

МЕТАНОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АЭРОБНЫХ МЕТАНОТРОФОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ОСАДКАХ МОРЯ ЛАПТЕВЫХ

© 2021 г. Е. Н. Тихонова^{а, *}, В. В. Кадников^б, И. И. Русанов^а, А. В. Белецкий^б, Е. Е. Захарова^а,
О. С. Самылина^а, Н. В. Равин^б, Н. В. Пименов^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^бИнститут биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2021 г.

После доработки 22.01.2021 г.

Принята к публикации 23.01.2021 г.

Исследованы интенсивность процесса окисления метана и разнообразие метанооксиляющих микроорганизмов в поверхностных слоях донных отложений моря Лаптевых в районе метановых сипов, в авандельте р. Лены, краевого шельфа и верхнего участка склона вне прямого влияния сипов и речного выноса. Наибольшие концентрации метана и величины скорости метаноокисления были выявлены на сиповых станциях и составляли до 1.16 мкмоль CH_4 дм⁻³ сут⁻¹. Основным продуктом микробного окисления метана для всех исследованных образцов являлась углекислота. На основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК выявлены организмы, относящиеся к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Methylococcales*. В местах непрерывного газовыделения доля метанотрофов в составе бактериального сообщества была высока (до 1.93% от общего количества прочтений), что позволяло выявлять их методом секвенирования нативных образцов. Филогенетическое разнообразие метанооксиляющих бактерий было невелико, все детектированные последовательности принадлежали организмам, входящим в кластер “Deep-Sea” 1. На филогенетическом дереве последовательности формировали отдельный кластер вместе с родом *Methyloprofundus*. В накопительных культурах, полученных из образцов осадков прибрежных станций, были обнаружены представители родов *Methylomonas* и *Methylobacter*, близкие к метанотрофам, населяющим пресноводные экосистемы.

Ключевые слова: метанооксиляющие бактерии, интенсивность микробного окисления метана, высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК, накопительные культуры, метановые сипы, море Лаптевых

DOI: 10.31857/S0026365621030150

Одной из серьезных экологических проблем современности является постоянное и значительное увеличение в атмосфере концентрации метана (CH_4), который обладает существенно большей способностью к формированию парникового эффекта, чем углекислый газ.

Эмиссия метана с поверхности океанов составляет в среднем 14 (от 5 до 25 по оценкам разных исследователей) Тг (миллионов тонн) С/год (Saunio et al., 2016). Это примерно 4% от общих выбросов из естественных источников и 1.9% от общей эмиссии метана в атмосферу.

Было показано, что важнейшим источником эмиссии метана в атмосферу являются мелководные шельфовые моря Восточной Арктики (МВА):

Лаптевых, Восточно-Сибирское и Чукотское (Shakhova et al., 2010, 2014).

Шельф морей Восточной Арктики характеризуется целым рядом особенностей, которые делают его исключительным с точки зрения цикла углерода. Благодаря географическому положению и особенностям седиментации, МВА являются регионом, особенно благоприятным для накопления в их донных отложениях огромных запасов органического углерода (Гинсбург, Соловьев, 1994). Мощные осадочные бассейны, которые формируются в условиях пассивной континентальной окраины, создают благоприятные условия для метаногенеза и формирования залежей метана в донных отложениях. Благодаря длительному суб-аэральному промерзанию и формированию зон

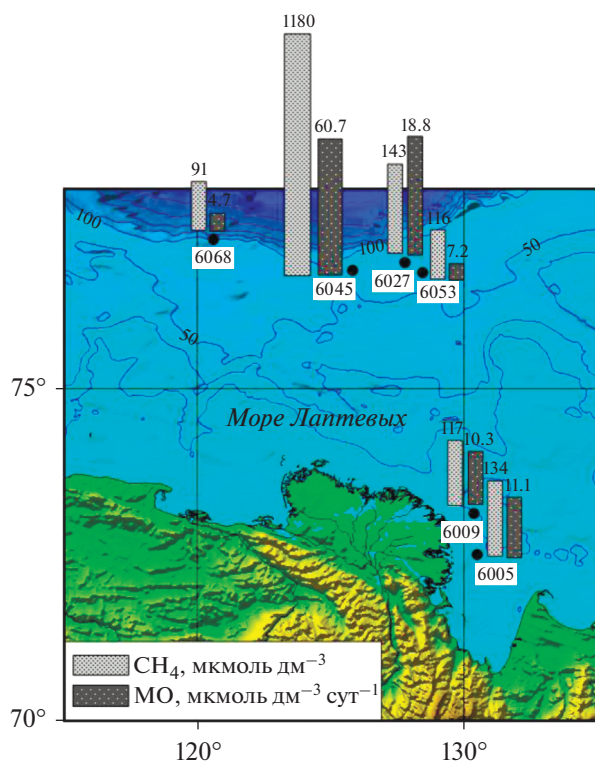


Рис. 1. Карта-схема расположения исследованных станций, распределение интегральных величин (расчитанных под 1 м² для верхних 10 см осадка) (1) концентрации метана (CH₄, мкмоль/дм³) и (2) интенсивности микробного окисления метана (МО, мкмоль/дм³ сут) в море Лаптевых.

стабильности газогидратов, сохранение метана в таких залежах определяется состоянием мерзлоты (Romanovskii et al., 2005). Глобальное потепление климата в арктическом регионе сопровождается уменьшением зоны мерзлоты осадочной толщи и высвобождением метана в виде локальных сипов (Shakhova et al., 2014).

Значительная часть метана окисляется в верхних слоях осадка и толще воды, не достигая атмосферы (James et al., 2016). Относительно низкий суммарный поток метана в атмосферу из морских экосистем напрямую связан с эффективным микробным фильтром, функционирующим в морских отложениях и водной толще, способным окислять более 80% выделяющегося метана. Процессы метанобразования и метаноокисления в биогеохимически активных зонах Северного Ледовитого океана активно изучаются на протяжении более 30 лет (Охотское, Баренцево, Карское, Лаптевых, Белое, Чукотское моря) (Леин и соавт., 1994, 1996; Pimenov et al., 1999; Леин и соавт., 2000; Саввичев и соавт., 2000, 2004, 2007). Результаты этих исследований позволили количественно оценить интенсивности микробных процессов метаногенеза в донных осадках и сопоставить их со скоростями микробного окисления метана в осадках и водной

толще других морских регионов. Однако данные о таксономическом разнообразии и функциональной активности отдельных филогенетических групп метаноокисляющих бактерий фрагментарны.

