

*На правах рукописи*

Ошуркова Виктория Игоревна

**МЕТАНОБРАЗУЮЩИЕ АРХЕИ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ  
АРКТИКИ**

Специальность: 03.02.03 - Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Пушино - 2017**

Работа выполнена в лаборатории анаэробных микроорганизмов отдела «Всероссийская коллекция микроорганизмов» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), г. Пущино

**Научный руководитель:** **Щербакова Виктория Артуровна,**  
кандидат биологических наук, заведующая лабораторией анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

**Официальные оппоненты:** **Петрова Майя Александровна,**  
доктор биологических наук, заведующая сектором анализа и хранения микроорганизмов Федерального бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

**Паршина София Николаевна,**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Ведущая организация:** «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»)

Защита состоится \_\_\_\_\_ на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу: 142290, г. Пущино Московской области проспект Науки, д.5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН. Автореферат размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,

Т.В. Кулаковская

**Актуальность проблемы.** Низкотемпературные экосистемы играют важную роль в формировании климата Земли и баланса парниковых газов в атмосфере. Тундровая зона, в частности, является важным источником биогенного метана. В дополнение к сезонному оттаивающему верхнему слою большое количество метана обнаружено в толщах многолетнемерзлых отложений (ММО), так называемой «вечной мерзлоте», которые никогда не оттаивали после замерзания (Corradi *et al.*, 2005; Schuur *et al.*, 2015). В настоящее время этот метан выведен из биогеохимического цикла углерода (Gilichinsky *et al.*, 1997; Rivkina *et al.*, 2001). Эксперименты с радиоактивно мечеными субстратами ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  и  $\text{Na}^{14}\text{CH}_3\text{CO}_2$ ) показали, что метаногенез может осуществляться в образцах арктических ММО при отрицательных температурах до  $-16,5\text{ }^\circ\text{C}$  (Rivkina *et al.*, 2002; Rivkina *et al.*, 2004). Биогенное происхождение обнаруженного в ММО метана было подтверждено изотопным составом углерода (Rivkina *et al.*, 2007), который был легким ( $-64$  до  $-99\text{ ‰}$ ).

Метанобразующие археи играют ключевую роль в процессе анаэробного разложения органических веществ в отсутствие таких акцепторов, как нитраты, сульфаты, Fe(III) и Mn(IV), поддерживающие более высокий окислительно-восстановительный потенциал в окружающей среде. Эти микроорганизмы участвуют в образовании биогенного метана в таких местах обитания, как болота, рисовники, рубец жвачных животных, свалки бытовых отходов и донные отложения (Hedderich and Whitman 2013; Costa and Leigh 2014). Активное изучение разнообразия и распространения архей, включая метаногенов, в многолетнемерзлых экосистемах началось приблизительно 25 лет назад. Применение микробиологических методов позволило выделить, идентифицировать и описать новые метаногенные виды архей родов *Methanosarcina* и *Methanobacterium* в голоценовой, плиоценовой и плейстоценовой вечной мерзлоте, которые ответственны за образование метана в экстремальных условиях ММО (Rivkina *et al.*, 2007; Krivushin *et al.*, 2010; Shcherbakova *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2013). Большая часть исследований некультивируемого разнообразия архей в мерзлых почвах и вечной мерзлоте (Høj *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2009; Blake *et al.*, 2015) не обнаруживали метаногенных архей в изученных образцах. Недавно опубликованные результаты метагеномного секвенирования двух образцов вечномерзлых осадков позволили предположить, что состав архейного сообщества и наличие в нем метаногенов определяется происхождением ММО (Krivushin *et al.*, 2015; Rivkina *et al.*, 2016).

Поскольку большинство планет Солнечной системы характеризуются криолитолизом, а вечномерзлые грунты являются уникальной моделью внесезонного местообитания для живых организмов (Гиличинский, 2002; Демидов *и др.*, 2012), то выделенные из ММО микроорганизмы могут быть хорошей моделью для изучения возможной инопланетной жизни. Обнаружение в атмосфере Марса метана привлекло внимание исследователей к метаногенным автотрофным археям как модельным объектам в решении проблем астробиологии (Kendrick and Kral, 2006; Altheide and Kral, 2008; Kral *et al.*, 2011).

**Цель и задачи исследования.** В связи с вышеизложенным, целью нашей работы было исследование состава архейных микробных сообществ образцов многолетнемерзлых отложений Арктики различного возраста и особенностей биологии метаногенных изолятов, выделенных из мерзлых пород.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Исследование некультивируемого разнообразия архей в образцах многолетнемерзлых отложений Арктики.
- 2) Выделение и характеристика метанобразующей археи и бактериального спутника из метаногенной бинарной культуры, полученной в результате длительной инкубации ММО голоценового возраста при  $15^\circ\text{C}$ .
- 3) Исследование влияния бактериального спутника на метаногенез чистых культур метаногенов различного происхождения.

- 4) Изучение особенностей роста метанообразующих архей мерзлоты как модельных организмов для астробиологии.
- 5) Оценка возможности идентификации метанообразующих архей методом времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы.** Впервые исследовано некультивируемое разнообразие архей в многолетнемерзлых отложениях Арктики различного возраста. Охарактеризованы новые виды метанообразующей архей '*Methanosarcina gilichinskiia*' JL01<sup>T</sup> и ее бактериального спутника *Sphaerochaeta associata* GLS2<sup>T</sup>, выделенных из ММО голоценового возраста.

Исследовано влияние перхлоратов, как компонента грунта Марса, на рост и метаногенез метаногенных архей, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что метаногены из мерзлоты оказались более устойчивы к действию этих окислителей. Кроме того обнаружены свидетельства о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана.

Проведен МАЛДИ масс-спектрометрический анализ метанообразующих архей фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов. Показано, что данный метод может использоваться для экспресс-определения таксономической принадлежности новых метанообразующих архей.

**Практическое значение.** Изоляты адаптированных к холоду бактерий представляют интерес как компоненты искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации загрязняющих природу веществ в холодном климате, а также как источники холодоактивных ферментов, используемых в пищевой промышленности, при очистке сточных вод, в молекулярной биологии. Созданная база белковых профилей метаногенных архей может использоваться для идентификации новых изолятов.

**Личный вклад соискателя.** Соискатель лично принимал участие на всех этапах работы: разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

**Апробация работы.** Основные положения работы доложены на международной конференции The 10<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles (Санкт-Петербург, Россия, 2014), 19-ой и 21-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2015; 2017), 6-й международной конференции «Polar and Alpine Microbiology» (Ческе-Будеевице, Чехия, 2015), 5-ой Всероссийской конференции молодых ученых "Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы" (Улан-Удэ, Бурятия, 2016), 7-ом Европейском микробиологическом конгрессе FEMS (Валенсия, Испания, 2017).

**Публикации.** Материалы диссертации содержатся в 9 печатных работах: 3 экспериментальных статьях, в том числе в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК - 2, и 6 тезисах.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 158 страницах машинописного текста и включает 28 рисунков и 15 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей 2 главы (методы и результаты и обсуждения), заключения, выводов, списка литературы, который содержит 305 наименований, и 2 приложений.

**Место проведения работы.** Основная часть работы выполнялась в Лаборатории анаэробных микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН). Получение клоновых библиотек проводили в Национальном институте полярных исследований, г. Токио, Япония.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Щербаковой В.А. за предложенную тему, внимание и неоценимую помощь в работе и обсуждении результатов, а также всему коллективу лаборатории анаэробных микроорганизмов за практическую помощь, ценные советы и поддержку при написании диссертации. Особую благодарность автор выражает сотрудникам ИБФМ РАН: с.н.с., к.б.н. Арискиной Е.В. за помощь в определении Г+Ц состава ДНК и проведении анализа ДНК-ДНК гибридизации; с.н.с., к.б.н. Сузиной Н.Е. за помощь в проведении микроскопических исследований; с.н.с., к.б.н. Винокуровой Н.Г. за помощь в определении липидов; с.н.с., к.б.н. Лауринавичюсу К.С. за помощь в проведении МАЛДИ МС анализа. Автор также благодарна Новикову А.А. (ГУ нефти и газа им. Губкина) за помощь в определении жирнокислотного состава клеточных стенок и к.г.-м.н. Ривкиной Е.М. (лаборатория криологии почв ИФХиБПП РАН) за предоставленные образцы многолетнемерзлых отложений и плодотворное обсуждение полученных результатов. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ 04-15-08612а).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

**Объекты исследования.** Объектами исследования была метаногенная бинарная культура JL01, состоящая из штамма метаносарцины и анаэробной, устойчивой к антибиотикам, бактерии. Для сравнительных экспериментов использовали чистые культуры *Methanobacterium articum* M2<sup>T</sup> VKM В-2372<sup>T</sup>, *M. bryantii* M.o.H<sup>T</sup> VKM В-1629<sup>T</sup>, *M. veterum* МК4<sup>T</sup> VKM В-2440<sup>T</sup>, *Methanosarcina masei* S6<sup>T</sup> VKM В-1636<sup>T</sup> из Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM). Для определения белковых профилей целых клеток также использовали штаммы метанобразующих архей фонда VKM (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>).

**Отбор проб.** Для исследования разнообразия и распределения метаногенных архей в мерзлых отложениях использовали образцы (скважина 04-07, Колымская низменность, Якутия), предоставленные лабораторией криологии почв ИФХиБПП РАН. Данные образцы были отобраны в ходе экспедиции в 2007 году с различной глубины, охватывающей горизонты ММО, отличающиеся по температурному режиму. Характеристика образцов представлена в Таблице 1.

**Таблица 1. Характеристика многолетнемерзлых отложений Колымской низменности, в которых исследовалось архейное разнообразие**

Образец	Глубина, м	Возраст, лет*	Содержание общего C <sub>орг</sub> , %	CH <sub>4</sub> , мМ кг <sup>-1</sup>	δ <sup>13</sup> CH <sub>4</sub> , ‰*
Активный слой					
KL50	0,50-0,55	н.о.	4,1	0,035	н.о.
Слой с годовыми температурными колебаниями					
KL400	4,0-4,1	н.о.	1,5	0,648	-72
KL1450	14,5-14,6	н.о.	0,8	0,313	-88
Слой с постоянными отрицательными температурами					
KL1750	17,5-17,6	23800±170	0,27	0,104	-85
KL2200	22,2-22,3	30700±390	0,34	0,503	-95

н.о., не определено; \*данные Kraev *et al.*, 2013

**Культивирование микроорганизмов.** Для получения и культивирования накопительных и чистых культур метаногенных архей руководствовались анаэробной техникой (Hungate, 1969) и использовали основную минеральную среду (Balch *et al.*, 1979). Чистую культуру метаногенного штамма JL01<sup>T</sup> получали на аналогичной минеральной среде с добавлением казаминовых кислот (1 г/л) и ацетата (4 г/л). Штаммы *M. articum* M2<sup>T</sup> VKM В-2372<sup>T</sup> и *M. bryantii* М.о.Н<sup>T</sup> VKM В-1629<sup>T</sup>, используемые в сравнительных экспериментах, культивировали на модифицированной среде 141 (DSMZ). Штамм *M. veterum* МК4<sup>T</sup> VKM В-2440<sup>T</sup> выращивали на среде DSMZ 506 (Krivushin *et al.*, 2010), а штамм *Methanosarcina masei* S6<sup>T</sup> VKM В-1636<sup>T</sup> - на среде, аналогичной для штамма JL01<sup>T</sup>. Для выделения чистой культуры бактериального спутника штамм GLS2<sup>T</sup> использовали метод десятикратных разведений (Hungate, 1969) на модифицированной среде SM (Leadbetter & Breznak, 1996). Для определения белковых профилей метаногены культивировали на средах и температурах, соответствующих каждому штамму (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>).

