A.T., von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 1188–1195.

Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 268–274.

Pasulka A.L., Goffredi S.K., Tavormina P.L., Dawson K.S., Levin L.A., Rouse G.W., Orphan V.J. Colonial tube-dwelling ciliates influence methane cycling and microbial diversity within methane seep ecosystems // Front. Marine Sci. 2017. V. 3. Article 276.

Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. In situ activity studies in thermal environments // Methods Microbiol. 2006. V. 35. P. 29–53.

Rahalkar M., Deutzmann J., Schink B., Bussmann I. Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of Lake Constance (Germany) // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 75. P. 119–126.

Ritt B., Pierre C., Gauthier O., Wenzhöfer F., Boetius A., Sarrazin J. Diversity and distribution of cold-seep fauna associated with different geological and environmental settings at mud volcanoes and pockmarks of the Nile deep-sea fan // Mar. Biol. 2011. V. 158. P. 1187–1210.

Roslev P., King G.M. Aerobic and anaerobic starvation metabolism in methanotrophic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1563–1570.

Ruff S.E., Biddle J.F., TeskeA.P., Knitte K., Boetius A., Ramette A. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 4015–4020.

Schubert C.J., Coolen M.J.L., Neretin L.N., Schippers A., Abbas B., Durisch-Kaiser E., Wehrli B., Hopmans E.C., Sinninghe Damsté J.S., Wakeham S., Kuypers M.M.M. Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 1844–1856.

Sibuet M., Olu K. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins // Deep-Sea Res. II. 1998. V. 45. P. 517–567.

Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation aequencing // PLoS One. 2014. V. 9. e105592.

Tarnovetskii I. Yu., Merkel A. Yu., 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. I. 21. Article fny 235.

Taubert M., Grob C., Crombie A., Howat A.M., Burns O.J., Weber M., Lott C., Kaster A-K., Vollmers J., Jehmlich N., von Bergen M., Chen Y., Murrell J.C. Communal metabolism by Methylococcaceae and Methylophilaceae is driving rapid aerobic methane oxidation in sediments of a shallow seep near Elba, Italy // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. P. 3780– 3795.

Tavormina P.L., Hatzenpichler R., McGlynn S., Chadwick G., Dawson K.S., Connon S.A., Orphan V.J. Methyloprofundus sedimenti 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. 2014. V. 65. P. 251–259.

Vielstädte L., Haeckel M., Karstens J., Linke P., Schmidt M., Steinle L., Wallmann K. Shallow gas migration along hydrocarbon wells-an unconsidered, anthropogenic source of biogenic methane in the North Sea // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. P. 10262–10268.

746

Identification of Aerobic Methane-Oxidizing Bacteria in Coastal Sediments of the Crimean Peninsula

E. N. Tikhonova^{1,} *, I. Yu. Tarnovetskii¹, T. V. Malakhova², M. B. Gulin², A. Yu. Merkel¹, and N. V. Pimenov¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia *e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Received April 30, 2020; revised May 27, 2020; accepted June 5, 2020

Methane oxidation rates and diversity of methane-oxidizing microorganisms in the upper sediment layers of the Crimean Peninsula coastal regions (Black Sea) were investigated. Analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed microorganisms of the class *Gammaproteobacteria*, order *Methylococcales*. At the sites of continuous gas seepage, the percentage of methanotrophs in the bacterial community was high (up to 2.1% of the total read number), which made it possible to detect them by sequencing of the native samples. At the sites of intermittent gas seepage formed during summer and autumn, methanotrophs were minor components of the communities and could be detected only after incubation of the sediment samples in the presence of methane. Low similarity between their 16S rRNA sequences and those of the known methanotrophs indicates that some organisms probably belong to new taxa of the species and genus levels.

Keywords: methane-oxidizing bacteria, high-throughput 16S rRNA gene sequencing, enrichment cultures, methane seeps, Black Sea