

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
Сибирского отделения Российской академии наук**

*На правах рукописи*



**ЗАХАРЕНКО**

Александра Сергеевна

**АЭРОБНЫЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ВОДНОЙ ТОЛЩИ  
ОЗЕРА БАЙКАЛ**

03.02.08 – экология  
(биологические науки)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук

Т. И. Земская

Иркутск, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1.1. Бюджет метана в биосфере .....	9
1.2. Аэробные метанотрофные бактерии .....	12
1.2.1. Основные аспекты экологии аэробных метанооксиляющих бактерий....	12
1.2.2. Основные аспекты физиологии аэробных метанотрофных бактерий....	14
1.2.3. Современные представления о филогении метанотрофов .....	17
1.2.4. Методы изучения метанотрофного разнообразия .....	19
1.3. Аэробное окисление метана в пресноводных водоемах .....	26
1.3.1. Метанотрофы арктических и субарктических озер .....	28
1.3.2. Метанотрофное сообщество тропических озер .....	30
1.3.3. Метанотрофные бактерии озер умеренного климата.....	32
1.3.4. Метанотрофы озера Байкал .....	37
<b>ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	39
2.1. Объекты исследования .....	39
2.2. Методы исследования.....	41
2.2.1. Физико-химические методы .....	41
2.2.2. Молекулярно-микробиологические методы.....	42
<b>ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ВОДНОЙ ТОЛЩИ ИССЛЕДУЕМЫХ РАЙОНОВ</b> .....	51
<b>ГЛАВА 4. ЧИСЛЕННОСТЬ И РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ МЕТАНОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В ВОДНОЙ ТОЛЩЕ БАЙКАЛА</b> .....	55
<b>ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА НА РАЗВИТИЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)</b> .....	90
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	95
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	98
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	100
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	101
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	138

## ВВЕДЕНИЕ

Метан – один из основных парниковых газов, влияющих на изменение климата, особенно в современный период. Парниковый эффект от метана в несколько десятков раз выше, чем от углекислого газа (Myhre et al., 2013). Исследования цикла метана ( $\text{CH}_4$ ) имеют общемировое значение и привлекают внимание ученых из разных стран. Эти исследования направлены на оценку потоков  $\text{CH}_4$  из различных резервуаров: морских и пресноводных экосистем, рисовых чеков, торфяников, районов вечной мерзлоты, а также метановых сипов и газогидратных полей (Rudd, Taylor, 1980; Ivanov et al., 1993; Borowski, 2004; Malinverno, Goldberg, 2015; Zhang et al., 2016; Hopcroft, 2017; Dean et al., 2018; Sanches et al., 2019). С применением комплекса методов исследованы биогеохимические циклы  $\text{CH}_4$  в различных типах озер (Гальченко и др., 2001; Carini et al., 2005; Eller et al., 2005a; Murase et al., 2005; Пименов и др., 2010; Crowe et al., 2011; Naeher et al., 2014; Thomas et al., 2019).

К настоящему времени в озере Байкал отмечены многочисленные районы, где из донных осадков в водную толщу поступают жидкие и газообразные углеводороды (Кузьмин и др., 1998; Клеркс и др., 2003; Хлыстов и др., 2007; Granin et al., 2010; Khlystov et al., 2013; Zenskaya et al., 2015). Количество сипов в Байкале на единицу площади аналогично количеству в Мировом океане (Хлыстов и др., 2014), а потенциальный объем метановых гидратов в байкальских отложениях сопоставим с крупнейшими в мире залежами газовых гидратов (ГГ) в Блейк Ридж (Blake Ridge, Атлантический океан, США) (Borowski, 2004). Объем газа в ГГ в оз. Байкал составляет от  $8.8 \times 10^{11}$  до  $9 \times 10^{12} \text{ м}^3$  (Голубев, 2000; Vanneste et al., 2001; Хлыстов и др., 2002).

Первые измерения концентраций  $\text{CH}_4$  в водной толще оз. Байкал свидетельствовали о том, что метан, высвобождающийся из донных осадков с глубины 1400 м, в основном растворяется и окисляется в толще воды и не выходит в атмосферу (Schmid et al., 2007). Более поздние исследования поверхностных вод прибрежной зоны и устьев рек во время весеннего периода

показали его эмиссию в атмосферу (Пестунов и др., 2015). В глубинных слоях пелагиали озера Байкал, вблизи выходов  $\text{CH}_4$  и грязевых вулканов были отмечены высокие концентрации  $\text{CH}_4$  (Гранин и др., 2013). В ряде публикаций была рассмотрена проблема увеличения содержания метана в воде озера Байкал и возможные причины этого явления (Гранин и др., 2013, 2014; Mizandroutsev et al., 2019; Мизандронцев и др., 2020). Основная гипотеза – изменение уровня воды в Байкале после строительства Иркутской ГЭС, что могло привести к разложению гидратов  $\text{CH}_4$  и формированию аномально высоких концентраций метана в глубинных водах и эмиссии в атмосферу.

Исследования микроорганизмов, участвующих в цикле  $\text{CH}_4$ , в глубоководном и олиготрофном озере Байкал, в основном касались сообществ донных отложений (Намсараев, Земская, 2000; Гайнутдинова и др., 2005; Намсараев и др., 2006; Дагурова и др., 2007; Шубенкова и др., 2007, 2011; Земская и др., 2008). Есть несколько работ, в которых приведены данные о численности метанотрофов в придонной воде районов разгрузки углеводородов оз. Байкал (Намсараев и др., 2002; Шубенкова, 2006) и о скоростях окисления метана (Гайнутдинова, 2005; Намсараев и др., 2006). Наличие метаноокисляющих бактерий (МОБ) в различных слоях водной толщи озера в фоновых районах было отмечено рядом исследователей при анализе разнообразия сообществ с помощью молекулярных методов (Денисова и др., 1999; Белькова и др., 2003; Kurilkina et al., 2016). Состав бактериальных сообществ в водной толще озера Байкал вблизи выходов жидких и газообразных углеводородов ранее не исследован. Учитывая современные климатические изменения и большие запасы метана в виде ГГ в оз. Байкал, изучение метанотрофных бактерий, основной функциональной группы, участвующей в окислении  $\text{CH}_4$  в аэробных условиях (Hanson, Hanson, 1996), весьма актуально.

**Цель работы:** установить филогенетическое разнообразие, численность и физиологические особенности метанотрофных бактерий, а также определить

скорости окисления метана в водной толще озера Байкал в районах с различными экологическими условиями.

**Задачи:**

1. Определить филогенетическое разнообразие и численность метанотрофных бактерий с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК, *pmoA* и *mxaF* и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в различные гидрологические сезоны.

2. Определить метанооксиляющую активность в водной толще вблизи районов выхода жидких и газообразных углеводородов с помощью радиоизотопного метода.

3. Провести сравнительный анализ метанооксиляющих сообществ водной толщи в различные гидрологические сезоны и выявить взаимосвязь с условиями среды обитания.

4. Выявить гены метаболизма углерода и азота в геномах метанотрофов, полученных с помощью глубокого метагеномного анализа (MAG);

5. Оценить в эксперименте влияние различных источников азота на развитие метанооксиляющих бактерий.

**Научная новизна работы.** Впервые исследована структура метанотрофных сообществ водной толщи оз. Байкал в экологических зонах, где отмечена разгрузка углеводородов, с использованием комплекса методов, включая эпифлуоресцентную микроскопию, радиоизотопный метод, культивирование и высокопроизводительное секвенирование. В различные гидрологические сезоны в трех районах озера Байкал определена численность МОБ и выявлено наличие метанового биофильтра в зонах с повышенными концентрациями  $\text{CH}_4$ . Установлено, что таксономический состав бактериальных сообществ водной толщи в зонах разгрузок различается в зависимости от глубины, температуры воды и типов поступающих углеводородов (с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК). В глубинных слоях водной толщи районов

разгрузки углеводов установлена активная роль метанотрофов в окислении  $\text{CH}_4$ . Получены структуры последовательностей байкальских линий метанотрофов, образующих на филогенетическом дереве отдельные кластеры, не имеющие культивируемых гомологов. Впервые аннотировано три генома метанооксиляющих бактерий из водной толщи оз. Байкал. При культивировании в психрофильных условиях впервые исследовано влияние различных источников азота на развитие МОБ оз. Байкал.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты работы позволили установить активную роль метанооксиляющих бактерий в водной толще различных экологических зон оз. Байкал и выявить эндемичных представителей этой группы микроорганизмов. Понимание их метаболизма в ультрапресном и глубоководном водоеме позволит установить отклик метанооксиляющих микроорганизмов на изменения окружающей среды. Результаты исследования могут быть использованы при расчете потоков метана из водной толщи в атмосферу, а также при оценке вклада оз. Байкал в региональный бюджет метана в условиях современных климатических изменений.

Существенно расширена база данных последовательностей генов 16S рРНК и *ptoA* метанооксиляющих бактерий, населяющих водную толщу оз. Байкал. Полученные массивы данных секвенирования зарегистрированы в базе данных NCBI для проведения сравнительного анализа с последовательностями из других сред обитания. Кроме того, полученные в работе геномы метанооксиляющих бактерий могут быть использованы для разработки молекулярных методов детекции этих микроорганизмов в холодноводных водоемах.

**Защищаемые положения:**

1. В пелагиали озера Байкал с различными экологическими условиями (температурный режим, тип разгружающихся углеводов, концентрации метана, минерализация, глубина) доминируют

- метанотрофные бактерии I типа. Метанооксиляющая активность выше в придонных слоях водной толщи с повышенными концентрациями метана;
2. Разнообразие и структура метанооксиляющих сообществ водной толщи различны, что определяется не только физико-химическими условиями среды, но и составом жидких и газообразных углеводородов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях, конгрессах и симпозиуме:

1. VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013);
2. Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 25-летию обнаружения струйных метановых газовыделений в Черном море, «Метан в морских экосистемах» (Севастополь, 2014);
3. Шестой Международной Верещагинской Байкальской конференции и четвертом Байкальском Микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2015).
4. II-ой Всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2017).
5. I-ом Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017);
6. Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий», посвященной 100-летию Иркутского государственного университета (Иркутск, 2018);
7. 12<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2018) (Ischia, Italy, 2018);
8. Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 5 статей, индексируемых Web of Science, и 9 тезисов конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 138 страницах, содержит 20 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 374 источника, из которых 46 отечественных и 328 зарубежных.

**Место проведения работы и благодарности.** Основная часть работы была выполнена в лаборатории микробиологии углеводов Лимнологического института СО РАН с 2013 по 2018 годы. Исследования по секвенированию и аннотации геномов метанотрофных бактерий были выполнены совместно с коллегами из Университета им. Мигеля Эрнандеса, Испания. Автор выражает благодарность д.б.н. Н. В. Пименову (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва), к.б.н. И. В. Морозову (ЦКП «Геномика» СО РАН, Новосибирск), к.б.н. О. В. Шубенковой, к.г.н. В. Г. Иванову, к.б.н. Ю. П. Галачьянц, к.б.н. А. А. Морозову, А. А. Краснопееву (ЛИН СО РАН) и к.х.н. Г. В. Калмычкову (Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН). Автор выражает глубокую признательность научному руководителю зав. лаб. микробиологии углеводов д.б.н. Т. И. Земской за полезные практические советы и помощь на всех этапах работы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Бюджет метана в биосфере

Метан – неотъемлемый компонент глобального цикла углерода и один из наиболее важных факторов, влияющих на изменение климата, поскольку парниковый эффект метана в 25 раз выше, чем у диоксида углерода ( $\text{CO}_2$ ) (Forster et al., 2007; IPCC, 2015), и он находится в залежах по всему миру (Myhre et al., 2013). После окисления атом углерода из молекулы  $\text{CH}_4$  превращается в основной парниковый газ –  $\text{CO}_2$  (Myhre et al., 2013). Кроме того, окисление  $\text{CH}_4$  в атмосфере приводит к образованию озона, вызывающего парниковый эффект. В стратосфере при окислении  $\text{CH}_4$  образуется водяной пар, который способствует повышению радиационного воздействия. Расчетные глобальные выбросы  $\text{CH}_4$  в атмосферу за десятилетие с 2008 по 2017 гг. в среднем составляли около 572 Тг в год (Saunois et al., 2019), что на 24 Тг в год больше, чем за период с 2003 по 2012 гг. (Saunois et al., 2016). В последние 650 тысяч лет концентрации  $\text{CH}_4$  в атмосфере были стабильными (Spahni et al., 2005), но резко стали расти в 2007 г. в связи с высоким антропогенным воздействием (Dlugokencky et al., 2009; Frankenberg et al., 2011) и на сегодняшний день продолжают повышаться (Prinn et al., 2018; Dlugokencky, 2019). Причины этого роста не до конца понятны и поэтому существует несколько гипотез, объясняющих рост  $\text{CH}_4$  в атмосфере (Nisbet et al., 2019; Turner et al., 2019).

Вклад антропогенных источников достигает в среднем 60% (диапазон 50–70%) от суммарной концентрации  $\text{CH}_4$  (Saunois et al., 2019). Наиболее значимыми из них являются рисовые поля, животноводство, а также обширные свалки, в которых происходит разложение органических отходов с образованием больших количеств  $\text{CH}_4$ . Увеличение антропогенной эмиссии парниковых газов привело к явлению, известному как «эффект парниковых газов». Это явление может привести к опасным изменениям климата, а именно

к колебаниям температуры, приводящим к катастрофическим последствиям. Глобальное потепление представляет собой фундаментальную угрозу для планеты Земля, а выброс парниковых газов играет ключевую роль в этом.

При обсуждении глобального цикла углерода рассматривают не только крупные источники этих газов, включающие морские экосистемы, рисовые чеки, торфяники, термитники, а также и более мелкие экосистемы (Rudd, Taylor, 1980; Ivanov et al., 1993; Borowski, 2004; Conrad, 2009; Malinverno, Goldberg, 2015; Zhang et al., 2016; Hopcroft, 2017; Dean et al., 2018; Sanches et al., 2019). В этом направлении проводят многочисленные исследования, направленные на оценку потоков  $\text{CH}_4$  из различных резервуаров, а также роли аэробных и анаэробных микроорганизмов, участвующих в цикле  $\text{CH}_4$ . Некоторые ученые предполагают, что концентрации метана, поступающего в атмосферу из природных сред, увеличатся к 2100 году и продолжат расти (Dean et al., 2018; Beaulieu et al., 2019).

Метан выделяется не только в результате антропогенной деятельности, но также из различных природных источников. Независимо от источника, около 85% мирового бюджета метана производится метаногенными микроорганизмами (Knittel, Voetius, 2009) при микробной деградации органического вещества, в основном в анаэробных условиях. Оставшиеся 15%  $\text{CH}_4$ , выделяемого в атмосферу, возникают из-за термогенного разложения ископаемого органического материала на геологический  $\text{CH}_4$  и другие газы, известные как природный газ.

Образование  $\text{CH}_4$  может проходить как в бескислородных условиях посредством архейного метаногенеза в донных осадках (Reeburgh, 2007; Valentine, 2011), так и в кислородных: за счет аэробного катаболизма метилированных фосфорсодержащих соединений (Karl et al., 2008; Damm et al., 2010; Carini et al., 2014; Yao et al., 2016; Repeta et al., 2016; Wang et al., 2017a), при фиксации азота (Zheng et al., 2018) или за счет альтернативных путей, которые не включают чувствительные к кислороду ферменты (Tang et al., 2016).

В анаэробных условиях метаногенез осуществляют представители домена *Archaea*, восстанавливающие  $\text{CO}_2$  с использованием в качестве доноров электронов водорода (гидрогенотрофный метаногенез), ацетата (ацетокластический метаногенез) или метилированных соединений (метилотрофный метаногенез) (Conrad, 1999; Hedderich, Whitman, 2006). Было высказано предположение, что метаногенез в поверхностных водах в аэробных условиях тесно связан с ростом водорослей (Bogard et al., 2014), но эту теорию опровергли (Fernández et al., 2016), объяснив присутствие  $\text{CH}_4$  в кислородных зонах озер, переносом растворенного  $\text{CH}_4$  из районов его образования. Работа (Lenhart et al., 2016) показала, что микроводоросли могут образовывать  $\text{CH}_4$  путем деметилирования сероорганических соединений. М. Бизик-Ионеску (Bižić-Ionescu) с коллегами показали, что цианобактерии могут легко преобразовывать фиксированный неорганический углерод непосредственно в  $\text{CH}_4$  и что этот процесс, скорее всего, связан с общим метаболизмом клеток, таким как фотоавтотрофная фиксация углерода (Bižić-Ionescu et al., 2019). Аэробное бактериальное образование  $\text{CH}_4$  позволяет объяснить так называемый «метановый парадокс» (повышенное содержание  $\text{CH}_4$  в поверхностных насыщенных кислородом водах) (Repeta et al., 2016).

Снижение концентрации парниковых газов в атмосфере, в основном  $\text{CH}_4$ , может привести к стабилизации температур. Однако уменьшение концентраций  $\text{CH}_4$  затруднено, т.к. это технически дорогостоящий и проблематичный процесс. Альтернативным методом является микробное окисление  $\text{CH}_4$ . Метаболические пути, используемые для потребления  $\text{CH}_4$ , включают как аэробную метанотрофию, так и анаэробное окисление  $\text{CH}_4$  (АОМ), в зависимости от наличия акцепторов электронов (например, сульфата, нитрата) (Borrel et al., 2011).

## 1.2. Аэробные метанотрофные бактерии

### 1.2.1. Основные аспекты экологии аэробных метанооксиляющих бактерий

Облигатные МОБ представляют собой уникальную группу прокариотических микроорганизмов, структурно и функционально специализированных на использовании  $\text{CH}_4$  в качестве единственного источника углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996; Гальченко, 2001; Bowman, 2006; Троценко, Хмеленина, 2008; Kalyuzhnaya et al., 2019). Метанотрофы были центром внимания с момента их открытия двумя независимыми исследователями в начале 20-го века (Kaserer, 1905; Söhngen, 1906). В 1906 году *Bacillus methanicum* была первой выделенной бактерией, окисляющей  $\text{CH}_4$ . В настоящее время, способность к аэробному росту на  $\text{CH}_4$  выявлена у представителей двух классов *Proteobacteria*: *Gamma*proteobacteria и *Alphaproteobacteria* (Hanson, Hanson, 1996; Kalyuzhnaya et al., 2019). Основываясь на физиологических, биохимических и фенотипических свойствах протеобактериальные метанотрофы были классически разделены на тип I и тип II (Hanson, Hanson, 1996). Не так давно были описаны метанотрофные представители филы *Verrucomicrobia* (Pol et al., 2007; Islam et al., 2008; Op den Camp et al., 2009, 2019; van Teeseling et al., 2014). *Verrucomicrobia* являются ацидофилами (оптимум роста при pH 2.0–4.3) и наиболее термофильными из всех известных метанотрофов (оптимум роста при 55–60°C) (Op den Camp et al., 2019; Houghton et al., 2019). Эти термоацидофильные метанотрофы были обнаружены только в геотермальных местах обитания (Sharp et al., 2014), хотя могут расти в более широком интервале температур (van Teeseling et al., 2014; Op den Camp et al., 2019). Кроме того, было показано, что анаэробный вид *Methyloirabilis oxyfera* (тип NC10) образует  $\text{O}_2$  внутриклеточно и использует его для аэробного окисления  $\text{CH}_4$  (Ettwig et al., 2010).

Метанотрофы были обнаружены в самых разных экосистемах, поскольку основным фактором, определяющим их жизнедеятельность, служит наличие

CH<sub>4</sub> и кислорода. Они выявлены в водоемах, наземных переувлажненных зонах, в очистных сооружениях, угольных шахтах, стоках животноводческих комплексов, заболоченных и обильно удобренных почвах, в почвах нефтегазоносных районов, в рубце крупного рогатого скота и водных растениях (Hutton, Zobell, 1949; Whittenbury et al., 1970; Dedysh et al., 1998; Deng et al., 2013; Oshkin et al., 2014; Abdallah et al., 2014; Morana et al., 2015; Kalyuzhnaya et al., 2015; Paul et al., 2017). Метанотрофы распространены как в мезофильных, так и в экстремальных средах. Кроме того, аэробные метанотрофы, подобные тем, которые обнаружены на Земле, могут потенциально поддерживать метаболизм при низких температурах и концентрациях CH<sub>4</sub>, встречающихся на поверхности Марса (Seto et al., 2019). Метанотрофы являются биологическим фильтром, препятствующим избыточной эмиссии CH<sub>4</sub> в атмосферу (Hanson, Hanson, 1996; Park et al., 2002) и вносят значительный вклад в регулирование концентрации CH<sub>4</sub> в атмосфере (Semrau et al., 2010). На сегодняшний день получены чистые культуры термофильных, психрофильных, ацидофильных, алкалофильных и галофильных метанотрофов (Bowman et al., 1993, 1997; Dedysh et al., 1998, 2000, 2002; Tsubota et al., 2005; Islam et al., 2008; Vorobev et al., 2011; Oshkin et al., 2014; Deutzmann et al., 2014).

В озерах метанооксиляющие бактерии широко распространены в водной толще и донных осадках (Costello, Lidstrom, 1999; Sundh et al., 2005; He et al., 2012; Osudar et al., 2016). Сообщалось, что разнообразие метанотрофов в озерах больше, чем в торфе или морской среде (Costello, Lidstrom, 1999). До настоящего времени большинство исследований метанотрофов в озерах были проведены в донных осадках (Auman et al., 2000; Costello et al., 2002; Pester et al., 2004; Dumont et al., 2013; Yang et al., 2016). Информации о распространенности метанотрофов в водной толще озер меньше, их наличие было продемонстрировано различными методами (Lidstrom, Somers, 1984; Eller et al., 2005b; Biderre-Petit et al., 2011; He et al., 2012; Morana et al., 2015; Ullrich et al., 2016; Michaud et al., 2017; Rissanen et al., 2018; Yang et al., 2019; Kallistova et al., 2019). Метанотрофы I типа, как полагают (Borrel et al., 2011), являются

доминирующей метанотрофной группой в большинстве пресноводных озер. Представители семейства *Beijerinckiaceae* (II тип) были обнаружены преимущественно в различных почвенных средах, а не в пресноводных местах обитаниях (Knief, 2015).

### 1.2.2. Основные аспекты физиологии аэробных метанотрофных бактерий

Окисление  $\text{CH}_4$  – многоступенчатый процесс с образованием промежуточных продуктов реакции (метанол, формальдегид и формиат), которые последовательно окисляются специфическими ферментами до углекислого газа и воды (Троценко, Хмеленина, 2008). Метанотрофные бактерии обычно полностью метаболизируют  $\text{CH}_4$  до  $\text{CO}_2$  (Hanson, Hanson, 1996). Эта серия реакций происходит внутриклеточно, но было сообщено (Corder et al., 1986; Xin et al., 2004), что прерывание ферментативных реакций путем мутаций или манипулирования условиями окружающей среды приводит к образованию избыточного внеклеточного метанола.

Окисление  $\text{CH}_4$  до метанола является первой и ключевой ферментативной стадией метаболизма метанотрофов, которая катализируется специализированной многокомпонентной ферментной системой – метанмонооксигеназой (ММО), существующей в двух формах: растворимой (рММО), локализованной в цитоплазме, и мембранной (мММО), связанной с мембранами (Murrell et al., 2000; Хмеленина, Троценко, 2006; Ross, Rosenzweig, 2016). Последняя найдена у всех изученных метанотрофов, кроме представителей рода *Methylocella* и *Methyloferula* (Dumont, Murrell, 2005; Dedysh et al., 2000, 2015). Обе формы метанмонооксигеназы присутствуют лишь у ограниченного числа исследованных штаммов (Троценко, Хмеленина, 2008). ММО имеют одинаковую метаболическую функцию в метанотрофах, но структурно и эволюционно различны. Более распространенная форма (мММО) является мембрансвязанным ферментом с наличием меди в активном центре, в то время как рММО обнаружена только в отдельных группах метанотрофов, с

активным центром  $\text{Fe}_2^+$  (Semrau et al., 2010, 2018). Метанотрофы, содержащие как мММО, так и рММО не редки среди культивируемых метанотрофных изолятов, тем не менее, метанотрофы только с мММО составляют подавляющее большинство (Osborne, Haritos, 2018). Метанотрофы, обладающие только рММО, относятся к семейству *Beijerinckiaceae*.

После превращения  $\text{CH}_4$  в метанол с помощью ММО, последний окисляется до формальдегида пирролохинолинхинон-зависимой метанолдегидрогеназой (Anthony, Dales, 1996; Jiang et al., 2010). Большинство аэробных метанотрофов потребляют углерод на уровне формальдегида с помощью либо рибулозомонофосфатного цикла, либо серинового (Hanson, Hanson, 1996; Jiang et al., 2010; Strong et al., 2015). Кроме того, формальдегид может полностью окисляться до диоксида углерода, что создает восстанавливающие эквиваленты для клеточного метаболизма (Dumont, Murrell, 2005). Метанотрофы I типа используют рибулозомонофосфатный путь, тогда как II типа – сериновый. Метанотрофы X типа используют оба пути, но в основном рибулозомонофосфатный (Lieberman, Rosenzweig, 2004; Jiang et al., 2010; Park, Lee, 2013). Однако некоторые метанотрофы для ассимиляции углерода не используют ни один из этих путей, к ним относятся представители фила *Verrucomicrobia* (Pol et al., 2007; Islam et al., 2008; Op den Camp et al., 2009). Они окисляют метанол непосредственно до формиата (Keltjens et al., 2014), а углерод получают путем фиксации углекислого газа через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама (Khadem, 2011; van Teeseling, 2014).

Аэробные метанотрофы в основном растут на одноуглеродных ( $\text{C}_1$ ) соединениях в окружающей среде, но представители рода *Methylocella* могут использовать в качестве единственного источника энергии как одноуглеродные соединения (метан и метанол), так и многоуглеродные (ацетат, пируват, сукцинат, малат и этанол) (Dedysh et al., 2005).

Метанотрофные бактерии вносят значительный вклад в глобальный цикл азота, вовлекая в свой метаболизм нитраты, нитриты и аммоний, а также органические азотсодержащие соединения, некоторые обладают способностью

связывать  $N_2$ . В настоящее время известно, что способность фиксировать атмосферный азот присуща представителям родов *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylomonas* и *Methylococcus*, а также открытым недавно метанотрофным *Verrucomicrobia* (Khadem et al., 2011).

**Маркерные гены метанооксиляющих бактерий.** Гены *pmoA* (кодирующие 27-кДа субъединицу мММО), *mmoX* (кодирующие альфа-субъединицу гидроксилазы рММО), а также гены 16S рРНК чаще всего используют в качестве молекулярных маркеров для описания разнообразия метанотрофов в окружающих средах (Dumont, Murrell, 2005). Ген 16S рРНК не является кодирующим белок и, следовательно, напрямую не определяет функцию. Поэтому нельзя точно определить, являются ли метанотрофными последовательности, расположенные близко или отдаленно от известных монофилетических метанотрофных клад. Функциональные гены ферментов, обнаруженных в метаболических путях метанотрофов, напрямую связаны с физиологией, поэтому их предпочтительнее использовать для изучения метанотрофных бактерий с неустановленным таксономическим статусом (McDonald, Murrell, 1997).

