_____ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ____ СТАТЬИ

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, ПРИУРОЧЕННЫХ К МЕЛКОВОДНЫМ СИПАМ В ПОЙМЕ РЕКИ БОЛЬШАЯ РЕЧКА, ЗАПАДНАЯ СИБИРЬ

© 2021 г. О. В. Данилова^{а, *}, А. А. Иванова^а, И. Е. Терентьева^b, М. В. Глаголев^c, А. Ф. Сабреков^b

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

^bИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119991 Россия

*e-mail: olga.v.danilova10@gmail.com

Поступила в редакцию 27.04.2021 г. После доработки 23.05.2021 г. Принята к публикации 26.05.2021 г.

Одним из потенциально значимых и неучтенных источников метана в природе являются недавно открытые поля сипов, широко распространенные в средней тайге Западной Сибири. Локализованные исключительно в поймах небольших рек и ручьев, сипы обнаруживают значительную гетерогенность по форме и размерам, локализации в пространстве, а удельный поток метана из них может достигать высоких значений, делая эти природные формирования значимым региональным источником. Информация о составе микроорганизмов, приуроченных к сипам, остается фрагментарной и затрагивает лишь метанотрофные бактерии. В настоящей работе впервые проведена оценка общего разнообразия бактериального сообщества в осадках мелководных сипов, расположенных в пойме реки Большая Речка, с помощью высокопроизволительного секвенирования генов 16S рРНК. Молекулярный анализ состава сообщества показал доминирование представителей Gammaproteobacte*гіа и Actinobacteria* (соответственно, 28.5–33.8 и 11–13.2% полученных фрагментов гена 16S рРНК). Значительная доля последовательностей была представлена филами Chloroflexi, Desulfobacterota и Bacteroidota. Представители Acidobacteriota и Verrucomicrobiota выявлены в количестве 1.5-2.7 и 1-1.9% соответственно. В метанотрофном сообществе преобладали бактерии рода Methylobacter. Наиболее многочисленная (8% от всех полученных фрагментов гена 16S рРНК) операционная единица видового уровня была представлена Methylobacter tundripaludum. Последовательности метанотрофных Alphaproteobacteria в сипах выявлены не были. Полученные результаты указывают на существование в осадках мелководных сипов смешанного микробного сообщества, ведущая роль в котором принадлежит метанотрофам Gammaproteobacteria.

Ключевые слова: субарктические пресноводные экосистемы, метановые сипы, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК, психрофильные метанотрофные бактерии, *Methylobacter tundripaludum*

DOI: 10.31857/S0026365621050049

Метан (CH₄) — ключевой парниковый газ для атмосферы Земли. Общее радиационное воздействие (форсинг) метана составляет треть от форсинга всех долгоживущих парниковых газов, что делает его третьим по важности парниковым газом после воды и углекислого газа (Ciais et al., 2013). Поскольку концентрация метана в воздухе, измеренная за индустриальный период развития человечества, имеет тенденцию к увеличению (с ~0.8 ppm до современных ~1.8 ppm), а общий дисбаланс между источниками и стоками метана за последние десятилетия оценивается в ± 25 Tr CH₄ в год (Bousquet et al., 2006; Ciais et al., 2013), то каждый значимый, даже на региональном масштабе, источник привлекает внимание исследователей (Fletcher, Schaefer, 2019). К таким потенциально новым и неучтенным источникам относятся сипы — локализованные выходы метана, обнаруженные в начале 2000-х годов в поймах рек и ручьев средней тайги Западной Сибири. Несмотря на прошедшие десятилетия, эти природные объекты все еще остаются крайне слабо изученными. Предварительные расчеты показали, что удельный поток метана из сипов может достигать достаточно высоких значений (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014; Sabrekov et al., 2020), а его происхождение до сих пор не установлено. Имеющиеся данные позволяют с высокой степенью ве-

роятности утверждать, что метан, выделяющийся через сипы, генерируется в верховых болотах, почти полностью покрывающих водоразделы в регионе исследований (Terentieva et al., 2016), и транспортируется горизонтально в поймы рек с помощью грунтовых вод (Sabrekov et al., 2020). Сипы, найденные в средней тайге Западной Сибири, сосредоточены исключительно в поймах рек; они отсутствуют на покрытых болотами водоразделах, облесенных склонах и в озерах, и представляют собой плоские не покрытые растительностью участки насыщенного водой грунта с многочисленными отверстиями, воронками, кратерами, из которых выходят на поверхность грунтовые воды. Размер сипов колеблется от одиночных "луж" плошалью несколько квалратных метров до вытянутых вдоль русла цепей полей сипов площадью до 10000 м² каждое. При этом газ и вода, выделяющиеся из сипов, не содержат кислород (Sabrekov et al., 2020).

Несмотря на уникальность экосистемы, данные о составе сообществ микроорганизмов, обитающих в местах локальных выходов метана в сипах, остаются фрагментарными. Известно лишь несколько работ, посвященных оценке разнообразия метанотрофного сообщества (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014). В данных работах исследовали крупные одиночные сипы-воронки, представляющие собой выпуклые участки насыщенного водой грунта, формирующие ярко выраженные кратерные структуры, высотой 10–20 см. Было показано доминирование в данных сипах метанотрофов Gammaproteobacteria, среди которых значительную долю занимали психрофильные представители рода Methylobacter. Работ же по общему микробному разнообразию сообществ, населяющих сипы-воронки, до настоящего времени сделано не было.