В связи с этим целью данной работы была оценка разнообразия и активности аэробных метаноокисляющих микроорганизмов в поверхностных осадках моря Лаптевых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Пробы донных осадков были отобраны в ходе 73-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в октябре 2018 г. в море Лаптевых. Для данной работы взяты поверхностные осадки на 6 станциях из 3 различных районов (рис. 1). Две станции (АМК6005 и АМК6009) располагались в районе влияния дельты р. Лены. Три станции находились в районе краевого шельфа. Из них две располагались в районе метановых сипов (АМК6027 и АМК6045), а одна (АМК6053) являлась фоновой, не подверженной прямому влиянию сипов. Еще одна станция (АМК6068) отобрана в верхней части континентального склона. Координаты отбора и описание исследованных осадков приведены в табл. 1.

В работе использован комплекс радиоизотопных, газо-геохимических, микробиологических и молекулярно-биологических методов. Немедленно после подъема на борт судна коробчатого дночерпателя типа “Vox-corer” вставляли в осадок пластиковую трубку диаметром 15 см и отбирали осадочный керн. Затем в судовой лаборатории послойно отбирали образцы донных осадков для измерения содержания и скорости окисления метана, проведения молекулярно-биологического анализа и посевов на селективную минеральную среду для метанотрофов.

Концентрацию метана в придонной воде и донных отложениях измеряли на газовом хроматографе Кристалл-2000-М (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором методом фазово-равновесной дегазации (Egorov, Ivanov, 1998). Погрешность измерения не превышала 5%.

Измерение скорости окисления метана радиоизотопным методом. Скорость окисления метана (МО) определяли радиоизотопным методом с ¹⁴C-метаном, растворенным в дегазированной дистиллированной воде. Из каждого горизонта ненарушенные осадки в количестве 2.5 см³ отбирали пластиковыми шприцами (общий объем 5 см³) с резиновым поршнем и обрезанным краем, герметично закрывали пробкой из бутиловой резины. 0.2 мл меченого ¹⁴C-метана (1 мКи на пробу) вносили туберкулиновым шприцем, прокалывая резиновую пробку иглой по центру и равномерно

Таблица 1. Характеристика станций отбора образцов, исследованных в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш”

Место отбора пробы, горизонт, см	Координаты	Глубина, м	Краткая характеристика осадков	Хлорид, мг/л	Сульфат, мг/л
АМК73-6005 0–4 см	72°30' с.ш. 130°29.94' в.д.	14	Песчано-алевритовый ил с небольшой примесью мелкозернистого песка, окисленный, темно-коричневый Гетерогенный слой алеврита	8040	1190
4–20 см				10550	1550
АМК73-6009 0–2 см	73°6.9' с.ш. 130°22.44' в.д.	23	Пелитовый алеврит, сметанообразный, окисленный. Граница с нижележащим слоем постепенная Пелитовый алеврит темно-серый, мягкий, со следами биотурбации и рыжими пятнами. Граница плавная	11670	1700
2–10 см				10100	1400
АМК73-6027 (метановый сип) 0–1 см	76°53.52' с.ш. 127°47.82' в.д.	64	Алевритово-песчаный наилок, коричневый, окисленный Алевритово-песчаный ил серого цвета с трубками вестиментифер. Граница с нижележащим слоем постепенная	14250	2100
1–6 см				9850	1700
АМК73-6045 (метановый сип) 0–3 см	76°46.44' с.ш. 125°50.16' в.д.	72	Песчанистый алеврит, полужидкий, окисленный, коричневого цвета. Граница с нижележащим слоем резкая Песчанистый алеврит светло-серого цвета, мягкий. Граница с нижележащим слоем резкая	12700	2100
3–7 см				13670	2230
АМК73-6053 (фоновая станция) 0–4 см	76°44.34' с.ш. 128°27.18' в.д.	65	Пелитовый алеврит коричневого цвета, окисленный, полужидкий. Граница с нижележащим слоем постепенная Пелитовый алеврит мягкий, однородный	13500	2390
4–10 см				12850	2180
АМК73-6068 0–1 см	77°14.76' с.ш. 120°36.84' в.д.	185	Алевритовый песок, полужидкий, окисленный. Граница с нижележащим слоем постепенная Песчаный алеврит мягкий, с неравномерными включениями линз более плотного осадка. Граница с нижележащим слоем постепенная	11600	1800
2–5 см				11900	1850

распределяя субстрат по длине шприца с осадком. Контролем служили пробы, фиксированные 1 мл 0.5 н раствора КОН и выдержанные в холодильнике 6 ч до внесения меченого субстрата. После внесения меченого метана образцы донных осадков инкубировали в течение 2 сут при температуре, близкой к температуре *in situ*. После инкубации пробы фиксировали и транспортировали в стационарную лабораторию для дальнейшего определения продуктов микробного окисления и трансформации С-метана: в углекислоту (CO₂), в биомассу микроорганизмов (БМ) и в растворенный органический углерод (РОУ) в составе растворенного органического вещества (РОВ). Обработку проб и расчеты интенсивности метаноокисления

проводили по ранее описанной методике (Русанов и соавт., 1998; Ivanov et al., 2002). Радиоактивность (¹⁴C) продуктов микробного процесса МО измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике PackardTRI-CarbTR 2400 (США). Для расчетов численных показателей интенсивности образования продуктов микробного окисления и трансформации углерода метана использовали среднюю величину, полученную из двух повторностей измерений для каждого образца.