**Микроскопия.** Морфологию клеток изучали с помощью светового микроскопа Zeiss Axiostar plus, а также микроскопа Nikon Eclipse Ci с камерой Jenoptic Prog Res SpeedXT<sup>core</sup>5. Ультратонкое строение клеток исследовали по методу Рейнольдса (Reynolds, 1963) на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM-100B.

**Культуральные свойства и физиологические особенности** определяли, руководствуясь минимальными стандартами для описания новых таксонов метаногенов (Boone and Whitman, 1988) и общепринятыми методиками (Powel, 1983; Gerhardt, 1994). Оптимальные параметры роста определяли по скорости роста, о которой судили по оптической плотности (OD) при 600 нм (штамм GLS2<sup>T</sup>) на спектрофотометре Specol 221 (Германия), либо по образованию метана в газовой фазе (метаногены).

Влияние перхлоратов на рост метаногенов оценивали путем изменения скорости образования метана из CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> и ацетата при действии NaClO<sub>4</sub> или Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

**Аналитические методы.** Образование метана и ацетата определяли на газовом хроматографе Pye-Unicam (Великобритания). Определение водорода осуществляли на газовом хроматографе Shimadzu 8A с теплопроводным детектором. Концентрацию белка в клеточной биомассе определяли методом Бредфорд (Bradford, 1976). Липиды экстрагировали из лиофилизированных клеток в соответствии с методикой (Minnikin *et al.*, 1979). Отделение липидов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии на ТСХ-пластинах Silica Gel 60F (Merck). Фосфолипиды определяли молибденовым синим, гликолипиды -  $\alpha$ -нафтолом (Minnikin *et al.*, 1979). Биомассу для анализа жирнокислотного состава клеток обрабатывали согласно инструкциям Microbial Identification system (Sasser, 1990). Полученные экстракты эфиров жирных кислот анализировали с помощью хроматографической системы Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II GC-MS при температурном режиме колонки от 120 до 300°C. Концентрацию перхлоратов определяли на хроматографе IC-2010 (Токио, Япония). Ингибирующее действие (I%) перхлоратов определяли по формуле % I = 100 - % АСТ.

**Молекулярно-генетические методы.** ДНК из образцов многолетнемерзлых отложений выделяли с помощью набора Power Soil DNA (USA) согласно протоколу производителя. Выделение и очистку хромосомной ДНК чистых культур метаногенов проводили модифицированным методом Мармура (Marmur, 1961). Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoPhotometer®P-Class (Implen, Германия). Амплификацию генов осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). В Таблице 2 представлены праймеры, использованные в работе.

**Таблица 2. Праймеры, использованные в работе**

Праймер	Ген-мишень	Последовательность (5`-3`)	Ссылка
340F2	16S рPHK архей	CCCTAYGGGGYGCASCAGGC	Murakami <i>et al.</i> , 2011
932R	16S рPHK архей	GCYCYCCCGCCAATTCMTTTA	Murakami <i>et al.</i> , 2011
27f	16S рPHK бактерий	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1492r	16S рPHK бактерий	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
ML-f	<i>mcrA</i>	GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWAC AGC	Luton <i>et al.</i> , 2002
ML-r	<i>mcrA</i>	TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT	Luton <i>et al.</i> , 2002
MCR1R	<i>mcrA</i>	ARCCADATYTGRTCRTA	Hales <i>et al.</i> , 1996
MCRf	<i>mcrA</i>	TAYGAYCARATHTGGYT	Springer <i>et al.</i> , 1995

Создание клоновых библиотек генов 16S рPHK и *mcrA* проводили при помощи клонирования соответствующих ПЦР продуктов с использованием набора QIAEX II Gel (Qiagen, Hilden, Germany).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов 16S рPHK и *mcrA* проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН и Институте полярных исследований (г. Токио, Япония) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК 3730 Applied Biosystems. Филогенетические дендрограммы были построены с использованием пакета программ MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) с применением метода «neighbor-joining» (Saitou *et al.*, 1987).

Статистический анализ последовательностей проводили по методике (Good, 1953; Chao, 1987). Индексы видового разнообразия Шеннона (H) и доминирования Симпсона (D) определяли с использованием программного обеспечения “Shannon and Chao 1 index RBD” (Cole *et al.*, 2014).

Содержание Г+Ц пар в ДНК определяли по температуре плавления ДНК (Mesbah *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 1985). Реакцию ДНК-ДНК гибридизации проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora с соавт. (2011).

**МАЛДИ-масс спектрометрический анализ** проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker Daltonics», Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics» (Германия): flex Control 2.4 (Build 38) и flex Analysis 2.4 (Build 11).

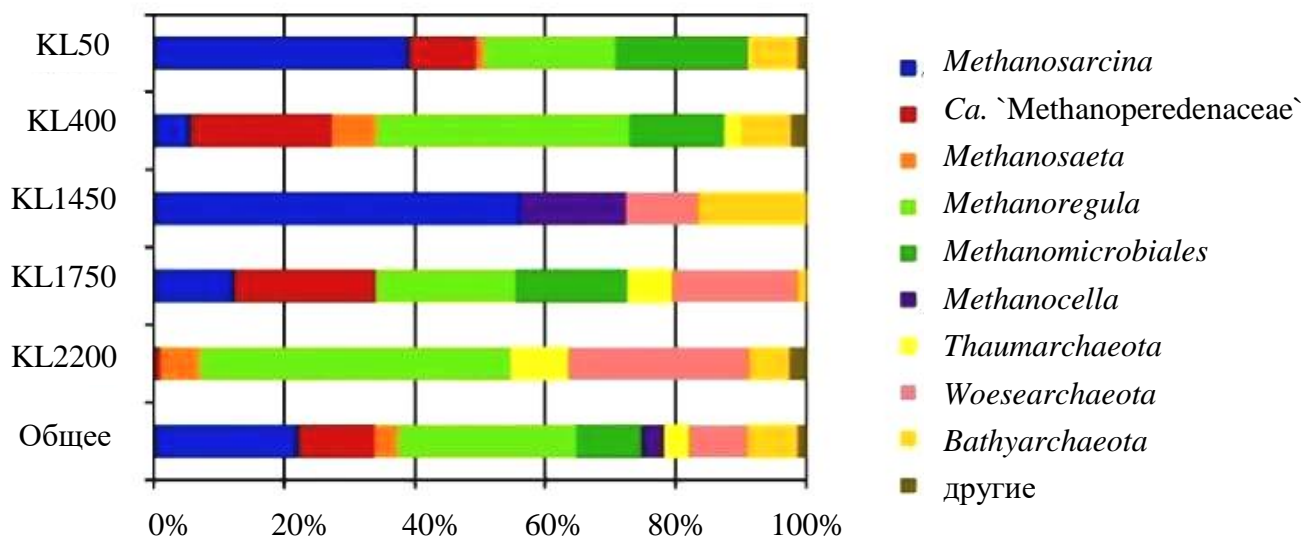
## Результаты исследования и их обсуждение

### Исследование разнообразия архей в многолетнемерзлых образцах различного возраста

**Создание клоновой библиотеки гена 16S рPHK.** В результате амплификации общей ДНК, выделенной из каждого образца, с универсальными архейными праймерами и последующим клонированием, были созданы пять клоновых библиотек, объем выборки которых составил от 81 до 88 клонов с покрытием от 70 до 93%. Доминантным (57-93% архейных клонов) во всех образцах оказался филум *Euryarchaeota*. Кроме того, во всех

исследованных образцах были обнаружены представители филума *Bathyarchaeota*. Остальные последовательности 16S рРНК гена были отнесены к филумам *Thaumarchaeota* и *Woesearchaeota*.

Четыре ветви филума *Euryarchaeota* представляли метанобразующие группы: ацетокластические метаногены, относящиеся к родам *Methanosarcina* и *Methanosaeta* порядка *Methanosarcinales*; и водородиспользующие метаногены родов *Methanoregula* и *Methanocella* порядков *Methanomicrobiales* и *Methanocellales*. Филотип *Candidatus* 'Methanoperedenaceae' (Haroop *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015) порядка *Methanosarcinales* был обнаружен в четырех из пяти образцов и имел наибольшее сходство по 16S рРНК с семью филотипами, три из которых относились к родственной филогенетической группе *Methanoregulaceae* порядка *Methanomicrobiales*. (Рисунок 1).



**Рисунок 1. Частота встречаемости клонов, содержащих амплифицированные фрагменты генов 16S рРНК указанных архей из образцов многолетнемерзлых пород.**

В дополнение к метаногенной составляющей, в образцах KL50, KL400 и KL2200 присутствовал минорный компонент (1,2-2,5% клонов), относящийся к порядку *Thermoplasmata* (KL-16S-OTU35 и KL-16S-OTU26). Микроорганизмы данной группы содержат *mcrA* ген и, вероятнее всего, могут образовывать метан (Paul *et al.*, 2012).

Две ветви *Thaumarchaeota* включали три филотипа, относящихся к С3 и SCG группам архей. Филогенетическая группа *Woesearchaeota* состояла из 11 филотипов, большинство из которых были обнаружены в образце KL2200 (Рисунок 1 и 2). Анализ последовательностей 16S рРНК гена показал, что семь таксономических групп имеют нуклеотидные последовательности, на 100% идентичные ранее секвенированным последовательностям, полученным из природных образцов холодных мест обитания, таких как, вода, отложения пресноводных озер, болот и многолетней мерзлоты. Так, филотип KL-16S-OTU0 (22,1% общего числа клонов), чьим близким родственником оказался вид *Methanoregula formicica* (97% сходства), был идентичен с филотипом, полученным из образцов устья Жемчужной реки в Китае на глубине 1,5 м (Chen *et al.*, 2014). Вторая большая группа клонов (8,8%), относящаяся к филотипу KL-16S-OTU4, представляла новое семейство порядка *Methanomicrobiales* (Рисунок 2) и включала последовательности, полностью совпадающие с последовательностями, обнаруженными в образцах отложений Цинхай-Тибетского нагорья (Китай).