В настоящей работе впервые исследованы мелководные сипы, представляющие собой слегка вогнутые участки грунта, для которых глубина затопления не превышает нескольких сантиметров. Мелководные сипы формируют обширные поля по всей исследуемой территории и представляют собой стабильные природные объекты, вследствие чего были выбраны нами для оценки общего микробного разнообразия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. Исследования и отбор проб проводили в сентябре 2019 г. в пойме реки Большая Речка (60.945° с.ш., 68.341° в.д.) (рис. 1) в зоне средней тайги Западной Сибири со среднегодовой температурой воздуха –0.5°С и среднегодовым количеством осадков 550 мм. Климат региона — континентальный субарктический с жарким летом (среднемесячная температура воздуха в июле 17°С) и очень холодной зимой (среднемесячная температура воздуха в январе -20° C) (meteoinfo.ru). На данном участке представлено типичное поле мелководных сипов, расположенное в 30 м от русла реки. В качестве объектов исследования было выбрано три мелководных сипа на расстоянии около 10 м друг от друга. Окружающая пойменная растительность представлена монодоминантными сообществами осоки водяной (*Carex aquatilis* Wahlenb.) на пониженных и затопленных участках и канареечника (*Phalaris arundinacea* L.) на повышенных участках. На склонах террас и водоразделов произрастают березовоосиновые леса, сменяющиеся на террасах зональными таежными сообществами.

Измерение концентрации растворенного метана в воде, выделяющейся из сипов. Концентрацию растворенного в воде метана оценивали с помощью метода равновесия (Норе et al., 1995). Пробы воды в трех повторностях для каждого сипа объемом 5 мл отбирали в пластиковый шприц, после чего в этот же шприц добавляли 15 мл атмосферного воздуха и закрывали носик резиновой пробкой. Полученную смесь энергично встряхивали в течение трех минут, воду сливали, а оставшуюся пробу газа транспортировали в лабораторию. Концентрацию метана в пробе газа измеряли с помощью инфракрасного газоанализатора Gas Scouter G4302 ("Picarro", США) в течение 72 ч после отбора.

Отбор образцов для анализа. Отбор проб грунта осуществляли с поверхности насыщенного водой ила по краю воронки по одной пробе для каждого сипа. Пробы грунта отбирали в пластиковые сосуды Falcon объемом 15 мл, герметично закрывали крышкой и фиксировали пленкой Parafilm ("Pechiney Plastic Packaging", США). До анализа грунт хранили при температуре –20°С.

Пробы воды для химического анализа отбирали в трех повторностях для каждого сипа с помощью пластиковых шприцев (50 мл) максимально близко к отверстию воронки, из которой текла вода. Отобранные пробы воды фильтровали в лаборатории через одноразовые фильтры-насадки из ацетилцеллюлозы (диаметр фильтра 28 мм, диаметр пор 0.2 мкм, "Corning", США) и хранили при 4°С. Химический анализ проб воды проводили с помощью системы капиллярного электрофореза Капель-205 ("Люмэкс", Россия).

Величины pH и удельной электропроводности поступающей из сипов воды измеряли в трех повторностях для каждого сипа в полевых условиях с помощью портативного прибора HANNA HI 98130 ("Hanna Instruments", США). Температуру воды оценивали с помощью термодатчика Thermochron Ibutton ("Maxim Integrated", США).

Оценка микробного разнообразия сообщества мелководных сипов с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Для выделения тотальной ДНК из исследуемого осадка использовали



Рис. 1. (а) Локализация исследуемого участка на карте. Черная рамка указывает расположение места отбора образцов; (б) общий вид р. Большая Речка, ХМАО. На первом плане видно поле сипов; (в) общий вид сипов мелководного типа. Черные стрелки указывают места выхода метана на поверхность.

навеску ила весом 0.5 г. ДНК выделяли с использованием набора FastDNA SPIN kit for soil ("MP Biomedicals", США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Полученные образцы ДНК хранили до анализа при -20°С. Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей вариабельного региона V3-V4 гена 16S рРНК. Для получения ампликонов использовали прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCAT-ACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGC-TCTTCCGATCTXXXXXZZZZGTGBCAGCMC-СGCGGTAA-3'), состоящий, соответственно, из "5' Illumina Linker Sequence", "Index 1", "Heterogeneity Spacer" (Fadrosh et al., 2014) и 515F праймерной последовательности (Hugerth et al., 2017) и обратный праймер (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATC-TACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT-CTXXXXXZZZZGACTACNVGGGTMTCTAATC-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 5 2021