Определение состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК. Суммарная ДНК была выделена из 3 г осадка с помощью DNeasy PowerMax Soil Kit (“Qiagen”, Carlsbad, CA, США). ПЦР фрагменты

гена 16S рРНК были получены с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGG-GDBGWCWSCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVG-GGTHTCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 ("Illumina", США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads ("Beckman Coulter", Brea, CA, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была подсчитана с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit ("Invitrogen", Carlsbad, CA, США). Затем все ПЦР фрагменты были смешаны в равных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 × 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации с использованием алгоритма Usearch. Таксономическая идентификация была выполнена по базе SILVA v.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Полученные последовательности были депонированы в GenBank NCBI в рамках проекта PRJNA679168.

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; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; CaCl_2 – 0.1; NaCl – 20.0; KCl – 1.5; Na_2HPO_4 – 0.358; KH_2PO_4 – 0.13. Микроэлементы 1 мл/л состава: (мг/100 мл): нитрилтриуксусная кислота (НТА) – 150; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 50; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10; CoCl_2 – 10; ZnSO_4 – 10; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – 1; H_3BO_3 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1; pH готовой среды составлял 6.8–7.2.

Во флаконы объемом 120 мл помещали 10 мл среды, 0.5 г образца осадка, герметично закрывали резиновой пробкой. В газовую фазу шприцем добавляли 30% метана. Инкубировали статично при 15°C в течение 1 мес.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика районов исследования и микробного окисления метана. На рис. 1 представлено расположение станций отбора образцов. Две станции располагались в авандельте р. Лены (ст. АМК73-6005 и АМК73-6009), две станции в районе метановых сипов (АМК73-6027 и АМК73-

6045) и две станции были условно фоновыми, не подверженными прямому влиянию выноса реки или метановых сипов – в районе краевого шельфа (АМК73-6053) и верхнего склона (АМК73-6068). На каждой станции было исследовано 3–4 горизонта осадка от поверхности до глубины 8–10 см. Глубины станций отбора, а также некоторые характеристики исследованных осадков представлены в табл. 1. Верхние 2–4 см всех осадков были представлены окисленными алеврито-песчанистыми или алеврито-пелитовыми илами. Глубже осадки приобретали сероватый оттенок, характерный для слабо окисленных или слабо восстановленных илов.

Содержание метана в верхних горизонтах большинства исследованных станций характеризовалось достаточно высокими величинами и варьировало в интервале 1–2 мкмоль дм^{-3} . Исключение составляют осадки станции АМК73-6045, расположенной в зоне сипа. Концентрация метана на этой станции уже в верхнем горизонте осадка составляла 2.6 мкмоль дм^{-3} , а к 10 см практически линейно увеличилась на порядок до 20.3 мкмоль дм^{-3} (рис. 1 и 2, табл. 2).

Послойное распределение концентрации метана по горизонтам, в верхнем 10 см слое, также различалось для осадков из разных районов отбора. На станциях авандельты (АМК73-6005 и АМК73-6009) и на станции (АМК73-6068) верхней части склона после поверхностного относительного максимума следовал подповерхностный минимум (рис. 2). Затем с глубиной концентрация метана плавно нарастала. Это может объясняться схожестью в скоростях осадконакопления, наличием лабильного органического вещества на поверхности и интенсивностью микробиологических процессов. В осадках краевого шельфа, как в районе сипов (ст. АМК73-6027 и АМК73-6045), так и на фоновой станции АМК73-6053, слабо подверженной влиянию сипов, наблюдался другой профиль в распределении метана. Начиная от поверхности, концентрация метана практически линейно, плавно или резко, нарастала с глубиной осадка. Максимальное увеличение детектировано на "сиповой" станции АМК73-6045 (рис. 2).

Наибольшие величины скорости МО выявлены в поверхностных окисленных горизонтах 0–1 и 1–3 см осадочной толщи (рис. 2). Ниже окисленной зоны активность метанотрофов резко снижалась на всех исследованных станциях. Максимальные значения величин МО зафиксированы на сиповой станции АМК73-6045, где от поверхностных горизонтов к глубине 1–3 см скорость процесса возрастала в 2 раза от 0.56 до 1.16 мкмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, а затем на глубине 3–7 см резко уменьшалась до 0.4 мкмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ (рис. 2).

Профиль распределения продуктов микробного окисления и трансформации углерода мета-