Для метанотрофов их уникальным функциональным ферментом является метанмонооксигеназа (мММО и рММО), кодируемая генами *pmoA* и *mmoX*, соответственно. Гены *pmoA* и *mmoX* обладают высокой консервативностью и соответствуют филогении гена 16S рРНК (Holmes et al., 1999; Kolb et al., 2003), являясь альтернативой гену 16S рРНК и подходящими маркерами для исследований, независимых от культивирования (McDonald et al., 2008; Knief, 2015; Wang et al., 2017b). Ген *pmoA*, кодирующий бета-субъединицу метанмонооксигеназы, отвечающий за первую стадию окисления  $CH_4$ , является наиболее часто используемым маркером для обнаружения метанотрофов в образцах, поскольку он присутствует у большинства аэробных метанотрофных бактерий за исключением *Methylocella* и *Methyloferula* (Dedysh et al., 2000; Dumont, Murrell, 2005; Vorobev et al., 2011). Кроме того, в 2016 году был описан новый вид *Methyloceanibacter methanicus* sp., в геноме которого присутствует

только pMMO (ген *mtoX*) (Vekeman et al., 2016). В некоторых метанотрофах ген *pmoA* присутствует в двух копиях (Semrau et al., 1995).

С помощью фермента метанолдегидрогеназы метанол окисляется до формальдегида, который либо ассимилируется в клеточную биомассу, либо окисляется через формиат до CO<sub>2</sub>. Ген *mxaF* кодирует большую альфа-субъединицу метанолдегидрогеназы и является высоко консервативным среди отдаленно родственных метилотрофных видов в классах *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria. Он встречается у всех метанотрофов, в отличие от других метанотроф-специфичных генов (*pmoA* и *mtoX*), которые отсутствуют в некоторых метанотрофных протеобактериальных родах, но обнаружен у всех грамотрицательных метилотрофных бактерий. Считается (Lau et al., 2013), что ген *mxaF* может быть функциональным и филогенетическим маркером протеобактериальных метанотрофов.

Не так давно был обнаружен альтернативный ген *хоxF*, отвечающий за окисление метанола до формальдегида, и было показано, что в метилотрофах гены *хоxF* более широко распространены, чем гены *mxaF*. Они присутствуют во всех известных грамотрицательных метилотрофах (Chistoserdova, 2011a), но на сегодняшний день ген *mxaF* лучше изучен, чем ген *хоxF*. В своем исследовании Ф. Чу и М. Лидстром рассмотрели роль *хоxF* в метанотрофах I типа, на примере *Methylobacterium buryatense* 5GB1C и пришли к выводу, что *хоxF* выступает в качестве преобладающей метанолдегидрогеназы (Chu, Lidstrom, 2016).

### 1.2.3. Современные представления о филогении метанотрофов

Впервые, бактерии, способные к окислению метана, идентифицировали два исследователя независимо друг от друга (Kaserer, 1905; Söhngen, 1906). Позднее Р. Виттенбери выделил и охарактеризовал более ста метанооксиляющих бактерий, тем самым он установил основы для классификации метанотрофов (Whittenbury et al., 1970). Классически аэробные метанотрофы разделены на две основные группы на основе структуры внутрицитоплазматических мембран,

морфологических различий и некоторых других физиологических характеристик: I тип (*Gamma*proteobacteria) и II тип (*Alphaproteobacteria*) (Trotsenko, Murrell, 2008; Chistoserdova, Lidstrom, 2013). Исследования Р. Виттенбари с коллегами по изучению метанотрофа *Methylococcus capsulatus* показали, что этот организм, ранее отнесенный к I типу, обладает некоторыми свойствами метанотрофов II типа. Поэтому, было предложено I тип разделить на типы I и X (Whittenbury et al., 1975). Протеобактериальные метанотрофы относятся к семействам *Methylococcaceae*, *Methylothermaceae*, *Crenotrichaceae* (*Gamma*proteobacteria) и *Methylocystaceae*, *Beijerinckiaceae* (*Alphaproteobacteria*) (Parte, 2014; Bowman, 2019). За последнее десятилетие число известных родов и видов было удвоено (Knief, 2015). В настоящее время классификация аэробных метанотрофов имеет более сложную систему: I и II типы были разделены на подтипы a, b, c (Dumont et al., 2014; Knief, 2015). В классификации, предложенной (Dumont et al., 2014), Ia тип включает в себя последовательности *pmoA*, связанные с классическими метанотрофами I типа (кроме X типа). К Ib типу относятся *Methylococcus* и близкородственные роды. Тип Ic включает все остальные последовательности I типа с более неоднозначной принадлежностью. В тип IIa входят последовательности семейства *Methylocystaceae*, в тип IIb – все остальные последовательности II типа. По классификации базы данных Silva 132, к метанотрофам I типа относятся следующие семейства: *Methylomonaceae* (Ia, плюс нитчатые формы), *Methylococcaceae* (Ib) и *Methylohalobiaceae* (Ic). Метанотрофы II типа включают в себя семейство *Beijerinckiaceae* (IIa и IIb).

Недавно были получены представители двух новых родов термоацидофильных метанотрофных бактерий в пределах филы *Verrucomicrobia* (*Methyloacidiphilum* и *Methylacidimicrobium*), которые условно относят к типу III (Dunfield et al., 2007; Pol et al., 2007; Islam et al., 2008; Op den Camp et al., 2009, 2018; van Teeseling et al., 2014).

К настоящему времени описано более 20 родов аэробных МОБ из класса *Gamma proteobacteria*, 5 родов в пределах класса *Alphaproteobacteria* и 2 рода среди представителей фило *Verrucomicrobia* (Kalyuzhnaya et al., 2019).

На основе филогенетического анализа всех доступных в настоящее время последовательностей геномов метанотрофов порядка *Methylococcales* с учетом фенотипических характеристик была предложена реклассификация в пределах этого порядка на уровне рода и вида (Orata et al., 2018). Реклассификация заключается в объединении видов *Methylomicrobium alcaliphilum*, *Methylomicrobium buryatense*, *Methylomicrobium japanense*, *Methylomicrobium kenyense* и *Methylomicrobium pelagicum* в новый род *Methylotuvimicrobium* gen. nov., а так же во внесении еще ряда изменений.

К. Хатри с коллегами (Khatri et al., 2019) был выделен гаммапротеобактериальный метанотрофный штамм FWC3 из осадка канала Западной Индии, геном которого был прочитан. Авторы полагают, что штамм принадлежит новому роду и виду метанооксиляющих бактерий, который предложено назвать '*Candidatus Methylolobus aquaticus*' FWC3 Ts 83.

Кроме того, были получены новые виды алкалофильных и галофильных метанотрофных бактерий (*Halomonas* sp. PGE1 и *Alishewanella* sp. RM1), у которых ранее не была обнаружена способность использовать  $\text{CH}_4$  в качестве единственного источника углерода и энергии (Cantera et al., 2019). Авторы выявили ген *pmoA* у штамма *Alishewanella* sp. RM1 и полагают, что штамм *Halomonas* sp. PGE1 способен осуществлять неспецифическое окисление  $\text{CH}_4$ , используя другую монооксигеназу.

#### 1.2.4. Методы изучения метанотрофного разнообразия

**Получение чистых культур.** Метанотрофные бактерии считаются медленно растущими бактериями с низкой скоростью роста (van Bodegom et al., 2001), и часто для получения чистой культуры требуется от нескольких недель до нескольких месяцев (Horz et al., 2002; Nguyen et al., 2017; Cantera et al., 2019).

Большинство метанотрофных культур были выделены из проб окружающей среды с использованием жидких сред с добавлением  $\text{CH}_4$  в газовую фазу с последующим пересевом на чашки Петри с агаризованной средой и отбором выросших колоний (Whittenbury et al., 1970; Dunfield et al., 2003; Kip et al., 2011). Основным недостатком этого подхода является длительное время культивирования и ограниченное разнообразие выделенных штаммов. Кроме того, с метанотрофами, как правило, растут метилотрофы, а также другие гетеротрофы, живущие на метаболитах, выделяемых метанотрофами (Kaluzhnaya, 2013; Oshkin et al., 2015; Kim et al., 2018). В первую очередь растут преобладающие в среде быстрорастущие метанотрофы, а присутствующие в относительно низких количествах редко удается получить, даже если они быстрорастущие. Эти недостатки требуют разработки новых методов культивирования, которые могут ускорить процедуру изоляции (Kwon et al., 2019). Изменение состава среды и условий инкубации позволяет увеличить разнообразие культивируемых метанотрофов (Dunfield et al., 1999, 2003, 2007; Islam et al., 2008; Dedysh, Dunfield, 2014).

Рост метанотрофов зависит от различных факторов: концентрации составляющих газовой фазы, температуры, pH и концентрации питательных веществ (Deutzmann et al., 2014; Hernandez et al., 2015; Amodeo et al., 2018). Концентрация  $\text{CH}_4$  оказывает значительное влияние на состав сообщества метанотрофов. Каждый тип МОБ может проявлять различное сродство к концентрациям  $\text{CH}_4$  (Amaral, Knowles, 1995). Согласно (Costello et al., 2002), тип I доминирует в водной среде, где наблюдаются более высокие концентрации  $\text{CH}_4$ . Исследования (Knief, Dunfield, 2005; Knief et al., 2006) показали, что метанотрофы II типа менее конкурентоспособны, чем метанотрофы I типа при высоких концентрациях  $\text{CH}_4$ . Тем не менее, есть случаи, когда при высоких концентрациях  $\text{CH}_4$  доминировали метанотрофы II типа (Henckel et al., 2000; Macalady et al., 2002). Кроме того, некоторые виды в пределах одного рода могут показывать различное сродство к  $\text{CH}_4$  (Baani, Liesack, 2008). Хорошо известно, что окисление  $\text{CH}_4$  метанотрофами

чувствительно к примесям в метане, поэтому при культивировании лучше использовать высокоочищенный  $\text{CH}_4$  (Whittenbury et al., 1970).

Растворенные питательные вещества, такие как содержание меди, нитратов, аммония или кислорода могут сильно повлиять на относительное распределение каждого типа метанотрофов и их активность (Graham et al., 1993; Hanson, Hanson, 1996). В лабораторных условиях, используя накопительные культуры (Воробьев, Дедыш, 2008), исследователями было показано, что как условия инкубации, так и наличие источника связанного азота в среде оказывают весьма существенное влияние на состав формирующихся накопительных культур метанотрофов. По мнению ряда исследователей, ион аммония ингибирует рост многих видов облигатных метанотрофов по причине конкуренции аммония с метаном на уровне метанмонооксигеназы (Квасников и др., 1969; Whittenbury, 1970; King, Schnell, 1994; Nyerges, Stein, 2009). Другое исследование показало, что *Methylocystis* sp. рос значительно лучше с аммонием, а не с нитратом, в качестве источника азота (Nyerges et al., 2010). Кроме того, гидроксиламин или нитрит, образующиеся при окислении метанотрофами аммония, могут быть токсичными для МОБ (Holmes et al., 1995; Bodelier, Laanbroek, 2004).

К. Тейс с коллегами (Tays et al., 2018) провели сравнение влияния двух источников азота (аммония и нитрата) на скорости роста и выходы биомассы двух метанотрофов I типа и трех метанотрофов II типа. Для культур, выращенных в присутствии  $\text{CH}_4$ , аммоний в качестве источника азота приводил к более высокой общей биомассе, чем на среде с нитратом. Но при высокой концентрации  $\text{CH}_4$  два метанотрофа I типа при разных источниках азота давали сходное количество биомассы. Результаты указывают на дифференциальную реакцию на условия роста, с предпочтением роста на основе аммония по сравнению с нитратом (Tays et al., 2018).

Кроме того, воздействие различных видов азота (аммония, нитрата или низкомолекулярного органического азота) на развитие метанотрофных сообществ обычно различно и зависит от типа экосистемы. В рисовых почвах

добавление аммония способствовало росту и активности метанотрофов I типа и подавляло II тип, а добавление нитрата способствовало росту и активности обоих типов метанотрофов (Hu, Lu, 2015). Также отмечено, что нитрат может быть предпочтительнее аммония при выделении представителей рода *Methylobacter*. Однако показано, что при росте на среде с аммонием разнообразие и активность метанотрофных сообществ из болотной луговой почвы были более высокими, чем на среде с нитратом (He et al., 2019). При высоких концентрациях  $\text{CH}_4$  аммоний не ингибирует рост некоторых метанотрофов (Stein, Klotz, 2011). Кроме того, получены первые результаты, говорящие о том, что летучие органические соединения, образующиеся при росте метанотрофов в присутствии гетеротрофов, могут влиять на рост и активность метанотрофов (Veraart et al., 2018). Поскольку различные факторы могут влиять на физиологию и рост отдельных штаммов МОБ, оптимизация питательной среды должна быть определена эмпирически для каждого изолята.

На сегодняшний день получено достаточно много чистых культур протеобактериальных метаноокисляющих бактерий, а также выделены чистые культуры метанотрофов филы *Verrucomicrobia* из сред с экстремальными условиями (Chistoserdova, Lidstrom, 2013).

Отмечено, что метанотрофы в пробах окружающей среды и накопительных культурах часто находятся в тесных взаимоотношениях с другими бактериями, в том числе метилотрофами (Jensen et al., 2008; Redmond et al., 2010; He et al., 2012; Dubinsky et al., 2013; Rivers et al., 2013; Oshkin et al., 2015), что предполагает некоторый тип сотрудничества (Beck et al., 2013; Van der Na et al., 2013). Исследования окисленных слоев осадков пресноводных водоемов, таких как озеро Вашингтон (Washington), арктических и субарктических озер, показали, что в этих сообществах главную роль в ассимилировании  $\text{C}_1$ -соединений выполняют представители облигатных метанотрофов рода *Methylobacter* семейства *Methylococcaceae* и облигатных метилотрофных представителей рода *Methylothera* семейства *Methylophilaceae* (Kalyuzhnaya et al., 2008; He et al., 2012). Спутники могут снабжать

метанотрофов необходимыми питательными веществами или смягчать токсические эффекты метанола, одного из метаболитов окисления  $\text{CH}_4$ , тогда как выделяемые метанотрофами метаболиты служат источником углерода для других бактерий (Stock et al., 2013; Ho et al., 2014, 2016; Krause et al., 2017). Несмотря на десятилетия исследований, связь между метанотрофами и другими микроорганизмами еще предстоит выяснить (Ho et al., 2016).

**Определение численности метанотрофных бактерий *in situ*.** При изучении МОБ в образцах окружающей среды важным критерием является их численность. Одним из используемых методов в современной микробной экологии является флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Этот метод позволяет определить численность бактерий непосредственно в их естественной среде без необходимости культивирования (Amann et al., 1990, 1995). Для выявления МОБ I и II типов был разработан ряд 16S рРНК-специфичных олигонуклеотидных зондов (Holmes et al., 1995; Bourne et al., 2000; Dedysh et al., 2001; Eller et al., 2001). Исследование численности метанотрофов с использованием этого метода было успешно проведено в различных экосистемах, включая пресноводные водоемы (Holmes et al., 1995; Bourne et al., 2000; Dedysh et al., 2001; Eller et al., 2001; Schubert et al., 2010; Durisch-Kaiser et al., 2011; Oshkin et al., 2014; Bessette et al., 2017).

**Методы детекции, основанные на идентификации гена 16S рРНК и функциональных генов.** Так как получение чистых культур метанотрофных бактерий является трудоемким процессом, молекулярные подходы, такие как ПЦР (полимеразная цепная реакция) и высокопроизводительное секвенирование с использованием наборов специфических праймеров, часто используют для изучения разнообразия метанотрофов в различных средах (Murrell et al., 1998; Mitsumori et al., 2002; Biderre-Petit et al., 2011; Siljanen et al., 2012; Cai et al., 2016; Osudar et al., 2016) и проверки полученных метанотрофных культур (Nguyen et al., 2017).

С помощью изучения фрагментов гена 16S рРНК МОБ выявляют в различных средах, но данный ген не является кодирующим белок, поэтому для

обнаружения метанотрофов предпочтительнее использовать праймеры, нацеленные на функциональные гены. Экологические исследования последовательностей *pmoA* и *mmoX* выявили большое разнообразие потенциальных метанотрофов (Knief, 2015). Т.к. метанотрофы с мембрансвязанной ММО составляют подавляющее большинство (Osborne, Naritos, 2018), то наиболее часто для изучения метанотрофного сообщества используют праймеры, нацеленные на ген *pmoA*.

Существуют различные пары праймеров для ПЦР, которые могут выявлять *pmoA* с разной специфичностью (Dumont, Murrell, 2005). Например, набор праймеров A189F / A682R, кроме гена *pmoA*, нацелен и на ген *amoA* (Holmes et al., 1995). Одним из часто используемых *pmoA*-специфичных наборов праймеров является A189F / mb661R (Costello, Lidstrom, 1999). Этот набор широко применяют в количественной ПЦР для определения численности метанотрофов (Shrestha et al., 2010; Xu et al., 2013). Кроме того, эти праймеры используют и при высокопроизводительном секвенировании для оценки метанотрофного разнообразия (Kir et al., 2011; Lüke, Frenzel, 2011). С помощью метода секвенирования ампликонов *pmoA* было показано, что более 80% обнаруженных последовательностей относятся к новым видам еще не культивированных метанотрофов (Yan et al., 2006; Håvelsrud et al., 2011; Abdallah et al., 2014).

Для выявления гена *mxaF*, ответственного за вторую стадию окисления  $\text{CH}_4$ , были разработаны праймеры f1003 / r1561 на основе последовательностей трех метилотрофных бактерий (*Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium organophilum* и *Paracoccus denitrificans*), которые активно используют для выявления метанотрофных бактерий из проб окружающей среды (McDonald, Murrell, 1997; Wang et al., 2004; Islam et al., 2016). Так же был разработан другой набор праймеров *mxaF* (1003f / 1555r) на основе последовательностей четырнадцати *mxaF*-содержащих бактерий (Neufeld et al., 2007). Эти праймеры выявляют большее разнообразие метано- и метилотрофов из различных экологических ниш (McDonald et al., 2008; Knief, 2015).

Для всех методов, основанных на ПЦР, используемые праймеры не охватывают все типы метанооксиляющих бактерий, такие как *Verrucomicrobia* и NC10 (Bergmann et al., 2011; Sharp et al., 2014; Erikstad, Birkeland, 2015), поэтому ученые пытаются сконструировать праймеры, которые могли бы выявить все известные группы метанотрофов (Ghashghavi et al., 2017). Результаты молекулярных экологических исследований указывают на то, что некультивируемые метанотрофы представляют новые таксоны и широко распространены в окружающей среде (Knief, 2015).

**Метагеномный анализ геномов.** Знания о метанотрофах, населяющих конкретные места обитания, долгое время были основаны на культивируемых представителях (Whittenbury et al., 1970; Anthony, 1982) или на обнаружении специфических молекулярных маркеров с помощью ПЦР (Kalyuzhnaya et al., 2004; Dumont, Murrell, 2005; Neufeld et al., 2007; Lau et al., 2013). Однако эти методы подвержены систематическим ошибкам, так как не все виды легко поддаются культивированию и не все обладают целевыми маркерами. Метагеномика является современным методом анализа микробных сообществ в их естественной среде обитания, исключая культивирование. С появлением секвенирования следующего поколения, филогения с использованием последовательностей целого генома, в отличие от отдельных генов, стала важным инструментом для определения прокариотических таксонов и выяснения таксономических несоответствий (Garrity et al., 2016; Parks et al., 2018). Первая полная геномная последовательность метанотрофа была получена в 2004 году (Ward et al., 2004). Недавно были выделены несколько новых метанотрофов и секвенированы их геномы, обеспечивающие дополнительное понимание метаболизма  $\text{CH}_4$  (Boden et al., 2011; Khmelenina et al., 2013; Kits et al., 2013; Hamilton et al., 2015; Flynn et al., 2016; Akberdin et al., 2018; Gupta et al., 2019).

Получение геномов из метагеномов (MAG) является новым подходом с восстановлением почти полных геномов, что способствует созданию точной реконструкции метаболизма и экологических ролей большинства

микроорганизмов, включая ранее не изученные линии (Anantharaman et al., 2016). До недавнего времени сборка геномов из метагеномных данных была ограничена образцами с низким микробным разнообразием (Tyson et al., 2004), но улучшенная пропускная способность и прогресс в вычислительных методах теперь позволяют собирать геномы из сред с высоким разнообразием (Wrighton et al., 2012; Yeoh et al., 2016). Геномы, собранные из метагеномов, были аннотированы из различных сред, в том числе из водных образцов (Cabello-Yeves et al., 2017; Pedron et al., 2019; Wilkins et al., 2019).

Геномы метанотрофов, собранные из различных экосистем, способствуют увеличению разнообразия метанооксиляющих бактерий (Skennerton et al., 2015; Edwards et al., 2017; Oswald, 2017; Padilla et al., 2017; Smith et al., 2018; Shi et al., 2019).

### **1.3. Аэробное окисление метана в пресноводных водоемах**

Пресноводные озера занимают лишь 2–3% от общей площади земной поверхности (Downing et al., 2006; Schubert, Wehrli, 2019). Однако они составляют 6–16% (8–48 Тг в год) от общего объема выбросов  $\text{CH}_4$ , что, по существу, больше, чем объем выбросов  $\text{CH}_4$  из океана (Bastviken et al., 2004, 2011). По данным (Saunois et al., 2019), концентрации метана в пресноводных озерах достигают 71 Тг в год, что согласуется с данными Bastviken et al., 2011 (71.6 Тг в год). В некоторых озерах было отмечено высокое содержание  $\text{CH}_4$  в водной толще (Grossart et al., 2011; Blees et al., 2015; Tang et al., 2016). Разные оценки концентраций  $\text{CH}_4$  зависят от применения различных методов измерения. Для определения точных концентраций  $\text{CH}_4$  ряд ученых предлагает новые аспекты в исследовании цикла метана (Brankovits et al., 2017; Davidson et al., 2018; Emilson et al., 2018). Л. Санчес с коллегами (Sanchez et al., 2019) в своем крупномасштабном исследовании попытались определить движущие факторы, связанные с эмиссией  $\text{CH}_4$  в атмосферу из открытых вод 297 озер мира. Они показали, что температура окружающей среды и осадки действуют

как важные движущие факторы эмиссии  $\text{CH}_4$ , причем эмиссия сильнее при высокой температуре воздуха и большом количестве выпавших осадков. Диффузия, наиболее распространенный и измеряемый путь выбросов метана (265 из 297 озер), вносит ограниченный вклад в общий поток. Кроме того, систематические измерения переменных окружающей среды и характеристик озера облегчили бы исследование механизмов, которые влияют на выбросы  $\text{CH}_4$  из озер. Ученые приходят к выводу, что для точной оценки потоков  $\text{CH}_4$  с поверхности озер в атмосферу нужно тщательнее выбирать используемые методы (Sanches et al., 2019; Saunois et al., 2019).

В озерах  $\text{CH}_4$ , преимущественно, образуют метаногенные археи в бескислородных осадках. В полностью перемешиваемых озерах, где кислород присутствует в толще воды и даже проникает в верхние слои осадка,  $\text{CH}_4$  эффективно удаляется посредством аэробного окисления (Bastviken et al., 2002). Многочисленные озера и пруды в северных районах (к северу от  $50^\circ$  с.ш.) с годовым выбросом  $\text{CH}_4 \sim 16.5$  Тг (от 6 до 7%) являются особенно важными компонентами глобального бюджета  $\text{CH}_4$  (Wik et al., 2016).

Окисление  $\text{CH}_4$  в воде примерно на два-три порядка ниже значений, регистрируемых в донных осадках. В олиго- и мезотрофных водоемах в одном литре воды за сутки окисляется от десятков нанолитров до десятков микролитров  $\text{CH}_4$ . В эвтрофных водоемах скорость метаноокисления в воде достигает сотен мкл/(л сут). Скорость окисления  $\text{CH}_4$  незначительна при низкой концентрации  $\text{CH}_4$  в воде, интенсивность процесса повышается при увеличении концентрации. В стратифицированных озерах с постоянными (меромиктическими) или сезонными (моно- или димитическими) бескислородными условиями придонных вод процессы окисления  $\text{CH}_4$  сосредоточены в узком слое на границе между аэробной и анаэробной зонами (Rudd et al., 1974; Jannasch, 1975; Rudd et al., 1980; Kosolapov, 2002; Дзюбан, 2010; Пименов и др., 2010). Тем не менее, было показано, что в озерах осуществляется метаноокисление в отсутствие  $\text{O}_2$  (Panganiban, 1979; Schubert, 2011; Durisch-Kaiser et al., 2011; Su et al., 2017; Roland et al., 2018). В

перемешиваемых водоемах метаноокисление протекает по всей водной толще с некоторым увеличением ко дну (Дзюбан, 2010).

В водно-болотных угодьях и пресноводных экосистемах до 95% производимого  $\text{CH}_4$  потребляется метанотрофами (Frenzel et al., 1990; Le Mer, Roger, 2001; Bastviken et al., 2008), а в бореальных озерах, по оценкам, расходуется до 88%  $\text{CH}_4$ , диффундирующего в толщу воды (Kankaala, 2006, 2007). Меньше известно о роли метанотрофов в арктических и субарктических экосистемах. Озера и пруды, характерные для северных ландшафтов, являются одними из основных источников  $\text{CH}_4$  в данных районах (Walter et al., 2008; Northington, Saros, 2016; Wik et al., 2016).

Большинство исследований метанотрофов были сосредоточены на озерных отложениях. Работ по определению численности и структуры сообществ метанотрофов пелагиали пресноводных озер гораздо меньше.

### **1.3.1. Метанотрофы арктических и субарктических озер**

Таяние вечной мерзлоты имеет глобальные последствия для биогеохимического круговорота углерода, поскольку углерод, который копился в течение тысячелетий, становится доступным для микробной деградации (Tranvik et al., 2009), что приводит к образованию парниковых газов, особенно  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$  (Wik et al., 2016). Воды северных озер потенциально являются источником выбросов  $\text{CH}_4$  в объеме около 24 Тг в год (Walter et al., 2007). Большинство мелководных арктических озер являются термокарстовыми (Walter et al., 2007). Арктические озера существенно отличаются от озер низких и средних широт сезонными сдвигами температуры, концентрациями растворенного кислорода и  $\text{CH}_4$  (Phelps et al., 1998; Clilverd et al., 2009). Эти условия окружающей среды могут благоприятствовать развитию аэробного метанотрофного сообщества.

Достаточно малочисленны сведения о численности и разнообразии аэробных МОБ, а также скоростях окисления  $\text{CH}_4$  в пресноводных условиях

Арктики, особенно в толще воды (He et al., 2012; Osudar et al., 2016; Michaud et al., 2017; Kallistova et al., 2019). Эти исследования показывают высокую пространственную изменчивость.

Изучение аэробных метанооксиляющих сообществ в водной толще и донных осадках озер Килларни (Killarney) и Кваллуурак (Qalluuraq), расположенных на Аляске с помощью методов культивирования и пиросеквенирования показало, что метанотрофы рода *Methylocystis* (II тип) доминировали, на их долю приходилось 74–75% от общего количества чтений, особенно в накопительных культурах из арктического озера Кваллуурак (He et al., 2012). Метанотрофы I типа (*Methylomonas*, *Methylobacter* и неклассифицированные *Methylococcaceae*) были обнаружены в незначительных количествах (1.7%). Состав метанооксиляющих бактерий в озерах был разным. Распространенность *Methylocystis* в накопительных культурах может указывать на преобладание этих организмов в воде и / или их более быстрый рост в культурах, в сравнении с доминирующими организмами (Bussmann et al., 2004).