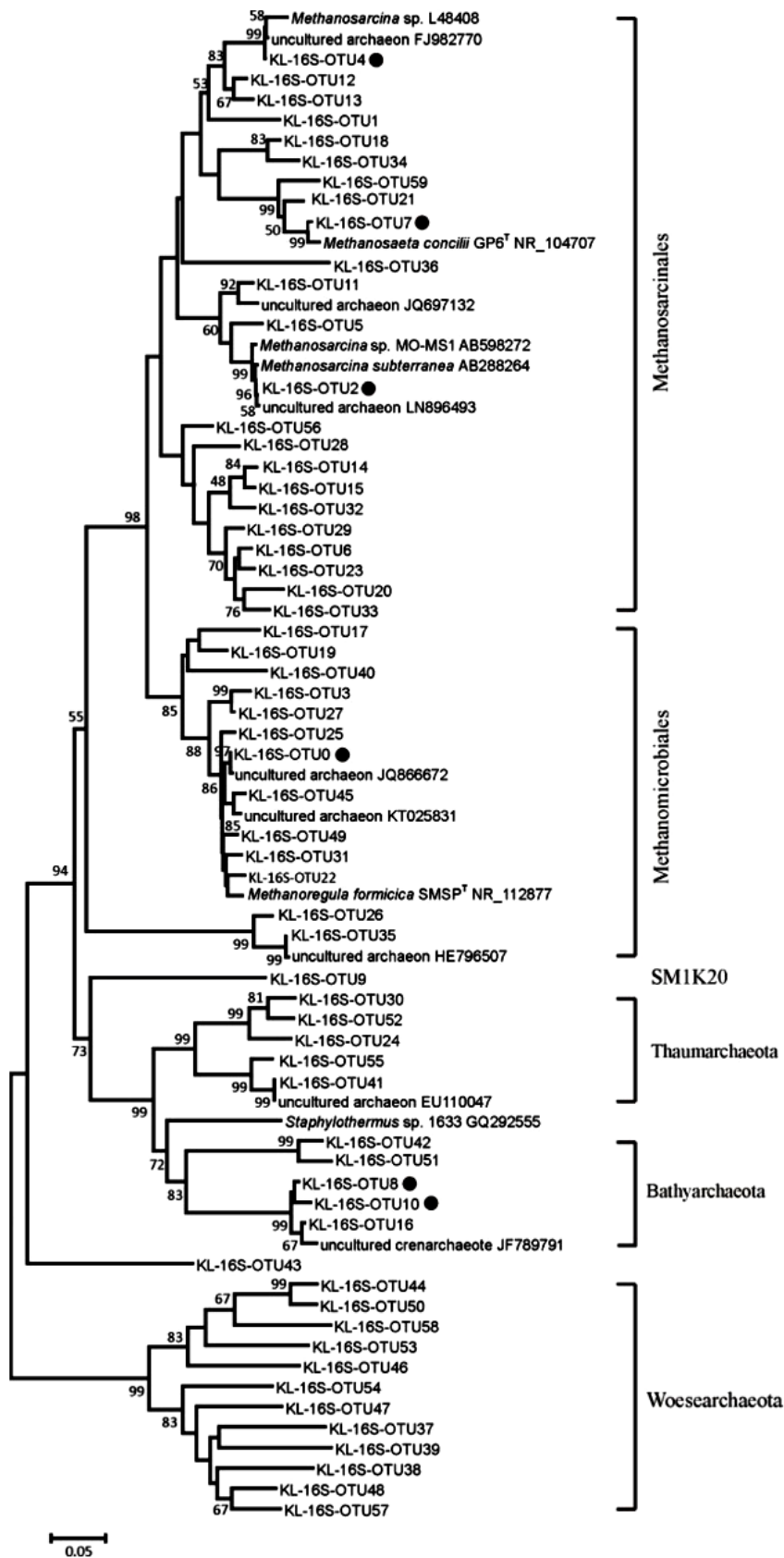
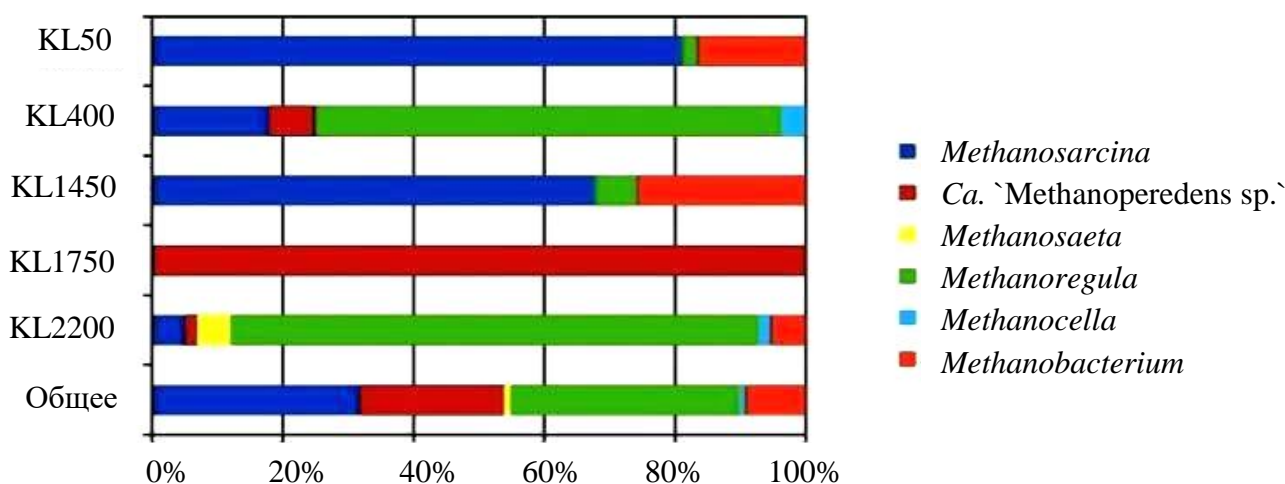


Рисунок 2. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК (~517 п.о.) образцов многолетнемерзлых отложений. Черными точками отмечены филоциты, обнаруженные более чем в трех образцах. Степень ветвления определена методом “neighbor-joining”. Данные “bootstrap”- анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

**Создание клоновой библиотеки гена *mcrA*.** Выборка библиотеки клонов гена *mcrA* включала от 43 до 59 клонов, а общее количество филоотипов составило 37. В каждом образце ММО были обнаружены от 3 до 23 таксономических групп архей. Покрытие составило 59-95%, что выше средних значений, необходимых для достоверной характеристики разнообразия в библиотеках. Большая часть метаногенных филоотипов была обнаружена на глубине 4 м (KL400), меньшая - на глубине 14,5 м (KL1450).

32% общего количества последовательностей *mcrA* гена были отнесены к роду *Methanosarcina*, 35% - *Methanoregula*, 9% - *Methanobacterium*. К филоотипу *Ca. 'Methanoperedenaseae'* относилось 22% последовательностей, обнаруженных только в образцах трех самых нижних из исследованных горизонтов (Рисунок 3).

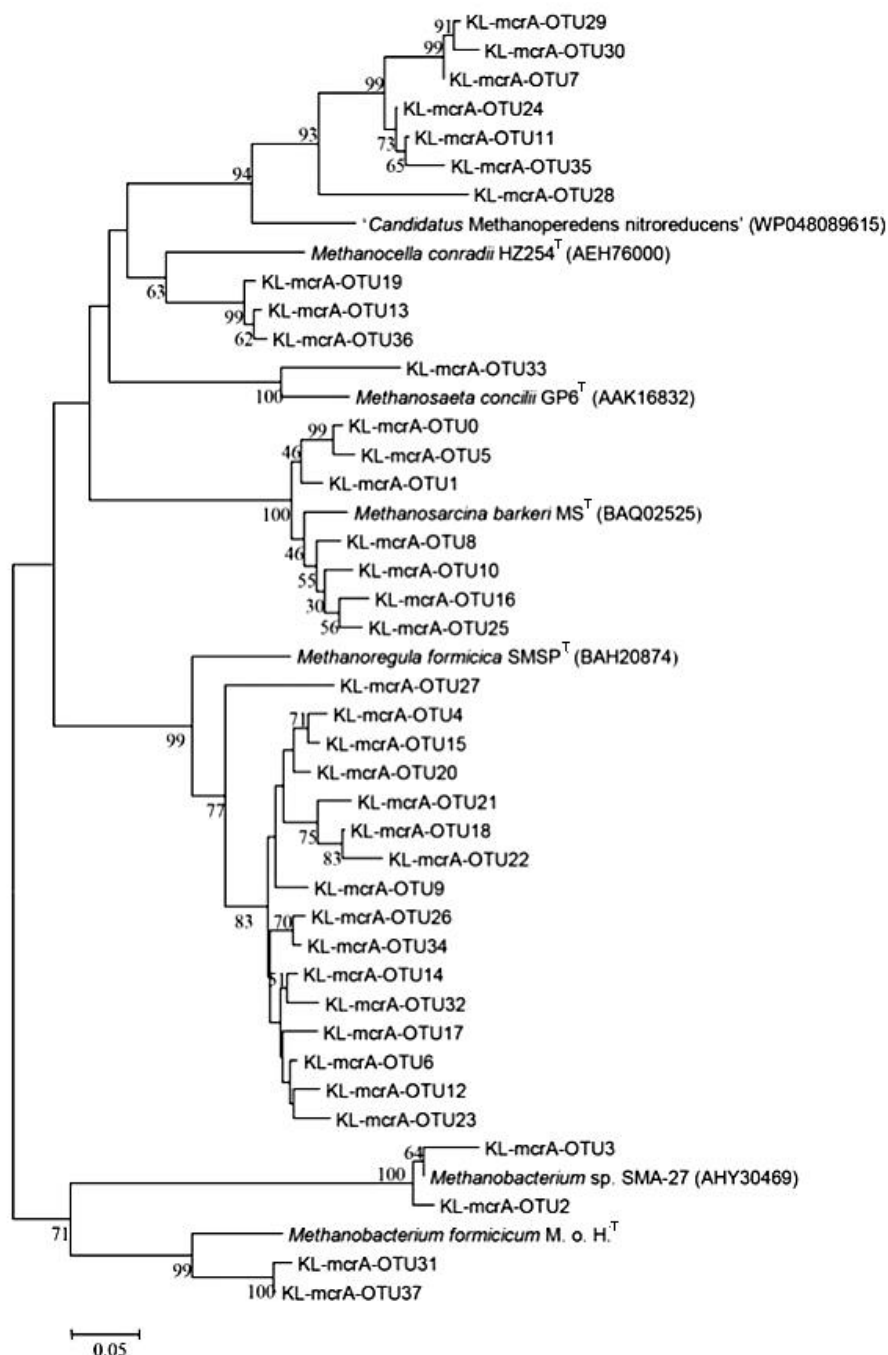


**Рисунок 3. Частота встречаемости клонов, содержащих амплифицированные фрагменты генов *mcrA* в исследуемых образцах многолетнемерзлых пород.**

Сравнение последовательностей *mcrA* гена, полученных в результате наших исследований, с последовательностями, помещенными в GenBank, показало, что представители родов *Methanoregula* (KL-*mcrA*-OTU9) и *Methanocella* (KL-*mcrA*-OTU36) полностью идентичны таксономическим группам, полученным ранее из образцов горных областей Швейцарии и Китая, а последовательность *mcrA* гена филоотипа *Ca. 'Methanoperedens sp.'* (KL-*mcrA*-OTU11) полностью совпала с последовательностью, полученной из образца анаэробного биореактора.