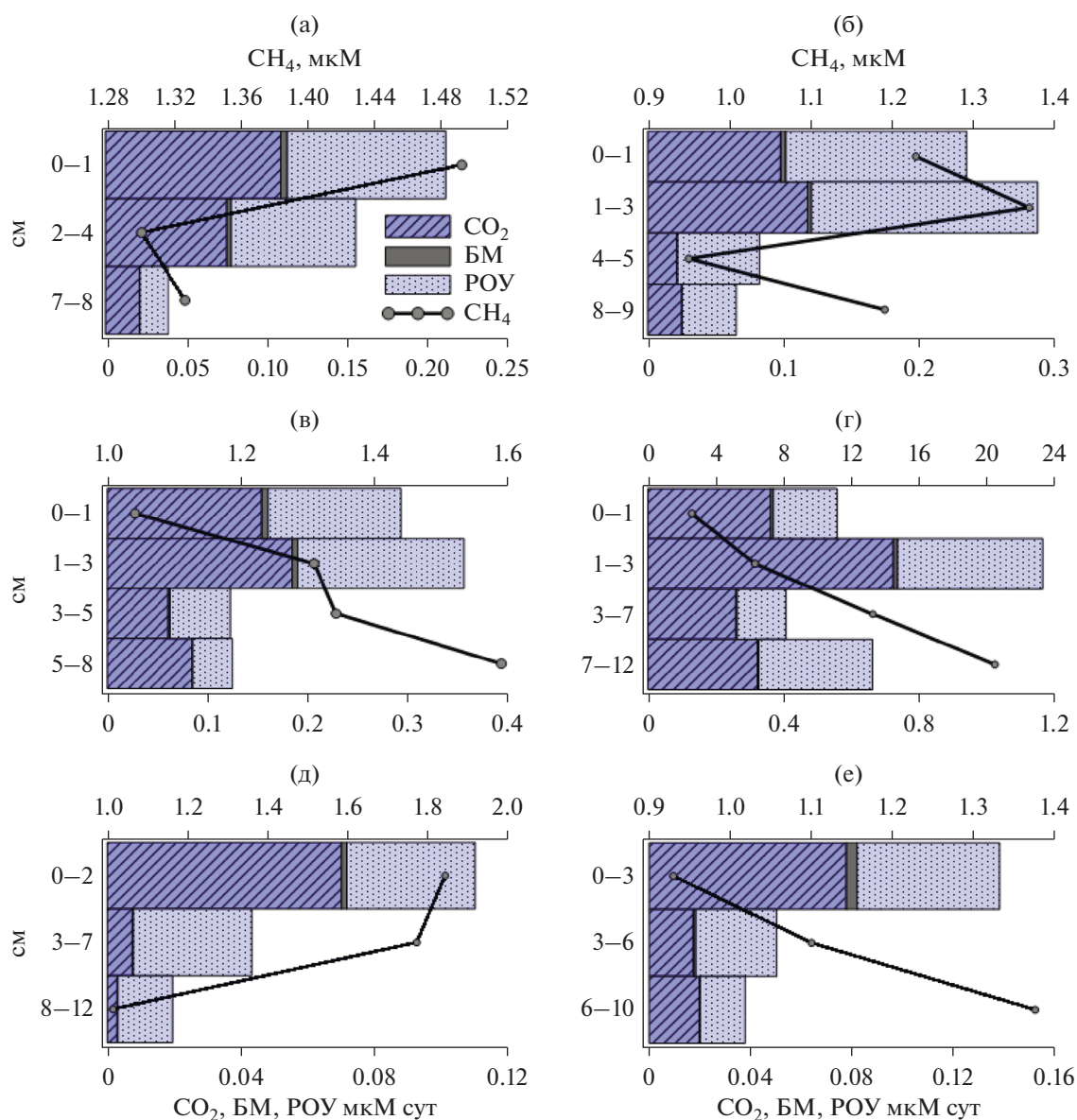


Рис. 2. Профили распределения величин концентрации метана (мкмоль/дм^3) и интенсивности микробного окисления метана ($\text{мкмоль/дм}^3 \text{сут}$) в верхних горизонтах исследованных станций в море Лаптевых: а, б – авандельта р. Лены (ст. АМК73-6005 и АМК73-6009); в, г – станции над сипами (АМК73-6027 и АМК73-6045); д, е – станция верхнего склона (АМК73-6068) и фоновая станция на шельфе (АМК73-6053).

на (до НСO_3^- , БМ и РОУ) на большинстве станций различался между собой. При этом во всех исследованных осадках наблюдалась общая закономерность. Основным продуктом микробной утилизации метана для всех исследованных образцов являлся НСO_3^- (до 68%), в экзометаболиты (РОУ) переходит 30–60% углерода метана, а в биомассу включается до 2%. Исключение составляет осадок с глубины 10 см станции АМК73-6068, где до СО_2 окисляется лишь 17% метана.

Характеристики накопительных культур. Первичные накопительные культуры содержали

большое количество минеральных частиц из образца осадка, поэтому визуально оценить рост метанооксиляющих микроорганизмов было практически невозможно. Последующие пересевы на минеральную среду с метаном в качестве источника углерода показали стабильный рост для культур, полученных из образцов осадков со станций АМК73-6005 и АМК73-6009. Равномерный рост характерен для культуры 11L и хлопьевидный рост для культур 13L, 14L и 16L. В фазах экспоненциального и линейного роста преобладали одиночные клетки или диплоформы, в фазе замедленного роста и стационарной фазе за счет

Таблица 2. Содержание метана и активность его окисления в образцах осадков, отобранных в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш”

Место отбора пробы, горизонт, см	Содержание метана, мкМ	Скорость окисления метана, мкМ сут	Включение C-CH ₄ в CO ₂ , мкМ сут (%)	Включение C-CH ₄ в БМ, мкМ сут (%)	Включение C-CH ₄ в РОУ, мкМ сут (%)
АМК73-6005					
0–1 см	1.49	0.21	0.109 (52)	0.004 (2)	0.098 (46)
2–4 см	1.30	0.16	0.076 (48)	0.003 (2)	0.077 (50)
7–8 см	1.33	0.04	0.021 (54)	0.000 (1)	0.018 (45)
АМК73-6009					
0–1 см	1.23	0.197	0.098 (50)	0.004 (2)	0.095 (48)
1–3 см	1.37	0.227	0.117 (52)	0.003 (1)	0.106 (47)
4–5 см	0.95	0.042	0.021 (51)	0.000 (1)	0.020 (48)
АМК73-6027					
0–1 см	1.04	0.293	0.154 (53)	0.006 (2)	0.133 (45)
1–3 см	1.31	0.356	0.185 (52)	0.005 (2)	0.166 (47)
3–5 см	1.34	0.123	0.61 (50)	0.002 (1)	0.060 (49)
5–8 см	1.59	0.125	0.85 (68)	0.001 (1)	0.040 (32)
АМК73-6045					
0–1 см	2.58	0.554	0.359 (65)	0.008 (1)	0.187 (34)
1–3 см	6.27	1.155	0.718 (62)	0.012 (1)	0.425 (37)
3–7 см	13.17	0.404	0.257 (64)	0.003 (1)	0.143 (36)
АМК73-6053					
0–3 см	0.93	0.138	0.078 (56)	0.004 (3)	0.56 (41)
3–6 см	1.10	0.050	0.017 (35)	0.001 (2)	0.32 (63)
6–10 см	1.38	0.038	0.020 (52)	0.000 (1)	0.18 (47)
АМК73-6068					
0–1 см	1.8	0.110	0.070 (64)	0.002 (1)	0.038 (35)
10 см	1.0	0.020	0.003 (17)	0.000 (1)	0.016 (82)

выделяемой метанотрофами слизи образовывались скопления, которые выглядели как хлопья.

Идентификация метанотрофов в нативных осадках и накопительных культурах. В результате секвенирования фрагментов генов 16S рРНК для нативных образцов и первичных накопительных культур было получено 4202726 и 187820 последовательностей соответственно. Дальнейшая их кластеризация и анализ по базе SILVA выявили метанотрофных бактерий, относящихся к порядку *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* (рис. 3).