Исследование метанооксиляющих сообществ было проведено в пяти арктических термокарстовых озерных системах в дельте реки Лены (Osudar et al., 2016). Выявлены высокие колебания концентрации  $\text{CH}_4$ , численности и состава сообществ метанотрофов. Самые высокие концентрации  $\text{CH}_4$  и скорости метаноокисления составляли 514.6 мкл/л и 193536 нл/(л сут), соответственно. Во всех водных системах были обнаружены метанотрофы как I, так и II типов. Численность метанотрофов в водной толще озер не превышала в среднем 1.8 кл/мл.

Анализ генов 16S рРНК и *pmoA*, проведенный в подледниковом озере Уилланс (Whillans) показал, что *Methylobacter tundripaludum* и другие метанотрофные таксоны составляли до 3.0% в толще воды и 16% в верхних слоях донных осадков (0–6 см). Концентрация  $\text{CH}_4$  составляла 0.528 мкл/л в водной толще и 6720 мкл/л – в пробе глубинных донных осадков. Измерения концентраций  $\text{CH}_4$  и скоростей его окисления показали, что аэробные

метанотрофные бактерии окисляют >99% поступающего  $\text{CH}_4$  (Michaud et al., 2017).

С помощью комплекса методов изучены микробные сообщества, участвующие в цикле  $\text{CH}_4$ , в водной толще субарктического пресноводного меромического озера Светлое (Kallistova et al., 2019). Концентрация  $\text{CH}_4$  в эпилимоне (0–17 м) варьировала в диапазоне 0.672–8.96 мкл/л с небольшим увеличением (6.72–8.96 мкл/л) в поверхностном слое 0–5 м. Ниже 21 м, содержание  $\text{CH}_4$  возрастало с 100.8 до 20608 мкл/л (33 м). Метанотрофные бактерии выявлены как в кислородных, так и бескислородных условиях в пределах класса *Gamma proteobacteria* (I тип), с доминированием представителей рода *Methylobacter*. Наибольшее количество последовательностей (до 11%) отмечено в хемоклине (21–21.5 м) (Kallistova et al., 2019).

### 1.3.2. Метанотрофное сообщество тропических озер

В целом, тропические озера недостаточно изучены и поэтому для оценки их состояния необходимо больше знаний о биогеохимии  $\text{CH}_4$  в таких системах.

Озеро Киву (Kivu) является одним из глубоких озер в Восточно-Африканской рифтовой долине с максимальной глубиной 485 м. Озеро меромическое, бескислородный монимолимнион богат питательными веществами и растворенным  $\text{CH}_4$  (Schmid et al., 2005). Очень высокие концентрации  $\text{CH}_4$  (до 448000 мкл/л; Schmid et al., 2005) делают озеро Киву привлекательной системой для изучения микробных сообществ, вовлеченных в окисление  $\text{CH}_4$  в водной среде. Скорость аэробного окисления  $\text{CH}_4$  была оценена в 31–33 г С м<sup>-2</sup> год<sup>-1</sup> (Jannasch, 1975; Pasche et al., 2011), а скорость выбросов  $\text{CH}_4$  составляет всего 0.01 г С м<sup>-2</sup> год<sup>-1</sup> (Borges et al., 2011). Исследование (Pasche et al., 2011) метанотрофных бактерий в водной толще озера Киву с помощью методов секвенирования по Сенгеру выявило в

кислородной зоне последовательности, относящиеся к *Methylococcus capsulatus* (X тип).

Молекулярные и изотопные данные (Zigah et al., 2015) показали, что аэробное окисление  $\text{CH}_4$  в ограниченных питательными веществами поверхностных водах озера осуществляется МОБ II типа, а в бескислородных, богатых  $\text{CH}_4$  и питательными веществами, глубинных слоях озера в окислении  $\text{CH}_4$  принимают участие МОБ I типа. Количество клеток МОБ I типа не превышало 1.3% от общей численности микроорганизмов (ОЧМ), а МОБ II типа были менее многочисленными – до 0.3% от ОЧМ (Zigah et al., 2015). Согласно же данным (Morana et al., 2015) на основе анализа жирных кислот в аэробном метанотрофном сообществе преобладали метанотрофы I типа, никаких доказательств активного участия метанотрофов II типа в окислении  $\text{CH}_4$  обнаружено не было.

Олиготрофное озеро Танганьика (Tanganyika) представляет собой озерную систему, которая расположена в Африканской рифтовой долине. В этом озере находится самый большой в мире бескислородный пресноводный слой, в котором хранится приблизительно 23 Тг  $\text{CH}_4$  (Неску, 1991). По данным (Durisch-Kaiser et al., 2011), максимальная численность метанотрофов I и II типа, определенная с помощью метода FISH, составляла 12–17% от ОЧМ на глубине 30–40 м в северном бассейне и от 19 до 22% – на глубине 100 м в южном бассейне, с доминированием метанотрофов I типа (до 95%). В обоих бассейнах концентрация растворенного  $\text{CH}_4$  в толще воды постепенно снижалась от глубоких бескислородных слоев к поверхности, в то время как в термоклине с 90 м до 300 м концентрации возрастали (Durisch-Kaiser et al., 2011).

Бескислородный бассейн эвтрофного озера Матано (Matano) содержит  $4.6 \times 10^{10}$  моль  $\text{CH}_4$ . Биогенный  $\text{CH}_4$  накапливается в глубоких водах озера до концентраций, превышающих 31360 мкл/л, что сравнимо с концентрациями в озерах, имеющих входы вулканического газа, такие как озеро Киву (Crowe et al., 2011). Скорости окисления  $\text{CH}_4$  в озере Матано варьировали от 8064 нл/(л

сут) до 2620800 нл/(л сут). Несмотря на накопление  $\text{CH}_4$  до относительно высоких концентраций в глубоком монимолимнионе озера, бóльшая часть (до 90%) окисляется непосредственно в озере, исключая сильные потоки  $\text{CH}_4$  в атмосферу (Sturm et al., 2018).

### 1.3.3. Метанотрофные бактерии озер умеренного климата

Аэробные метанотрофы были исследованы в таких пресноводных озерах, как озеро Вашингтон (Auman et al., 2000; Costello et al., 2002; Chistoserdova et al., 2011a, 2013), озеро Констанц (Constance) (Pester et al., 2004; Rahalkar et al., 2007, 2009; Deutzmann et al., 2014; Bornemann et al., 2016) и некоторых других озерах (Carini et al., 2005; Biderre-Petit et al., 2011; Yang et al., 2019). Исследования были проведены, в основном, в донных осадках.

В водной толще озера Вашингтон изучено распределение концентраций  $\text{CH}_4$ , скоростей его окисления и МОБ (Lidstrom, Somers, 1984). Профили распределения  $\text{CH}_4$  варьировали от 1.12 до 67.2 мкл/л. Максимальные значения концентраций (67.2 мкл/л), скоростей окисления (26880 нл/(л сут)) и численности метанотрофов (50 КОЕ/мл) выявлены на границе раздела фаз вода-осадок. Озеро Вашингтон в течение ряда лет служило модельным объектом для изучения метилотрофии (Chistoserdova et al., 2011, 2013). Эксперименты, основанные на культивировании, позволили получить чистые культуры метанотрофов из донных осадков семейства *Methylococcaceae* (I тип) и семейства *Methylocystaceae* (II тип) (Auman et al., 2000; Bussmann et al., 2006). Было показано, что основная метанотрофная популяция в осадках озера Вашингтон состоит из метанотрофов рода *Methylomonas* (тип I) (Auman et al., 2000; Auman, Lidstrom, 2002), но *Methylobacter tundripaludum* неоднократно доминировал в экспериментах по культивированию метанотрофов из осадков озера (Beck et al., 2013; Kalyuzhnaya et al., 2015).

Процессы окисления  $\text{CH}_4$  в донных осадках являются предметом многочисленных исследований в глубоком олиготрофном озере Констанц

(Schulz, Conrad, 1995; Rahalkar et al., 2007; 2009; Deutzmann et al., 2011). В донных отложениях МОБ I типа преобладали над МОБ II типа (Rahalkar et al., 2009). М. Борнеманн с коллегами (Bornemann et al., 2016) провели комплексное исследование окисления метана в водной толще озера. Были оценены концентрации  $\text{CH}_4$ , скорости его окисления, а также численность и структура сообщества пелагических метанотрофов в местах выхода газа. Концентрации  $\text{CH}_4$  в поверхностных (5–10 м) и промежуточных (40–60 м) слоях водной толщи над покмарками варьировали в среднем от 0.896 до 2.8 мкл/л и увеличивались до 32.3 мкл/л в придонном слое (70–80 м, ~10 м над дном). В фоновом районе самые высокие концентрации метана были обнаружены в поверхностном слое водной толщи и не превышали 1.187 мкл/л. Окислительная активность в поверхностных и промежуточных слоях водной толщи над покмарком варьировала от 67.2 до 1411.2 нл/(л сут), а максимальные скорости окисления (10259.2 нл/(л сут)) отмечены в более глубоких слоях ~ 10 м над дном. В фоновом районе скорости метаноокисления были значительно ниже: не превышали 694.4 нл/(л сут) в поверхностных водах и 38.08 нл/(л сут) в придонной области. Численность метанотрофных бактерий, определенная с помощью количественного ПЦР-анализа, варьировала в среднем от 0.1% до 0.6% от всего микробного сообщества. Было обнаружено, что метанотрофы наиболее распространены в придонных слоях воды, близких к выходам  $\text{CH}_4$ . Численность МОБ коррелировала с концентрациями  $\text{CH}_4$  и активностями его окисления. Филогенетический анализ показал преобладание представителей *Methylococcaceae* (I тип), причем большинство найденных последовательностей входило в специфическую кладу, отдаленно связанную (идентичность нуклеотидной последовательности  $\leq 86\%$ ) с метанотрофами родов *Methylovulum* и *Methylobacter* (метанотрофы Ia типа). Метанотрофы II типа не были обнаружены. МОБ были довольно равномерно распределены в толще воды, их количество незначительно было выше в непосредственной близости от покмарков (Bornemann et al., 2016).

С помощью амплификации генов 16S рРНК и *pmoA* были исследованы планктонные метанотрофные бактерии в меромиктическом пресноводном озере Павен (Pavin). Концентрации  $\text{CH}_4$  возрастали с глубины 60 м (6.72 мкл/л) до дна (94080 мкл/л). Были выявлены три типа (I, II и X) метаноокисляющих бактерий, с преобладанием последовательностей, относящихся к роду *Methylobacter* (I тип). Эти последовательности были доминирующими на всех исследованных глубинах (Biderre-Petit et al., 2011).

Озеро Штехлин (Stechlin) – димиктическое олиготрофное озеро в северо-восточной Германии. На основе анализа генов 16S рРНК в гипolimнионе озера Штехлин были идентифицированы метанотрофы I типа рода *Methylobacter*, кроме того, были отмечены повышенные концентрации  $\text{CH}_4$  в поверхностных и придонных слоях водной толщи, с максимумом на глубине 6 м (32.26 мкл/л) (Grossart et al., 2011). Этот результат подтверждает предыдущее исследование, в котором показано, что метанотрофы I типа рода *Methylobacter* доминировали в поверхностном окисленном осадке озера Штехлин (Dumont et al., 2011, 2013). С помощью методов протеомики в эксперименте по инкубации природных бактериальных сообществ из глубинного слоя водной толщи (Ullrich et al., 2016) сравнили ферменты, участвующие в метаболизме  $\text{CH}_4$  в контрольной и обогащенной  $\text{CH}_4$  воде из гипolimниона. Концентрация  $\text{CH}_4$  в природном образце воды составляла 1008 мкл/л. Все ферменты были отнесены к метанотрофам I типа (представители семейства *Methylococcaceae*). Метанотрофов II и X типов обнаружено не было (Ullrich et al., 2016).

Озера Ротзее (Rotsee) и Цуг (Zug) в Центральной Швейцарии – типичные примеры систем озер с умеренным климатом. Оба озера являются стратифицированными, с гипolimнионом богатым метаном. Было показано, что гаммапротеобактериальные МОБ доминировали в обоих озерах (Schubert et al., 2010; Oswald et al., 2015, 2016). Концентрации  $\text{CH}_4$  в толще воды оз. Ротзее варьировали в разные сезоны исследований, максимальные концентрации (22400 мкл/л) были выявлены в бескислородном слое придонной области (Schubert et al., 2010). С помощью молекулярных методов было

установлено присутствие метанотрофов I типа (род *Methylomonas*), их численность не превышала 2% от ОЧМ. Максимальные значения коррелировали с повышенной метанооксиляющей активностью (до 112000 нл/(л сут)) (Schubert et al., 2010). Численность МОБ была исследована в водной толще оз. Ротзее в 2012 и 2013 годах (Oswald et al., 2015). В 2012 г. выявлены МОБ как I типа ( $\leq 0.6\%$  от ОЧМ), так и II типа ( $\leq 1.9\%$  от ОЧМ), в 2013 г. обнаружен был лишь I тип ( $\leq 0.5\%$ ). В кислородном эпилимнионе концентрации  $\text{CH}_4$  варьировали от 0.672 до 67.2 мкл/л, с глубиной содержание  $\text{CH}_4$  увеличивалось и достигало 13440 мкл/л в придонной бескислородной зоне (Oswald et al., 2015). В водной толще оз. Цуг самые высокие концентрации  $\text{CH}_4$  (1344 мкл/л) были обнаружены в бескислородных условиях вблизи поверхности донного осадка, в содержащем кислород эпилимнионе содержание  $\text{CH}_4$  было ниже предела обнаружения (0.224 мкл/л). Максимальная активность метаноокисления (14336 нл/(л сут)) выявлена в оксиклине. Метанотрофы I типа доминировали на всех глубинах озера (10–15% от ОЧМ), численность МОБ II типа не превышала 1% от ОЧМ (Oswald et al., 2016). Позднее исследователи (Oswald et al., 2017) на основе полученных молекулярных и метагеномных данных сделали вывод, что род *Crenothrix polyspora* является стабильной частью микробных сообществ озер Ротзее и Цуг. Кроме того, в водной толще озера Ротзее среди представителей метанотрофов I типа были обнаружены последовательности родов *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylocaldum* и *Methyloglobulus* (Oswald et al., 2017).

М. Самад и С. Бертилссон (Samad, Bertilsson, 2017) провели исследование о сезонной изменчивости численности и разнообразия бактериальных метанотрофов в пяти умеренных шведских озерах. Концентрация  $\text{CH}_4$  в озерах варьировала незначительно по глубине и между сезонами, повышенные значения отмечены в поверхностных слоях. Средняя концентрация  $\text{CH}_4$  в озерах составляла 4.56 и 6.5 мкл/л для лета и зимы, соответственно. Подобные концентрации  $\text{CH}_4$  отмечены ранее в других шведских озерах (Bastviken et al., 2004; Denfeld et al., 2016). Содержание метанотрофов определяли с помощью

количественной ПЦР в реальном времени. Метанотрофы присутствовали во всех образцах водной толщи озер, их численность увеличивалась с глубиной, но вклад в микробное сообщество составлял не более 1.3%. Была выявлена слабая и даже отрицательная корреляция между концентрациями  $\text{CH}_4$  и численностью метанотрофов, что, возможно, было связано с потреблением  $\text{CH}_4$ . Относительная распространенность метанотрофов была значительно выше зимой, чем летом. Филогенетический анализ генов *pmoA* в придонных зимних образцах двух озер (Экольн (EkoIn) и Рамсен (Ramsen)) показал, что метанотрофы относятся к роду *Methylobacter* (I тип). МОБ присутствовали во всех исследованных озерах независимо от глубины, времени года и трофического статуса. Это говорит о том, что метанотрофы являются неотъемлемой частью экосистемы озер. Результаты также указывают на значительные различия метанотрофных сообществ в озерах с разным трофическим статусом, в то время как значительных различий в составе сообществ метанотрофов в зависимости от глубины не было (Samad, Bertilsson, 2017).

С помощью анализа генов 16S рРНК и *pmoA* исследован состав метанотрофных сообществ водной толщи бореальных озер Финляндии: Алинен-Мустаярви (Alinen-Mustajärvi) и Мекоярви (Mekkojärvi). Аэробные гаммапротеобактериальные метанотрофы (*Methylococcales*) доминировали в сообществах озер как выше, так и ниже оксиклина. Впервые была определена новая линия в *Methylococcales*, *Candidatus Methyloimidiphilus alinensis*, доминирующая в сообществах озера Алинен-Мустаярви, в то время как метанотрофы, принадлежащие роду *Methylobacter*, были более распространены в озере Мекоярви. МОБ II типа составляли <1.7% в Мекоярви и отсутствовали в библиотеках ампликонов озера Алинен-Мустаярви (Rissanen et al., 2018).

Последние геохимические и микробиологические данные из водной толщи стратифицированных озер (с временным или постоянным бескислородным гипolimнионом) умеренной зоны показывают, что аэробные

МОВ доминируют как в насыщенном кислородом, так и в бескислородном слоях (Biderre-Petit et al., 2011; Oswald et al., 2015, 2016).

### 1.3.4. Метанотрофы озера Байкал

В озере Байкал выявлены все известные генетические типы  $\text{CH}_4$  (биогенный, эндогенный и термогенный) с преобладанием  $\text{CH}_4$  микробного происхождения (Калмычков и др., 2006). Метан эндогенного типа зафиксирован лишь в термальных источниках, термогенный тип – в районах разгрузки газа со дна озера. Кроме того, обнаружен метан смешанного типа (бактериальный, термогенный) в мелководных газовых сипах и в осадках подводных грязевых вулканов (Калмычков и др., 2006).

Исследования микроорганизмов, участвующих в цикле  $\text{CH}_4$ , в глубоководном и олиготрофном озере Байкал в основном касались сообществ донных отложений (Намсараев, Земская, 2000; Гайнутдинова и др., 2005; Намсараев и др., 2006; Дагурова и др., 2007; Шубенкова и др., 2007, 2011; Земская и др., 2008).

В водной толще и придонных слоях районов разгрузки углеводородов ранее были отмечены повышенные концентрации  $\text{CH}_4$ , достигающие сотен нанолитров в литре (0.01–0.11 мкл/л – измерения Н. Г. Гранина (Гранин и др., 2013), 0.01–0.3 мкл/л – данные А. В. Егорова (Егоров и др., 2003)). Следует отметить, что исследования содержания  $\text{CH}_4$  в водах Байкала не носили систематического характера и были проведены с применением различных методов и приборов (Егоров и др., 2003; Обжиров и др., 2005; Schmid et al., 2007; Гранин и др., 2013). В водной толще глубоководных фоновых районов скорость метаноокисления сильно варьировала и в среднем составляла 500 нл/(л сут) (Гайнутдинова, 2005; Намсараев и др., 2006). Численность метаноокисляющих бактерий в придонной воде районов разгрузок, оцененная с помощью метода предельных разведений, составляла  $10^2$ – $10^7$  кл/мл (Шубенкова, 2006).

Исследования бактериальных сообществ водной толщи в различных районах озера Байкал были проведены вне зон выхода  $\text{CH}_4$  (Денисова и др., 1999; Белькова и др., 2003; Парфенова и др., 2013; Михайлов и др., 2015; Kurilkina et al., 2016; Wilburn et al., 2019). Метанотрофные бактерии в работе (Денисова и др., 1999) были представлены двумя последовательностями в пределах класса *Gamma*proteobacteria (I тип), выявленными в глубинном слое воды фонового района Южного Байкала с помощью молекулярных методов. Позже последовательности МОБ были выявлены в глубинных слоях водной толщи в фоновом районе средней котловины Байкала (1400 м и 1650 м) также в пределах класса *Gamma*proteobacteria (I тип) (Белькова и др., 2003). Кроме того, с помощью метода пиросеквенирования метанотрофы I типа были выявлены при разных гидрологических условиях в Южном Байкале в пределах семейства *Methylococcaceae*. Они преобладали в поверхностном слое водной толщи в весенний период (Kurilkina et al., 2016).

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись бактериальные сообщества водной толщи районов разгрузки углеводородсодержащих флюидов (нефте-метановый сип Горевой Утес – район I; грязевой вулкан Большой – район II) и фонового глубоководного района вблизи поселка Листвянка (район III). Для эксперимента использовали поверхностный осадок из района глубоководного метанового сипа Посольская Банка – район IV) (рис. 1; табл. 1). Исследования проводили с 2013 года по 2018 год.

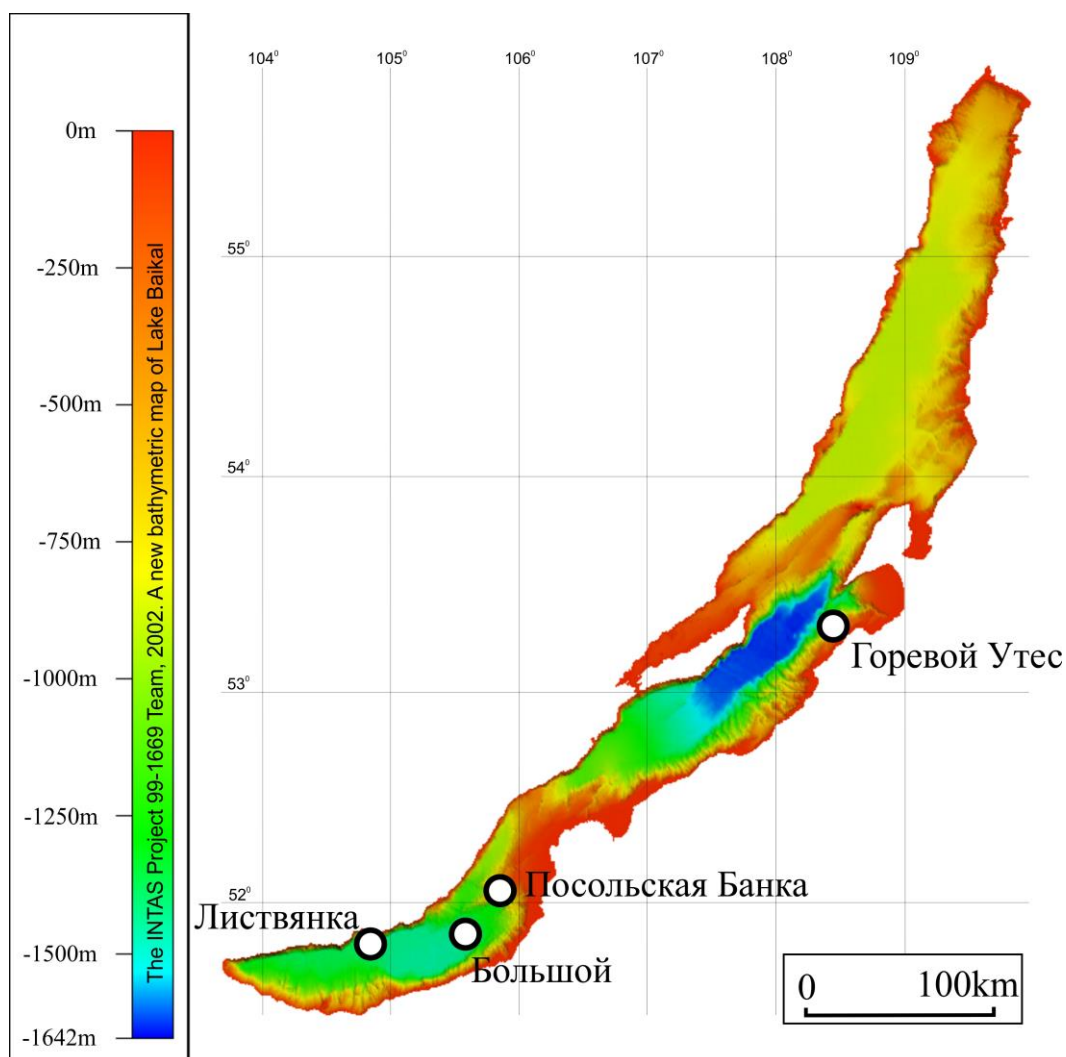


Рисунок 1 – Схема отбора природных образцов на озере Байкал

Таблица 1 – Районы отбора проб

Район отбора проб	Характеристика района	Координаты	Глубина озера в месте отбора, м	Глубина, м	№ района	№ образца
Средний Байкал	Нефте-метановый сип <b>Горевой Утес</b>	53°18'16"N 108°23'31" E	890	0	I	I/0
				50		I/50
				100		I/100
				200		I/200
				300		I/300
				500		I/500
				700		I/700
				855		I/855
Южный Байкал	Грязевой вулкан <b>Большой</b>	51°52'40"N 105°33'2"E	1414	0	II	II/0
				50		II/50
				100		II/100
				700		II/700
				1370		II/1370
	Фоновый район <b>Листвянка</b>	51°47'244"N 104°56'346"E 51°50'910"N 104°47'234"E	1410	5	IIIa	III/5
				20		III/20
				1250	IIIб	III/1250
				1350		III/1350
				Глубоководный метановый сип <b>Посольская Банка</b>	52°2'8"N 105°50'36"E	500

Отбор проб воды проводили системой батометров SBE 32 Carousel Water Sampler, донный осадок отбирали с помощью грейфера с борта НИС «Г. Ю. Верещагин». Одновременно с пробоотбором на этих же станциях проводили измерения профилей температуры и минерализации зондом SBE 19Plus.

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Физико-химические методы

*Содержание  $\text{CH}_4$  в водной толще определяли методом «Headspace»* (Большаков, Егоров, 1987) на газовом хроматографе «Эхо-EW» с пламенно-ионизационным детектором (Новосибирск, Россия). Анализ  $\text{CH}_4$  в газовой фазе экспериментальных флаконов проводили на хроматографе «ЭХО-ПИД» (пламенно-ионизационный детектор, сорбент – Porapak, режим изометрический,  $T = 1000^\circ\text{C}$ ). Объем газа для анализа составлял 0.03–0.05 мл (объем иглы хроматографического шприца). Измерение концентраций  $\text{CH}_4$ , профилей температуры и минерализации в водной толще выполнял к.г.н. В. Г. Иванов (лаборатория гидрологии и гидрофизики ЛИИ СО РАН). Анализ концентраций  $\text{CH}_4$  в эксперименте проводил к.х.н. Г. В. Калмычков (Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН).

*Измерения метанооксиляющей активности* в водной толще проводил д.б.н. Н. В. Пименов (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва) радиоизотопным методом с  $^{14}\text{C}$ -метаном. Немедленно после подъема на борт судна образцы воды из батометров разливали в 30-мл пенициллиновые флаконы и закрывали их резиновой пробкой. Раствор  $^{14}\text{C}$ -метана (0.2 мл) в дистиллированной воде активностью 1 мкК вносили стерильным шприцом в пенициллиновый флакон. Инкубацию проб с меченым  $\text{CH}_4$  проводили в течение 24–36 часов в холодильнике при температуре 3–4°C. После завершения инкубации пробы воды фиксировали 1 мл 2N NaOH. Контролем служили пенициллиновые флаконы, заполненные отобранной из батометров водой, куда перед внесением

раствора  $^{14}\text{C}$ -метана добавляли 1 мл 2N NaOH. Дальнейшую обработку проб проводили по методике, подробно описанной ранее (Гальченко, 1994). При расчете скорости окисления  $\text{CH}_4$  учитывали как окисление  $^{14}\text{C}$ - $\text{CH}_4$  до углекислоты, так и включение  $^{14}\text{C}$ -углерода  $\text{CH}_4$  в нелетучую при подкислении фракцию органического вещества.