Последовательности гена *mcrA*, полученные в нашем исследовании, были отнесены к классам *Methanobacteria* и *Methanomicrobia*. Доминирующим оказался класс *Methanomicrobia*, который, в свою очередь, включал филоотипы, относящиеся к порядкам *Methanocellales* (3 ОТЕ), *Methanomicrobiales* (9 ОТЕ) и *Methanosarcinales* (16 ОТЕ) (Рисунок 4).

Таким образом, обнаруженные метаногенные археи относились к культивируемым и некультивируемым представителям порядков *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanobacteriales*. Семь филоотипов порядка *Methanosarcinales* были идентифицированы как представители ранее предложенного семейства *Ca. 'Methanoperedenaseae'*. В настоящее время данное семейство не имеет культивируемых представителей, но основываясь на данных геномов, авторы описания предполагают, что *Ca. 'Methanoperedenaseae sp.'* может получать энергию в процессе анаэробного окисления метана (АОМ) с использованием нитрата как конечного акцептора электронов.

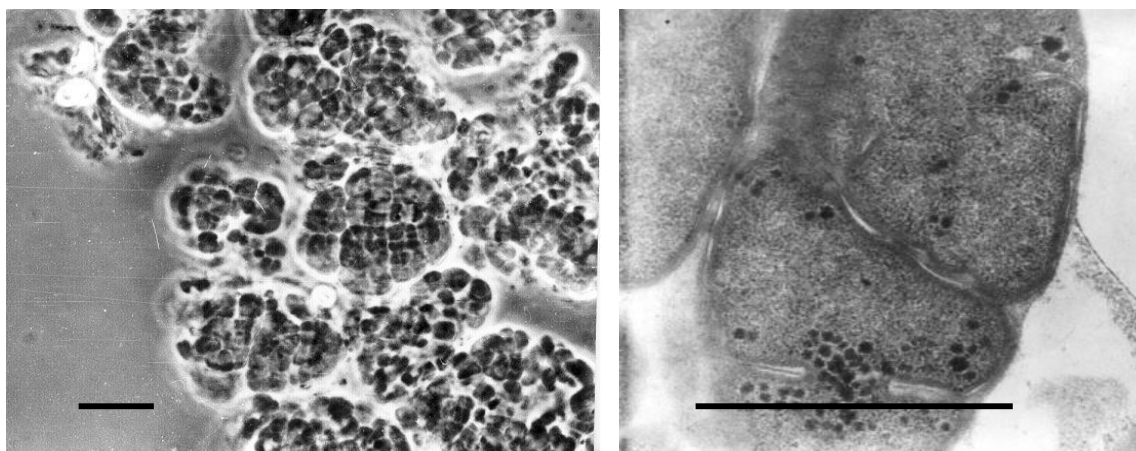


**Рисунок 4. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов *mcrA* гена (142 п.о.) образцов многолетнемерзлых отложений. Степень ветвления определена методом “neighbor-joining”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.**

### Описание нового вида метаносарцины

Методом длительного анаэробного культивирования при 15°C с использованием ацетата в качестве источника углерода в присутствии пенициллина и образцов голоценовых многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (северо-восток России, 70°06'N, 154° 04'Е) была получена бинарная метаногенная культура. В последствие, методом клонирования был определен бактериальный спутник и обозначен нами как штамм GLS2. Путем многократных пересевов с антибиотиками различных классов нам удалось получить чистую культуру метаногена, обозначенную нами как штамм JL01<sup>T</sup>, и охарактеризовать ее.

Клетки штамма JL01<sup>T</sup> были неподвижны, окрашивались по Граму положительно и представляли собой нерегулярные кокки 1,0-1,5 мкм в диаметре, располагающиеся в виде агрегатов (Рисунок 5). Некоторые клетки имели электронно-плотные включения, вероятно, полифосфаты. На твердых питательных средах штамм JL01<sup>T</sup> образовывал желтые зернистые колонии 1-3 мм в диаметре после 14-16 дней культивирования, а на жидких средах небольшие, оседающие на дно, агрегаты.

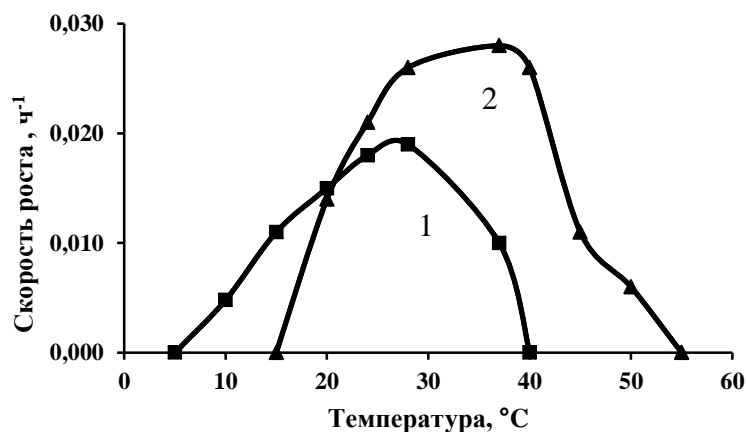


А

Б

**Рисунок 5. Микрофотографии клеток штамма JL01<sup>T</sup>. А – фазовый контраст, величина масштабной линейки 10 мкм; Б - ультратонкие срезы, величина масштабной линейки 1 мкм.**

Штамм JL01<sup>T</sup> был мезофилом, рос при температуре от 10 до 37°C (оптимальный рост при 24-28°C), тогда как референтный штамм S-6<sup>T</sup> - от 20 до 50°C (оптимальный рост при 37°C) (Рисунок 6) и нейтрофилом, растущим в диапазоне рН от 5,5 до 8,5 (оптимум 6,8-7,3). Нуждался в NaCl в концентрациях от 0,01 до 0,2 М. Оптимальная концентрация NaCl в среде для роста составляла 0,075 - 0,1 М NaCl.



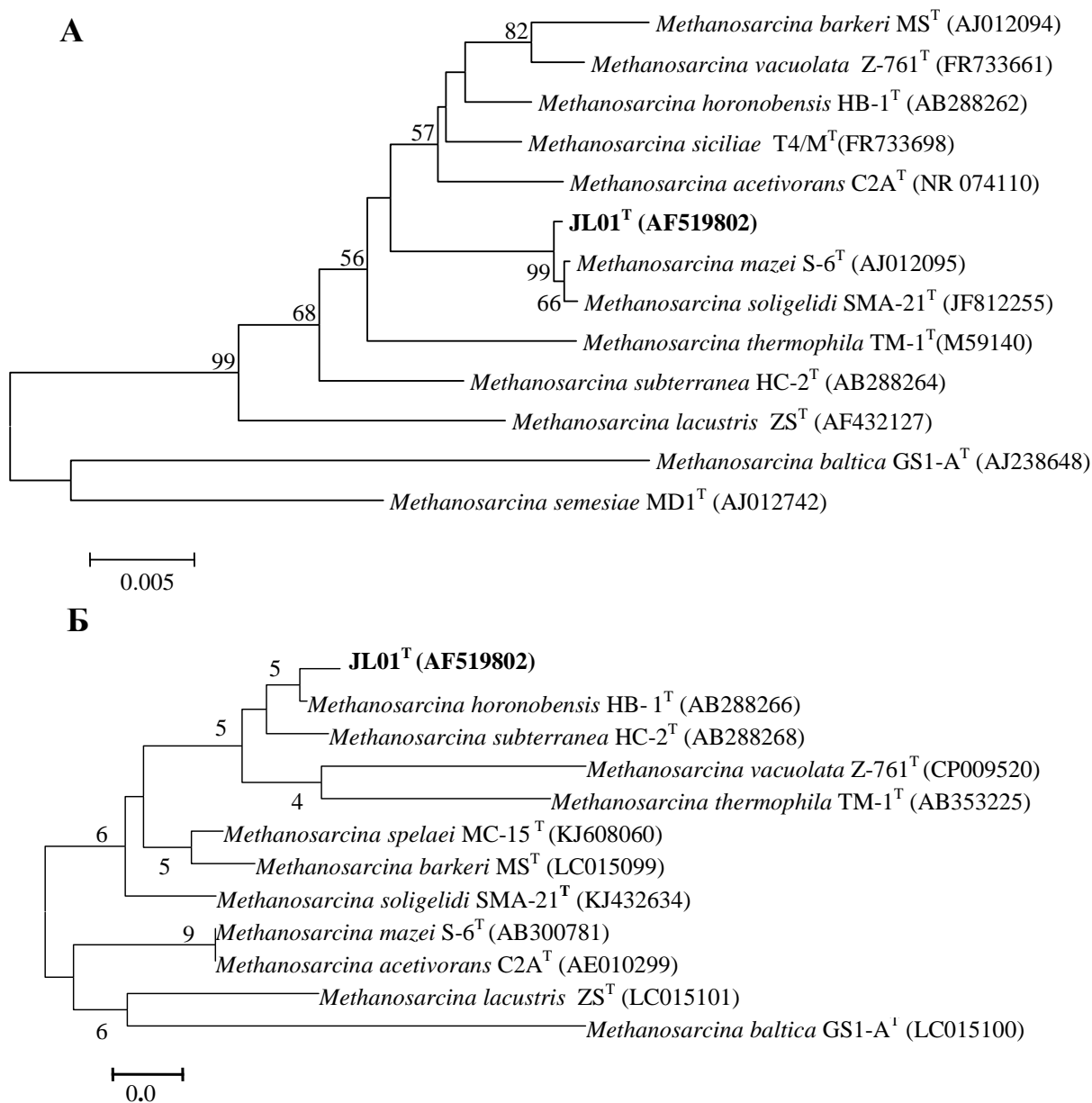
**Рисунок 6. Влияние температуры на рост штаммов JL01<sup>T</sup> (1) и S-6<sup>T</sup> (2) на метаноле.**

Рост не наблюдался на H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>+метаноле, H<sub>2</sub>+этаноле, пропионате, бутирате, формиате, лактате, дрожжевом экстракте. Метанол (0,038 ч<sup>-1</sup>), ацетат (0,027 ч<sup>-1</sup>), метиламин (0,014 ч<sup>-1</sup>), диметиламин (0,013 ч<sup>-1</sup>) и триметиламин (0,028 ч<sup>-1</sup>) поддерживали рост и метаногенез штамма JL01<sup>T</sup>.

Штаммы JL01<sup>T</sup> и *M.mazei* S-6<sup>T</sup> были чувствительны к хлорамфениколу (10 мг/мл) и полимиксину (10 мг/мл), устойчивы к пенициллину (2000 мг/мл), ванкомицину (2000 мг/мл),

эритромицину (1000 мг/мл) и канамицину (2000 мг/мл). Добавление в среду бацитрацина (10 мг/мл) замедляло рост штамма JL01<sup>T</sup>.

Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рНК показал, что штамм JL01<sup>T</sup> образует единый кластер с представителями рода *Methanosarcina*, ближайшими видами являются *M. mazei* S-6<sup>T</sup> (99,5% сходства) и *M. soligelidi* SMA-21<sup>T</sup> (99,4% сходства) (Рисунок 7 А). Сравнение транслированной аминокислотной последовательности гена А субъединицы метил-коэнзим М редуктазы (*mcrA*) штамма JL01<sup>T</sup> с другими последовательностями этого гена типовых штаммов всех видов рода *Methanosarcina* показало, что *mcrA* ген штамма JL01<sup>T</sup> на 99,4% идентичен подобному гену *M. horonobensis* HB-1<sup>T</sup>, в то время как идентичность с *mcrA* генами *M. mazei* и *M. soligelidi* составила 93,1 и 96,2%, соответственно (Рисунок 7 Б).



**Рисунок 7. Филогенетические дендрогаммы последовательностей генов 16S рНК (А) и транслированных аминокислотных последовательностей *mcrA* генов (Б), показывающие положение штамма JL01<sup>T</sup> относительно типовых штаммов других видов рода *Methanosarcina*; степень ветвления определена методом “neighbor-joining”. Данные “bootstrap”- анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления. Номера последовательностей в GenBank приведены в скобках.**

Сравнение фенотипических характеристик штамма JL01<sup>T</sup> с типовыми штаммами близкородственных видов показало, что все они имеют сходные оптимальные параметры роста (Таблица 3). Однако штамм JL01<sup>T</sup> отличается окрашиванием клеток по Граму и неспособностью к автотрофному росту на H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>. Содержание Г + Ц пар в ДНК штаммов JL01<sup>T</sup> и штамма S-6<sup>T</sup> составило 39,2 и 42,3 мол%, соответственно. А уровень ДНК-ДНК гибридизации (26,2 ± 2,7%) показал, что штаммы принадлежат разным видам.

**Таблица 3. Сравнительная характеристика штамма JL01<sup>T</sup> с типовыми штаммами близкородственных видов метаносарцин**

Штаммы: 1 - JL01<sup>T</sup> (данные нашего исследования); 2 - *M. mazei* DSM 2053<sup>T</sup> (Mah, 1980), \* - наши исследования; 3 - *M. soligelidi* SMA-21<sup>T</sup> (Wagner *et al.*, 2013)

Характеристика	1	2	3
<b>Морфология</b>	Псевдосарцины	Псевдосарцины, псевдококки	Псевдококки
<b>Диаметр, мкм</b>	1,0-1,5	1,0-3,0	1,3-2,5
<b>Окраска по Граму</b>	+	-	-
<b>Температура, °С</b>			
<b>Диапазон (оптимум)</b>	10-37 (24-28)	20-50 (30-40)*	0-54 (28)
<b>рН</b>			
<b>Диапазон (оптимум)</b>	5,5-8,5 (6,8-7,3)	5,5-8,5 (6,0-7,0)	4,8-9,9 (7,8)
<b>NaCl, М</b>			
<b>Диапазон (оптимум)</b>	0,01-0,2 (0,075-0,1)	0,1-1,0 (0,1-0,3)*	0,02-0,6 (0,02)
<b>Г+Ц, мол. %</b>	39,2	42,0*	40,9
<b>Субстраты</b>	Метанол, ацетат, метиламины	Метанол, ацетат, метиламины, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> *	Метанол, ацетат, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
<b>Источник выделения</b>	ММО, Арктика, Россия	Биореактор, США	Мерзлые почвы, Арктика, Россия

Таким образом, получены убедительные данные о таксономической обособленности штамма JL01<sup>T</sup> в рамках рода *Methanosarcina*, для которого нами предложено название *Methanosarcina gilichinskiia* sp.nov.

#### **Диагноз *Methanosarcina gilichinskiia* sp. nov.**

*Methanosarcina gilichinskiia* (L. fem. adj. *gilichinskiia*, в честь Давида Гиличинского, инициатора исследований микроорганизмов вечной мерзлоты).

Клетки грамположительные неподвижные нерегулярные кокки, имеют включения полифосфатов. Встречаются в парах или в составе агрегатов. Строгий анаэроб. Метан получает из метанола, уксусной кислоты и метиламинов. Не растет на H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>+метаноле, H<sub>2</sub>+этаноле, пропионате, бутирате, формиате, лактате, дрожжевом экстракте.

Пенициллин, ванкомицин, эритромицин и канамицин не влияют на рост. Не нуждается в факторах роста, но витамины, триптиказа и казаминовые кислоты стимулируют рост. Рост наблюдается при температуре 10-37°C (оптимальная 24-28°C), при рН 5,5-9,0



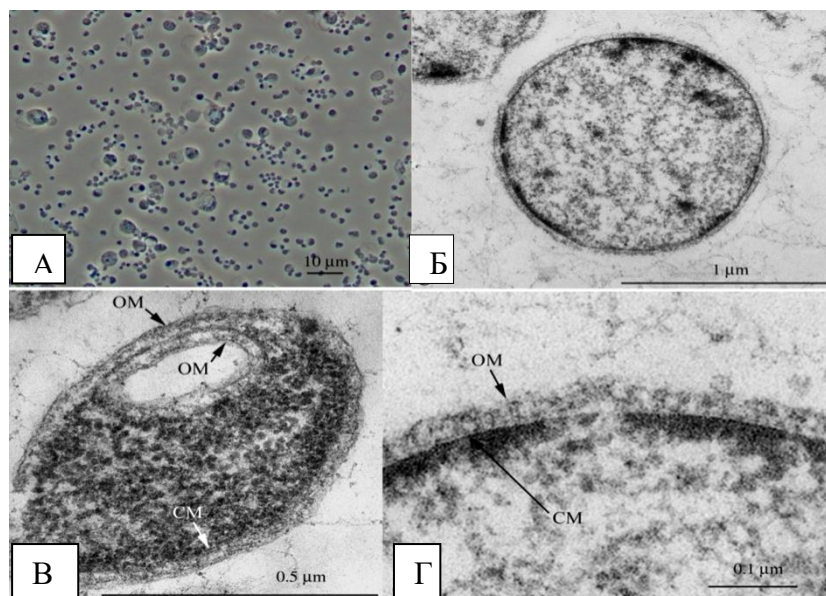
(оптимальный pH 6,8-7,3) и в присутствии NaCl от 0,01 до 0,2 М (оптимальная 0,075 - 0,1 М NaCl). Содержание Г+Ц пар в ДНК составляет 39,2% мол.

Типовой штамм JL01<sup>T</sup> (=VKM В-2370<sup>T</sup>=JCM 31898<sup>T</sup>) был выделен из многолетнемерзлых отложений голоценового возраста Колымской низменности, Россия. Последовательности генов 16S рРНК и *mcrA* депонированы в GenBank под номерами AF519802 и KY368727, соответственно.

### Бактериальный спутник '*Methanosarcina gilichinskii*' JL01<sup>T</sup>

В метаногенной культуре JL01 методом клонирования был определен бактериальный спутник, относящийся к роду *Sphaerochaeta*. Путем десятикратных разведений на жидкую среду, содержащую ксилозу, была выделена и охарактеризована чистая культура штамма GLS2<sup>T</sup>.

Изолят представлял собой грамотрицательные неподвижные клетки сферической или овальной формы, размерами от 0,2 до 1-2 мкм, часто объединяющиеся в агрегаты различных размеров, напоминающие шары. (Рисунок 8, А, Б). Также отмечались одиночные яркие сферические тела размером около 4 мкм и клетки в виде колец (Рисунок 8, В). Трансмиссионная электронная микроскопия выявила Грам-отрицательный тип клеточной стенки (Рисунок 8, Г). Электронная микроскопия клеток GLS2<sup>T</sup> показала многочисленные формы без явной клеточной стенки. Некоторые из этих клеток имели очень небольшие размеры (около 100 нм), и, по-видимому, были образованы путем экструзии мембраны. Клетки GLS2<sup>T</sup>, выращенные в присутствии ампициллина, могли проходить через стерильную мембрану размером пор 0,22 мкм, после чего наблюдался рост культуры.



**Рисунок 8. Микрофотографии клеток штамма GLS2<sup>T</sup>:** фазовый контраст (А), трансмиссионный электронный микроскоп, негативно окрашенные ультратонкие срезы – коккоидные клетки (Б), клетка в виде кольца (В), клеточная стенка (Г). Условные обозначения:СМ- клеточная мембрана; ОМ – наружная мембрана.

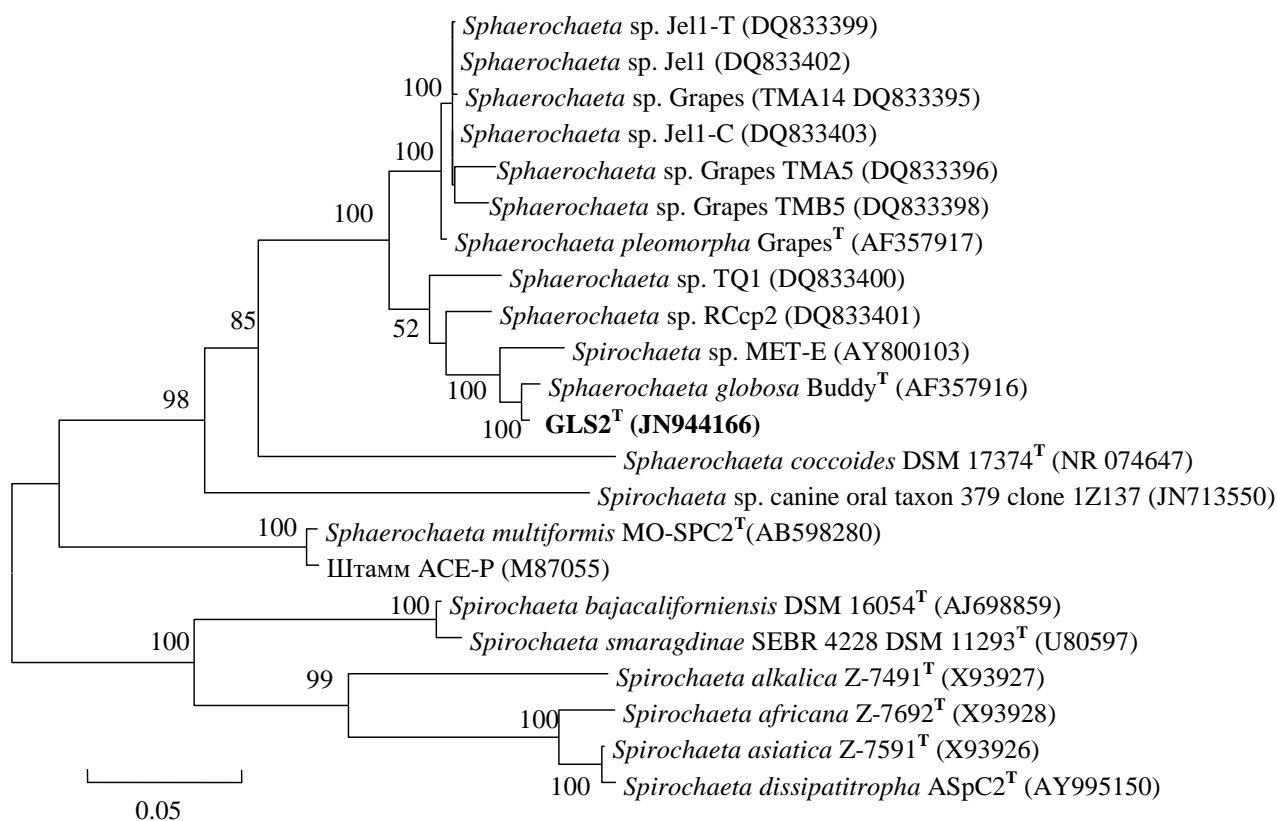
Штамм GLS2<sup>T</sup> являлся строгим анаэробом, мезофилом с ростом в диапазоне температур от 20 до 40 °С (оптимум при 30-34°С) и нейтрофилом. Оптимальное значение pH для роста составляло 6,8-7,5, однако рост также наблюдался при pH от 5,7 до 8,2. Штамм GLS2<sup>T</sup> нуждался в NaCl в концентрации 0,02-0,03 М для оптимального роста. Присутствие в среде NaCl в концентрации 0,08 М и выше ингибировало рост.