Таксономическое разнообразие метанотрофов в нативных образцах оказалось невелико, были выявлены представители *Methylococcaceae*, отнесенные только к 4 ОТЕ (табл. 3). Их доля составляла от 0.01 до 1.93% от общего числа последовательностей всех микроорганизмов. На филогенетическом дереве последовательности формировали отдельный кластер вместе с родом *Methyloprofundus* (рис. 3).

В результате секвенирования и филогенетического анализа первичных накопительных культур

после инкубирования в среде с метаном были выявлены метанооксиляющие бактерии, отличные от организмов в нативных осадках (рис. 3).

Для накопительных культур 11L (культура получена из образца со станции АМК73-6005, 0–1 см), 13L (АМК73-6005, 7–8 см), 14L (АМК73-6009, 0–1 см) и 16L (АМК73-6009, 4–5 см) было получено дополнительно 5 ОТЕ, относящихся к метанотрофам (табл. 4).

В накопительных культурах обнаружены метанотрофы родов *Methylomonas* (0.01–18.78% от общего числа прочтений) и *Methylobacter* (9.64–61.88% от общего числа последовательностей). Представители рода *Methyloprofundus* выявлены не были (в отличие от данных секвенирования для нативных образцов).

ОБСУЖДЕНИЕ

Микробные сообщества осадков Арктических морей активно изучаются с применением мето-

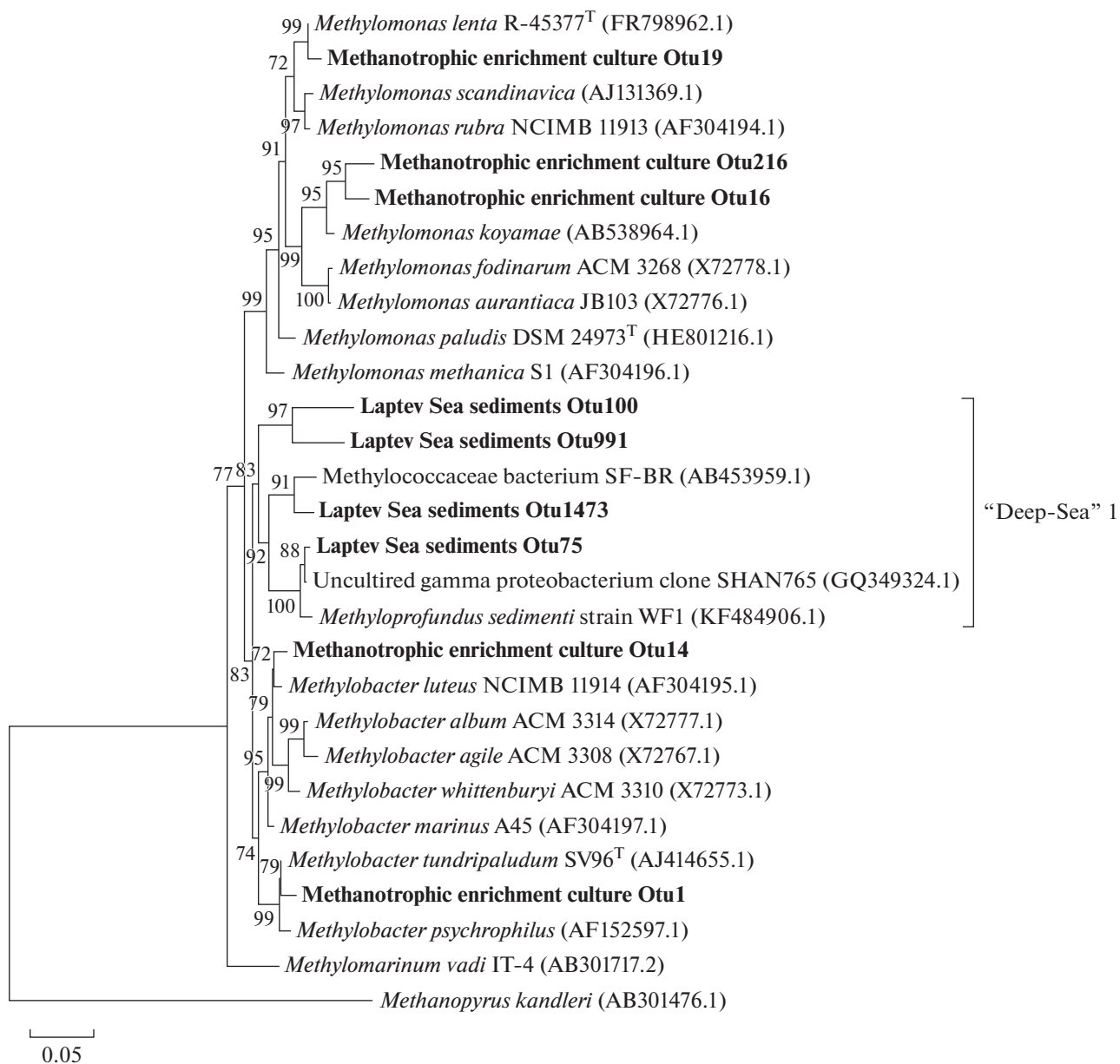


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S рНК и отображающее положение выявленных в ходе данного исследования ОТЕ.

дов молекулярной биологии (Koch et al., 2009; Kirchman et al., 2010; Zeng et al., 2013; Lin et al., 2017). При анализе результатов секвенирования гена 16S рНК основное внимание, как правило, уделяется крупным таксонам на уровне семейств и выше (Bienhold et al., 2012; Yergeau et al., 2017; Savvichev et al., 2018). Детекция метанотрофов методом секвенирования гена 16S рНК в сложных микробных сообществах затруднена ввиду того, что эти физиологические группы не являются монофилетическими, и их доля в сообществе обычно невелика (Baptiste, 2005; Knittel, 2009).