### 2.2.2. Молекулярно-микробиологические методы

Для подсчета ОЧМ пробы воды фиксировали 4% формалином и окрашивали флуорохромным красителем ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндол) (Porter, 1980). Пробы фильтровали через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм («Millipore», Германия), окрашенные суданом черным, при помощи фильтровальной установки. Фильтры промывали стерильной водой, помещали на предметное стекло в каплю иммерсионного нефлуоресцирующего масла (CarlZeiss, Германия) и выдерживали в темноте 20 мин. Полученные препараты просматривали под эпифлуоресцентным микроскопом (AxioImager.M1, CarlZeiss, Германия). Просматривали не менее 20 полей зрения на образец. Подсчет клеток на фотографиях проводили с помощью программы ImageTest. Вычисление ОЧМ проводили по формуле:

$$X = \frac{a \times b \times 10^6}{c \times d \times e},$$

где  $a$  – площадь фильтра ( $\text{мм}^2$ );  $b$  – число подсчитанных бактерий;  $c$  – площадь микрометра ( $\text{мкм}^2$ );  $d$  – объем наносимого препарата (мл);  $e$  – число просчитанных полей зрения (Gerhardt, 1981).

**Численность метанотрофного сообщества** определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием олигонуклеотидных зондов, меченных флуоресцентным красителем Cy3. Для исследования были использованы стандартные зонды на I и II типы метанотрофов. Структура флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов

(ООО «Биосинтез», Новосибирск), используемых в исследовании, приведена в табл. 2 (Eller et al., 2001).

Таблица 2 – Зонды, используемые для флуоресцентной *in situ* гибридизации

Зонд	Краситель	Последовательность (5'-3')	Целевой организм
М-450	Су3	ATCCAGGTACCGTCATTATC	II тип
М-84	Су3	CCACTCGTCAGCGCCCGA	I тип
М-705	Су3	CTGGTGTTCCTTCAGATC	I тип

Фиксацию микроорганизмов проводили методом, разработанным ранее (Gloeckner et al., 1996). Пробы воды (от 100 до 250 мл) фильтровали на белые поликарбонатные фильтры (диаметр 25 мм, размер пор 0.2 мкм; Millipore, Германия) с использованием ручного вакуумного насоса. Затем фильтры обрабатывали 3 мл холодного раствора 4% параформальдегида (PFA, Sigma, Германия) в фосфатном буфере (PBS, pH 7.2) в течение 30 мин при комнатной температуре. По истечении времени фиксатор отфильтровывали и промывали три раза 3 мл буфера PBS и 3 мл дистиллированной воды. Высушенные на воздухе фильтры хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Гибридизацию препаратов с зондами проводили в соответствии с методикой (Stahl, Amann, 1991). Сегменты фильтра подписывали и помещали на предметное стекло, где обрабатывали 20 мкл гибридизационного буфера, содержащего 0.9M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% SDS и концентрацией формамида, соответствующей определенному зонду. После гибридизации фильтры отмывали от несвязанного и неспецифично связанного зонда. Для этого их помещали в отмывочный буфер, содержащий 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 5 mM ЭДТА, 0.01% SDS и концентрации NaCl, соответствующие определенному зонду. После отмывки, сегменты фильтров сушили на фильтровальной бумаге и окрашивали в течение 10 минут 1 мкМ раствором универсального, ДНК-специфичного флуоресцентного красителя (ДАФИ). Окрашенные фильтры промывали безбактериальной дистиллированной водой и

высушивали на воздухе. Сегменты фильтров помещали на стекло с иммерсионным маслом и накрывали покровным стеклом. Подсчет клеток производили под эпифлуоресцентным микроскопом AxioImager.M1 с помощью программы ImageTest.

*Для анализа таксономического состава бактерий* на приборе Illumina MiSeq была выделена ДНК из водных образцов, донного осадка и накопительных культур метанотрофных бактерий. Для этого было профильтровано 5–10 л проб воды, отобран 1 г осадка и 20 мл накопительных культур, полученных на средах с разными источниками азота. Для сборки геномов из суммарной ДНК из водной толщи, проанализированной на приборе Illumina HiSeq 3000/4000 (Oklahoma Medical Research Foundation, США), было профильтровано 26–30 л воды. Пробы воды фильтровали на нитроцеллюлозные фильтры (диаметр 47 мм, размер пор 0.2 мкм; «Millipore», Германия) с использованием вакуумного насоса. Фильтр помещали в стерильные пробирки и добавляли TE-буфер (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0), затем замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  и в таком виде транспортировали в лабораторию. Образцы донных осадков упаковывали в стерильную фольгу и помещали в жидкий азот до момента выделения ДНК в лаборатории. Выделение ДНК из всех образцов проводили согласно модифицированной методике (Шубенкова и др., 2005) фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Было получено 8 образцов ДНК из водной толщи района I, 5 образцов ДНК – из водной толщи района II, 4 – из района III и 3 (включая 2 образца из накопительных культур) – из района IV. Список образцов ДНК, выделенных из микробных сообществ, указан в приложении А. Выделенную ДНК хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования.

*Аmplификация и секвенирование* образцов районов I, II и IV на основе платформы Illumina MiSeq были проведены к.б.н. И. В. Морозовым (ЦКП «Геномика» СО РАН, Новосибирск). Суммарную ДНК, полученную из

образцов, использовали в качестве матрицы в ПЦР. В данном исследовании проводили амплификацию фрагментов следующих генов (табл 3).

Таблица 3 – Локусы, выбранные для анализа, и последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемые в работе

Ген	Праймер	Последовательность (5'–3')	Ссылка
16S рРНК	16S_BV2f	AGTGGCGGACGGGTGAGTAA	Sahm et al., 2013
	16S_BV3r	CCGCGGCTGCTGGCAC	
<i>pmoA</i>	A189	GGNGACTGGGACTTCTGG	Holmes et al., 1995
	A682	GAASGCNGAGAAGAASGC	
<i>mxaF</i>	mxa_f1003	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT	Neufeld et al., 2007
	mxa_r1555	CATGAABGGCTCCCATCCAT	

Для оценки таксономического разнообразия микробных сообществ использовали праймеры на регион V2–V3 гена 16S рРНК, который обладает наибольшей разрешающей способностью на уровне таксонов низшего ранга (роды, виды). Для амплификации (районы I, II и IV) использовали Hot Start II High-Fidelity ДНК-полимеразу (Thermo Scientific #F-549S) с High-Fidelity буфером (Thermo Scientific #F-549S) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакционные смеси для амплификации содержали 1.5 мМ Mg<sup>2+</sup>, 175 мкМ каждого dNTP и 0.2 мкМ каждого праймера. После оптимизации условий ПЦР (температурный профиль и концентрация Mg<sup>2+</sup>) для каждого локуса был скорректирован требуемый минимум циклов ПЦР для каждого образца ДНК, предотвращающего плато-эффект концентрации продуктов. С этой целью состав и концентрацию продуктов ПЦР контролировали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Shimadzu Multi-NA (DNA-12000 reagent kit). Типичное число циклов ПЦР варьировало между 24–30 для 16S рРНК и 28–36 – для *pmoA* и *mxaF*. Продукты амплификации для каждого локуса определяли количественно и смешивали в молярных соотношениях, соответствующих запланированной доле покрытия нуклеотидной последовательности для каждого локуса. Библиотеки для анализа Illumina

MiSeq были получены из ампликонных смесей с помощью NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs).

Аmplификация локуса *rpoA* из ДНК-матриц, выделенных из образцов района I, дала гораздо более крупные продукты (примерно 800 и 1100 п.н.), чем ожидалось (400 п.н.). Для облегчения амплификации продуктов ПЦР ожидаемой длины условия были дополнительно оптимизированы, а время отжига и удлинения было уменьшено. Несмотря на дополнительную оптимизацию, образцы ДНК из района I, взятые с глубин 500 и 700 м, дали более длинные продукты.

**Процесс обработки данных** выполнен совместно с к.б.н. Ю. П. Галачьянц (лаборатория ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН). Парные прочтения демультимплексировали по соответствию их 5'-концевых участков с последовательностями праймеров для наработки ампликонов. При сравнении последовательностей было разрешено не более одного различия между прямым и обратным праймерами и последовательностью. Последовательности R1 и R2, соответствующие ампликонам рРНК, были объединены в контиги в программе Mothur v.1.34.4 (Kozich et al., 2013) с помощью команды `merge.contigs`. Полученные фрагменты были отфильтрованы по качеству в неперекрывающихся регионах, как не имеющие более 5 сайтов с Phred-value  $\leq 15$  (для ампликонов 'E' Phred-value  $\leq 20$ ). Сценарии, используемые для демультимплексирования и фильтрации данных MiSeq, доступны по адресу [www.github.com/yuragal/mothur-scripts](http://www.github.com/yuragal/mothur-scripts).

Дальнейшая обработка последовательностей 16S рРНК была выполнена с использованием программного обеспечения Mothur в соответствии с рекомендациями MiSeq SOP (Schloss et al., 2009). Чтобы сравнить микробное разнообразие между образцами, была сделана подвыборка по наименьшему количеству последовательностей путем случайного удаления чтений секвенирования с использованием команды `sub.sample` программы Mothur. Отфильтрованные последовательности были выровнены, сгруппированы и

таксономически идентифицированы с использованием базы данных SILVA 123 (районы I и II) и SILVA 132 (район IV) (<http://www.arb-silva.de>).

Для данных *pmoA* и *mxaF* в процессе демультиплексирования не было перекрытия между праймерами и R1 / R2. Следующий подход был разработан для применения Mothur SOP к последовательностям *pmoA*, не имеющим референсного выравнивания. Референсное выравнивание последовательностей гена *pmoA* было создано к.б.н. А. А. Морозовым (лаборатория ультраструктуры клетки ЛИИ СО РАН). Сначала был загружен набор таксономически известных фрагментов *pmoA* (Dumont et al., 2014). Эти референсные последовательности были переведены в аминокислотные и были выровнены со hidden Markov model PF02461 из Pfam с использованием hmalign. Аминокислотное выравнивание было проверено вручную и исправлено в местах низкого качества. Полученное выравнивание было обратно переведено в нуклеотидное выравнивание.

Для фильтрации контигов *pmoA* проводили следующие проверки: i) наличие открытой рамки считывания (ОРС) длиной более 400 н. о. на протяжении всей последовательности, ii) совпадение фланкирующих последовательностей контига с консервативными областями аминокислотной последовательности *pmoA*, полученными при анализе референсного выравнивания (С- и N-терминальная последовательности (WF)(KER)D(RG) и PEY(IVL)R, соответственно). Значительная часть полученных нуклеотидных последовательностей была низкого качества в области 80-100aa переведенных ОРС, вероятно, из-за ограничения чтения длины MiSeq. Эта область была удалена из анализа, чтобы обеспечить однозначную кластеризацию при обработке последовательностей в Mothur.

Чтобы сгенерировать выравнивание для последовательностей *mxaF* с использованием tblastn (Altschul et al., 1990), мы впервые обнаружили контиги, которые произвели надежные BLAST-хиты ( $e$ -значение  $< 1e-50$ , длина выравнивания более 150aa) с большой субъединицей последовательности метанолдегидрогеназы (GenBank: WP\_014149867.1). В качестве двойной проверки, ОРС N- и С-концы должны были соответствовать шаблонам GTNWG

и WEPFM, соответствующим сайтам прямого и обратного праймеров. Опять же, в конечном наборе данных мы идентифицировали значительное количество последовательностей, имеющих неоднозначные нуклеотиды («N») в положениях выравнивания от 249 до 297. Поскольку эта область, соответствующая 83–99 положениям в аминокислотном выравнивании ORF с фрагментами *ptoA*, была низкого качества, она была удалена до кластеризации. Пакет CD-HIT (Fu et al., 2012) использовали для создания кластеров на расстоянии 0.03 с последующим молекулярно-филогенетическим анализом полученных последовательностей *txaF*, представляющих обильные группы.

**Таксономическую сложность сообществ** оценивали путем анализа последовательностей 16S рРНК. Проведено исследование кривых разрежения, отражающих зависимость числа флотипов от числа последовательностей, проанализированных на генетическом расстоянии 0.03. Чтобы охарактеризовать молекулярно-генетическое разнообразие всех генов на расстоянии 0.03, было подсчитано количество операционных таксономических единиц (ОТЕ), охват (Chao), а также индексы видового богатства (Chao1, ACE) и разнообразия (индекс Шеннона и обратный индекс Симпсона). Канонический анализ соответствия выполняли в R (Team et al., 2018) с использованием пакета "vegan" (Oksanen et al., 2007).

Ближайшие гомологи последовательностей фрагментов генов были найдены с помощью BLAST-поиска в базе данных NR (Altschul et al., 1997). Метод ближайших соседей (neighbor-joining) (Saitou et al., 1987) на основе «двухпараметрической дистанции Кимуры» (Kimura two-parameter) (Kimura, 1980) и метод коррекции Пуассона (Poisson correction) (Zuckermandl, Pauling, 1965) были использованы для построения филогенетических деревьев в программе MEGA, версия 7.0 (Kumar et al., 2016). Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании «bootstrap»-анализа (Felsenstein, 1985) 500 альтернативных деревьев. Последовательности 16S рРНК, *ptoA* и *txaF* были депонированы в архив GenBank, секцию SRA (№№ PRJNA380525, PRJNA506297).

*Для оценки сходства сообществ бактерий* образцы анализировали с использованием RCoA (метод главных координат) и группировали с использованием средневзвешенных показателей UniFrac, рассчитанных в Mothur. Результаты представлены на графиках RCoA и дендрограммах UPGMA, выполненных в программах Grapher 9 и FigTree, соответственно. Метод главных компонент был использован для определения взаимосвязей между сообществами и физико-химическими параметрами водной толщи.

*Сборка геномов из метагеномов водной толщи.* Секвенирование образцов ДНК из водной толщи фонового района вблизи п. Листвянка (с глубины 5 м и 20 м) проводили с использованием Illumina HiSeq 3000/4000 (Oklahoma Medical Research Foundation, США), образцы ДНК с глубин 1250 м и 1350 м были секвенированы на платформе Illumina HiSeq X Ten PE 2X150 bp (компания «Novogene»). Поскольку секвенировали напрямую, то есть без ПЦР-амплификации, как в случае секвенирования ампликонов, результаты не являются ПЦР-предвзятыми. Аннотация контигов и геномов, собранных из метагеномов (MAG), были оценены с помощью программ BLAST (Nr), COG (Tatusov et al., 2001), TIGFRAM (Haft et al., 2001), tRNAscan (Lowe, Eddy, 1997), ssu-align (Nawrocki, Eddy, 2010), RAST (Overbeek et al., 2013), Kegg-KO (Kanehisa, Goto, 2000), CDD-SPARCLE (Marchler-Bauer et al., 2016) и BLAST Koala (Kanehisa et al., 2016). MAGs использовали только при контаминации <5% и >50% полноты, оцененные пакетом CheckM (Parks et al., 2015). Филогеномная классификация MAGs была проведена в соответствии с последней версией GTDB (Parks et al., 2018). Полученные данные зарегистрированы в NCBI под номерами PRJNA396997 и PRJNA521725. В Genbank MAGs метанотрофов имеют номера доступа SAMN10915757, SAMN10915758 и SAMN10915748.

*Влияние источников азота* на структуру и разнообразие накопительных культур байкальских метанотрофных бактерий оценивали в эксперименте с поверхностным донным осадком из района метанового сипа Посольская Банка, где отмечены высокие концентрации CH<sub>4</sub>. Окисленный слой осадка 0–2 см

отбирали стерильным шприцом, затем 5 см<sup>3</sup> осадка суспендировали в 25 мл стерильной воды, после чего по 1 см<sup>3</sup> суспензии вносили в герметично закрытые стерильные стеклянные флаконы объемом 120 мл с 40 мл среды. Для посева использовали жидкую минеральную среду Виттенбери (Whittenbury et al., 1970) с различными источниками азота: одна содержала аммонийный азот (AMS), другая – нитратный (NMS), pH среды 6.8–7.0. Затем в пробы вводили природный байкальский CH<sub>4</sub> из ГГ до концентрации около 67200 мкл/л. Первичное измерение концентрации CH<sub>4</sub> во флаконах проводили непосредственно на НИС «Г. Ю. Верещагин». Флаконы инкубировали при 10°C в стационарных условиях в течение 5 недель. Все эксперименты проводили в трех повторностях. О росте метанотрофных бактерий в среде судили по убыли CH<sub>4</sub>.

### ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ВОДНОЙ ТОЛЩИ ИССЛЕДУЕМЫХ РАЙОНОВ

Известно, что факторы окружающей среды оказывают влияние на развитие МОБ (Graham et al., 1993; Hanson, Hanson, 1996; Воробьев, Дедыш, 2008). Мы провели исследования в трех районах озера Байкал с различными гидрологическими условиями. Как видно на рис. 2, распределение значений температуры и минерализации в водной толще исследуемых районов было различным. Значения ионной минерализации в районах разгрузок углеводов и в фоновом районе соответствовали наблюдаемым в летний и зимний сезоны, соответственно (Блинов и др., 2017). В районе I температура варьировала от 3.3 до 3.8°C, что характерно для весенней гомотермии (Атлас Байкала, 1993). В районе II температура воды соответствовала периоду прямой стратификации и составляла 3.3–5.0°C. Так как пробоотбор в районе III проводили зимой, температура воды на поверхности варьировала от 0.45 до 0.68°C, а в придонных слоях – от 3.27 до 3.33°C (период обратной температурной стратификации).

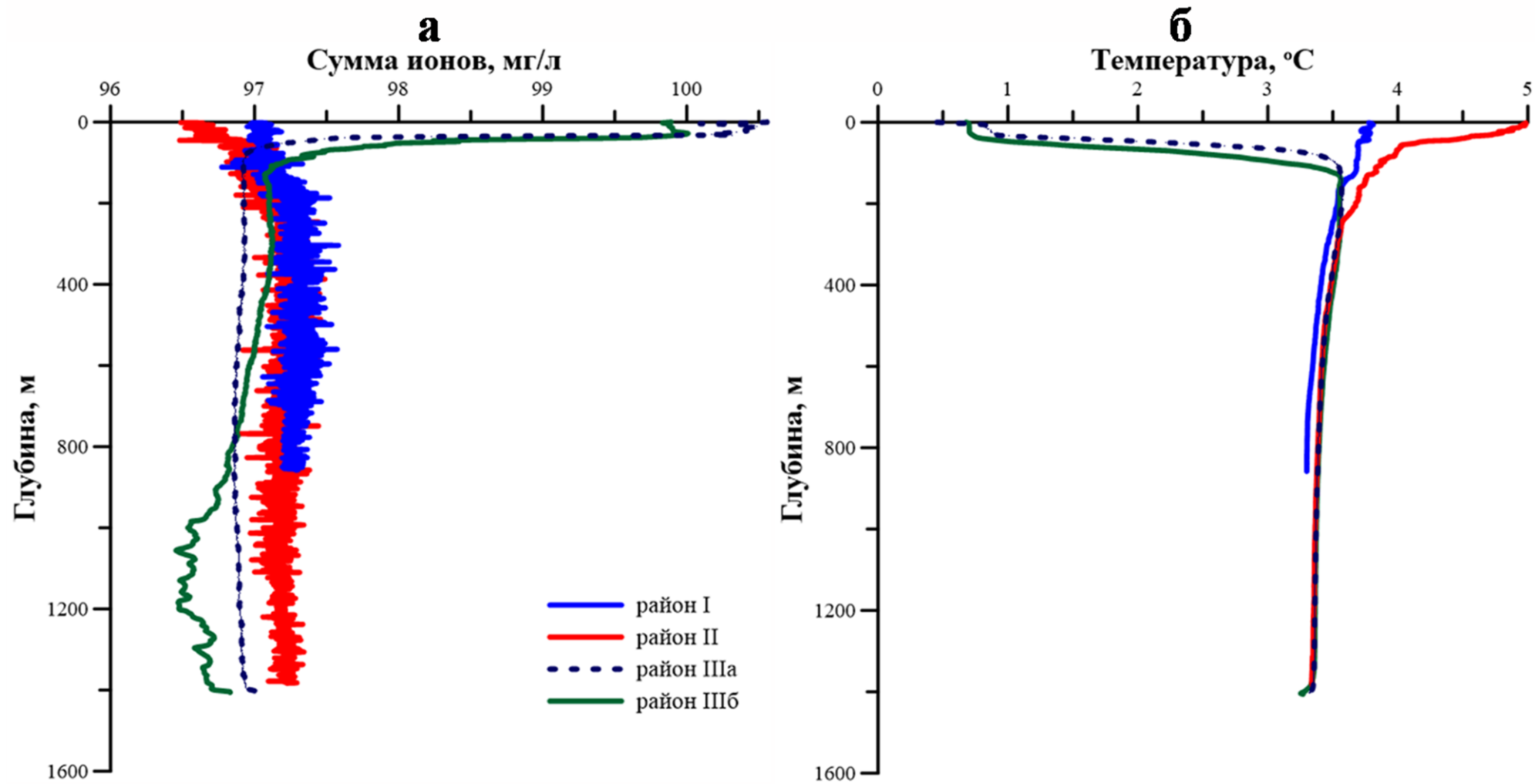


Рисунок 2 – Распределение суммы ионов (а) и температуры (б) в водной толще районов разгрузки углеводородов (I, II) и в фоновом районе (IIIа, б) оз. Байкал

Содержание  $\text{CH}_4$  в водной толще района III варьировало от 0.04 мкл/л до 0.43 мкл/л (рис. 3), что соответствовало отмечаемым концентрациям в фоновых районах (Гранин и др., 2013; Мизандронцев и др., 2020).

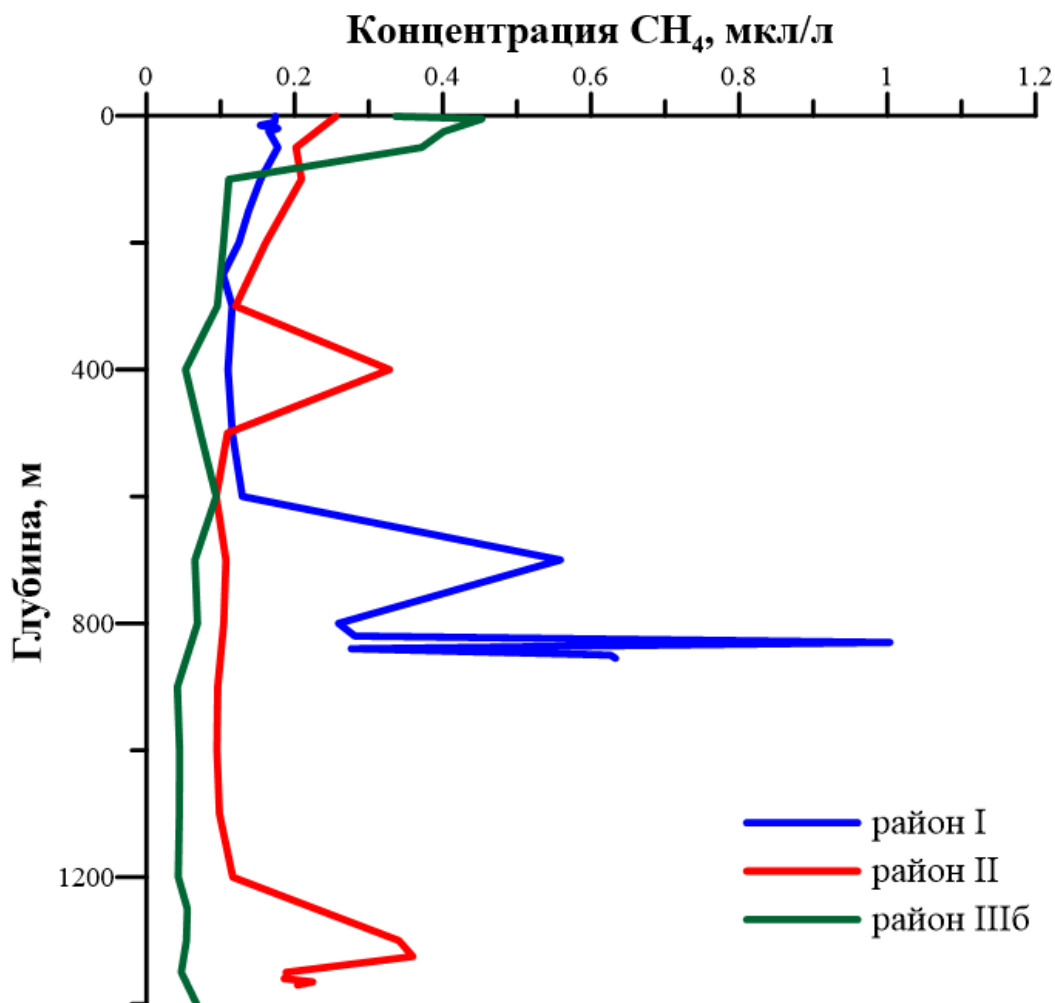


Рисунок 3 – Профили распределения  $\text{CH}_4$  в водной толще трех районов оз. Байкал

В водной толще районов разгрузки углеводородов концентрации метана достигали 1 мкл/л, что превышает отмечаемые значения в участках Байкала вне выходов газовых флюидов, но ниже выявленных в придонной зоне глубоководной части озера в районе газогидрат-содержащих осадков (0.2–14.0 мкл/л) (Обжиров и др., 2005). В придонных зонах водной толщи выявлены максимальные концентрации  $\text{CH}_4$ : в районе I на глубинах 850 и 855 м они составляли 1.0 и 0.63 мкл/л, соответственно; в то время как в районе II на

глубинах 1300 и 1370 м концентрации  $\text{CH}_4$  были равны 0.19 и 0.36 мкл/л, соответственно. Концентрация  $\text{CH}_4$  от поверхности до глубины 600 м в районе I была практически одинаковой, что обусловлено вертикальным водообменом во время весенней гомотермии. Кроме того, во всех исследуемых районах с различным гидрологическим режимом отмечен «метановый парадокс» (повышенные концентрации метана в поверхностных слоях водной толщи). Максимальные значения выявлены в подледный период (0.43 мкл/л), что может быть связано с активным развитием фитопланктона. Кроме того, появление пиков метана на глубинах 300–400 м, может быть обусловлено активной жизнедеятельностью единственной планктонной амфиподы – макрогектопуса, которая, как известно, в дневное время концентрируется на глубинах ниже 200 м (Бекман, Афанасьева, 1977). Формирование анаэробных микрониш в кишечнике и пеллетах, благоприятных для развития метаногенных архей, может способствовать появлению локальных максимумов метана в водной толще озера.

Более низкие значения концентрации метана в районах разгрузок, полученные в наших исследованиях, скорее всего, обусловлены гидрологическими факторами, в частности усилением механизмов конвекции и водообмена в период перехода от гомотермии к прямой температурной стратификации, приводящими к интенсивному перемешиванию вод в исследуемых районах. Кроме того, неравномерное распределение метана в различных слоях водной толщи может быть следствием погрешностей при пробоотборе, учитывая глубину в исследуемых районах (дрейф судна и розетты), а также следствием поднятия и растворения в водной толще кристаллов гидратов метана (Егоров и др., 2014; Granin et al., 2019).