С-3'), состоящий из "3' Illumina Linker Sequence", "Index 2", "Heterogeneity Spacer" и Pro-mod-805R праймерной последовательности соответственно (Меркель и соавт., 2019). Для каждого образца ДНК было приготовлено две библиотеки, секвенированные параллельно с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 ("Illumina", США) на секвенаторе MiSeq ("Illumina", США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные фрагменты последовательностей гена 16S рРНК анализировали с использованием программного обеспечения пакета QIIME 2 v.2018.11 (https://qiime2.org) (Bolyen et al., 2019). Отбор нуклеотидных последовательностей, контроль их качества, удаление химерных последовательностей проводили с помощью плагина DADA2

Концентрация растворенного метана, мг/л	8.3 ± 1.1		
Концентрация растворенного кислорода (мг/л)	0.0		
pH	7.1 ± 0.1		
Удельная электропроводность, мкСм/см	473 ± 25		
Концентрация SO ₄ ²⁻ , мг/л	7.5 ± 1.2		
Концентрация HCO ₃ ²⁻ , мг/л	273 ± 27		
Концентрация Са ²⁺ , мг/л	66 ± 15		
Концентрация растворенного Fe, мг/л	4.7 ± 1.2		

Таблица 1. Физико-химическая характеристика воды, вытекающей из мелководных сипов

(Callahan et al., 2016). Последовательности кластеризовали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на видовом уровне идентичности (97% сходства) с помощью плагина VSEARCH (Rognes et al., 2016) и базы данных Silva v. 138 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014). Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили по базе Silva v. 138 методом BLASTN. Оценку биоразнообразия осуществляли путем расчета индексов на базе программы СПИМЕ 2. С помощью данной программы строили также тепловую карту вариабельности метанотрофов в мелководных сипах. Построение филогенетического дерева проводили с использованием программного пакета MEGA X (версия 10.2.2) (Kumar et al., 2018).

Полученные в результате секвенирования последовательности гена 16S рРНК депонированы в GenBank под номером PRJNA731098.

Оценку численности метанотрофов на основе копийности гена ртоА выполняли на термоциклере StepOnePlusTM Real-Time PCR System ("Thermo Fisher Scientific", США) с использованием набора аPCRmix-HS SYBR Kit ("Евроген", Россия) по методике, описанной в работе Kubista et al. (2006). Последовательности гена ртоА были получены с использованием праймерной системы А189f (ACGTC-(GGNGACTGGGACTTCTGG)–A650r CTTACCGAAGGT) (Holmes et al., 1995; Bourne et al., 2001) в соответствии со следующей программой: $94^{\circ}C - 20$ с. $62^{\circ}C - 20$ с. $72^{\circ}C - 15$ с в реакционной смеси общим объемом 50 мкл, содержащей праймеры в концентрации 0.5 мкМ. В качестве стандартов применяли растворы клонированных фрагментов гена *ртоА* чистой культуры Methylococcus capsulatus. Анализ проводили в трех повторностях для каждого образца. Коэффициент корреляции для стандартной кривой составлял 0.998.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика исследуемых метановых сипов и измерения концентрации метана. Полевые исследования в поймах реки Большая Речка, а

также близлежащих ручьях и старицах, выявили присутствие большого количества активных мелководных сипов (рис. 1а, 1б). Аналогичные поля сипов обнаружены также при исследовании ручьев близ деревни Шапша (61.087° с.ш., 69.481° в.д.), в районе одной из проток реки Оби, и старицах реки Большой Салым, близ деревни Лемпино (60.968° с.ш., 71.234° в.д.). В целом, наличие мелководных сипов в той или иной степени характерно для всей 100 км территории вокруг г. Ханты-Мансийск.

В табл. 1 суммированы результаты измерений физико-химических характеристик воды, вытекающей из исследованных сипов в пойме реки Большая речка. Проведенный анализ показал, что в данных сипах вода слабоминерализованная (≤500 мг/л), с около-нейтральным значением рН. Среди ионов присутствует карбонат, кальций, в меньшей степени сульфат и железо. Концентрация метана в исследованных сипах была сходной (около 8 мг/л), а процесс выделения его был достаточно стабилен и слабо различался от сипа к сипу. Концентрация растворенного в воде кислорода была ниже предела обнаружения использованного прибора (0.1 мг/л). Таким образом, ввиду избытка метана и недостатка кислорода, доступность последнего может иметь влияние на интенсивность окисления метана и разнообразие бактериального сообщества в исследованных мелководных сипах.

Общее разнообразие микробного сообщества, населяющего зоны микросипрования в мелководных сипах. В результате проведенного анализа было получено 44103 нуклеотидных последовательности размером, в среднем, 250 п.о. После процедуры контроля качества, выбраковки химер, удаления небактериальных и неархейных фрагментов, а также последовательностей размером менее 250 п.о., осталось 32605 ридов, из которых, в дальнейшем, было сформировано 741 ОТЕ со степенью сходства 97% (табл. 1). Индексы разнообразия Chao1 и Shannon варьировали в диапазонах 204–281 и 6.65–7.05 соответственно. Анализ

Образцы	Номер	Исходные последова- тельности	Последова-	ледова- сти после % цедуры ътрации	Количество ОТЕ	Индексы разнообразия	
			тельности после процедуры фильтрации			Chao1	Shannon
S1	1	6672	6385	95.7	204	204	6.65
	2	8578	8381	97.7	278	281	7.05
S2	1	7054	6899	97.8	265	266	6.85
	2	6906	6731	97.5	236	236	6.73
S 3	1	7770	7565	97.4	266	266	6.98
	2	7123	6869	96.4	248	248	7.03