Микробиологические исследования метановых сипов в Арктических морях вызывают особый интерес, поскольку в районах газовых высачиваний формируются уникальные бентосные сообщества, основу трофической цепи которых составляют метанотрофные бактерии и археи (Pimenov et al., 1999; Pimenov et al., 2000; Lösekann et al., 2007; Savvichev et al., 2018).

Для сравнения на каждой станции нами были рассчитаны интегральные величины для верхнего 10-сантиметрового слоя с площадью 1 м². Распределение интегральных величин концентрации метана и интенсивности его микробного окисления были

Таблица 3. Таксономическое разнообразие и относительное обилие метанотрофов в образцах ила моря Лаптевых (% от всего сообщества)

Организм (ОТЕ)	АМК73-6005		АМК73-6009		АМК73-6027			АМК73-6045			АМК73-6053			АМК73-6068		
	горизонт, см															
	0–1	7–8	0–1	3–7	0–1	3–5	5–8	0–1	1–3	3–7	0–3	3–6	6–10	0–2	10	
ОТЕ75	0.01	—	0.02	0.01	1.04	0.66	1.93	0.96	0.48	0.14	0.02	0.01	—	—	—	
ОТЕ1473	0.01	—	—	—	0.39	0.01	0.01	0.13	0.02	—	0.11	—	—	0.06	—	
ОТЕ991	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	
ОТЕ1000	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Примечание. ОТЕ, принадлежащие метанотрофам, не выявлены.

Таблица 4. Таксономическое разнообразие и относительное обилие метанотрофов в первичных накопительных культурах (% от всего сообщества)

Организм (ОТЕ)	Ближайший культивируемый родственник	% сходства	11L	13L	14L	16L
ОТЕ19	<i>Methylomonas lenta</i>	99	11.37	2.05	0.00	0.01
ОТЕ216	<i>Methylomonas koyamae</i>	96	0.02	2.51	0.00	0.00
ОТЕ16	<i>Methylomonas koyamae</i>	97	7.39	0.02	0.00	0.00
ОТЕ14	<i>Methylobacter marinus</i>	98	0.12	0.14	0.20	22.75
ОТЕ1	<i>Methylobacter tundripaludum</i>	99	9.53	43.17	53.76	39.13

сходными на станциях авандельты р. Лены (ст. АМК73-6005 и АМК73-6009), фоновой станции краевого шельфа (АМК73-6053) и станции верхнего склона (АМК73-6068). На “сиповой” станции АМК73-6027 эти величины были несколько выше, а на ст. АМК73-6045 многократно превосходили значения, полученные на других станциях (рис. 1).

Присутствие метанотрофных бактерий было показано на всех исследованных станциях в результате секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. Их доля в сообществе резко возрастала в осадках, отобранных в районах метановых сипов (станции АМК73-6027 и АМК73-6045), что обусловлено высоким содержанием метана глубинного происхождения. Данные о процентном соотношении метанотрофов в сообществах согласуются с высокими скоростями микробного метаноокисления в этих районах.

Наибольшая доля метанотрофов и интенсивности окисления метана выявлены на сиповой станции АМК73-6045. Осадки этой станции характеризуются резким увеличением количества метана с увеличением глубины осадочной толщи. В условиях разгрузки глубинного метана здесь формируется микробное сообщество, в котором метанотрофы составляют до 1%, что является весьма высоким показателем для этой группы организмов в зонах газопроявления.

Заметному влиянию метановых сипов подвержено микробное сообщество станции АМК73-6027, расположенной на расстоянии 30 миль от станции АМК73-6045. Здесь содержание метана и интегральные интенсивности процесса МО в поверхностных осадках были почти в 2 раза ниже. Однако метанотрофы составляли на этой станции также значительную величину (до 1.94% от всех бактерий), что может быть обусловлено как разгрузкой глубинного метана, так и распространением метана в составе придонных течений на значительные расстояния от площадок активных газовыделений (Shakhova et al., 2010, 2014, 2015). С увеличением расстояния уменьшается влияние сипов: для станций АМК73-6053 и АМК73-6068 зафиксированы невысокие скорости процесса МО и низкая доля метаноокисляющих бактерий в микробном сообществе, что согласуется с низким содержанием метана в поверхностных осадках этих станций.

В образцах нативных осадков для всех станций были обнаружены последовательности генов 16S рРНК, принадлежащие метаноокисляющим организмам (рис. 3), входящим в кластер “Deep-Sea” 1 (Luke, Frenzel, 2011). Обнаруженные метанотрофы являются филогенетически близкими и характерны для морских экосистем, в том числе для районов, где наблюдаются разгрузки метановых сипов (Bessette et al., 2017; Тихонова и соавт., 2020). Единственным культивируемым организ-

мом в кластере “Deep-Sea” 1 на данный момент является *Methyloprofundus sedimenti* WF1 (Tavormina et al., 2014), который детектируется во многих морских экосистемах. Этот организм микроаэрофил, способен расти при низких температурах и высоких значениях солености. Кроме того, показана его способность к образованию эндосимбиотических связей с морскими моллюсками.

Большее таксономическое разнообразие аэробных метанооксиляющих бактерий было выявлено методом культивирования для станций АМК73-6005 и АМК73-6009. Здесь количество метана не возрастает с увеличением глубины осадка, процессы его микробного окисления не превышают $0.22 \text{ мкмоль } \text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-3}$. Метанооксиляющие бактерии в составе сообщества не превышали 0.02%, однако их разнообразие оказалось выше, чем в глубоководных станциях. Помимо найденных в нативных образцах представителей кластера “Deep-Sea” 1, характерных для глубоководных морских экосистем, в накопительных культурах были обнаружены организмы, близкие к метанотрофам, населяющим пресноводные экосистемы. В накопительных культурах, полученных из образцов осадков, отобранных на станциях АМК73-6005 и АМК73-6009, обнаружены представители родов *Methylomonas* и *Methylobacter*. Их количество в нативных образцах было ниже уровня детекции молекулярно-биологическими методами. Обнаружение этих организмов стало возможным лишь в результате анализа первичных накопительных культур. Вероятно, пресноводные микроорганизмы попадают в осадочную толщу на частицах речной взвеси и сохраняют жизнеспособность в условиях значительного распреснения районов, подверженных влиянию речного стока. Однако низкое содержание метана в поверхностных осадках этих станций не позволяет метанотрофным микроорганизмам активно развиваться и составлять значительную долю в структуре микробного сообщества.