## ГЛАВА 4. ЧИСЛЕННОСТЬ И РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ МЕТАНОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В ВОДНОЙ ТОЛЩЕ БАЙКАЛА

*Профили распределения ОЧМ* в водной толще исследуемых районов с различными экологическими условиями имели сходный характер: с увеличением глубины отмечено уменьшение численности микроорганизмов (рис. 4, 5). Наиболее высокие значения ОЧМ зарегистрированы в поверхностных слоях каждой станции. Такое распределение ОЧМ характерно для глубоких олиготрофных озер, в том числе и для озера Байкал (Максимова, Максимов, 1989). В районе I в период весенней гомотермии ОЧМ варьировала от  $0.13 \pm 0.002$  до  $0.96 \pm 0.005$  млн. кл/мл. В придонной зоне на глубине 855 м отмечено повышение численности до  $0.78 \pm 0.008$  млн. кл/мл. В районе II в период прямой температурной стратификации ОЧМ колебалась от  $0.19 \pm 0.002$  до  $1.32 \pm 0.004$  млн. кл/мл. В фоновом районе IIIб ОЧМ варьировала от  $0.168 \pm 0.002$  до  $1.88 \pm 0.015$  млн. кл/мл (рис. 5).

*Метанотрофные бактерии* обнаружены в водной толще всех районов, но не на всех глубинах. В районе I в фотическом слое выявлены метанотрофные бактерии I и II типов. Метанотрофы I типа – на глубине 50 м в количестве  $2.28 \pm 0.26$  тыс. кл/мл (0.23% от ОЧМ), метанотрофы II типа –  $4.81 \pm 0.11$  тыс. кл/мл (0.5% от ОЧМ), в поверхностном слое воды. На глубине 700 м отмечено увеличение концентрации  $\text{CH}_4$  до 0.56 мкл/л и численности метанотрофов II типа до  $0.61 \pm 0.054$  тыс. кл/мл (0.45% от ОЧМ). На глубинах 100 м и 300 м метанотрофные бактерии не детектированы (рис. 4а). В районе II в поверхностном слое и на глубине 50 м обнаружены только метанотрофы II типа. Максимальное количество клеток метанотрофных бактерий II типа зафиксировано на глубине 100 м –  $13.63 \pm 0.48$  тыс. кл/мл (1% от ОЧМ). Здесь же отмечена повышенная численность метанотрофов I типа –  $10.15 \pm 0.16$  тыс. кл/мл (0.8% от ОЧМ). МОБ выявлены в единичных количествах на глубинах 300, 500, 700 м, на глубине 1370 м отсутствовали (рис. 4б).

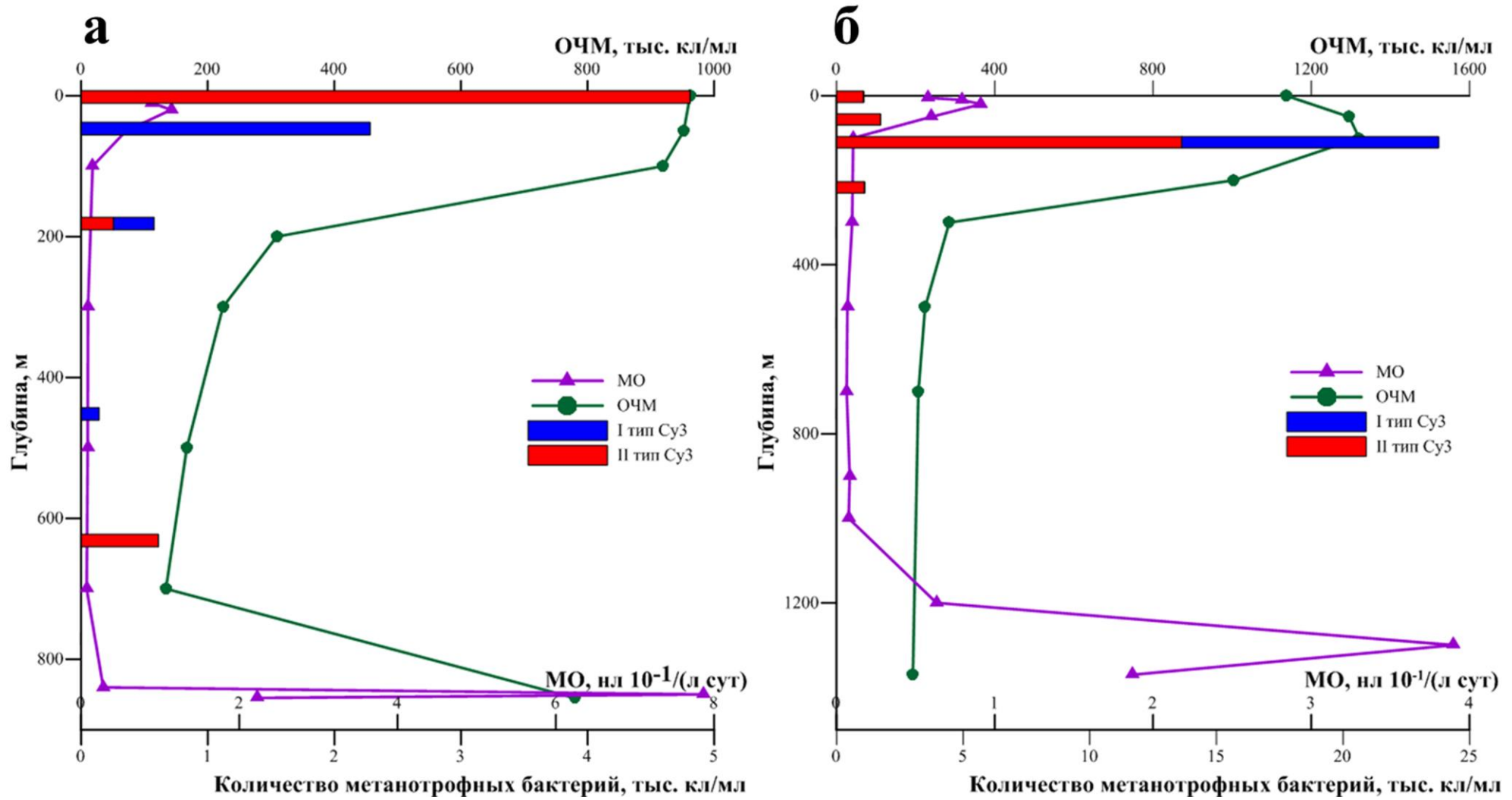


Рисунок 4 – Скорости метаноокисления, распределение ОЧМ и численности метанотрофных бактерий I и II типов в водной толще районов разгрузки углеводородов. **а** – район I; **б** – район II

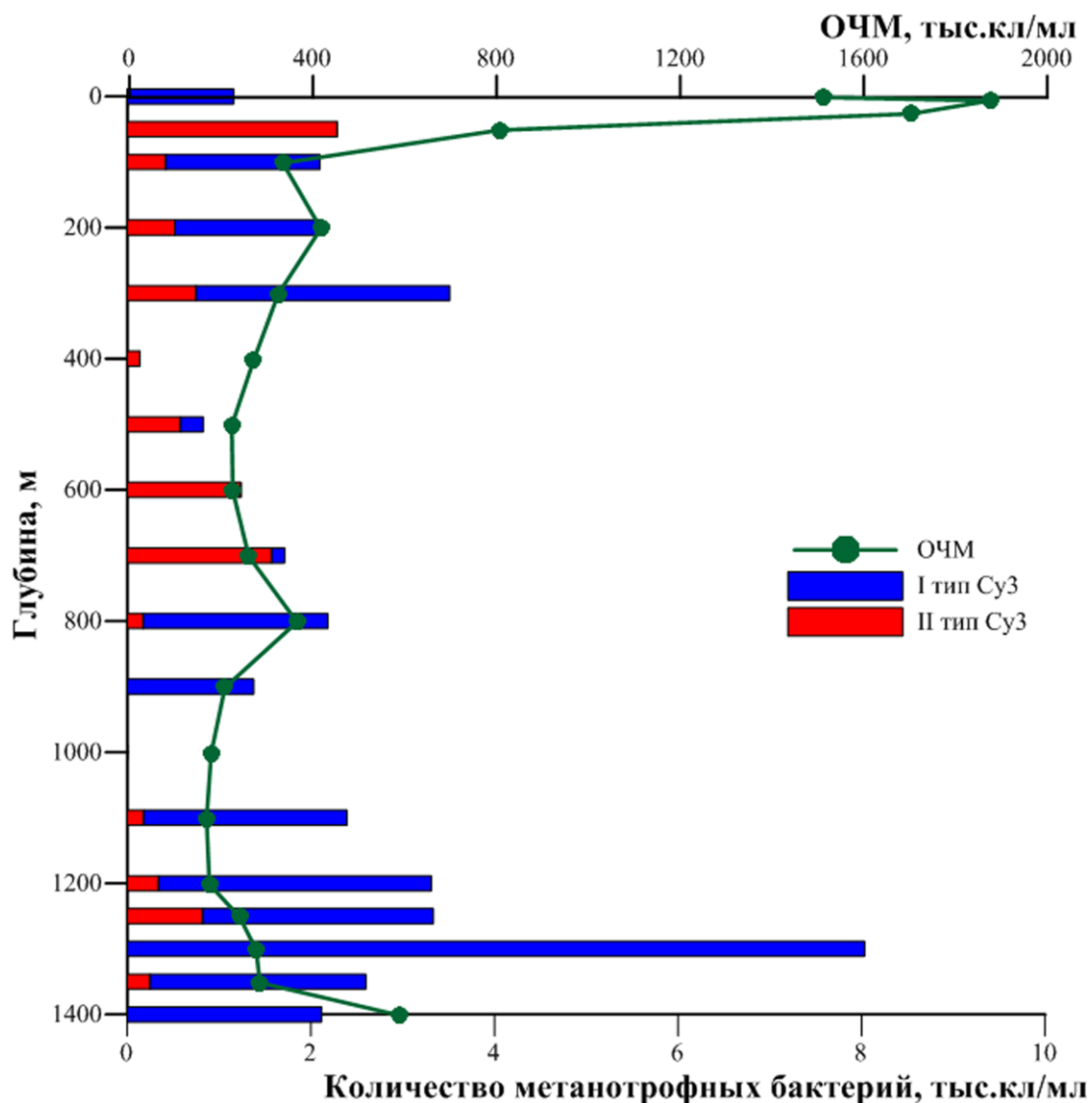


Рисунок 5 – Распределение ОЧМ и численности метанотрофных бактерий в водной толще фонового района ШБ

В фоновом районе численность метанотрофных бактерий не превышала  $8.033 \pm 0.134$  тыс. кл/мл, что составляло 2.9% от ОЧМ (рис. 5). В придонной области отмечена повышенная численность метанотрофов с преобладанием I типа.

*Для водной толщи районов разгрузки углеводородов оз. Байкал радиоизотопным методом установлено присутствие нескольких слоев с заметными различиями в интенсивности метаноокисления (МО) (рис. 4). Повышенная активность МО отмечена в поверхностном фотическом слое до глубины 50 м, что согласуется с повышенными концентрациями метана. В целом, разброс значений МО для верхних 50 м водной толщи на исследованных*

станциях составил  $0.58-1.14 \times 10^{-1}$  нл/(л сут). Глубже 50 м и практически до дна происходило резкое снижение интенсивности метаноокисления, но в глубинных слоях водной толщи значения МО варьировали от 0.064 до  $7.87 \times 10^{-1}$  нл/(л сут). Придонные воды (до 100 м от дна) отличались крайне высоким разбросом значений содержания  $\text{CH}_4$  и скоростей его окисления. По-видимому, это связано с месторасположением станций относительно действующих зон разгрузки  $\text{CH}_4$  на дне. Наибольшая скорость МО, как и концентрация  $\text{CH}_4$  ( $7.87 \times 10^{-1}$  нл/(л сут) и 1 мкл/л, соответственно) отмечены в районе I. Следует отметить, что пик МО и содержания  $\text{CH}_4$  располагался на глубине 850 м (5 м над дном), а не непосредственно у дна. Аналогичные результаты получены и для района II. Возможно, это связано с особенностями придонных течений и переносом слоев водной толщи, обогащенных  $\text{CH}_4$  и метанооксиляющими бактериями, в горизонтальном и вертикальном направлении относительно зоны метановых высачиваний. Измерения интенсивности МО в водной толще фонового района не проводили.

Согласно прямым радиоизотопным измерениям (Гайнутдинова, 2005; Намсараев и др., 2006) средняя скорость окисления метана в водной толще Байкала составляла около 500 нл/(л сут), но типичные концентрации растворенного в водной толще метана в несколько раз меньше его суточного потребления сообществом метанотрофных бактерий. Сопоставление же наших данных МО с расчетами, проведенными на основе осредненных профилей тритиево-гелиевого возраста водных масс и концентраций растворенного метана, показали достаточно высокую корреляцию для глубинных вод Байкала. По данным (Гранин и др., 2013), скорость окисления метана в фоновых районах Южного и Среднего Байкала варьировала от 0.003 до 0.021 нл/(л сут).

Метод главных компонент с нормализацией и центрированием данных показал, что векторы концентраций  $\text{CH}_4$  и скоростей метаноокисления в водной толще районов разгрузки углеводородов сонаправлены (рис. ба), но достоверной корреляции между этими параметрами нет ( $r = 0.45$ ). Кроме того, положительной корреляции не выявлено между численностью метанотрофов,

концентрациями  $\text{CH}_4$  и скоростями его окисления, но корреляция отмечена между ОЧМ и температурой ( $r = 0.86$ ).

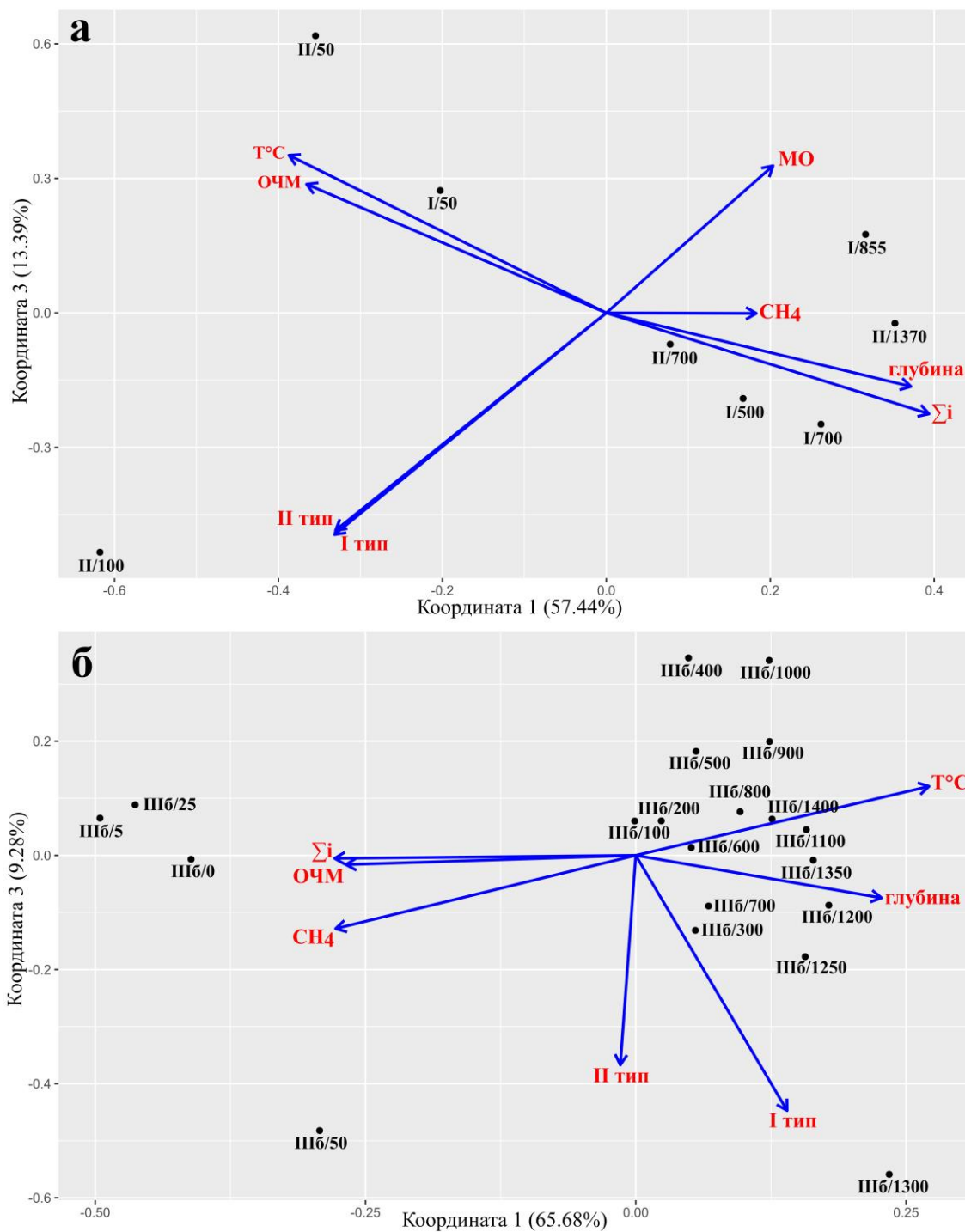


Рисунок 6 – Диаграмма рассеяния точек в пространстве первой и третьей главных компонент, построенная на основе микробиологических данных, глубине водной толщ,  $\Sigma i$ ,  $T^\circ\text{C}$ , концентраций  $\text{CH}_4$  и скоростей метаноокисления в водной толще оз. Байкал. Стрелками отображены векторы, направленные по градиентам изменения исследуемых показателей в образцах. **а** – районы разгрузки углеводов; **б** – фоновый район

В водной толще фонового района также не обнаружено корреляции между численностью МОБ и содержанием  $\text{CH}_4$  (рис 6б), но найдена значимая корреляционная связь между ОЧМ,  $\Sigma i$  и концентраций  $\text{CH}_4$  ( $r = 0.94, 0.97$ ).

**Анализ полученных данных** показал, что концентрации  $\text{CH}_4$  и скорости его окисления в водной толще оз. Байкал значительно ниже (на 3 и более порядков), чем в меромиктических озерах с различным трофическим статусом и температурным режимом (табл. 4). Кроме того, метанооксиляющая активность оказалась значительно ниже, чем было показано ранее (Гайнутдинова, 2005; Намсараев и др., 2006). В водной толще перемешиваемых озер умеренного климата, таких как Констанц (Bornemann et al., 2016), Вашингтон (Lidstrom, Somers, 1984), Штехлин (Grossart et al., 2011), Экольн и Рамсен (Samad, Bertilsson, 2017) концентрации  $\text{CH}_4$  и МО выше, чем в оз. Байкал, на 1–2 порядка. Вклад метанотрофных бактерий ( $\leq 2.9\%$ ), определенный методом флуоресцентной *in situ* гибридизации, в общий бактериопланктон озера Байкал сопоставим с отмечаемым в оз. Киву (Zigah et al., 2015), оз. Констанц (Bornemann et al., 2016) и оз. Ротзее (Oswald et al., 2015), но ниже, чем в оз. Танганьика (Durisch-Kaiser et al., 2011) и оз. Цуг (Oswald et al., 2016) (табл. 4). Возможно, низкая численность метанотрофов обусловлена недостатками метода флуоресцентной *in situ* гибридизации. Используемые нами зонды, хотя и были разработаны для детекции метанотрофных бактерий в холодноводных экосистемах, могли не связаться с ДНК всех метанотрофов (Eller et al., 2001). Видимо, этим можно объяснить и отсутствие МОБ в придонных горизонтах, где отмечены повышенные концентрации  $\text{CH}_4$  и скорости его окисления.

Таблица 4 – Содержание метана, скорости его окисления и наличие метаноокисляющих бактерий в водной толще некоторых пресноводных водоемов

Тип	Название озера	Глубина, м	T, °C	Концентрация CH <sub>4</sub> , мкл/л	МО, нл/(л сут)	МОБ	Метод	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Арктические и антарктические	Кваллуурак, Килларни	≤190	16.8–17; 9.4–18.7	≤46189 (глубинные осадки), 11200 (поверхностный осадок)	≤32480000	II тип (≤74–75%); I тип (≤1.7%)	культивирование, пиросеквенирование	He et al., 2012
	озера о. Самойлов (дельта р. Лены)	≤6	≈11.3–17	≤514.618	≤191923	≤1.8 кл/мл I и II типы	кПЦР, пиросеквенирование	Osudar et al., 2016
	Светлое (меромиктическое)	39	≈3–14	0.672–20608	≤58486.4	преобладание I типа, ≤11%	высокопроизводительное секвенирование	Kallistova et al., 2019
	Уилланс (подледное)	2.3	-	≤0.538	-	≤3%, преобладание <i>Methylobacter tundripaludum</i>	клонирование, секвенирование	Michaud et al., 2017

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тропические			-	≤448000 (Schmid et al., 2005)	≤24550.4	<i>Methylococcus capsulatus</i> (X тип)	секвенирование по Сенгеру	Pasche et al., 2011
	Киву (олиготрофное, меромиктическое)	485	≈23–24.5	≤64960	-	I тип ≤1.3% от ОЧМ; II тип ≤0.3% от ОЧМ	анализ фосфолипидных жирных кислот, CARD-FISH	Zigah et al., 2015
			-	≤20138	-	I тип	анализ фосфолипидных жирных кислот	Morana et al., 2015
	Танганьика (олиготрофное, меромиктическое)	1470	≈23–24.5	≤4928	-	19–22% от ОЧМ, доминирование I типа (до 95%)	FISH	Durisch-Kaiser et al., 2011
	Матано (олиготрофное, меромиктическое)	590	≈25–30	≤31360	8064–2620800	-	-	Sturm et al., 2018
Озера умеренного климата	Вашингтон (мезотрофное, мономиктическое)	65	≈7–17	1.12–67.2	1075.2–26880	≤10 КОЕ/мл, I и II тип	культивирование, электронная микроскопия	Lidstrom, Somers, 1984
	Констанц (мезотрофное, мономиктическое)	251	≈4–16	0.896–32.3 (разгрузка) ≤1.187 (фон)	67.2–10259.2 38.08–694.4	0.1–0.6%, I тип <i>Methylococcaceae</i> ≤0.1%, I тип <i>Methylococcaceae</i>	кПЦР, секвенирование по Сенгеру	Bornemann et al., 2016
	Павен (олигомезотрофное, меромиктическое)	92	≈4–12.5	6.72–94080	-	I, II и X типы, доминирование <i>Methylobacter</i> sp.	секвенирование по Сенгеру	Biderre-Petit et al., 2011

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Озера умеренного климата	Штехлин (олиготрофное, димиктическое)	69.5	≈5–25	≤32.26	-	I тип ( <i>Methylobacter tundripaludum</i> )	секвенирование по Сенгеру	Grossart et al., 2011
			5.4	1008 (17 м над осадком)	-	I тип	протеомный анализ	Ullrich et al., 2016
	Ротзее (эвтрофное, мономиктическое)	16	≈7–22	≤22400 – бескислород- ный слой	≤112000	≤2% от ОЧМ, I тип ( <i>Methylomonas rubra</i> )	FISH, секвенирование по Сенгеру	Schubert et al., 2010
				0.672–67.2 – кислородный слой; ≤13440 – придонная область, бескислород- ный слой	≤32928	I тип – ≤0.6% от ОЧМ, II тип – ≤1.9% от ОЧМ (2012 год); I тип – ≤0.5% (2013 год)	CARD-FISH	Oswald et al., 2015
				≤6944	≤156800	I тип (доминирование <i>Crenothrix polyspora</i> )	CARD-FISH, высокопроизво- дительное секвенирование	Oswald et al., 2017
				0.224 – кислородный слой; ≤1344 – придонная область, бескислород- ный слой	≤14336	I тип (10–15% от ОЧМ); II тип (<1% от ОЧМ)	CARD-FISH	Oswald et al., 2016
Цуг (эвтрофное, меромиктическое)	198	≈4–22						

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Озера умеренного климата	Цуг (эвтрофное, меромиктическое)	198	≈4–22	-	-	I тип (доминирование <i>Crenothrix polyspora</i> )	CARD-FISH, высокопроизводи- тельное секвенирование	Oswald et al., 2017	
	Экольн (эвтрофное, димиктическое)	40	≈1–2 (зима)	1.568–3.808	-	≤0.8%, I тип (род <i>Methylobacter</i> )	кПЦР, секвенирование по Сенгеру	Samad, Bertilsson, 2017	
	Рамсен (мезотрофное, димиктическое)	11.5	≈3–4 (зима)	0.896–8.96	-	≤1.3%, I тип (род <i>Methylobacter</i> )			
	Алинен-Мустаярви (дистрофное, меромиктическое весной)	6.5	≈5–15	<29120	-	I тип (доминирование Candidatus <i>Methyloumidiphilus alinensis</i> )	высокопроизводи- тельное секвенирование	Rissanen et al., 2018	
	Мекоярви (дистрофное, меромиктическое весной)	4	≈5–13	<3360	-	I тип (род <i>Methylobacter</i> ), II тип <0.3%			
	Байкал (олиготрофное, димиктическое)	1642			0.01–0.11 (средние данные)	0.003–0.028 (средние данные)			Гранин и др., 2013
							I тип (≤2.9% от ОЧМ); II тип (≤2.3% от ОЧМ)	FISH	Наши данные

*Оценка разнообразия сообществ в водной толще исследуемых районов на основе анализа библиотек генов 16S рНК.* Исследования таксономического состава микроорганизмов в водной толще фоновых районов озера Байкал ведется с 1990-х годов с использованием различных методов (Денисова и др., 1999; Белькова и др., 2003; Парфенова и др., 2013; Kurilkina et al., 2016; Wilburn et al., 2019). Представители таких фил как *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* доминировали во всех предыдущих работах.

При изучении биоразнообразия в водной толще южного бассейна озера с помощью секвенирования по Сенгеру были показаны различия в бактериальном составе поверхностных и придонных вод (Денисова и др., 1999). В поверхностном слое воды доминировали представители филы *Cyanobacteria*, на глубине 400 м преобладали *Actinobacteria*, тогда как сообщество на глубине 1200 м содержало представителей практически всех групп филы *Proteobacteria*. Кроме того, на этой глубине были выявлены последовательности цианобактерий, но они отличались от обнаруженных в поверхностных водах.

Позже было проведено исследование биоразнообразия микроорганизмов в водной толще фоновых районов трех бассейнов озера Байкал с помощью методов общей и молекулярной микробиологии (Белькова и др., 2003). Анализ последовательностей фрагментов гена 16S рНК из трех образцов водной толщи средней котловины озера Байкал выявил представителей *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Nitrospira*. В поверхностном слое (25 м) преобладали последовательности *Cyanobacteria* и *Actinobacteria*, на глубине 1400 м разнообразие было самым высоким и включало представителей всех фил, выявленных в данном исследовании. В самом нижнем слое водной толщи преобладали последовательности *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (Белькова и др., 2003).

С помощью метода пиросеквенирования (регион V1–V3 фрагментов гена 16S рНК) в образцах планктона, взятых из литоральной зоны фонового района южной котловины озера Байкал, показано, что преобладали представители трех

фил: *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Они составляли 85.3% от общего количества последовательностей (Парфенова и др., 2013). С помощью пиросеквенирования ампликонов V3–V4 участка гена 16S рРНК образцов фотического слоя трех котловин оз. Байкал было выявлено, что таксономический состав бактериальных сообществ был однороден и основная часть последовательностей во всех образцах принадлежала филам *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria* (Михайлов и др., 2015).