В качестве источников углерода и энергии для роста новая бактерия использовала моно-, ди- и трисахариды. Хороший рост наблюдался на арабинозе, ксилозе, мальтозе, галактозе, раффинозе и целлобиозе. Штамм не использовал в качестве единственного источника для роста лактозу, сахарозу, крахмал, фруктозу, целлюлозу, ксилан или дрожжевой экстракт. Штамм рос на лактате и глюкоуроновой кислоте, но не мог использовать другие органические кислоты (малат, цитрат, пируват, бензоат, фумарат, пропионат, ацетат) также как этанол, метанол, триметиламин, галактозамин и  $H_2+CO_2$ . Для роста на всех субстратах требовался дрожжевой экстракт. Также как *S. globosa* штамм Buddy<sup>T</sup> (Ritalahti *et al.*, 2012) при росте на ксилозе изолят мог ассимиляционно восстанавливать цитрат Fe(III) или EDTA-Fe(III) до Fe(II). При росте на ксилозе штамм GLS2<sup>T</sup> не восстанавливал сульфат, тиосульфат, сульфит и нитрат. Кроме того, сульфит полностью ингибировал его рост.

Анализ полярных липидов клеток штамма GLS2<sup>T</sup> показал, что в их состав входят гликолипиды, фосфолипиды и фосфогликолипиды.

Согласно анализу ферментативных активностей штаммы GLS2<sup>T</sup> и Buddy<sup>T</sup> характеризовались высокой активностью щелочной и кислой фосфатаз, нафтол-AS-BI-фосфогидролазы и  $\alpha$ -галактозидазы и слабой активностью  $\beta$ -галактозидазы. В то же время, штамм Buddy<sup>T</sup> проявлял слабую эстеразную и эстераза липазную активности, а штамм GLS2<sup>T</sup> – высокую валинариламидазную активность.

Основными жирными кислотами клеточных стенок штамма GLS2<sup>T</sup> были C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:0</sub> 3-OH и C<sub>16:1</sub>.



**Рисунок 9. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнения генов 16S рРНК изолятов, относящихся к родам *Sphaerochaeta* и *Spirochaeta*, и показывающее положение штамма GLS2<sup>T</sup>. Степень ветвления определена методом “neighbor-joining”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления. Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.**



Сравнение нуклеотидной последовательности штамма GLS2<sup>T</sup> с имеющимися последовательностями генов 16S рРНК в GenBank показало, что исследуемый штамм образует единый кластер с представителями рода *Sphaerochaeta* и имеет наибольшее сходство (99,3%) с *S. globosa* Buddy<sup>T</sup> (Рисунок 9). Содержание Г+Ц пар в ДНК штаммов GLS2<sup>T</sup> и штамма Buddy<sup>T</sup> составило 47,2 и 48,9 мол%, соответственно. А уровень ДНК-ДНК гибридизации (34,7 ± 8,8%) показал, что штаммы принадлежат разным видам.

На основании сравнения морфологических, физиологических, генотипических и филогенетических свойств штамма GLS2<sup>T</sup> и типовых штаммов других видов рода *Sphaerochaeta* (Таблица 4) нами был предложен новый вид *Sphaerochaeta associata*.

**Таблица 4. Дифференцирующие свойства штамма GLS2<sup>T</sup> и типовых штаммов рода *Sphaerochaeta***

Штаммы: 1, GLS2<sup>T</sup> (данные настоящего исследования); 2, *S. globosa* Buddy<sup>T</sup> (Ritalahti *et al.*, 2012); 3, *S. pleomorpha* Grapes<sup>T</sup> (Ritalahti *et al.*, 2012); 4, *S. coccoides* SPN1<sup>T</sup> (Dröge *et al.*, 2006; Abt *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.*, 2014). Все штаммы не содержат каталазу, имеют граммотрицательный тип клеточной стенки, ассимилируют D-ксилозу. \*Данные из Miyazaki *et al.*, 2014; н.о. – не определяли

Характеристика	1	2	3	4
<b>Морфология</b>	Плеоморфные кокки	Кокки	Плеоморфные кокки	Кокки
<b>Температура, (°C):</b>				
<b>диапазон</b>	20-40	20-37	15-30	15-40
<b>оптимум</b>	30-34	30	20-25	30
<b>pH:</b>				
<b>диапазон</b>	5,7-8,2	н.о.	н.о.	5.5-9.5
<b>оптимум</b>	6,8-7,5	6,5-7,5	6,5-7,5	7,4
<b>Оптимум NaCl, г/л</b>	1-1,5	1	1	1
<b>Основные жирные кислоты клеточных стенок</b>	C <sub>14:0</sub> ; C <sub>16:0</sub> ; C <sub>16:0</sub> 3-OH; C <sub>16:0</sub> DMA; C <sub>16:1</sub> ; C <sub>16:1</sub> DMA	C <sub>14:0</sub> ; C <sub>16:0</sub> ; C <sub>16:1</sub> ; C <sub>18:1</sub> ; br-C <sub>17:1</sub>	C <sub>14:0</sub> ; C <sub>16:0</sub> ; C <sub>16:1</sub> ; br-C <sub>17:1</sub>	*C <sub>14:0</sub> ; C <sub>16:0</sub> ; iso-C <sub>16:0</sub>
<b>Содержание Г+Ц пар в ДНК, мол%</b>	47,2	48,9	46,2	50,6
<b>Источник выделения</b>	<i>Methanosarcina</i> sp. JL01	Пресноводные отложения	Пресноводные отложения	Толстый кишечник термита <i>Neotermes castaneus</i>

**Диагноз *Sphaerochaeta associata* sp.nov.**

*Sphaerochaeta associata* (as.so.ci.a'ta. N.L. fem. part. adj. *associata*, выделен из бинарной культуры с '*Methanosarcina gilichinskiia*' JL01)

Клетки граммотрицательные неподвижные кокковидные, иногда в виде кольца размером 0,2-4,0 мкм. Штамм анаэробный, оксидазо- и каталазоотрицательный хемоорганогетеротроф. Образует кислотные и щелочные фосфатазы, нафтол-AS-VI-фосфогидролазу, α-галактозидазу, валинариламидазу. Для роста использует моно-, ди- и

трисахариды. Требуется дрожжевой экстракт для роста на всех субстратах. Не растет на фруктозе, целлюлозе, ксилане, дрожжевом экстракте, а также на ряде органических кислот, этаноле, метаноле, триметилаmine и  $H_2+CO_2$ . Рост наблюдался при температуре 20-40°C (оптимальная 30-34°C), при pH 5,7 – 8,2 (оптимальный 6,8-7,5) и оптимальной концентрации NaCl 0,02-0,03 М. Штамм устойчив к ампициллину, карбенициллину, цефепиму, ванкомицину, рифампицину, стрептомицину и чувствителен к канамицину, эритромицину и тетрациклину.

Типовой штамм GLS2<sup>T</sup> (=DSM 26261<sup>T</sup> = VKM В-2742<sup>T</sup>) был выделен из бинарной культуры с '*M. gilichinskiia*' JL01. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 47,2±0,8 мол%.

### Влияние *S. associata* GLS2<sup>T</sup> на рост и метаногенез '*M. gilichinskiia*' JL01<sup>T</sup>

Результаты исследования по влиянию бактерии '*S. associata*' и ее клеточных экстрактов на рост и метаногенез чистых культур, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и метаногенов, выделенных из наземных источников, показали, что совместное культивирование штамма JL01<sup>T</sup> и сахаролитической бактерии *S. associata* штамм GLS2<sup>T</sup> на среде для метаногенных архей (метанол в качестве субстрата) приводило к значительному увеличению продукции метана и сокращению лаг-периода (Рисунок 10). Подобное влияние *S. associata* на рост *M. arcticum* M2<sup>T</sup>, *M. veterum* МК4<sup>T</sup>, *M. bryantii* М.о.Н.<sup>T</sup> и *M. mazei* S-6<sup>T</sup> не было установлено.

В отличие от бактериальной культуры, экстракты клеток *S. associata*, полученные автоклавированием, не оказывали стимулирующего воздействия ни на один из исследованных штаммов метаногенов.

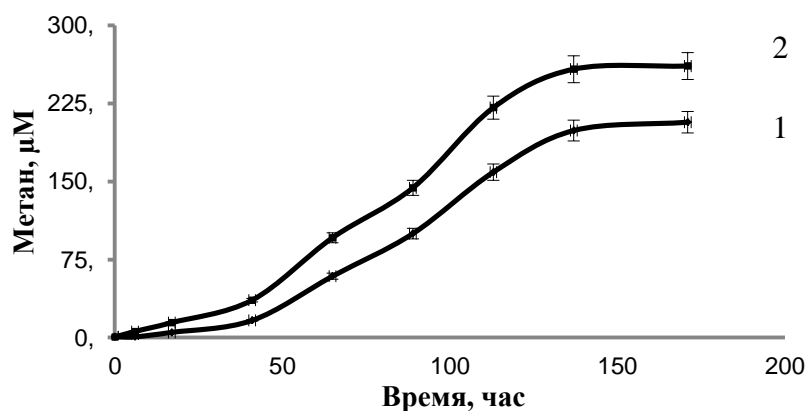


Рисунок 10. Образование метана штаммом JL01<sup>T</sup> при росте на метаноле (1) и в присутствии *S. associata* штамм GLS2<sup>T</sup> (2)

Увеличение скорости метаногенеза в таких совместных культурах может быть связано, например, с образованием сферохетой ацетата в процессе сбраживания компонентов клеточных стенок метаносарцины, который, в свою очередь, является субстратом для *Methanosarcina* spp. Метанобразующие археи, как известно, могут продуцировать предшественники витамина B<sub>12</sub> для других микроорганизмов (Zhang *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008). Ранее расшифрованный геном *S. globosa* Buddy<sup>T</sup> (Caro-Quintero *et al.*, 2012) показывает, что эта бактерия не имеет полного набора генов для синтеза витамина B<sub>12</sub> и нуждается в его предшественниках. Таким образом, можно предположить, что '*M. gilichinskiia*' штамм JL01<sup>T</sup> получает преимущество в экосистеме многолетнемерзлых отложений в процессе совместного сосуществования с бактериальным спутником, по физиологическим потребностям относящемся к микроорганизмам – диссипотрофам.