Таблица 2. Количество полученных и проанализированных фрагментов последовательностей гена 16S рРНК

полученных последовательностей показал, что компонентный состав бактериального сообшества варьировал между образцами незначительно. Лишь малая часть всех идентифицированных последовательностей (от 0.19 до 0.31%) принадлежала представителям группы Archaea. Она была представлена некультивируемыми археями Woeserchaeales (Nanoarchaeota) и Methanosaeta (Halobacterota). Последовательности, относящиеся к археям группы ANME, осуществляющим процесс анаэробного окисления метана, в сипах обнаружены не были. Наиболее многочисленная группа полученных фрагментов гена 16S рРНК принадлежала представителям Gammaproteobacteria (от 28.5 до 33.7% всех прочтений) (рис. 2). Относящиеся к данному филуму представители Methylococcales и Burkholderiales представляли собой одни из наиболее многочисленных ОТЕ бактерий в данных сообшествах (табл. 2). Доминировали в сипах метанотрофы рода Methylobacter, доля последовательностей которых составляла около 11% от общего количества полученных прочтений. Также, внутри группы Methylococcales значительная доля последовательностей принадлежала группе ОТЕ, идентифицированных как Crenothrix polyspora. Показано, что эта группа бактерий широко распространена в пресноводных экосистемах, предпочитая водоемы с застойной водой, где занимает микроаэрофильные зоны (Oswald et al., 2017). Из бактерий-неметанотрофов вторую по численности группу занимают метилотрофы рода *Methylotenera*, относящиеся к классу Methylophilaceae (табл. 2). Данные бактерии относятся к одной из наиболее часто встречающихся групп в консорциумах с метанотрофами (Kalyuzhnaja et al., 2008). Доля нуклеотидных последовательностей, принадлежащих представителям Alphaproteobacteria, составляла от 3.2 до 6% и была представлена целым рядом гетеротрофных организмов: Hyphomicrobium, Polymorphobacter, Rhodopseudomonas, Bradyrhizobium. Среди бактерий филума Actinobacteriota, представляющего собой вторую по численности группу в исследуемом сообществе (от 13.1 до 19% всех полученных последовательностей), значительную долю занимали некультивируемые представители таких малоизученных групп, как ОРВ41 и РеМ15, функции которых в бактериальном сообществе остаются невыясненными. Доля представителей филумов Chloroflexi, Desulfobacterota и Bacteroidota, широко распространенных в различных экосистемах, в полученном пуле данных составляла 9.9-12.1, 6.3-11.1 и 4.9-10.1% соответственно (рис. 2). Среди представителей филума Myxococcota существенную долю (около 75%) составляли бактерии рода Anaeromyxobacter – типичные обитатели разнообразных почв и пресноводных осадков (Sanford et al., 2012; Onley et al., 2017). Способность к анаэробному росту, с использованием широкого спектра неорганических и органических веществ, наряду с возможностью азотфиксации, позволяет данным бактериям доминировать в различных экосистемах. В исследуемом микробном сообществе осадков мелководных сипов доля бактерий рода Anaeromvxobacter достигала 3.3-4.9% от общего количества последовательностей 16S pPHK (табл. 2).

Филогенетическое разнообразие групп Acidobacteriota и Verrucomicrobiota. Анализ разнообразия представителей двух широко распространенных. но крайне малоизученных филумов Acidobacteriota и Verrucomicrobiota в исследованных сипах показал, что доля их в общем микробном разнообразии составляла 1.5-2.7 и 1.0-1.9% соответственно. Ацидобактерии являются одной из доминирующей групп бактерий в почвах, составляя до 20% всей ее микробиоты (Janssen, 2006). Они обнаружены в разнообразных почвах (Navarret et al., 2013), зонах ризосферы (da Rocha et al., 2013), морских местообитаниях, включая глубоководные осадки (Liao et al., 2011). Однако их экологическая функция в различных эконишах остается малоизученной (Kielak et al., 2016). Все культивируемые к настояшему моменту представители ацидобактерий являются гетеротрофами, способными использо-



Рис. 2. Состав бактериального сообщества на основании разнообразия гена 16S рРНК в природном образце ила, отобранном вблизи выхода метана в сипах мелководного типа.

вать широкий спектр органических веществ. В полученных библиотеках фрагментов гена 16S рРНК самая многочисленная группа ацидобактериальных последовательностей (от 30 до 58%) принадлежала классу Vicinamibacteria, в котором относительно недавно было описано два культивируемых представителя (рис. 3а). (Huber et al., 2016; Vieira et al., 2017). К одному из них, роду Luteitalea, принадлежала часть выявленных последовательностей. Группа Vicinamibacteria является одной из наиболее распространенных классов ацидобактерий, представители которой предпочитают около нейтральные значения рН и способны к росту в психрофильных условиях. Другими численно значимыми группами ацидобактерий в исследованных сипах являлись подгруппы 7 и 10, а также филум Aminicenantia. Данные группы до настоящего момента не имеют культивируемых представителей, в связи с чем экологическая роль их неизвестна. Оставшуюся часть (около

20%) всех полученных из осадков мелководных сипов последовательностей гена 16S pPHK ацидобактерий составляли представители классов *Thermoanaerobacula*, *Holophagae*, *Blastocatellia*, *Acidobacteriia*, ацидобактерии подгруппы 18. Описанные представители первых двух классов являются анаэробными термофилами, неспособными к росту ниже 25°С. Ацидобактерии *Blastocatellia* в большинстве своем описаны как аэробные гетеротрофы, способные к активному росту в близких к нейтральным значениям pH и психрофильных условиях (Pascual et al., 2015).