Кроме того, был изучен состав бактериальных сообществ в южной котловине озера Байкал в разные гидрологические периоды и на разных глубинах (до 1515 м) с помощью пиросеквенирования варибельной области V3 гена 16S рРНК. Было установлено, что состав доминирующих фил (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria*) на уровне семейства и их вклад в бактериальные сообщества разных слоев водной толщи варьировали в зависимости от гидрологического режима. Динамика физико-химических условий по всей толще воды и их относительное постоянство в глубоких слоях оказались решающими факторами, которые формировали структуру бактериальных сообществ в Байкале (Kurilkina et al., 2016).

В десяти фоновых районах трех бассейнов озера Байкал проведено изучение состава бактериопланктона с помощью метода секвенирования региона V4 гена 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq (Wilburn et al., 2019). Среди последовательностей преобладали типичные пресноводные *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Состав микробных сообществ отличался от предыдущих исследований озера Байкал (Денисова и др., 1999; Белькова и др., 2003; Парфенова и др., 2013; Kurilkina et al., 2016). Было выявлено очень незначительное количество последовательностей *Chloroflexi*, но показана существенная доля в сообществе *Verrucomicrobia*. Исследование бактериопланктона озера Байкал выявило, что температура и питательные вещества являются основными факторами,

определяющими состав, разнообразие и богатство микробного сообщества (Wilburn et al., 2019).

В нашем исследовании после секвенирования фрагментов, кодирующих область V2–V3 гена 16S рРНК, с последующим выравниванием, кластеризацией и удалением химер, было получено в общей сложности 61 870 последовательностей из 8 образцов района I и 47 448 последовательностей из 5 образцов района II, средняя длина – 392 п.н. Последовательности были сгруппированы в 2176 ОТЕ<sub>0.03</sub>. Количество ОТЕ в образцах варьировало от 102 до 353 в районе I и от 307 до 641 – в районе II (табл. 5).

Таблица 5 – Индексы видового разнообразия (0.03) бактериальных сообществ водной толщи районов разгрузки углеводородов озера Байкал

Образец	Количество чтений	Количество ОТЕ	Покрывтие (%)	Разнообразие		Богатство	
				индекс Шеннона	обратный индекс Симпсона	Chao1	ACE
I/0	6777	241	99.04	3.06	5.13	315	298
I/50	1569	102	97.71	2.81	6.74	139	141
I/100	10 892	353	99.02	3.91	19.36	491	470
I/200	4913	297	98.6	4.32	27.79	353	348
I/300	8737	288	98.62	3.78	14.62	670	806
I/500	12 468	125	99.56	2.50	6.45	224	364
I/700	9016	282	98.69	3.62	13.59	505	747
I/855	7498	105	99.49	2.37	4.78	205	249
II/0	7569	528	95.41	2.05	2.02	1438	2535
II/50	16 129	312	99.29	2.36	2.77	485	559
II/100	8410	307	98.68	2.97	4.25	460	437
II/700	6923	570	94.71	2.49	2.48	1614	2753
II/1370	8417	641	95.83	4.26	25.70	1544	2009

Анализ изменений индексов таксономического богатства (индексы Chao1 и ACE) и многообразия (индекс Шеннона и обратный индекс Симпсона) сообществ по всей водной толще показал, что более высокие значения были обнаружены в сообществах для образца П/1370 и для образцов I/100, I/200, I/300.

Кривые разрежения, построенные для генетического расстояния 0.03 в изученных библиотеках генов 16S рРНК, имели крутой наклон, за исключением трех образцов из района II (II/0, II/700 и II/1370) (рис. 7), что может быть связано с недостаточным покрытием.

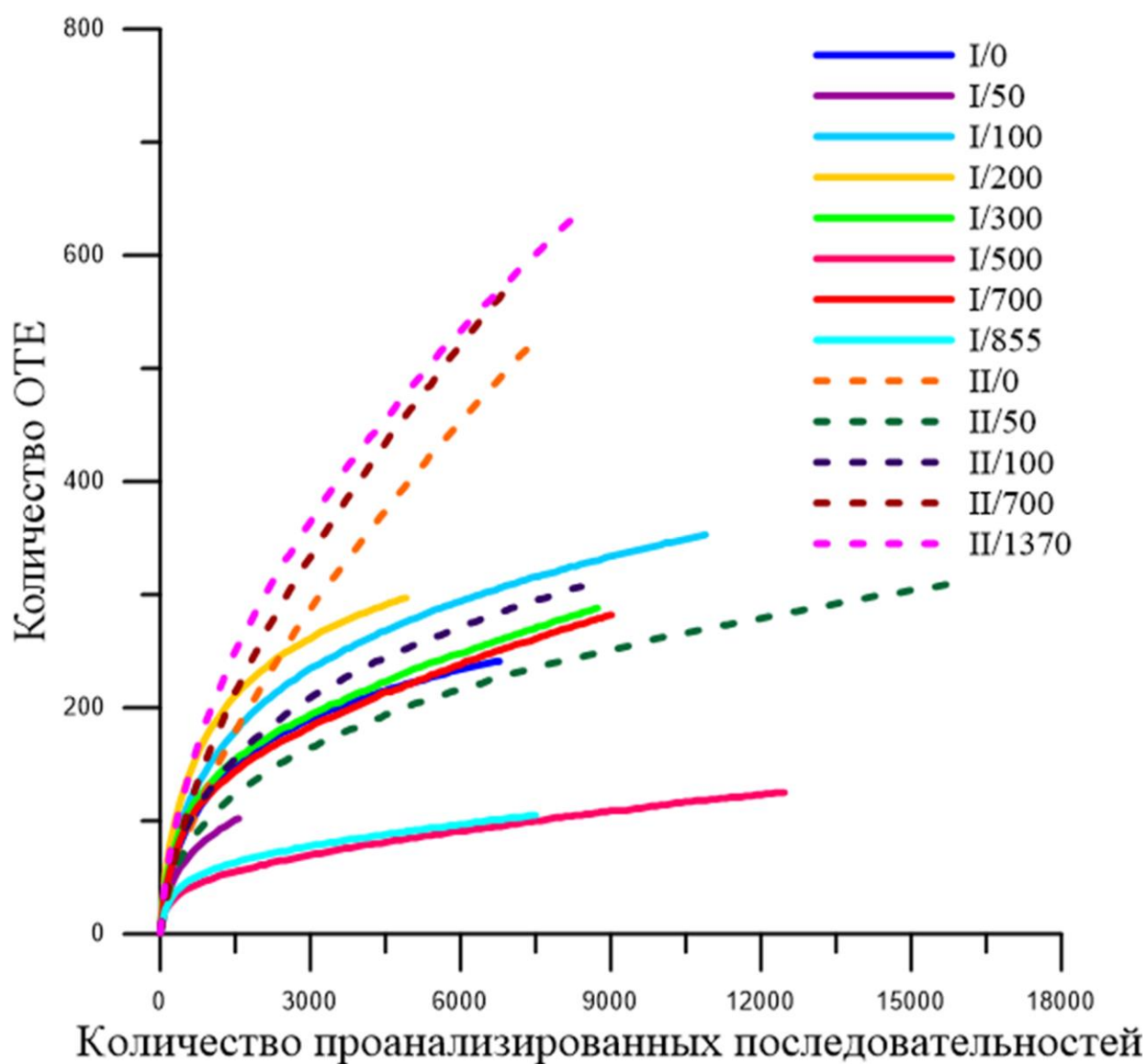


Рисунок 7 – Кривые накопления видов (генетическая дистанция 0.03) для образцов микробных сообществ водной толщи районов разгрузки углеводов оз. Байкал

Значения покрытия варьировали от 97.7% (I/50) до 99.6% (I/500) для образцов района I, от 94.7% (II/700) до 99.3% (II/50) – для образцов района II. Эти данные (табл. 5) свидетельствуют о том, что структура бактериальных сообществ из района I была охарактеризована наиболее полно.

***В период весенней гомотермии*** в бактериальных сообществах водной толщи района I были идентифицированы представители 21 филы. В трофогенном слое доминировали цианобактерии (до 43%) и протеобактерии, с глубиной доля протеобактерий в сообществах возрастала (до 81%) (рис. 8).

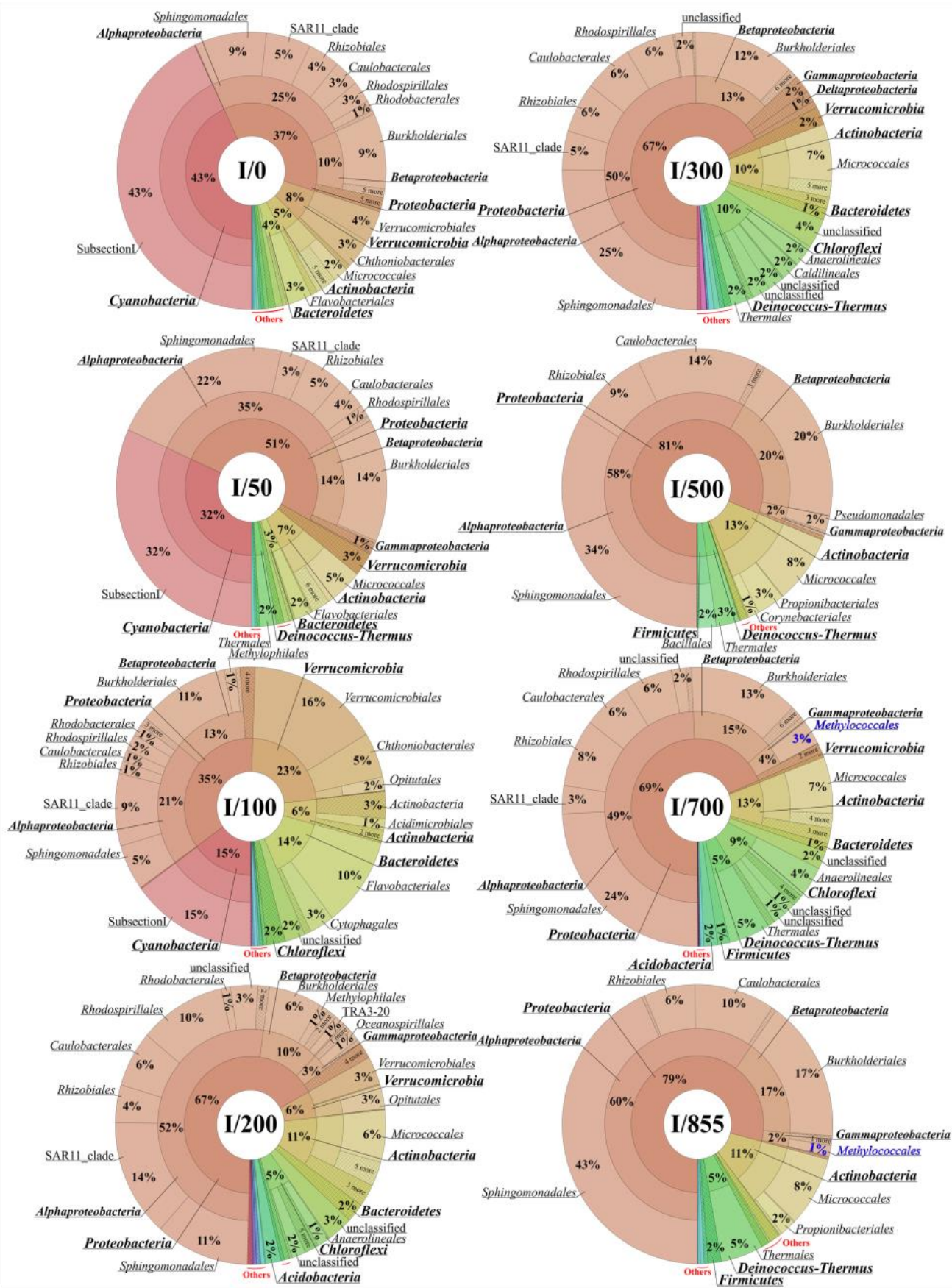


Рисунок 8 – Сравнение таксономического состава бактериальных сообществ из разных слоев водной толщи района нефте-метанового сипа, основанное на данных метагеномного анализа фрагментов генов 16S рРНК (SILVA 123)

Филогенетический анализ показал, что выявленные цианобактерии являются частью кластера планктонных цианобактерий озера Байкал. Они образуют две отдельные клады (рис. 9), демонстрируя высокую гомологию с родом *Synechococcus*.

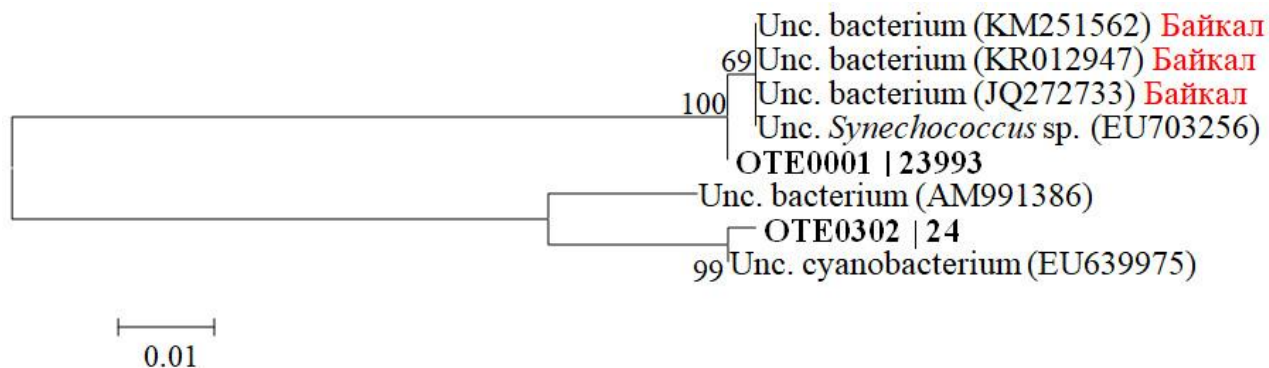


Рисунок 9 – Филогенетическое дерево представителей филои *Cyanobacteria*, построенное на основе нуклеотидных последовательностей региона V2–V3 фрагментов генов 16S рРНК. Метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных деревьев)

Преобладание цианобактерий в байкальской пелагической зоне в течение периода наблюдения, скорее всего, было связано с началом их цветения (Belykh et al., 2003, 2006, 2011). Самая распространенная ОТЕ (операционная таксономическая единица) рода *Synechococcus* имела ближайших гомологов из сообщества байкальских губок (Калюжная, Ицкович, 2015), но контрастировала с последовательностями, выделенными из байкальских отложений (Zemskaya et al., 2015). Отмечено, что цианобактерии, в том числе рода *Synechococcus*, могут продуцировать  $\text{CH}_4$  (Vižić-Ionescu et al., 2019). Это может объяснить повышенные содержания  $\text{CH}_4$ , как и ОЧМ (включающая цианобактерий), выявленные в фотическом слое исследуемых районов.

В сообществах глубже 200 м доля *Proteobacteria* составляла более чем 60% последовательностей (рис. 8), причем большинство из них принадлежало классам *Alpha-* и *Betaproteobacteria*. Класс *Alphaproteobacteria* был представлен последовательностями следующих порядков: 4-*Org1-14*, *Caulobacterales*, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *SAR11\_clade*, *Sphingomonadales* и unclassified *Alphaproteobacteria* (рис. 8). Наиболее

многочисленными (до 43%) были последовательности рода *Sphingomonas*. Представителей рода *Sphingomonas* часто выделяют из загрязненных нефтью почв, так как они обладают уникальной способностью разлагать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (Zhuang et al., 2003; Liu et al., 2004; Chaudhary, Kim, 2016; Zhou et al., 2016). По данным А. Г. Горшкова с соавторами (2011), в этом районе озера Байкал отмечены экстремальные концентрации нефтепродуктов, в том числе ПАУ, поступающих из донных осадков в водную толщу.

Класс *Betaproteobacteria* был вторым наиболее распространенным таксоном с более высоким процентом последовательностей в библиотеках генов 16S рРНК в глубинных слоях водной толщи (рис. 8). Среди них были идентифицированы восемь порядков: B1-7BS, *Burkholderiales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, SC-I-84, TRA3-20 и unclassified. Основным представителем порядка *Burkholderiales* являлось семейство *Comamonadaceae* (*Albidiferax*, *Limnohabitans*, *Pelomonas*, *Polaromonas*, *Tepidimonas* и unclassified).

Вклад последовательностей классов *Gamma*- и *Deltaproteobacteria* был незначительным, до 3.6% и 1.4%, соответственно. Единичные последовательности метанотрофных бактерий II типа выявлены на глубинах 100 и 200 м, ближайшими гомологами выявленной ОТЕ являлись представители рода *Methylocella* и Unc. bacterium. Метанотрофы I типа были представлены более разнообразно. Ближайшими гомологами наиболее обильной ОТЕ являлись некультивируемые представители семейства *Methylococcaceae* (рис. 10). Вклад метанотрофов в бактериальные сообщества водной толщи нефте-метанового района в период весенней гомотермии составлял не более 3% (рис. 8).

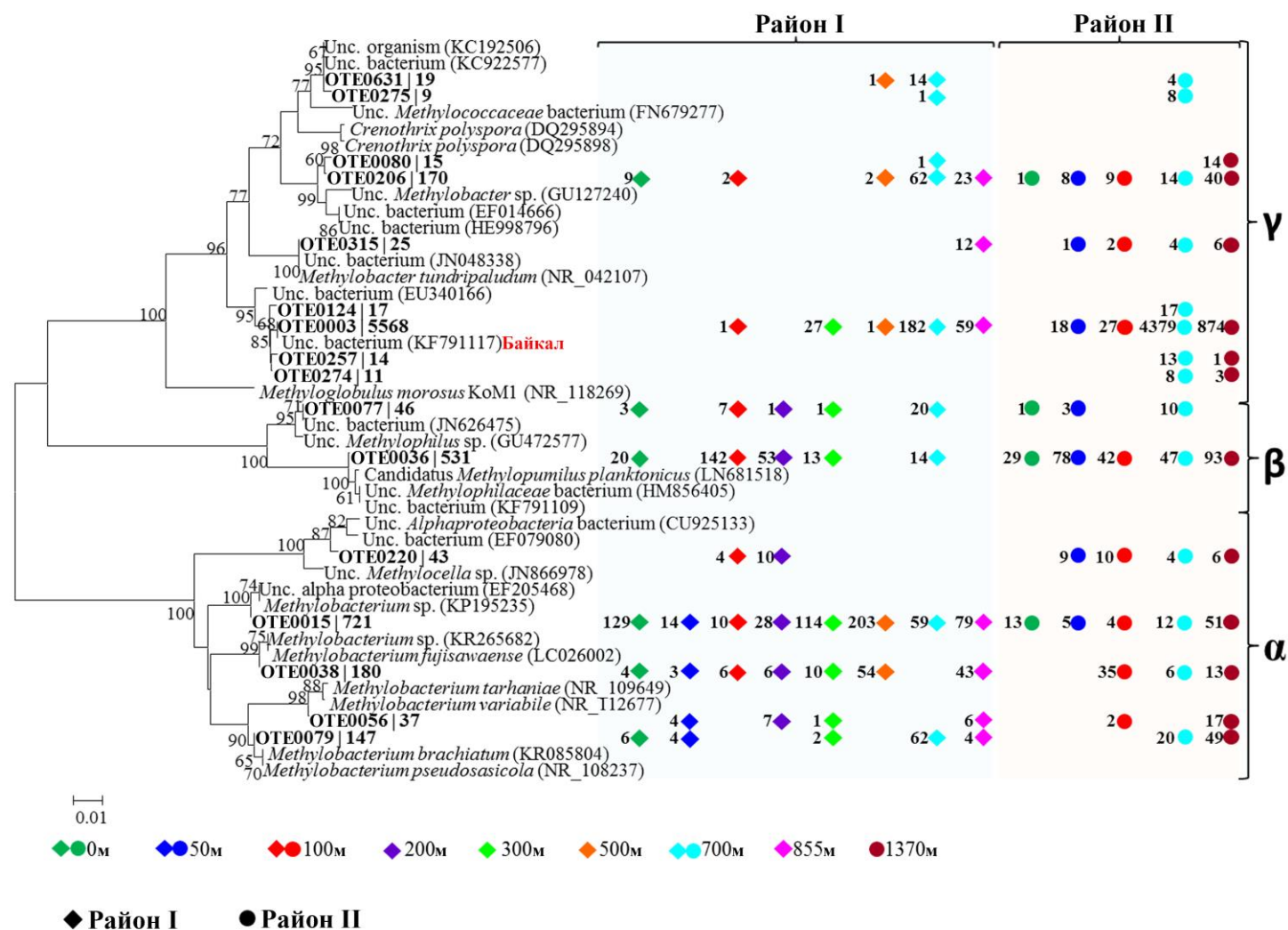


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево метилотрофных бактерий филы *Proteobacteria*, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК (регион V2–V3). Метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных деревьев)

Во всех образцах из района нефте-метанового сипа были обнаружены представители актинобактерий (рис. 8). Наиболее многочисленными были последовательности порядка *Micrococcales* (в основном род *Arthrobacter*) и *Propionibacteriales*. Представители рода *Arthrobacter* обычно находятся в загрязненных углеводородами средах, поскольку многие из них способны использовать широкий спектр галогенированных ароматических соединений (Leahy, Colwell, 1990; Haggblom, 1992). Значительные количества последовательностей филы *Chloroflexi* были обнаружены только в библиотеках генов 16S рРНК образцов I/200, I/300 и I/700 м (рис. 8). Их ближайшие гомологи были изолированы в основном из бескислородных сред богатых органическими веществами, таких как отложения, горячие источники и анаэробный осадок сточных вод. Эти бактерии участвуют в углеродном цикле: разлагают крахмал, сахара и пептиды (Hug et al., 2013).

Представители филы *Verrucomicrobia* отмечены в разных соотношениях в сообществах из разных слоев воды (рис. 8). Максимальный вклад рода *Luteolibacter* (семейство *Verrucomicrobiaceae*) был обнаружен в библиотеках генов 16S рРНК образца I/100. Эти гетеротрофы участвуют в разрушении водорослей и используют широкий спектр полисахаридов (Cardman et al., 2014). Бактерии этого рода широко распространены в морских и пресноводных экосистемах (Zhang et al., 2014). Известно, что некоторые представители филы *Verrucomicrobia* (роды *Methylacidiphilum* и *Methylacidimicrobium*), способны окислять  $\text{CH}_4$  (Op den Camp et al., 2009; van Teeseling et al., 2014). В исследуемых библиотеках генов 16S рРНК они выявлены в единичных количествах (рис. 11) на разных глубинах водной толщи и, скорее всего, являются представителями аллохтонной микрофлоры, поступающей в Байкал с речными водами. Их ближайшие гомологи были выделены из озер Гербер (Gerber) (HE857317), Бурже (Bourget) (JQ942061) и Йеллоустон (Yellowstone) (HM856402, HM856576).

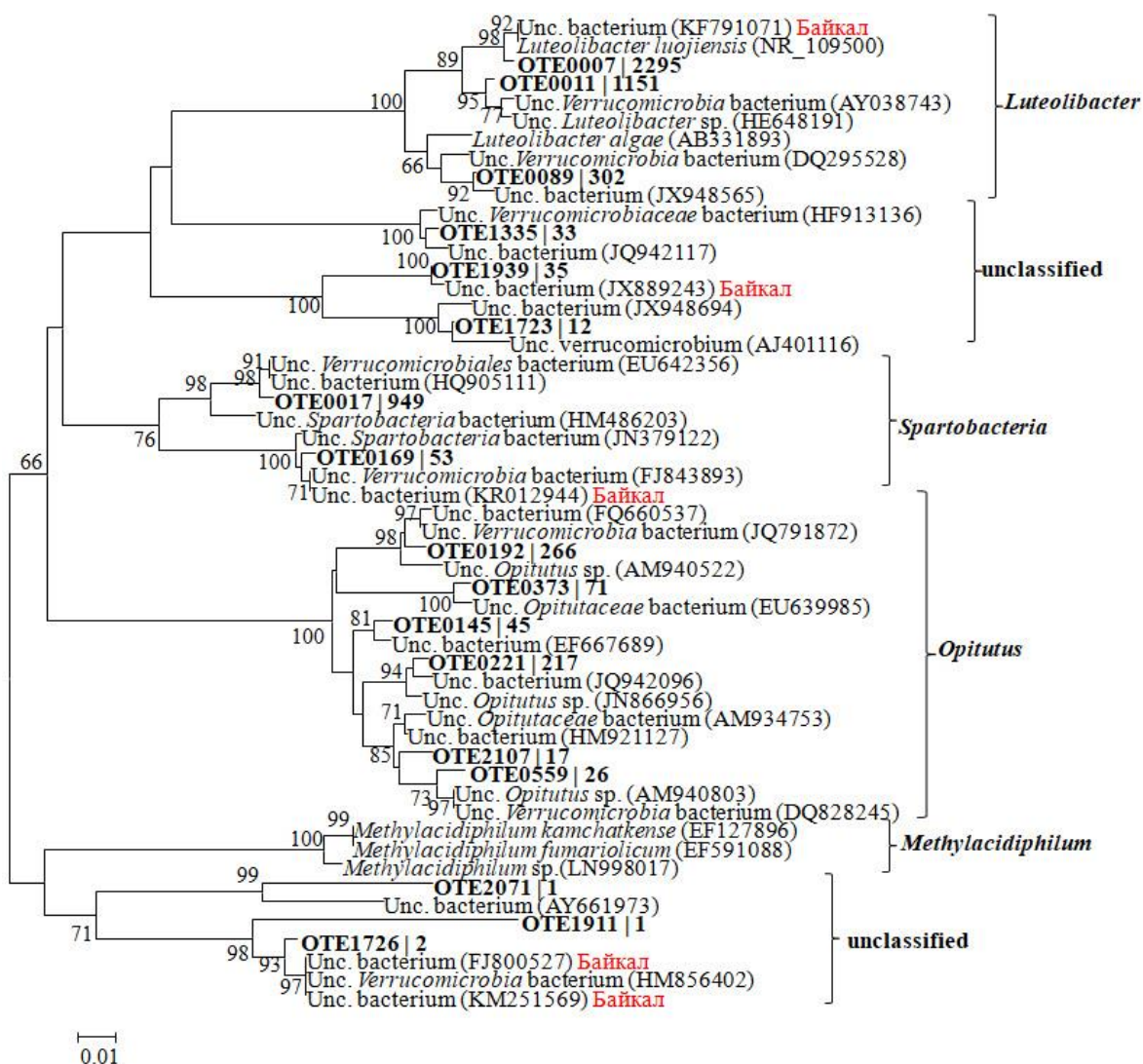


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево представителей фило *Verrucomicrobia*, построенное на основе нуклеотидных последовательностей региона V2–V3 фрагментов генов 16S рРНК. Метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных деревьев)

Представители фил *Aminicenantes*, *Armatimonadetes*, *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, PAUC34f, *Parcubacteria*, *Planctomycetes*, *Saccharibacteria* и TM6, а также классы *Proteobacteria* (SPOTSOC00m83, TA18 и unclassified *Proteobacteria*) были в минорном количестве во всех библиотеках генов 16S рРНК. В сумме их вклад в сообщества не превышал 3.2% (рис. 8).

**В период прямой температурной стратификации** в сообществах водной толщи района II выявлены представители 24 бактериальных фил с доминированием в трофогенном слое цианобактерий (образцы II/0–II/100), в более глубоких слоях – протеобактерий (рис. 12).