## Метанообразующие археи из мерзлоты – модельные организмы для астробиологии

Впервые в мае 2008 года лабораторией Wet Chemistry (USA) был выполнен химический анализ марсианского грунта, который характеризовался небольшой щелочностью и низкой концентрацией солей (Hecht *et al.*, 2009). К удивлению, были обнаружены перхлораты (0,6%) ( $\text{ClO}_4^-$ ), вероятнее всего  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  или  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ . Высокий восстановительный потенциал перхлората ( $\text{ClO}_4^- / \text{Cl}^- E_0 = 1,287 \text{ V}$ ) делает его идеальным акцептором электронов для микробного метаболизма. Однако, до сих пор среди архей известны только неметаногенные археи, которые восстанавливают перхлорат (Liebensteiner *et al.*, 2013; Oren *et al.*, 2014; Martínez-Espinosa *et al.*, 2015), и не ясно, являются ли эти соединения стрессорами для метаногенов.

### Определение ингибирующих концентраций перхлоратов на рост метаногенных архей

Ингибирующее действие перхлоратов проверяли на штаммах метаногенных архей *M. veterum* МК4<sup>T</sup> VKM В-2440<sup>T</sup>, *M. arcticum* М2<sup>T</sup> VKM В-2372<sup>T</sup>, и ‘*M. gilichinskiia*’ штамм JL01<sup>T</sup> VKM В-2370<sup>T</sup>, выделенных из многолетнемерзлых отложений различного возраста. Для сравнения использовали штаммы *M. bryantii* М.о.Н<sup>T</sup> VKM В-1629<sup>T</sup> и *M. mazei* S6<sup>T</sup> VKM В-1636<sup>T</sup> из VKM. Полученные результаты показали, что внесение в питательную среду от 2,1 до 9,0 мМ  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  приводило к снижению продукции метана у всех метаногенных штаммов на 20%. Совместное добавление перхлоратов натрия и магния во всех случаях усиливало ингибирующий эффект. Добавление 9,0 мМ  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  и 9,8 мМ  $\text{NaClO}_4$  снижало метанообразование *M. bryantii* М.о.Н<sup>T</sup> на 80%. Следует отметить, что *M. arcticum* М2<sup>T</sup> был наиболее устойчив к действию этих солей (Таблица 5).

**Таблица 5. Ингибирующее действие  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  и  $\text{NaClO}_4$  на рост метаногенных архей различного происхождения**

IC<sub>20,...</sub>50 - концентрации перхлоратов, вызывающие 20, 50 и 80%-ное ингибирование метаногенеза

Штаммы	$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , мМ			$\text{NaClO}_4$ , мМ			$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2 + \text{NaClO}_4$ , мМ		
	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>
<i>M. bryantii</i> , М.о.Н <sup>T</sup>	3,5	6,2	9,0	2,8	6,0	9,8	2,2	4,0	8,1
<i>M. arcticum</i> , М2 <sup>T</sup>	9,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
<i>M. veterum</i> МК4 <sup>T</sup>	2,6	6,6	>10,0	4,1	8,4	>10,0	2,5	5,6	9,0
<i>M. mazei</i> , S-6 <sup>T</sup>	5,0	9,2	>10,0	7,8	>10,0	>10,0	4,8	>10,0	>10,0
‘ <i>M. gilichinskiia</i> ’, JL01 <sup>T</sup>	2,1	5,2	>10,0	3,9	9,7	>10,0	1,8	4,8	>10,0

Микроскопическое исследование морфологии клеток *M. arcticum* М2<sup>T</sup>, выращенного в среде культивирования с добавлением  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  как сильного окислителя, показало, что в присутствии перхлората в логарифмической фазе роста началось образование цистоподобных клеток с более плотной цитоплазмой. Кроме того, наблюдались дифференцированные поверхностные слои (как правило, клетки штамма представляют собой неподвижные, слегка изогнутые палочки, часто образующие цепочки и нити). Способность образовывать такие морфотипы отличает *M. arcticum* М2<sup>T</sup> от других исследуемых метаногенов, и, вероятно, делает этот штамм устойчивым к перхлоратам.

Ранее было показано, что метаногенные археи родов *Methanobacterium*, *Methanospirillum* и *Methanosarcina* могут образовывать и в то же время окислять метан

(Zehnder *et al.*, 1979). Поэтому для проверки возможности потребления перхлората во время роста исследуемых штаммов мы проследили за изменением концентрации  $\text{NaClO}_4$  и  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  в среде культивирования через девять дней роста *Methanobacterium* spp. и шестнадцать дней для *Methanosarcina* spp. Оказалось, что в случае *Methanosarcina* spp. снижение содержания перхлоратов было менее, чем 10% от общего количества, первоначально добавленного в среду, включая контроль. Изменение содержания  $\text{NaClO}_4$  (5,7-16,1%) у *M. bryantii* М.о.Н<sup>Т</sup> и  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  (16,0-7,2%) у *M. veterum* МК4<sup>Т</sup> не превышало уменьшение концентрации перхлоратов в контроле (19,0 и 17,6%, соответственно). Однако у штамма *M. arcticum* М2<sup>Т</sup> содержание  $\text{NaClO}_4$  в культуральной среде снизилось до 31,8%, а  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  - до 45,6%.

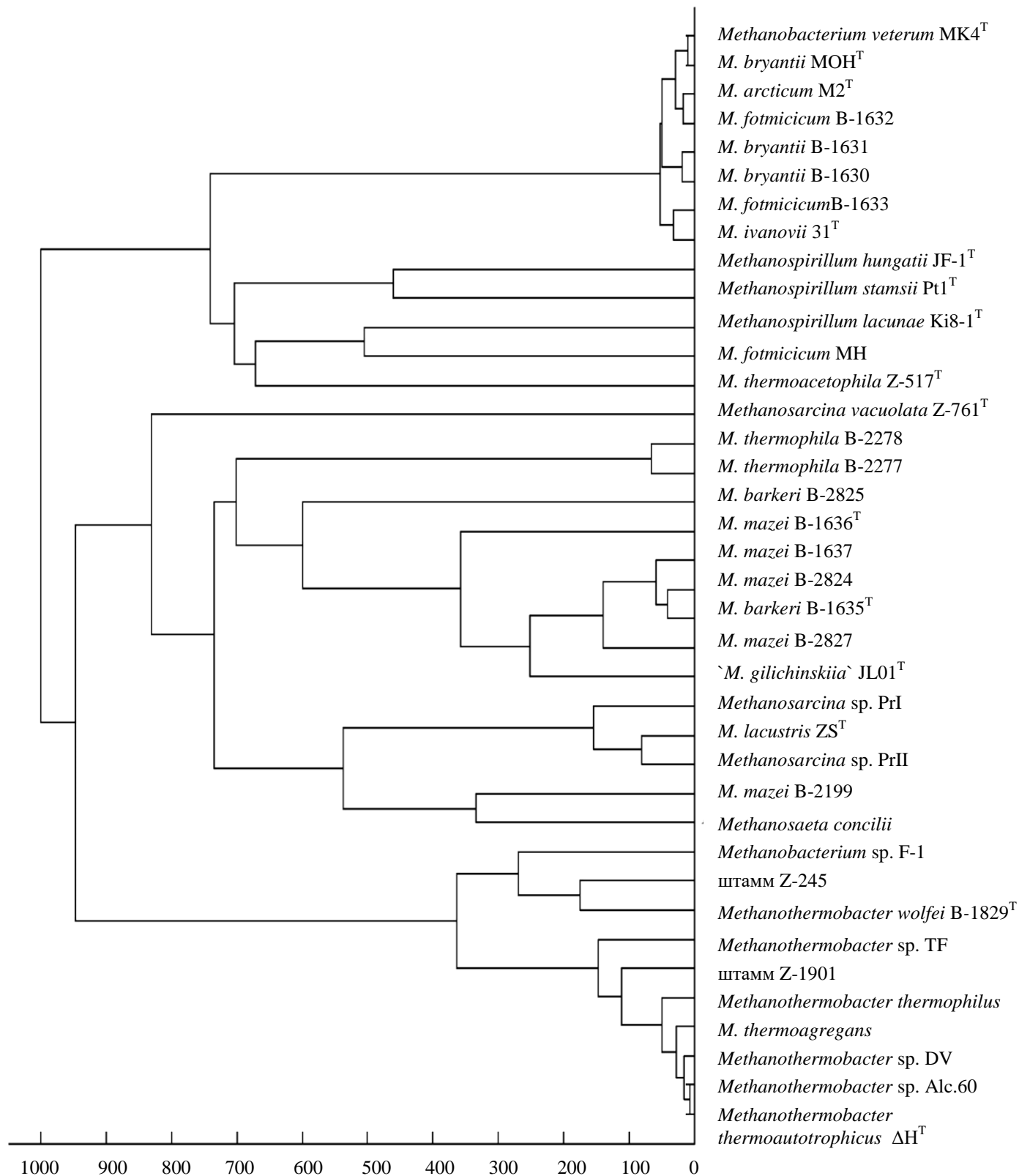
Таким образом, метанобразующие микроорганизмы, выделенные из многолетнемерзлых отложений, были устойчивы к окислителям, таким как перхлораты, а штамм *M. arcticum* М2<sup>Т</sup>, возможно, может использовать перхлорат в качестве акцептора электронов в АОМ.

### Идентификация метаногенных архей с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии

Обычно для идентификации метаногенных архей, как и для других прокариот, применяется метод филогенетического анализа гена 16S рРНК, а также гена метил-СоМ-редуктазы ( $\alpha$ -субъединицы, *mcrA*) – ключевого фермента метаногенеза. Однако данная группа архей включает облигатно анаэробных микроорганизмов, требующих использования анаэробной техники культивирования, что в значительной степени усложняет их идентификацию. В настоящее время в медицинской микробиологии для идентификации патогенов широко применяется метод МАЛДИ масс-спектрометрии (Clark *et al.*, 2013). В литературе имеется лишь несколько сообщений об использовании МАЛДИ МС для идентификации архей, в том числе метаногенов, ассоциированных с человеческим организмом или выделенных из природных мест обитания (Krader and Emerson, 2004; Dridi *et al.*, 2012; Shih *et al.*, 2015).

Нами были исследованы чистые культуры 39 штаммов метанобразующих архей, относящихся к 24 видам родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta* и *Methanotrix*, входящих в фонд ВКМ. Анализ полученных белковых профилей позволил установить таксономическое положение некоторых метанобразующих штаммов, хранящихся в ВКМ без проведения ПЦР и последующего секвенирования гена 16S рРНК (Рисунок 11). Так, штамм ВКМ В-2199, ранее отнесенный к виду *Methanobacterium formicicum*, по данным МАЛДИ образует единый кластер с тремя видами рода *Methanospirillum*, а штаммы Z-245, Z-1901 и *Methanobacterium* sp. F-1 относятся к роду *Methanothermobacter* и, вероятно, представляют собой новые виды этого рода. По данным МАЛДИ *Methanobacterium thermoagregans* ВКМ В-1959<sup>Т</sup> оказался очень близок к типовому штамму *Methanothermobacter thermoautotrophicus*  $\Delta\text{H}^{\text{Т}}$  (Рисунок 11). Секвенирование нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показало 99,92% сходства, что говорит о том, что эти микроорганизмы являются представителями одного вида.