Доля последовательностей гена 16S рРНК, принадлежащих бактериям филума Verrucomicrobiota, в полученной библиотеке составляла от 1 до 2% от общего количества фрагментов. Разнообразие их в осадках мелководных сипов было относительно невысоким и состояло из представителей нескольких порядков: Verrucomicrobiales, Chthoniobacterales, Pedosphaerales и Opitutales (рис. 36). Более 70%



Рис. 3. Круговая диаграмма, отображающая разнообразие групп *Acidobacteria* (a) и *Verrucomicrobia* (б) в исследованных образцах осадков вблизи мелководных сипов на основании разнообразия гена 16S рРНК.

всех последовательностей гена 16S рРНК бактерий Verrucomicrobia показывали филогенетическую близость к роду Luteolibacter, принадлежащему классу Verrucomicrobiae. На настоящий момент этот род насчитывает восемь охарактеризованных видов, полученных из различных местообитаний (Yoon et al., 2008; Pascual et al., 2017). Бактерии рода Luteolibacter предпочитают нейтральные или слабощелочные условия среды, и, по меньшей мере, для вида Luteolibacter arcticus показан активный рост при 4°С (Kim et al., 2015). Способность использовать целый спектр органических субстратов позволяет данным бактериям эффективно заселять различные экосистемы, включая холодноводные сипы. Вторая по численности группа последовательностей Verrucomicrobiota (около 15%) была филогенетически родственна представителям некультивируемого порядка Pedosphaerales. Минорную часть последовательностей Verrucomicrobiota составляли представители родов Terrimicrobium, Cephaloticoccus и Chthoniobacter (составляя, в среднем, 7, 2 и ≤1% соответственно). Показано, что они способны использовать простые сахара, предпочитая для роста нейтральные условия среды (Qiu et al., 2014; Lin et al., 2016).

Разнообразие и обилие метанотрофного сообщества осадков мелководных сипов. В общем пуле

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 5 2021

данных доля последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов достигала 18% и насчитывала 5885 фрагментов, составляющих 12 ОТЕ. Более 80% от всего количества прочтений были представлены бактериями рода Methylobacter. При этом на долю одной ОТЕ (DQ066945), принадлежащей к виду Methylobacter tundripaludum, приходилось более 40% всех фрагментов гена 16S pPHK (рис. 4). Этот метанотроф был также доминирующим видом во всем микробном сообществе, составляя 7.5% от общего количества последовательностей (табл. 2). Представленные результаты коррелируют с полученными ранее данными о составе метанотрофного сообщества холодных грязевых вулканов (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014), где доминировали представители рода Methylobacter. Methylobacter tundripaludum, наряду с метанотрофом Methylovulum psychrotolerans (Oshkin et al., 2016) способен к активному росту при низких температурах, вплоть до 4°С, что позволяет ему эффективно заселять холодные пресноводные экосистемы. Среди других метанотрофов Gammaproteobacteria значительная часть последовательностей (около 7.5%) принадлежала представителям рода Methylomonas, однако доля их в общем метанотрофном сообществе была ниже по сравнению с детектированной ранее в сипах (Oshkin et al., 2014). Единичные последовательности гена



Рис. 4. Тепловая карта, отображающая общее разнообразие и количественную представленность метанотрофных бактерий.

16S рРНК (0.01%) в пуле данных принадлежали метанотрофам рода Methylomagnum. Небольшая часть метанотрофных последовательностей, в среднем 2.8 и 6.9%, представленная двумя ОТЕ (АВ722259 и DQ066943 соответственно), филогенетически принадлежала кластеру Methylobacter. Однако сходство данных ОТЕ с ближайшим описанным видом Methylobacter tundripaludum было низким (91.5% для AB722259 и 93.1% для DQ066943), что позволяет выделить их в отдельную ветвь, возможно, родового уровня внутри класса Methylococcaceae (рис. 5). Метанотрофных представителей класса Alphaproteobacteria в исследуемом пуле данных гена 16S pPHK обнаружено не было, в отличие от выявленных ранее в сходных сипах бактерий рода Methylocystis (Oshkin et al., 2014). Также в работе 2014 г. показано присутствие в сипах некультивируемых групп метанотрофов lake cluster-2, LW и RPC-2B. Существование этих групп в осадках мелководных сипов сложно оценить, ввиду отсутствия знаний о соответствующих им генах 16S рРНК. В целом, полученные в настоящем исследовании данные о составе метанотрофного сообщества, населяющего осадки мелководных сипов, сопоставимы с опубликованными ранее данными для грязевых вулканов из схожих экосистем (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014). Значительная доля метанотрофного сообщества представлена психрофильными бактериями рода Methylobacter -

типичными обитателями холодных пресноводных экосистем.