В этом районе температура воды была выше, чем в районе I, поэтому вклад автотрофного пикопланктона был более значимым. Согласно (Nagata et al., 1994), автотрофный пикопланктон, особенно цианобактерии родов *Synechococcus* и *Synechocystis*, играют ключевую роль в формировании первичной продукции озера Байкал. Способность цианобактерий к фотосинтезу и фиксации азота в присутствии света и кислорода объясняет преобладание этой группы в фотической зоне. Кроме того, выявленная недавно способность цианобактерий образовывать  $\text{CH}_4$  (Vižić-Ionescu et al., 2019) вносит ясность в причины возникновения повышенных концентраций  $\text{CH}_4$  в поверхностных слоях водной толщи оз. Байкал.

Большинство последовательностей *Proteobacteria* принадлежали классам *Alpha-*, *Beta-* и *Gamma**proteobacteria*. Количество последовательностей альфапротеобактерий достигало 32.9% в библиотеках генов 16S рРНК из придонного слоя (рис. 12). Среди них преобладали последовательности порядков *Rhodospirillales* (до 6%) и *Sphingomonadales* (до 17%).

В библиотеках генов 16S рРНК из трофогенного слоя (II/0–II/100) вклад представителей класса *Gamma**proteobacteria* был небольшим (рис. 12). Последовательности этого таксона преобладали в библиотеках генов 16S рРНК образца II/700 и в образце придонного слоя II/1370. В основном класс был представлен семейством *Methylococcaceae* (до 65% от общего числа последовательностей). Ближайшими гомологами многочисленной ОТЕ метанотрофов, которая на филогенетическом дереве образует отдельный кластер, являлись некультивируемые бактерии, выделенные из озера Байкал (KF791117) и Йеллоустон (EU340166) (рис. 10).

Последовательности класса *Betaproteobacteria* были представлены следующими порядками: B1-7BS, *Burkholderiales*, Hot\_Creek\_32, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, *Rhodocyclales*, SC-I-84 и TRA3-20. Доминирующий порядок *Burkholderiales* был представлен семейством *Comamonadaceae* (*Albidiferax*, *Limnohabitans*, *Pelomonas*, *Polaromonas* и

unclassified), как и в сообществах из района I. Последовательности класса *Deltaproteobacteria* во всех образцах были в небольшом количестве (до 2%).

В библиотеках генов 16S рРНК из глубоководных горизонтов отмечено увеличение занимаемой доли в сообществе представителей фил *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, WCHV1-60 и *Planctomycetes* и уменьшение представителей филы *Bacteroidetes* (рис. 12). Вклад последовательностей филы *Verrucomicrobia* увеличивался до глубины 100 м, тогда как в бактериальных сообществах нижних слоев водной толщи они составляли менее 0.3%. Как и в сообществах района I, среди *Verrucomicrobia* доминировали представители рода *Luteolibacter*. Доля фил *Candidate\_division\_OP3*, *Chlorobi*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Gracilibacteria*, *Hydrogenedentes*, *Microgenomates*, *Nitrospirae*, PAUC34f, *Parcubacteria*, *Planctomycetes*, SM2F11, *Saccharibacteria* и TM6, а также классов *Proteobacteria* (SPOTSOCT00m83, TA18 и unclassified *Proteobacteria*) была незначительной (в сумме менее 2%) (рис. 12).

Анализ библиотек генов 16S рРНК бактерий водной толщи районов разгрузки углеводов показал незначительные различия в составе крупных таксонов, что характерно и для сообществ донных отложений озера Байкал (Zemskaya et al., 2015). В исследуемых районах отмечено наличие канонических протеобактериальных метанотрофов, принадлежащих классам *Gamma*- и *Alphaproteobacteria*. В пределах класса *Gammaproteobacteria* выявлены метанотрофы I типа, относящиеся к семействам *Crenotrichaceae* и *Methylococcaceae*, для большого количества последовательностей ближайшими гомологами являлись некультивируемые бактерии (рис. 10), выделенные из озера Байкал (KF791117) и Йеллоустон (EU340166). Наибольшее количество последовательностей этой ОТЕ, отмечено в образцах из глубинной области. Следует отметить, что метанотрофные бактерии из донных отложений (Zemskaya et al., 2015) так же образовывали большой кластер с ближайшим гомологом *Unc. bacterium* (KF791117), что может свидетельствовать об их поступлении в водную толщу из донных отложений и вовлечении в процесс

окисления  $\text{CH}_4$ . Метанотрофы II типа (семейство *Beijerinckiaceae*) представлены в сообществах меньшим количеством последовательностей. В библиотеках генов 16S рРНК района I метанотрофы I типа были менее разнообразными и присутствовали в небольшом количестве, но их структура была филогенетически близка метанотрофам I типа из абиссальной зоны района II.

**В районах разгрузок углеводов** с различными гидрологическими режимами мы проанализировали влияние суммы ионов, температуры воды, концентрации и скорости окисления  $\text{CH}_4$  на распределение отдельных флотипов ( $\text{OTE}_{0.03}$ ) всех библиотек генов 16S рРНК с помощью анализа основных координат (рис. 13а). Анализ включал в себя только те  $\text{OTE}_{0.03}$ , которые содержали 50 или более последовательностей. Достоверной корреляции между параметрами окружающей среды и структурой сообществ, кроме корреляции с глубиной водной толщи (р-значение  $<0.05$ ) выявлено не было. Отсутствие надежной корреляции с другими параметрами окружающей среды, скорее всего, обусловлено специфическими адвективными процессами в пелагической зоне озера Байкал в течение периодов наблюдения. В результате этих процессов воды, обогащенные органическими веществами и микроорганизмами из трофогенного слоя, проникают в более глубокие слои (Шимараев и др., 2000; Парфенова и др., 2000). Чтобы сравнить сообщества из разных слоев водной толщи двух районов между собой, была выполнена кластеризация на основе средневзвешенной дистанционной матрицы UniFrac (W-UniFrac). Рисунок 13б указывает на наличие двух кластеров, один из которых включал сообщества из трофогенного слоя (0–100 м), а другой – сообщества с глубин 200–1350 м. Кроме того, структура сообществ выявленных кластеров различна, о чем свидетельствуют результаты анализа библиотек генов 16S рРНК с использованием многомерного шкалирования (рис. 13в).

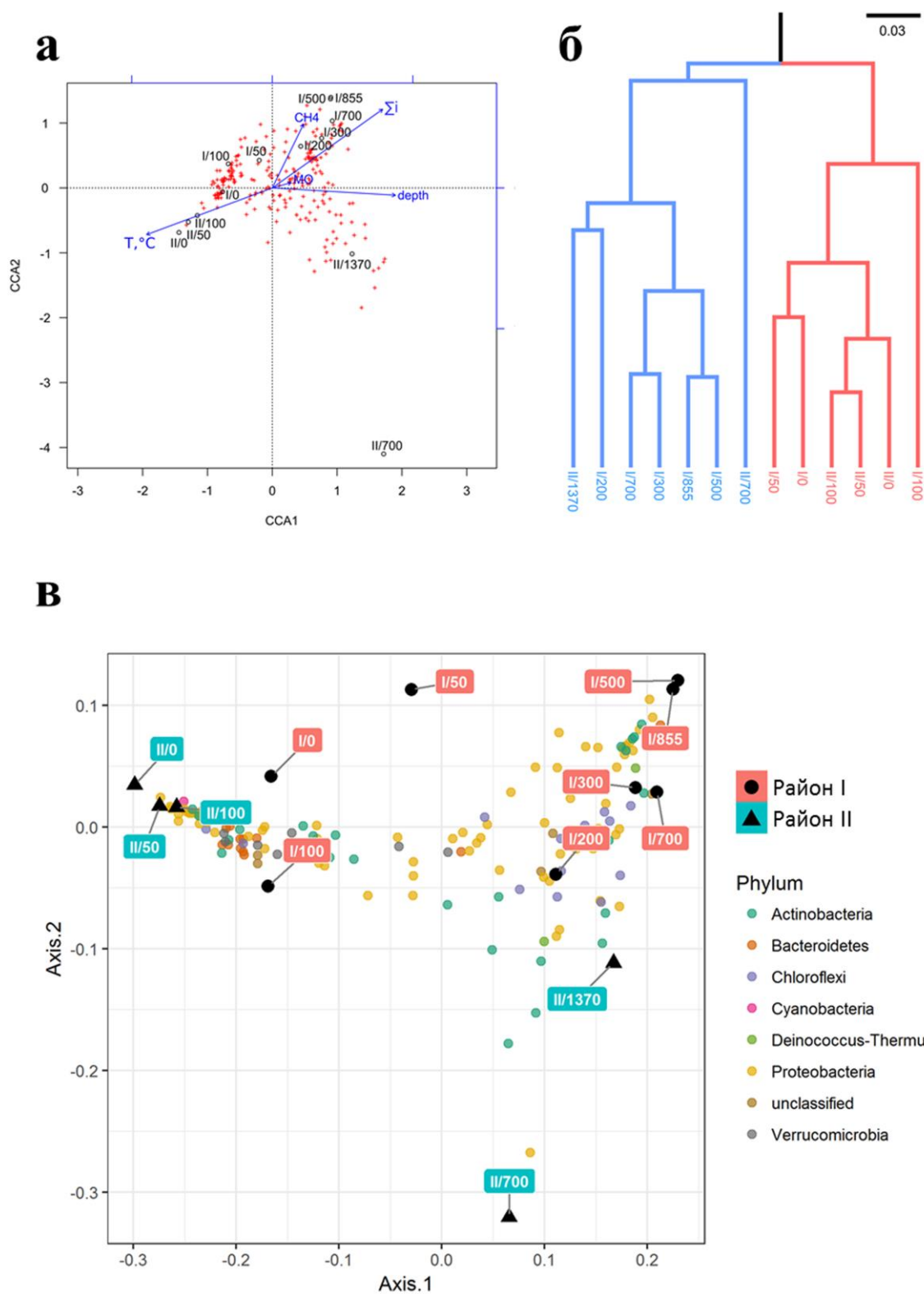


Рисунок 13 – График результатов анализа канонического соответствия (ССА) для микробных сообществ Байкала. Проверка модели проведена с использованием теста ANOVA, р-значение <0.05 только для параметра глубины – а. Дендрограмма UPGMA на основе взвешенной средней матрицы (W-UniFrac) – б. График анализа основных координат (PCoA) на основе взвешенной средней матрицы (W-UniFrac) – в

*Оценка разнообразия метанотрофных сообществ в водной толще исследуемых районов на основе анализа библиотек функциональных генов (pmoA и mxaF).* Метанмонооксигеназа является ключевым ферментом, ответственным за начальную стадию окисления метана до метанола. Как известно, существуют две формы этого фермента: мембрансвязанная (мММО) и растворимая (рММО) (Murrell et al., 2000; Хмеленина, Троценко, 2006; Ross et al., 2016). Ген, кодирующий *pmoA* бета-субъединицу метанмонооксигеназы, является наиболее часто используемым маркером, поскольку он присутствует у большинства аэробных метанотрофных бактерий.

В результате анализа было получено 4970 последовательностей *pmoA*: 4137 последовательностей из двух образцов района грязевого вулкана с прямой температурной стратификацией вод (II/700 и II/1370) и 833 последовательности из трех образцов района нефте-метанового сипа в период весенней гомотерии (I/100, I/200 и I/300). Для остальных образцов продуктов амплификации *pmoA* получено не было, даже после 40 циклов ПЦР. Все последовательности образцов района I относились МОБ II типа, в то время как все последовательности района II принадлежали I типу (рис. 14). Последовательности гена *pmoA* образовывали несколько кластеров в филогенетическом дереве. Среди метанотрофов I типа последовательности, образующие отдельную ветвь с некультивируемыми представителями *Methylococcaceae*, были самыми многочисленными. Ближайшим культивируемым гомологом являлся вид *Methyloglobulus morosus* (92%), выделенный из озера Констанс. Данный организм растет преимущественно при низких концентрациях кислорода и способен использовать в качестве единственного источника углерода и энергии метан и метанол (Deutzmann et al., 2014). Последовательности этого кластера были выявлены в глубокводной зоне района II с повышенными концентрациями CH<sub>4</sub>. Представители второго менее многочисленного кластера были обнаружены только в образце II/700. Последовательность некультивируемой гаммапротеобактерии, выделенной из водной толщи озера Шё (Schöhsee), была их ближайшим гомологом (100%).

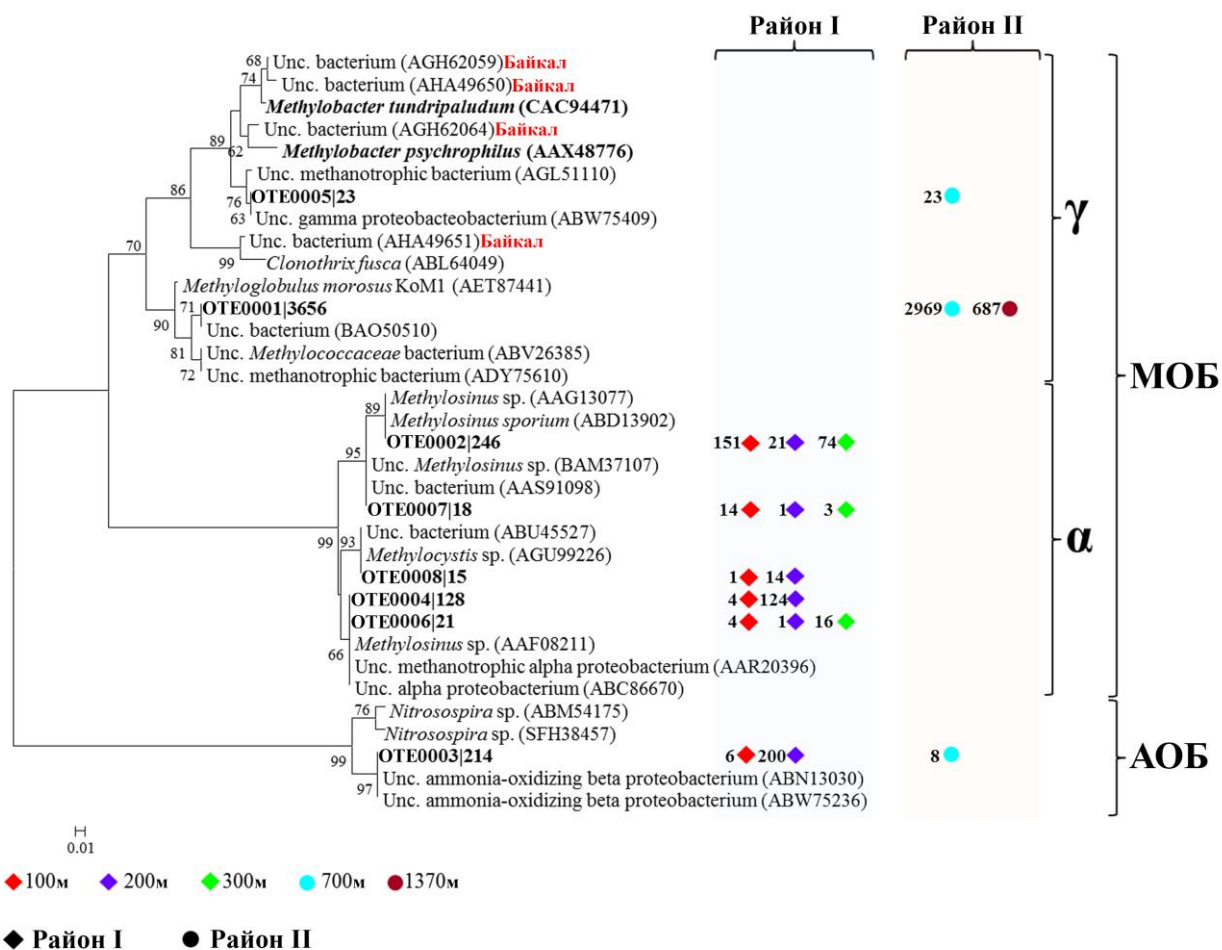


Рисунок 14 – Филогенетическое дерево, построенное на основании транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов генов *rpoA*. Метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода Poisson correction (500 альтернативных деревьев)

Последовательности в этом кластере были только на 96% идентичны культивируемым *Methylobacter* sp. и *Methylovulum miyakonense*, а также последовательностям из микробных матов метанового сипа Санкт-Петербург (Zemskaya et al., 2015). Третий кластер включал небольшое количество последовательностей, для которых ближайшими гомологами были *Unc. ammonia-oxidizing betaproteobacteria*, выделенные из водной толщи пресноводных озер Шё и Плусс (Plußsee). Скорее всего, этот кластер объединял последовательности, имеющие сходный по структуре с *rpoA* ген, кодирующий аммоний-монооксигеназу (Holmes et al., 1995).

Метанотрофные последовательности II типа были обнаружены в образцах района I на глубине 300 м и выше. На филогенетическом дереве они образовывали несколько ветвей с последовательностями родов *Methylosinus* и *Methylocystis* (сходство 99–100%). Примечательно, что состав сообществ МОБ в одних и тех же образцах с помощью анализа библиотек генов *pmoA* и 16S рРНК не был полностью идентичен.

Ген *mxaF* традиционно используют в качестве генетического маркера для обнаружения метанооксиляющих протеобактерий в пробах окружающей среды (McDonald, Murrell, 1997; Lau et al., 2013; Dumont, 2014). Несмотря на тот факт, что праймеры для амплификации *mxaF* были использованы на довольно широкий спектр метано- и метилотрофных бактерий (Neufeld et al., 2007), филогенетическое разнообразие в исследуемых образцах было незначительным. Все последовательности имели ближайших гомологов в пределах рода *Methylobacterium* (рис. 15). Количество ОТЕ (16) было более обширным в библиотеках генов *mxaF* района II, в районе I выявлено 10 ОТЕ. В исследованных образцах в библиотеках генов *mxaF* не выявлены метилотрофные представители семейств *Beijerinckiaceae*, *Methylophilaceae*, *Methylococcaceae* и *Crenotrichaceae*, отмеченные в библиотеках генов 16S рРНК. Возможно, что у них, как у двух изолятов из озера Цюрих (Zurich), отсутствует ген *mxaF*, что недавно было показано в работе (Salcher et al., 2015), или геномы байкальских метилотрофов содержат дополнительный ген(ы) окисления метанола, например, *хоxF4*, идентифицированный ранее в геномах метилотрофов (Giovannoni et al., 2008; Kalyuhznaya et al., 2009). Есть ли у байкальских метилотрофов характерный для пресноводных линий гомолог *хоxF4* или у них присутствует другой ген, обеспечивающий окисление метанола, предстоит выяснить.

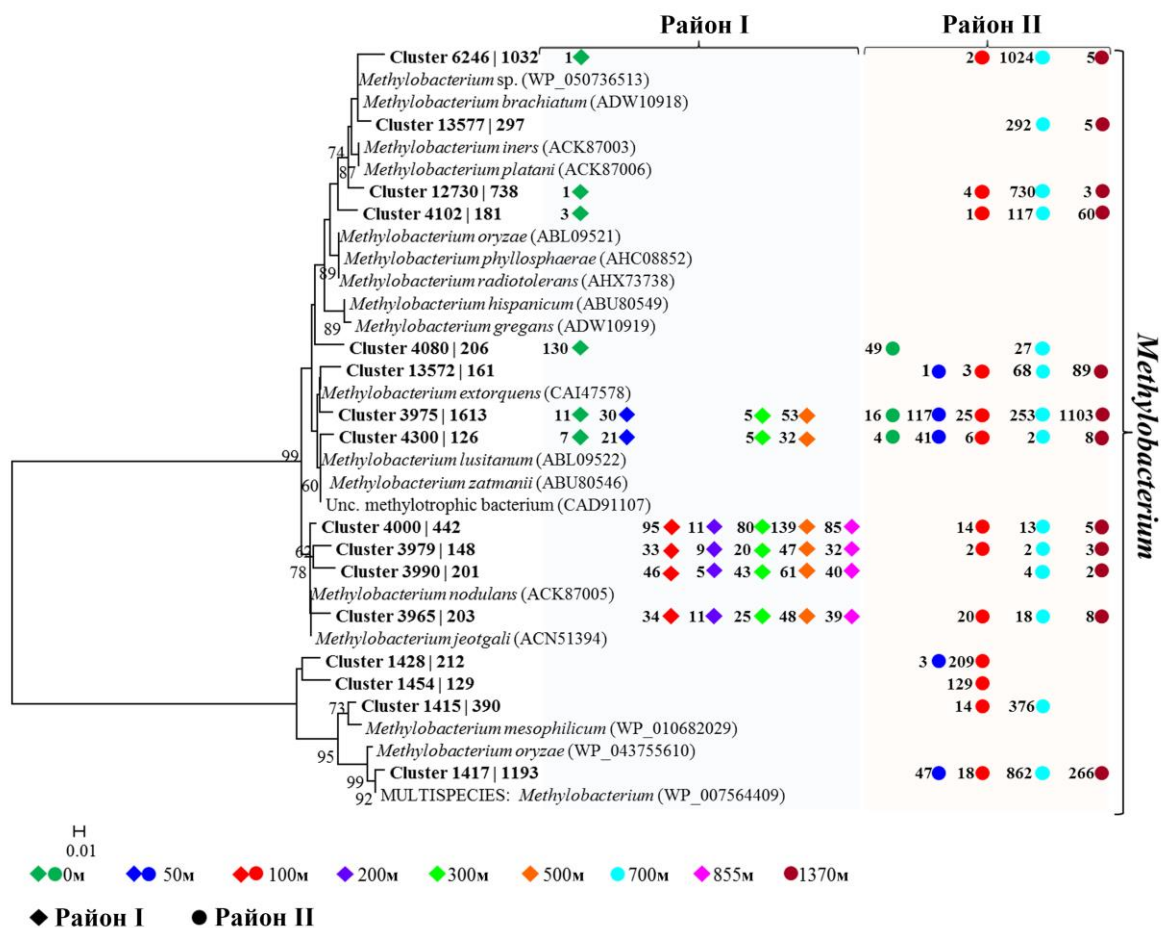


Рисунок 15 – Филогенетическое дерево, построенное на основании транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов генов *txaF*. Метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода Poisson correction (500 альтернативных деревьев)

В различных слоях водной толщи исследуемых районов с разным гидрологическим режимом разница в составе МОБ была более очевидной при анализе функциональных генов, чем при анализе генов 16S рРНК. Метанотрофы I типа выявлены в сообществах глубинных слоев водной толщи района II (700–1370 м), а метанотрофы II типа – в сообществах района I (до глубины 300 м).

Согласно исследованиям (Amaral, Knowles, 1995; Henckel et al., 2000), МОБ I типа лучше растут при низких концентрациях  $\text{CH}_4$  и кислорода, тогда как МОБ II типа – при высоком содержании  $\text{CH}_4$  и низкой концентрации кислорода. Согласно другим исследованиям, метанотрофы, принадлежащие семейству *Methylococcaceae*, преобладают в различных озерах с высокими

концентрациями  $\text{CH}_4$  (Tsutsumi et al., 2011; Milucka et al., 2015; Bornemann et al., 2016; Osudar et al., 2016; Oswald et al., 2016; Samad, Bertilsson, 2017). По нашим данным, представители этого семейства были многочисленны только в сообществах глубоководной зоны района II, хотя концентрации  $\text{CH}_4$  в этом районе были ниже (от 0.19 до 0.36 мкл/л), чем в районе I (от 0.63 до 1 мкл/л).

Другой причиной различий в составе метанотрофных сообществ водной толщи может быть приток метанотрофов II типа с притоками из болотистых мест Байкала. Известно, что в болотистых и торфяных экосистемах (Dedysh et al., 2000; Chen et al., 2008; Dedysh, 2009; Kip et al., 2011), а также в дельте реки Лена (Osudar et al., 2016) доминируют МОБ II типа. Представители этого типа были выявлены нами в сообществах поверхностных слоев водной толщи района I. Эти результаты предполагают два источника поступления МОБ в водную толщу: притоки (Liebner, Wagner, 2007; Liebner et al., 2009) и вертикальные потоки газоносных жидкостей из донных отложений. Оба типа МОБ могут активно проникать в глубокие и поверхностные слои воды через механизм вертикального обмена (Шимараев и др., 2000; Парфенова и др., 2000).

Кроме того, различие в составе МОБ на разных глубинах может быть определено температурным фактором (Liebner et al., 2009; Tsutsumi et al., 2011). Согласно исследованиям (Börjesson et al., 2004; Mohanty et al., 2007; Liebner et al., 2009; He et al., 2012; Oshkin et al., 2014; Crevecoeur et al., 2017), низкие температуры более благоприятны для МОБ I типа, поскольку они доминируют в сообществах биотопов с температурой ниже  $15^\circ\text{C}$ . В пелагической зоне Байкала температуры выше  $15^\circ\text{C}$  могут быть только в поверхностных слоях воды в течение очень короткого периода времени (Атлас Байкала, 1993). Скорее всего, не только психрофильные условия, но и содержание нефтяных и газообразных углеводородов, определяют развитие конкретного типа МОБ в озере Байкал. Этим можно объяснить распространенность в сообществах глубинных слоев нефте-метанового сипа (район I) последовательностей рода *Sphingomonas*, способных разлагать ПАУ.

Оценка разнообразия бактериальных сообществ с помощью анализа последовательностей генов 16S рРНК показала более широкий диапазон потенциальных МОБ, чем оценка, основанная на последовательностях генов *rpoA* и *mxaF*. С одной стороны, это может быть связано с узкой селективностью праймеров, используемых для амплификации локусов *rpoA* и *mxaF*, с другой стороны, некоторые МОБ могут иметь аналоги ферментных систем окисления  $\text{CH}_4$ , для которых на данный момент нет специфичных праймеров.

**Геномы метанотрофных бактерий.** Исследования проведены в подледный период в фоновом районе оз. Байкал. Для образцов из фотического (5 м, 20 м) и глубинного (1250 и 1350 м) слоев водной толщи было получено 210, 236, 282 и 240 миллионов последовательностей, соответственно. Соотношение преобладающих групп, обнаруженных в Байкале и в других озерах, исследованных с помощью данного метода, сходны. Тем не менее, на глубинах 5 и 20 м заметна большая доля представителей фило *Verrucomicrobia* (20% от суммарной 16S рРНК) и относительно небольшая доля *Betaproteobacteria* (рис. 16).

С использованием подхода MAG при анализе гена 16S рРНК выявлено, что структура сообществ поверхностных и глубинных образцов фонового района Байкала различна. В фотическом слое доминировали представители *Cyanobacteria* (отсутствовали в образце 1350 м и только 2% было обнаружено на глубине 1250 м, вероятно, из-за опускания клеток), *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Bacteroidetes*. В глубинных слоях более многочисленными таксонами (некоторые представители которых уникальны) являлись *CPR/Patescibacteria* (отсутствуют в поверхностных образцах), *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes*, классы *Deltaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria* и *Thaumarchaeota*. *Alpha-* и *Betaproteobacteria* были обнаружены в одинаковых количествах как в глубинных, так и в поверхностных образцах.