Неожиданным оказалось отсутствие достоверного роста в накопительных культурах из образцов осадков станций АМК73-6027, АМК73-6045, АМК73-6053, АМК73-6068, где наблюдались высокое содержание метана, скорости его микробного окисления, а также в нативных образцах выявлено присутствие метанотрофов. По-видимому, нам не удалось подобрать условия для получения активных накопительных культур этих микроорганизмов. Известно, что представители рода *Methyloprofundus* и близкие к ним организмы, являются трудно культивируемыми и для получения накопительных культур этих метанотрофов требуется не менее 12 месяцев (Tavormina et al., 2014).

Результаты наших исследований позволяют заключить, что метанотрофные бактерии кластера “Deep-Sea” 1, филогенетически близкие к един-

ственному культивируемому представителю организму *Methyloprofundus sedimenti*, доминируют в составе сообщества метанотрофов в поверхностных осадках районов газопроявления в море Лаптевых.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю 73-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” чл.-корр. РАН И.П. Семилетову, а также всему научному коллективу и команде судна за предоставленные возможности и всестороннюю помощь при отборе образцов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ А 20-04-00126, а также из средств государственного задания ФИЦ Биотехнологии РАН.

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, первичной обработки и описание образцов проведено И.И. Русановым и О.С. Самылиной. Измерение концентрации и скоростей окисления метана проведено Е.Е. Захаровой и И.И. Русановым. Выделение ДНК из нативных образцов, секвенирование гена 16S рРНК и построение филогенетического дерева выполнено В.В. Кадниковым. Получение накопительных культур, выделение ДНК выполнено Е.Н. Тихоновой. Текст статьи написан Н.В. Пименовым, Е.Н. Тихоновой и И.И. Русановым. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гинсбург Г.Д., Соловьев В.А. Субмаринные газовые гидраты. СПб.: ВНИИОкеангеология, 1994. 199 с.
- Лейн А.Ю., Миллер Ю.М., Намсараев Б.Б., Павлова Г.А., Пименов Н.В., Русанов И.И., Саввичев А.С., Иванов М.В. Биогеохимические процессы цикла серы на ранних стадиях диагенеза осадков на профиле река Енисей—Карское море // Океанология. 1994. Т. 34. С. 681—692.
- Lein A. Yu., Miller Yu. M., Namsaraev B. B., Pavlova G. A., Pimenov N. V., Rusanov I. I., Savvichev A. S., Ivanov M. V. Biogeochemical processes of sulfur cycling in the early stages of sediments diagenesis along the profile from the Yenisei River to the Kara Sea // Oceanology. 1994. V. 34. P. 681—692.

- Lein A.Yu., Pimenov N.V., Savvichev A.S., Pavlova G.A., Rusanov I.I., Miller Y.M., Ivanov M.V. Геохимические особенности диагенеза голоценовых отложений в районе архипелага Шпицберген // *Океанология*. 2000. Т. 40. С. 247–256.
- Lein A.Yu., Pimenov N.V., Savvichev A.S., Pavlova G.A., Rusanov I.I., Miller Y.M., Ivanov M.V. Geochemical features of the diagenesis of the holocene deposits in the area of the Spitsbergen Archipelago // *Oceanology*. 2000. V. 40. P. 228–236.
- Леин А.Ю., Русанов И.И., Пименов Н.В. Биогеохимические процессы циклов углерода и серы в Карском море // *Геохимия*. 1996. Т. 11. С. 1027–1044.
- 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. С. 710–717.
- Rusanov I.I., Savvichev A.S., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Exometabolite formation during microbial oxidation of methane in marine ecosystems // *Microbiology (Moscow)*. 1998. V. 5. P. 710–717.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Пименов Н.В., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Леин А.Ю., Крейн К., Иванов М.В. Микробные процессы циклов углерода и серы в Чукотском море // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 682–693.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Ivanov M.V., Lein A.Yu., Crane K. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in the Chukchi Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 603–613.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Пименов Н.В., Мицкевич И.Н., Байрамов И.Т., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробиологические исследования северной части Баренцева моря в начале зимнего сезона // *Микробиология*. 2000. Т. 69. С. 819–830.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Mitskevich I.N., Baïramov I.V., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological study of the northern part of the Barentz Sea at the onset of winter // *Microbiology (Moscow)*. 2000. V. 69. P. 819–830.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Юсупов С.К., Пименов Н.В., Леин А.Ю., Иванов М.В. Биогеохимический цикл метана в прибрежной зоне и литорали Кандалакского залива Белого моря // *Микробиология*. 2004. Т. 73. С. 540–552.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V., Lein A.Yu. The biogeochemical cycle of methane in the coastal zone and littoral of the Kandslaksha Bay of the White Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2004. V. 73. P. 457–468.
- Тихонова Е.Н., Тарновецкий И.Ю., Малахова Т.В., Гулин М.Б., Меркель А.Ю., Пименов Н.В. Идентификация аэробных метанооксиляющих бактерий в прибрежных осадках Крымского полуострова // *Микробиология*. 2020. Т. 89. С. 737–747.
- Tikhonova E.N., Tarnovetskii I.Yu., Malakhova T.V., Gulina M.B., Merkel A.Yu., Pimenov N.V. Identification of aerobic methane-oxidizing bacteria in coastal sediments of the Crimean Peninsula // *Microbiology (Moscow)*. 2020. V. 89. P. 740–749.
- Baptiste E., Brochier C., Boucher Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens // *Archaea*. 2005. V. 1. P. 353–363.
- Bessette S., Moalic Y., Gautey S., Lesongeur F., Godfroy A., Toffin L. Relative abundance and diversity of bacterial methanotrophs at the oxic–anoxic interface of the Congo deep-sea fan // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 715.
- Bienhold C., Boetius A., Ramette A. The energy-diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments // *ISME J.* 2012. V. 6. P. 724–732.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Egorov A.V., Ivanov M.K. Hydrocarbon gases in sediments and mud breccias from the central and eastern part of the Mediterranean Ridge // *Geo-Mar. Lett.* 1998. V. 18. P. 127–138.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. fiw018.
- Ivanov M.V., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Pimenov N.V., Yusupov S.K. Biogeochemical cycle of methane at North-Western shelf area of the Black Sea // *Proc. 6th Int. conf. "Gas in marine sediments"*. St. Petersburg, September 5–8. 2000.
- James R.H., Bousquet P., Bussmann I., Haeckel M., Kipfer R., Leifer I., Niemann H., Ostrovsky I., Piskozub J., Rehder G., Treude T., Vielstädte L., Greinert J. Effects of climate change on methane emissions from seafloor sediments in Arctic Ocean: A review // *Limnol. Oceanogr.* 2016. V. 61. S283–S299.
- Kirchman D.L., Cottrell M.T., Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 1132–1143.
- Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. V. 63. P. 311–334.
- Koch K., Knoblauch C., Wagner D. Methanogenic community composition and anaerobic carbon turnover in submarine permafrost sediments of the Siberian Laptev Sea // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 657–668.
- Lin X., Zhang L., Liu Y., Li Y. Bacterial and archaeal community structure of pan-Arctic Ocean sediments revealed by pyrosequencing // *Acta Oceanologica Sinica*. 2017. V. 36. № 8. P. 146–152.
- Lücke C., Frenzel P. Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 6305–6309.
- Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Pimenov N., Savvichev A., Rusanov I., Lein A., Egorov A., Gebruk A., Moskalev L., Vogt P. Microbial processes of carbon cycle as the base of food chain of Haakon Mosby Mud Volcano benthic community // *Geo-Mar. Lett.* 1999. V. 19. P. 89–96.
- Pimenov N.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycle in cold methane seeps in the North Atlantic // *Microbiology (Moscow)*. 2000. V. 69. P. 831–843.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ Preprints*. 2016. V. 4. e2409v1.