Для оценки обилия метанотрофных бактерий в исследуемом сообществе был использован метод количественной ПЦР, результаты которого оказались неоднозначными. Основанный на подсчете количества копий гена ртоА, кодирующего мембранную метаномонооксигеназу (ключевого фермента окисления метана), метод показал присутствие метанотрофов в исследуемом сообществе в количестве около 10⁵ кл./г сухого осадка. Эти результаты значительно ниже полученных ранее значений (107 кл./г сухого осадка) для сообщества грязевого сипа, определенных путем прямого подсчета клеток методом флуоресцентной in situ гибридизации (метод FISH) со специфичными для метанотрофов зондами М84 + М705 и М450 (Oshkin et al., 2014). Причиной низкой детекции метанотрофных бактерий можно предположить как высокую чувствительность данного метода к остаточным ингибирующим веществам в экстракте исследуемых ДНК, так и недостаточной специфичностью использованных праймерных систем при связывании с матрицей.

В целом, полученные в настоящей работе результаты показывают широкое распространение и разнообразие метановых сипов в поймах рек средней тайги Западной Сибири. В осадках мелководных сипов развивается разнообразное мик-



Рис. 5. Филогенетическая дендрограмма, построенная методом ближайших соседей на основе сравнительного анализа генов 16S рРНК полученных ОТЕ метанотрофных бактерий, населяющих осадки мелководных сипов (выделены жирным шрифтом) и других охарактеризованных метанотрофных бактерий. Показан бутстрэп (1000 построений) >75%. В качестве внешней группы использовались последовательности метанотрофов *Alphaproteobacteria*. Маркер – 0.02 замещение на нуклеотидную позицию.

робное сообщество. Присутствие повышенного содержания метана в совокупности с низкими температурами приводит к доминированию психрофильных метанотрофов рода Methylobacter. Компаньонами к ним выступают метилотрофы рода Methylotenera, эффективно использующие их метаболиты. Доминирующая роль в сообществе принадлежала представителям филума Gammaproteobacteria. Из других групп значительное развитие достигали представители филумов *Мухососсота* и Actinobacteriota. Показано, что в осадках мелководных сипов развивалось достаточно разнообразное ацидобактериальное сообщество с доминирующим видом рода Luteitalea класса Vicinamibacteria. Филум Verrucomicrobiota был представлен несколькими порядками с преобладанием бактерий рода Luteolibacter. Метанотрофное сообще-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 5 2021

ство сипов было представлено исключительно, метанотрофами *Gammaproteobacteria*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-77-10074). Логистика работы была организована при поддержке гранта Правительства Тюменской области в соответствии с программой Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня в рамках национального проекта "Наука".

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

ДАНИЛОВА и др.

OTE	Silva-таксономия	Численность, %	Ближайший гомолог	Сходство по 16S pPHK, %
1	DQ066945	7.5	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylobacter tundripaludum SV96	99.0
2	GU572365	2.2	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylobacter sp.	96.6
3	HQ844548	1.6	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylobacter sp.	96.8
4	FPLS01034453	3.83	Gammaproteobacteria; Burkholderiales; Methylotenera sp.	98.5
5	HE648180	3.26	Myxococcota; Myxococcales; Anaeromyxobacter	100.0
4	JX222588	2.65	Desulfobacterota; Geobacterales; Geobacter sp.	96.8
5	JX505286	2.55	Actinobacteriota; Gaiellales; uncultured	100.0
7	JN540130	2.0	Actinobacteriota; Coriobacteriia; OPB41	100.0
8	GQ351574	1.86	Cyanobacteria; Cyanobacteriales; Planktothrix sp.	98.50
9	AY145533	1.83	Actinobacteriota; Actinobacteria; uncultured PeM15	100.0
11	HM346763	1.46	Bacteroidota; Bacteroidales; uncultured Bacteroidetes vadin HA17	100.0
12	JQ711701	1.29	Firmicutes; Clostridiales; Clostridium sp.	96.13
13	AB722259	1.24	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Crenothrix polyspora	91.42
14	LC124505	1.22	Gammaproteobacteria; Burkholderiales; uncultured	100.0
15	KP896360	1.21	<i>Nitrospinota</i> ; P9X2b3D02; uncultured <i>Nitrospina</i> sp.	98.24
16	EU360304	1.18	Bacteria; MBNT15; uncultured	100.0
17	AB722196	1.18	<i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Methylococcales</i> ; uncultured <i>Crenothrix</i>	100.0
19	EU801391	1.12	Gammaproteobacteria; Burkholderiales; uncultured OM43 clade	100.0
20	JX223484	1.09	Chloroflexi; Anaerolineales; Leptolinea sp.	96.65
21	FJ382072	1.04	Gammaproteobacteria; Burkholderiales; Albidiferax sp.	98.37
22	MG576019	1.03	Gammaproteobacteria; Burkholderiales; Rhodoferax fermentans	100.0

Таблица 3. Наиболее многочисленные ОТЕ, полученные в результате молекулярного анализа бактериального сообщества, населяющего осадки мелководных сипов вблизи выхода метана

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белова С.Э., Ошкин И.Ю., Глаголев М.В., Лапшина Е.Д., Максютов Ш.Ш., Дедыш С.Н. Метанотрофные бактерии грязевых микровулканов в поймах северных рек // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 732–740.