Среди исследованных метаноархей лишь для *M. thermoautotrophicus*  $\Delta\text{H}^{\text{Т}}$  ВКМ В-1908<sup>Т</sup> и *Methanosarcina mazei* S-6<sup>Т</sup>, ВКМ В-1635<sup>Т</sup> секвенированы полные геномы (AE000666 и CP009512, соответственно), которые доступны для идентификации специфических сигналов в МАЛДИ спектрах. Используя экспериментальные массы, полученные в результате масс-спектрометрического анализа с помощью программного обеспечения TagIdent (<http://web.expasy.org/tagident/>), мы получили информацию о массах белков, которые могут использоваться в качестве идентификационных маркеров микроорганизмов. Так, для рода *Methanothermobacter* биомаркерами для идентификации рода могут служить ДНК-связывающий белок с предсказанной массой 7143 Да и 30S рибосомальный белок S17e с предсказанной массой 7199 Да (Таблица 6).



**Рисунок 11.** Дендрограмма МАЛДИ масс-спектров штаммов родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum* и *Methanotrix*. По шкале снизу – уровень расхождения, справа по шкале – исследуемые штаммы.

Наши исследования показали, что биомаркером для вида *Methanosarcina mazei* может служить специфический сигнал 10680-10687 Да, вероятно, соответствующий 50S рибосомальному белку L31e с предсказанной массой 10680 Да. Кроме того, у исследованных метаногенных штаммов обнаружены специфичные для каждого рода сигналы: 5444-5445 Да для *Methanothermobacter* spp. (Таблица 6), 6944-6946 и 7094-7096 Да – для *Methanobacterium* spp., 7480-7482 Да - для *Methanosarcina* spp. Дальнейший анализ и сравнение с белками из геномных данных позволит убедиться в значении этих белков для идентификации метаногенов на уровне вида и рода.

**Таблица 6. Биомаркерные белки рода *Methanothermobacter* по данным МАЛДИ и генома *M. thermoautotrophicus*  $\Delta$ H<sup>T</sup> VKM B-1908<sup>T</sup>**

Штаммы	UniPort ID	Предсказанная масса, Да	Наблюдаемая масса (Да)/ Интенсивность, %	Описание белка
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> $\Delta$ H <sup>T</sup> VKM B-1908 <sup>T</sup>	-	-	5445/23	-
	-	-	6235/24	-
	O27731	7143	7144/97	ДНК-связывающий белок HMt-1.2
	P50483	7152	<b>7152/100*</b>	ДНК-связывающий белок HMt-1.1.
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> VKM B-1959	O26894	7199	<b>7192/62</b>	30S рибосомальный белок S17e.
	-	-	5445/12	-
	-	-	6235/21	-
	-	-	7146/89	-
	-	-	<b>7152/100</b>	-
<i>Methanothermobacter</i> sp. VKM B-1958	-	-	<b>7193/52</b>	-
	-	-	5445/14	-
	-	-	6235/11	-
	-	-	7144/72	-
	-	-	<b>7152/100</b>	-
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> DV, VKM B-1851	-	-	<b>7192/54</b>	-
	-	-	5444/5	-
	-	-	6235/13	-
	-	-	7143/74	-
	-	-	<b>7151/100</b>	-
<i>Methanothermobacter thermophilus</i> M <sup>T</sup> VKM B-1786 <sup>T</sup>	-	-	<b>7190/48</b>	-
	-	-	6235/10	-
	-	-	7145/84	-
	-	-	<b>7153/100</b>	-
<i>Methanothermobacter</i> sp. F-1, VKM B-1852	-	-	<b>7192/65</b>	-
	-	-	5444/4	-
	-	-	<b>7154/100</b>	-
			<b>7194/81</b>	-

\*жирным выделены сигналы, встречающиеся у всех исследованных штаммов *Methanothermobacter* spp.

### Заключение

Исследование разнообразия архей микробных сообществ пяти арктических метан-содержащих образцов вечной мерзлоты различного возраста с использованием молекулярно-экологических приемов показало, что во всех образцах присутствовали археи.

Обнаруженные метаногены относились к порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* и *Methanobacteriales*.

Проведенные исследования показали, что в изучаемых образцах по мере увеличения глубины наблюдалось увеличение метаногенного разнообразия, что, вероятно, связано с преобладанием анаэробных условий в нижних горизонтах. Кроме того, возможно, что в более глубоких горизонтах ММО содержатся органические соединения, доступные для метаногенов (ацетат, метиламины или водород). Еще одно объяснение более разнообразного представительства метаногенов и архей заключается в том, что процесс отжата метана во время промерзания осадков к более глубоким слоям может также сопровождаться миграцией микробных клеток за фронтом промерзания.

Дополнительным аргументом в пользу биогенного происхождения метана и сохранения жизнеспособности метаногенных архей в ММО в течение геологического периода времени стало выделение в чистую культуру нового вида психроактивной метаносарцины '*Methanosarcina gilichinskiia*' JL01<sup>T</sup> и ее бактериального спутника *Sphaerochaeta associata* GLS2<sup>T</sup> из голоценовых отложений Арктики. Полученные данные о биологических свойствах этих штаммов позволили высказать гипотезу о большом значении тесной ассоциации архей и бактерий в метаногенных сообществах многолетнемерзлых отложений, характеризующихся низким содержанием органических веществ.

Исследовано влияние перхлоратов, как одного из компонентов грунта Марса, на рост метаногенных архей, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что *M. arcticum* штамм M2<sup>T</sup>, выделенный из мерзлоты, оказался более устойчивым к действию окислителей. Обнаружено, что в процессе роста этого штамма происходило уменьшение концентрации перхлоратов, что свидетельствует о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Это, в свою очередь, открывает новые возможности для изучения необычных способов получения энергии метаногенами, в том числе во взвешенных условиях.

До начала наших исследований в коммерческих базах данных почти полностью отсутствовали данные о белковых профилях целых клеток метаногенов. Нами проведен МАЛДИ масс-спектрометрический анализ метанобразующих архей фонда VKM. Не смотря на то, что данный метод имеет некоторые ограничения, сравнение полученных данных с данными филогенетического анализа исследованных штаммов показывает принципиальную возможность экспресс-определения новых метаногенных архей методом МАЛДИ масс-спектрометрии с точностью до вида.

Дальнейшее изучение биологических особенностей описанных микроорганизмов, а также расшифровка, анализ и сравнение уже полученных геномов позволит оценить механизмы их адаптации к соответствующим условиям среды и способы выживания в низкоэнергетических средах, которыми являются толщи вечной мерзлоты.

## ВЫВОДЫ:

1. В образцах многолетнемерзлых отложений Арктики установлено широкое распространение некультивируемых архей, принадлежащих филумам *Euryarchaeota* и *Bathyarchaeota*, а в трех наиболее глубоких образцах детектированы представители *Woesearchaeota*. Обнаруженные последовательности генов 16S рРНК и *mrcA* метаногенных архей относились к порядкам *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* и *Methanocellales*.
2. Показано, что бинарная метаногенная культура, ранее полученная путем длительной инкубации голоценовых многолетнемерзлых отложений при 15°C, состояла из метаногенной археи штамм JL01<sup>T</sup> (= VKM B-2370<sup>T</sup>) и сахаролитической бактерии штамм GLS2<sup>T</sup> (= VKM B-2742<sup>T</sup>), представляющих новые виды *Methanosarcina gilichinskiia* sp. nov. и *Sphaerochaeta associata* sp. nov., соответственно.

3. Установлено, что совместное культивирование '*M. gilichinskiia*' JL01<sup>T</sup> и *S. associata* GLS2<sup>T</sup> на минеральной среде для метаногенных архей приводило к увеличению продукции метана приблизительно на 25%.
4. Исследование влияния перхлоратов, как компонента грунта Марса, на рост метаногенов различного происхождения показало, что водородпотребляющий метаноген *Methanobacterium arcticum* M2<sup>T</sup> (= VKM B-2372<sup>T</sup>), выделенный из многолетнемерзлых отложений, устойчив к действию перхлоратов, что может быть связано со способностью образовывать цистоподобные клетки.
5. Методом времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии определены белковые профили клеток метанообразующих архей фонда ВКМ, ранее отсутствующие в коммерческих базах данных. Анализ полученных результатов и их сравнение с геномными данными позволил выявить массы белков, которые могут использоваться в качестве маркеров для идентификации метаногенов рода *Methanobacterium* и *Methanosarcina*.

### Список работ, опубликованных по материалам диссертации

#### Статьи:

1. Shcherbakova V., Oshurkova V., Yoshimura Y. The Effects of Perchlorates on the Permafrost Methanogens: Implication for Autotrophic Life on Mars // *Microorganisms*. – 2015. – V. 3. – №. 3. – P. 518-534.
2. Troshina O., Oshurkova V., Suzina N., Machulin A., Ariskina E., Vinokurova N., Kopitsyn D., Novikov A., Shcherbakova V. *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01 // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2015. – V. 65. – №. 12. – P. 4315-4322.
3. Shcherbakova, V., Yoshimura, Y., Ryzhmanova, Y., Taguchi, Y., Segawa, T., Oshurkova, V., & Rivkina, E. Archaeal communities of Arctic methane-containing permafrost // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2016. – V. 92. – №. 10. – P. fiw135.

#### Тезисы:

1. Shcherbakova V., Yoshitaka Y., Taguchi U., Segawa T., Oshurkova V., Rivkina E.. Archaeal communities of Arctic permafrost: an unexpected diversity // *The 10<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles*. – 2014. - Saint Petersburg (Russia). - P. 85.
2. Ошуркова В., Лауринавичюс К., Щербакова В. Использование MALDI-TOF масс спектрометрии для идентификации метаногенных архей: возможности и ограничения // 19-ая Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». – 2015. - Пушино, (Россия). - С. 51.
3. Oshurkova V., Rivkina E., Shcherbakova V. The search of methanogens in Arctic and Antarctic permafrost // *The 6<sup>th</sup> International Conference on Polar and Alpine Microbiology*. – 2015. - Ceske Budejovice (Czech Republic). - P. 103.
4. Ошуркова В., Ривкина Е., Щербакова В. Метаногены в многолетнемерзлых отложениях: подбор условий для выделения новых таксонов // IV Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием. Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы. – 2016. - Улан-Удэ (Бурятия). - С. 103.
5. Ошуркова В.И., Левко О.В., Щербакова В.А. Исследование реакции метанообразующих архей на окислительный стресс // 21-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 2017. - Пушино. - С. 31.
6. Oshurkova V., Shcherbakova V., Rivkina E. Bioprospecting of methanogenic archaea in Arctic and Antarctic permafrost // *The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017)*. – 2017. - Valencia (Spain). - abstract №483.