- Romanovskii N.N., Hubberten H.-W., Gavrilov A.V., Eliseeva A.A., Tipenko G.S. Offshore permafrost and gas hydrate stability zone on the shelf of East Siberian Seas // *Geo-Mar. Lett.* 2005. V. 25. P. 167–182.
- Saunio M., Bousquet P., Poulter B., Peregon A., Ciais P., Canadell J.G., et al. The global methane budget 2000–2012 // *Earth Syst Sci Data.* 2016. V. 8. P. 697–751.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Kadnikov V.V., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial community composition and rates of the methane cycle microbial processes in the upper sediments of the Yamal sector of the southwestern Kara Sea // *Microbiology (Moscow).* 2018. V. 87. P. 238–248.
- Shakhova N., Semiletov I., Leifer I., Salyuk A., Rekant P., Kosmach D. Geochemical and geophysical evidence of methane release over the East Siberian Arctic Shelf // *J. Geophys. Res.* 2010. V. 115. C08007.
- Shakhova N., Semiletov I., Leifer I., Sergienko V., Salyuk A., Kosmach D., Chernykh D., Stubbs C., Nicolsky D., Tumskov V., Gustafsson O. Ebullition and storm-induced methane release from the East Siberian Arctic Shelf // *Nat. Geosci.* 2014. V. 7. P. 64–70.
- Shakhova N., Semiletov I., Sergienko V., Lobkovsky L., Yusupov V., Salyuk A., Salomatin A., Chernykh D., Kosmach D., Panteleev G., Nicolsky D., Samarkin V., Joye S., Charkin A., Dudarev O., Meluzov A., Gustafsson Ö. The East Siberian Arctic Shelf: towards further assessment of permafrost-related methane fluxes and role of sea ice // *Phil. Trans. R. Soc. A.* 2015. V. 373. Art. 20140451.
- Yergeau E., Michel C., Tremblay J., Niemi A., King T.L., Wyglinski J., Lee K., Greer C.W. Metagenomic survey of the taxonomic and functional microbial communities of seawater and sea ice from the Canadian Arctic // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 42242.
<https://doi.org/10.1038/srep42242>
- Zeng Y., Zhang F., He J., Lee S.H., Qiao Z., Yu Y., Li H. Bacterioplankton community structure in the Arctic waters as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2013. V. 103. P. 1309–1319.

Methane-Oxidizing Activity and Phylogenetic Diversity of Aerobic Methanotrophs in the Laptev Sea Upper Sediment Horizons

E. N. Tikhonova^{1,*}, V. V. Kadnikov², I. I. Rusanov¹, A. V. Beletsky², E. E. Zakharova¹, O. S. Samylina¹, N. V. Ravin², and N. V. Pimenov¹

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

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

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Received January 10, 2021; revised January 22, 2021; accepted January 23, 2021

Abstract—Methane oxidation rates and diversity of methane-oxidizing microorganisms were studied in the upper sediment layers of the Laptev Sea (methane seep area, Lena fore-delta, shelf, and upper slope not affected by seeps and river flow). The highest methane concentrations and methane oxidation rates (up to 1.16 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ dm}^{-3} \text{ day}^{-1}$) were revealed at the seep stations. Carbon dioxide was the main product of methane oxidation at all stations. Sequencing of the 16S rRNA gene fragments revealed microorganisms of the class *Gammaproteobacteria*, order *Methylococcales*. Since the share of methanotrophs was high at the sites of constant gas seepage (up to 1.93% of the total read number), they could be detected by sequencing of the native samples. Phylogenetic diversity of methane-oxidizing bacteria was not high, and all detected microorganisms belonged to the Deep-Sea 1 cluster. On the phylogenetic tree, the sequences formed a cluster together with the genus *Methyloprofundus*. Members of the genera *Methylomonas* and *Methylobacter* related to methanotrophs inhabiting freshwater ecosystems were revealed in enrichments from the coastal stations sediment samples.

Keywords: methane-oxidizing bacteria, rate of microbial methane oxidation, high-throughput sequencing of the 16S rRNA genes, enrichment cultures, methane seeps, Laptev Sea