Belova S.E., Oshkin I.Y., Dedysh S.N., Glagolev M.V., Lapshina E.D., Maksyutov S.S. Methanotrophic bacteria in cold seeps of the floodplains of northern rivers // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 743–750.

Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тощаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655– 664.

Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V., Tarnovetskii I.Y. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.

Bourne D.G., McDonald I.R., Murrell J.C. Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methano-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 5 2021

611

troph diversity in three Danish soils // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 3802–3809.

Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.

Bousquet P., Ciais P., Miller J.B., Dlugokencky E.J., Hauglustaine D.A., Prigent C., van der Werf G.R., Peylin P., Brunke E.-G., Carouge C., Langenfelds R.L., Lathie're J., Papa F., Ramonet M., Schmidt M., Steele L.P., Tyler S.C., White J. Contribution of anthropogenic and natural sources to atmospheric methane variability // Nature. 2006. V. 443. P. 439–443.

Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 581–583.

Ciais P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., Chhabra A., DeFries R., Galloway J., Heimann M. et al. Carbon and other biogeochemical cycles // Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC / Ed. Stocker T.F. et al. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. P. 465–570.

da Rocha U.N., Plugge C.M., George I., van Elsas J.D., van Overbeek L.S. The rhizosphere selects for particular groups of Acidobacteria and Verrucomicrobia // PLoS One. 2013. V. 8. Art. e82443.

Fadrosh D., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. 2014. V. 2. P. 6.

Fletcher S.E.M., Schaefer H. Rising methane: A new climate challenge // Science. 2019. V. 364. P. 932–933.

Holmes A.J., Costello A., Lidstrom M.E., Murrell J.C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonium monooxygenase may be evolutionarily related // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 132. P. 203–208.

Hope D., Dawson J.J., Cresser M.S., Billett M.F. A method for measuring free CO_2 in upland streamwater using head-space analysis // J. Hydrol. 1995. V. 166. P. 1–14.

Huber K.J., Geppert A.M., Wanner G., Fösel B.U., Wüst P.K., Overmann J. The first representative of the globally widespread subdivision 6 Acidobacteria, Vicinamibacter silvestris gen. nov., sp. nov., isolated from subtropical savannah soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 2971–2979.

Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S. Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 80. P. 5116–5123.

Janssen P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 1719–1728.

Kalyuzhnaya M.G., Lapidus A., Ivanova N., Copeland A.C., McHardy A.C., Szeto E., Salamov A., Grigoriev I.V., Suciu D., Levine S.R., Markowitz V.M., Rigoutsos I., Tringe S.G., Bruce D.C., Richardson P.M., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 1029–1034. *Kielak A.M., Barreto C.C., Kowalchuk G.A., van Veen J.A., Kuramae E.E.* The ecology of *Acidobacteria*: moving beyond genes and genomes // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 744.

Kim M., Pak S., Rim S., Ren L., Jiang F., Chang X., Liu P., Zhang Y., Fang C., Zheng C., Peng F. Luteolibacter arcticus sp. nov., isolated from high Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter //* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 1922–1928.

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlbergag A., Zorica N. The real-time polymerase chain reaction // Mol. Aspects Med. 2006. V. 2. P. 95–125.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.

Liao L., Xu X.W., Jiang X.W., Wang C.S., Zhang D.S., Ni J.-Y., Wu M. Microbial diversity in deep-sea sediment from the cobalt-rich crust deposit region in the Pacific Ocean // FEMS Microbiol. Ecol. 2011. V. 78. P. 565–585.

Lin J. Y., Russell J.A., Sanders J.G., Wertz J.T. Cephaloticoccus gen. nov., a new genus of "Verrucomicrobia" containing two novel species isolated from Cephalotes ant guts // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 3034–3040.

Navarrete A.A., Kuramae E.E., de Hollander M., Pijl A.S., van Veen J.A., Tsai S.M. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 83. P. 607– 621.

Onley J.R., Ahsan S., Sanford R.A., Löffler F.E. Denitrification by *Anaeromyxobacter dehalogenans*, a common soil bacterium lacking the nitrite reductase genes *nirS* and *nirK*// Appl. Environ Microbiol. 2017. V. 84. Art. e01985-17.

Oshkin I.Y., Belova S.E., Danilova O.V., Miroshnikov K.K., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damste J.S., Liesack W., Dedysh S.N. Methylovulum psychrotolerans sp. nov., a cold-adapted methanotroph from low-temperature terrestrial environments, and emended description of the genus Methylovulum // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 2417–2423.

Oshkin I.Y., Wegner C.E., Lüke C., Glagolev M.V., Filippov I.V., Pimenov N.V., Liesack W., Dedysh S.N. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold methane seeps in floodplains of West Siberian rivers // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5944–5954.

Oswald K., Graf J., Littmann S., Tienken D., Brand A., Wehrli B., Albertsen M., Daims H., Wagner M., Kuypers M., Schubert C.J., Milucka J. Crenothrix are major methane consumers in stratified lakes // ISME J. 2017. V. 11. P. 2124-2140.

Pascual J., Garcia-Lopez M., Gonzalez I., Genilloud O. Luteolibacter gellanilyticus sp. nov., a gellan-gum-degrading bacterium of the phylum *Verrucomicrobia* isolated from miniaturized diffusion chambers // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3951–3959.

Pascual J., Wüst P.K., Geppert A., Foesel B.U., Huber K.J., Overmann J. Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in *Acidobacteria* Subdivision 4 // Syst. Appl. Microbiol. 2015. V. 38. P. 534–544.

Qiu Y.L., Kuang X.Z., Shi X.S., Yuan X.Z., Guo R.B. Terrimicrobium sacchariphilum gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium of the class "*Spartobacteria*" in the phylum *Verrucomicrobia*, isolated from a rice paddy field // Int. J. Syst. Evol Microbiol. 2014. V. 64. P. 1718–1723.

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. V. 41. P. 590–596.

Ratcliffe J.L., Creevy A., Andersen R., Zarov E., Gaffney P.P., Taggart M.A., Mazeie Y., Tsyganov A.N., Rowson J.G., Lapshina E.D., Payne, R.J. Ecological and environmental transition across the forested-to-open bog ecotone in a west Siberian peatland // Sci. Total Environ. 2017. V. 607. P. 816– 828.

Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics // PeerJ. 2016. V. 4. Art. e2584.

Sabrekov A.F., Terentieva I.E., Glagolev M.V., Litti Y.V., Maksyutov S.S. Methane seeps in West Siberian middle taiga river floodplains: origin and fluxes // AGU Fall Meeting. 2020.

Sanford R.A., Wagner D.D., Wu Q., Chee-Sanford J.C., Thomas S.H., Cruz-García C., Rodríguez G., Massol-Deyá A., Krishnani K.K., Ritalahti K.M., Nissen S., Konstantinidis K.T., Löffler F.E. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 19709–19714.

Terentieva I.E., Glagolev M.V., Lapshina E.D., Sabrekov A.F., Maksyutov S. Mapping of West Siberian taiga wetland complexes using Landsat imagery: implications for methane emissions // Biogeosci. 2016. V. 13. P. 4615–4626.

Vieira S., Luckner M., Wanner G., Overmann J. Luteitalea pratensis gen. nov., sp. nov. a new member of subdivision 6 *Acidobacteria* isolated from temperate grassland soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1408–1414.

Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O. The SILVA and "all-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. P. 643–648.

Yoon J., Matsuo Y., Adachi K., Nozawa M., Matsuda S., Kasai H., Yokota A. Description of Persicirhabdus sediminis gen. nov., sp. nov., Roseibacillus ishigakijimensis gen. nov., sp. nov., Roseibacillus ponti sp. nov., Roseibacillus persicicus sp. nov., Luteolibacter pohnpeiensis gen. nov., sp. nov. and Luteolibacter algae sp. nov., six marine members of the phylum "Verrucomicrobia", and emended descriptions of the class Verrucomicrobiae, the order Verrucomicrobiales and the family Verrucomicrobiaceae // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 998–1007.

Microbial Community Composition of Floodplains Shallow-Water Seeps in the Bolshaya Rechka Floodplain, Western Siberia

O. V. Danilova^{1, *}, A. A. Ivanova¹, I. E. Terent'eva², M. V. Glagolev³, and A. F. Sabrekov²

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

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: olga.v.danilova10@gmail.com

Received April 27, 2021; revised May 23, 2021; accepted May 26, 2021

Abstract—Recently discovered fields of seeps in western Siberia are an important, previously unknown source of methane. Seeps are located in the floodplains of small rivers and vary in shape, size and localization. Methane fluxes from seeps may be high, making them the sources of high regional importance. However, the data on the seep bacterial community composition are scarce, concentrating mainly on methanotrophic bacteria. In the present work, the overall bacterial diversity in the sediments of shallow-water seeps at the floodplain of the Bolshaya Rechka River was studied using high-throughput 16S rRNA gene sequencing. Molecular analysis revealed that *Gammaproteobacteria* and *Actinobacteria* were the most abundant bacterial groups (28.5–33.8 and 11–13.2% of total 16S rRNA genes, respectively). A significant part of the sequences belonged to *Chloroflexi, Desulfobacterota*, and *Bacteroidota*. *Acidobacteriota* and *Verrucomicrobiota* were responsible for 1.5–2.7 and 1.0–1.9%, respectively. The methanotrophic community was dominated by bacteria of the genus *Methylobacter tundripaludum* (97% identity). Methanotrophic *Alphaproteobacteria* were not detected in the seeps. Our results point to the presence of an mixed microbial community in the sediments of shallow-water seeps, with predominance of methanotrophic *Gammaproteobacteria*.

Keywords: subarctic freshwater habitats, methane seeps, microbial diversity, high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene fragments, psychrophilic methanotrophs, *Methylobacter tundripaludum*

2021