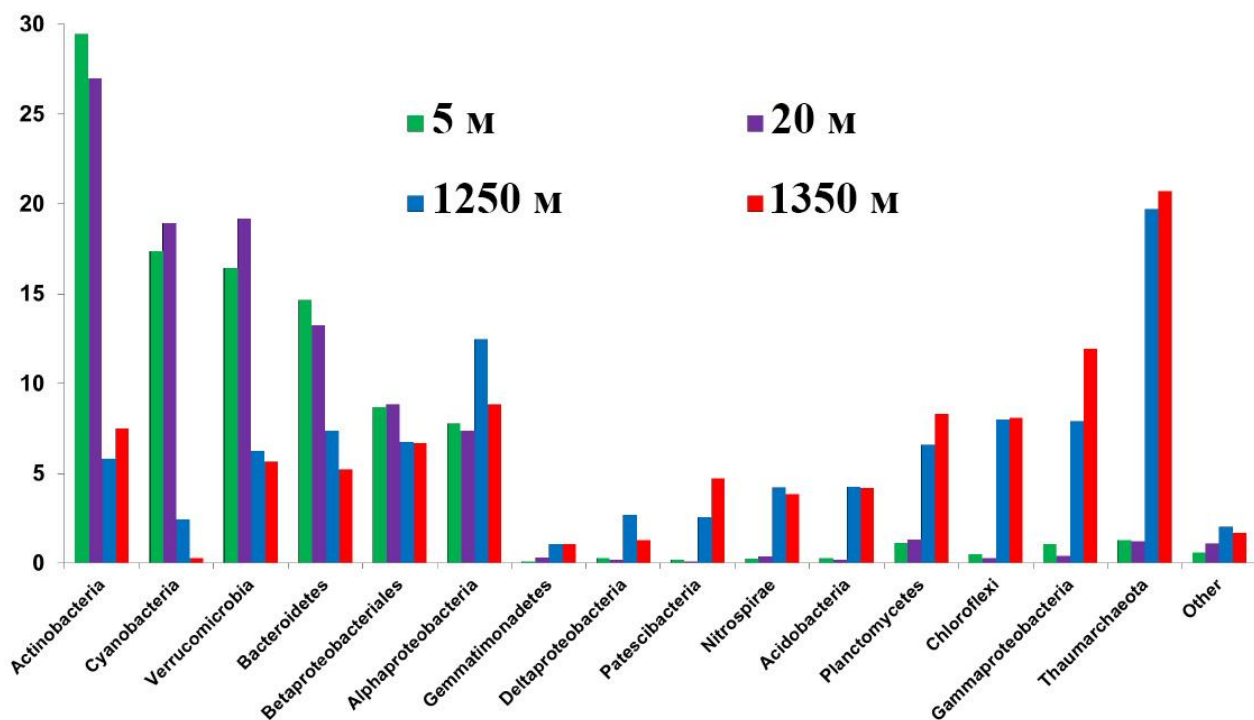


Рисунок 16 – Сравнение таксономического состава бактериальных сообществ из разных слоев водной толщи района III, основанное на данных метагеномного анализа генов 16S рРНК

Анализ геномов байкальских микроорганизмов показал невысокое разнообразие в поверхностных слоях, кроме того, отмечены новые линии, которые не были выявлены в других водоемах и отдаленно связаны с другими пресноводными микроорганизмами. Геномы многих микроорганизмов из фотической зоны района IIIa содержали гены родопсина, указывающие на способность бактерий использовать солнечную энергию для жизнедеятельности в зимних условиях. Что касается метанотрофов, то они были выявлены только в глубинных образцах в пределах класса *Gammaproteobacteria* (I тип). Было аннотировано два генома метанотрофов порядка *Methylococcales* и один (*Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142), тесно связанный с видом *Methyloglobulus morosus* (рис. 17), но отличающийся от него небольшим размером генома (менее 2.5 Мб). Кроме того, *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142 не был обнаружен ни в одном общедоступном пресноводном метагеноме, что может говорить об эндемичности данного микроорганизма.

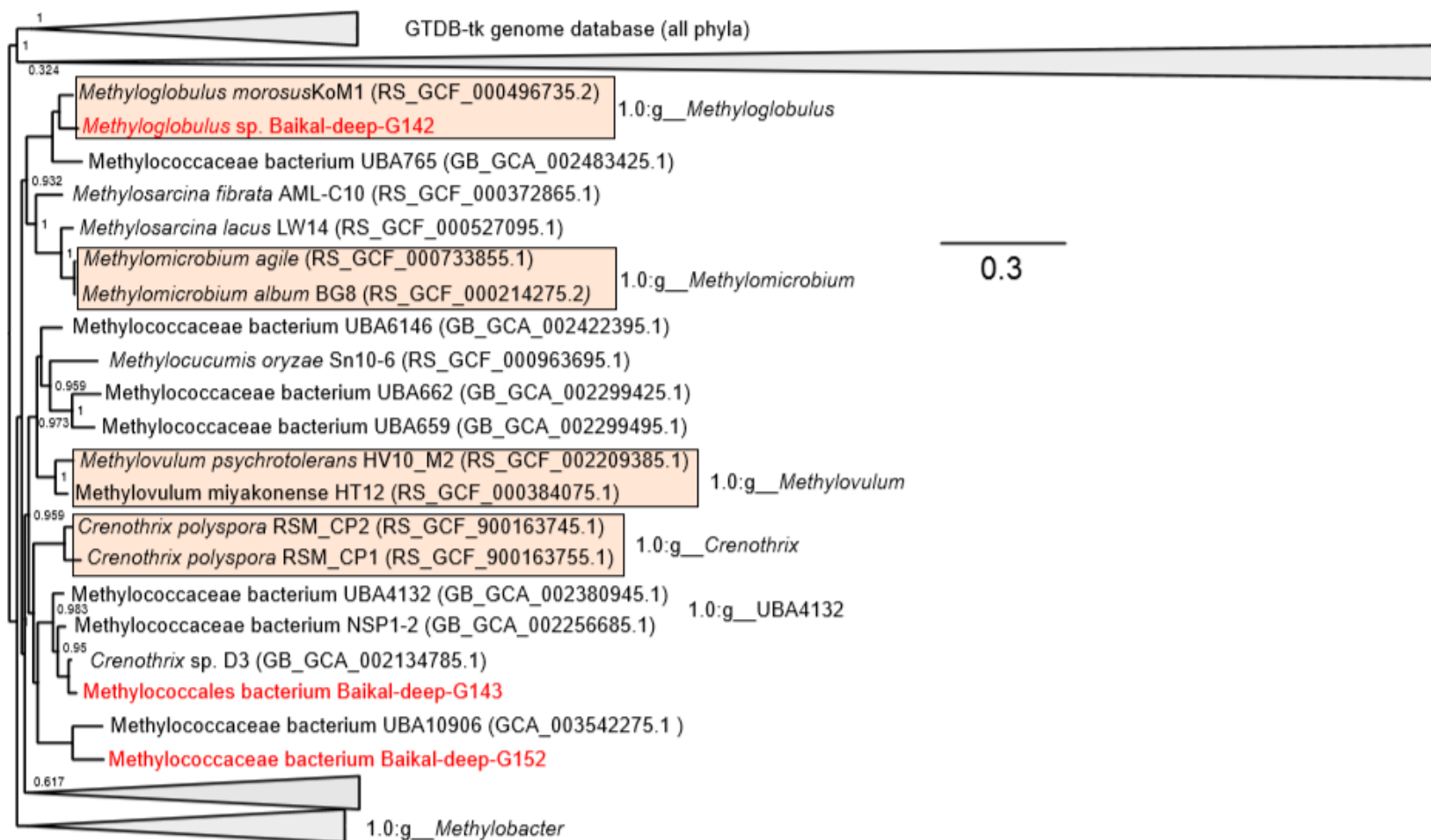


Рисунок 17 – Филогенетическое дерево MAGs метанооксиляющих бактерий

Гаммапротеобактерии рода *Methyloglobulus* и порядка *Methylococcales* являлись единственными метанотрофами, чьи геномы удалось собрать. В них выявлены гены, обеспечивающие участие в циклах углерода, азота и серы. Геномы *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142, *Methylococcales* Baikal-deep-G143 и *Methylomonadaceae* bacterium Baikal-deep-G152 содержат предполагаемые гены метан- / аммониймонооксигеназы, диссимиляторной сульфитредуктазы (DsrC), а так же ассимиляторной нитратредуктазы. Структурные гены кластера уреазы (ureABC) были обнаружены в геномах *Methyloglobulus* и *Methylomonadaceae*. Геномы метилотрофов порядка *Betaproteobacteriales* (*Methylothera*, *Methylophilus* и относящийся к семейству *Nitrosomonadaceae*), содержащие метанол- и формальдегиддегидрогеназу, были обнаружены в относительно высоких количествах. Метанолдегидрогеназы (*mdh1*, *mxaF*) были также обнаружены у *Betaproteobacteria* bacterium Baikal-deep-G93 / 97, *Gamma proteobacteria* Baikal-deep-G152, *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142 и *Gemmatimonadetes* bacterium Baikal-deep-G156.

## ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА НА РАЗВИТИЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

Для понимания условий развития метанотрофных бактерий был проведен эксперимент с природным микробным сообществом из зоны высоких концентраций  $\text{CH}_4$ . Для эксперимента был взят поверхностный слой осадка, значительно насыщенный  $\text{CH}_4$  (до 12006 мкл/л), ионы аммония и нитрат-ионы отсутствовали. Содержание кислорода в придонном слое воды составляло 11.5 мг/л, рН 7.78.

В результате секвенирования региона V2–V3 фрагментов гена 16S рРНК после выравнивания, кластеризации, удаления химер и удаления ОТЕ, содержащих менее 3 последовательностей, было получено 47 040 последовательностей со средней длиной 430 п.н. (табл. 6). Анализ библиотек ампликонов гена 16S рРНК выявил 952 ОТЕ при генетической дистанции 0.03. Количество ОТЕ в образце накопительной культуры, полученной на среде с аммонийным источником азота, составляло 336, на среде с нитратным источником азота – 128, максимальное количество ОТЕ отмечено в сообществе нативного осадка – 488 (табл. 6).

Таблица 6 – Индексы видового богатства и разнообразия (при кластерном расстоянии 0.03) в библиотеках генов 16S рРНК микробных сообществ нативного осадка и накопительных культур метанотрофных бактерий из оз. Байкал

№	Образец	Количество чтений	Количество ОТЕ	Покрытие (%)	Разнообразие		Богатство	
					индекс Шеннона	обратный индекс Симпсона	Chao1	ACE
1	AMS+ $\text{CH}_4$	24 156	336	99.64	2.02	3.98	423.02	398.70
2	NMS+ $\text{CH}_4$	14 219	128	99.71	1.79	3.92	171.16	160.98
3	Осадок 0–2 см	8 665	488	99.85	4.99	47.34	493.20	491.18

Индексы видового богатства и разнообразия были максимальными в накопительной культуре, полученной на среде с аммонийным источником азота. Значения покрытия варьировали от 99.64% до 99.85% (табл. 6). Кривые разрежения, построенные для генетического расстояния 0.03, в исследуемых библиотеках генов 16S рРНК выходят на плато (рис. 18). Наиболее полно охарактеризована структура бактериального сообщества при культивировании на среде с аммонием.

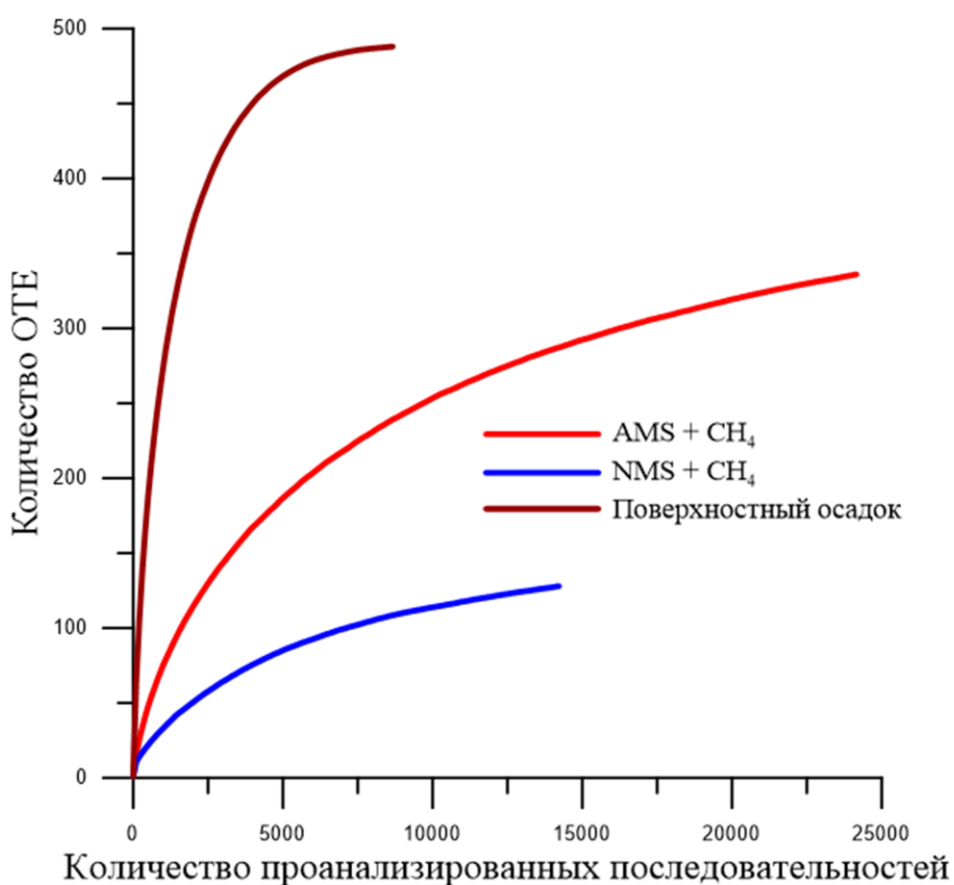


Рисунок 18 – Кривые разрежения. Показана зависимость числа флотипов (генетическая дистанция 0.03) от количества полученных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК

В сообществе из нативного слоя осадка значительную долю всех последовательностей генов 16S рРНК составляли представители фило *Proteobacteria* (65.2%) (рис. 19а).

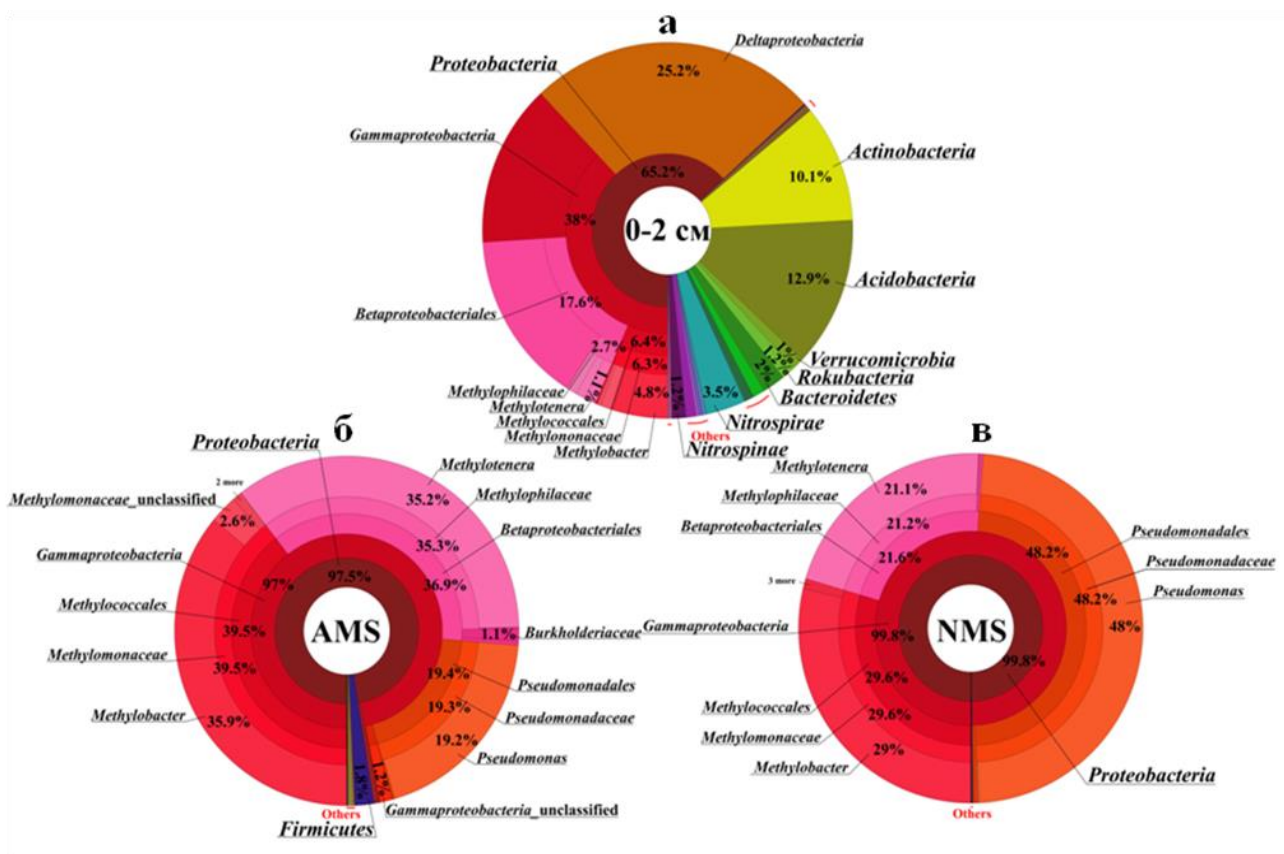


Рисунок 19 – Сравнение таксономического состава бактериальных сообществ нативного поверхностного осадка из района метанового сипа Посольская Банка оз. Байкал (а) и сообществ, полученных при культивировании на средах с аммонийным (б) и нитратным (в) источниками азота. Данные метагеномного анализа фрагментов генов 16S рРНК (SILVA 132)

Большая их часть принадлежала классам *Gamma-* (38%) и *Deltaproteobacteria* (25.2%). Доля представителей порядка *Methylococcales* в осадке составляла 6.4%, из них 4.8% принадлежало представителям рода *Methylobacter*. Представители рода *Methylotenera*, являющиеся облигатными метилотрофами, в исходном образце составляли 1.1%. Нужно отметить, что последовательности представителей класса *Alphaproteobacteria* в данном образце не были обнаружены. Кроме того, в бактериальном сообществе исследуемого осадка были обнаружены представители следующих фил: *Acidobacteria* (12.9%), *Actinobacteria* (10.1%), *Nitrospirae* (3.5%), *Bacteroidetes* (2%), *Nitrospinae* (1.2%), *Rokubacteria* (1.2%), *Verrucomicrobia* (1%). Менее 5% в сумме составляли филы, представленные в минорных количествах.

В сообществах, культивированных на средах с аммонийным и нитратным источниками азота в атмосфере  $\text{CH}_4$ , фила *Proteobacteria* составляла основную долю последовательностей (97.5 и 99.8%, соответственно) (рис. 18б, в). Все они принадлежали классу *Gamma proteobacteria*.

На среде с аммонийным азотом ( $\text{AMS} + \text{CH}_4$ ) процент представителей порядка *Methylococcales* (последовательности рода *Methylobacter*) был заметно выше (39.5%), чем в накопительной культуре с нитратным азотом ( $\text{NMS} + \text{CH}_4$ ) (29.6%). Также доля последовательностей, относящихся к облигатному метилотрофу рода *Methylothera*, на среде с аммонийным азотом была выше (35.2%), чем на среде с нитратом (21.1%). Кроме того, анализ показал, что в сообществе, полученном на среде с  $\text{NH}_4^+$ , 2.6% последовательностей принадлежало неклассифицированным представителям семейства *Methylomonaceae* и 1.8% – филе *Firmicutes*. Доля представителей порядка *Pseudomonadales* в сообществе, полученном на среде с аммонийным азотом, составляла 48%; на среде с нитратным азотом – 19.4% (рис. 19б, в).

Более богатое и разнообразное метанотрофное сообщество выявлено на среде с аммонийным азотом. Следует отметить, что большинство последовательностей метанооксиляющих бактерий отмечено как на среде с аммонийным, так и с нитратным азотом. В данном исследовании представителей метанотрофов II типа не было обнаружено ни в нативном осадке, ни в экспериментальных культурах. Таким образом, вклад последовательностей метано- и метилотрофных бактерий в сообщество заметно выше при культивировании в атмосфере  $\text{CH}_4$  на среде с аммонийным азотом, чем на среде с нитратом. В результате филогенетического анализа последовательностей метанотрофного сообщества накопительных культур и природного осадка было выявлено 18 ОТЕ. В ходе анализа было установлено, что все они принадлежали порядку *Methylococcales* (рис. 20).

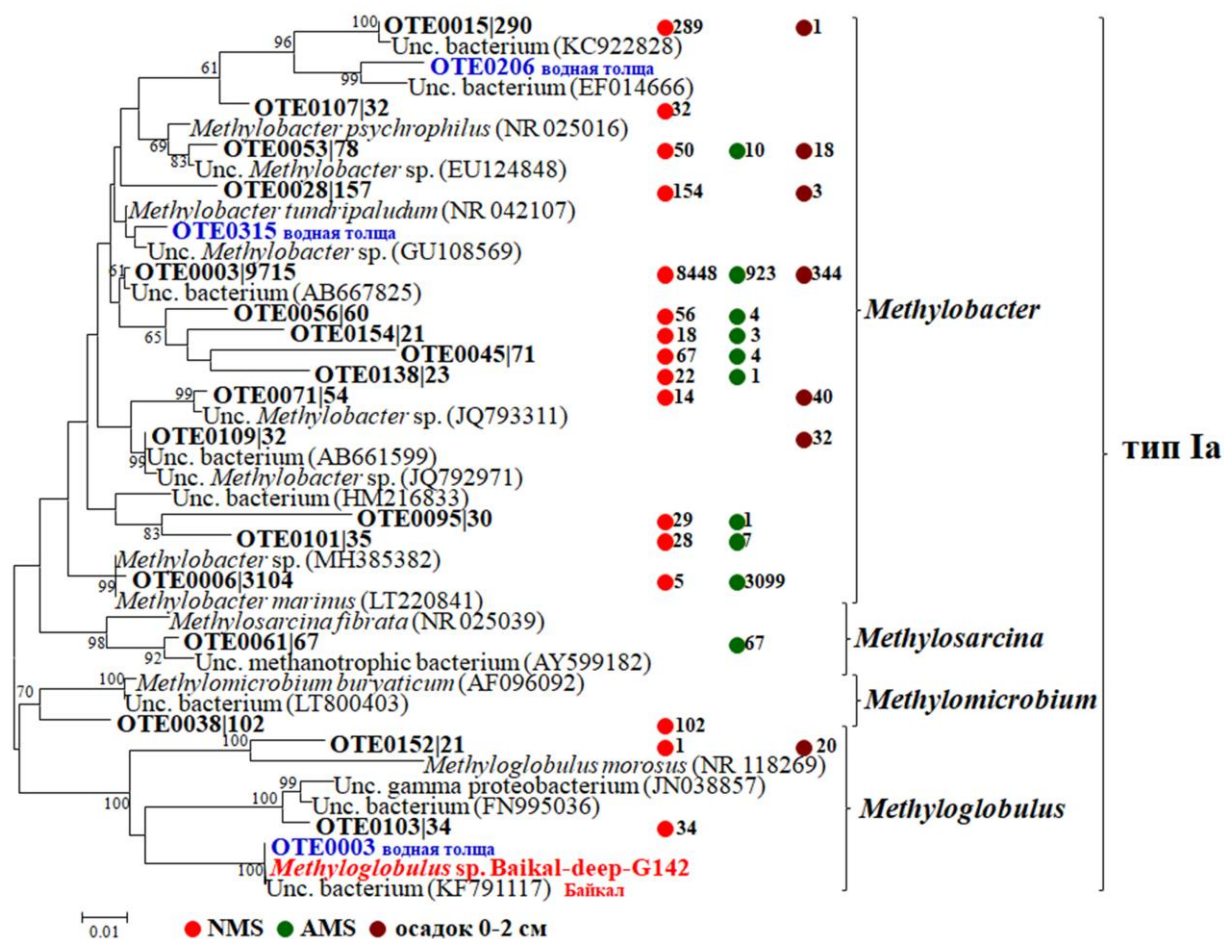


Рисунок 20 – Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей региона V2–V3 фрагментов генов 16S рРНК, полученных из ДНК из поверхностного осадка района VI и водной толщи районов I и II и ДНК накопительных культур метанотрофных бактерий. Используются ОТЕ, содержащие более 20 последовательностей. Применен метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных деревьев)

Последовательности метанотрофов, выявленные в водной толще, в накопительных культурах получены не были. Но на филогенетическом дереве видно, что многочисленная ОТЕ из водной толщи районов разгрузки углеводов образует отдельную кладу с последовательностью *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142, полученной в результате сборки геномов из водной толщи фонового района. Это свидетельствует о том, что данный микроорганизм обитает как в фоновых районах оз. Байкал, так и в местах разгрузки жидких и газообразных углеводов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пресноводные озера являются одними из крупнейших источников  $\text{CH}_4$ . Из всего разнообразия микроорганизмов в аэробных условиях лишь метанотрофные бактерии способны использовать  $\text{CH}_4$  в качестве единственного источника углерода и энергии. Исследования метанотрофных сообществ в пресноводных водоемах, включая оз. Байкал, проводили в основном в донных осадках, поэтому изучение МОБ в водной толще весьма актуально, особенно в период климатических изменений.

Методами эпифлуоресцентной микроскопии, а так же классической и молекулярной биологии проведено исследование пространственного распределения и таксономического разнообразия метанотрофов, населяющих водную толщу фонового района и районов разгрузки нефтяных и газообразных углеводородов озера Байкал в различные гидрологические сезоны. Определены концентрации  $\text{CH}_4$  и скорости его окисления.

В водной толще районов разгрузки углеводородов наибольшие концентрации  $\text{CH}_4$  (до 1 мкл/л) зарегистрированы в придонной области, что является следствием его поступления из донных осадков. Повышенные концентрации  $\text{CH}_4$  в поверхностных слоях водной толщи, скорее всего, обусловлены существованием «метанового парадокса», который можно объяснить наличием большого количества цианобактерий, продуцирующих  $\text{CH}_4$  в кислородных условиях за счет преобразования фиксированного неорганического углерода непосредственно в  $\text{CH}_4$  (Vižić-Ionescu et al., 2019). Кроме того, появление пиков метана ниже фотического слоя может быть обусловлено активной жизнедеятельностью макрогектопуса, а также следствием поднятия и растворения в водной толще кристаллов гидратов метана. Согласно нашим прямым измерениям с использованием  $^{14}\text{C}$ - $\text{CH}_4$ , наиболее активное метаноокисление выявлено в глубоководной зоне (от 0.007 до 0.79 нл/(л сут)). Наибольшие интенсивности окисления метана, наблюдаемые в поверхностных и придонных водах Байкала, превышают расчетные данные Н.

Г. Гранина с соавт. (2013). По данным коллег, скорость окисления  $\text{CH}_4$  в Южном Байкале варьировала от 0.004 до 0.021 нл/(л сут), а в Среднем – от 0.003 до 0.019 нл/(л сут). На наш взгляд, это легко объяснимо, поскольку прямые измерения скорости МО отражают процесс в реальном времени, в то время как, основываясь на концентрационном распределении  $\text{CH}_4$  и данных усредненных профилей тритиево-гелевого возраста водных масс, можно получить только средние значения скоростей метаноокисления и наиболее общие закономерности изменения скоростей МО по профилю глубин.

Анализ полученных данных показал, что концентрации  $\text{CH}_4$  и скорости его окисления в водной толще оз. Байкал значительно ниже (на 3 и более порядков), чем в меромиктических озерах с различным трофическим статусом и температурным режимом. В водной толще перемешиваемых озер, таких как Констанц, Вашингтон, Штехлин, Экольн и Рамсен концентрации  $\text{CH}_4$  и МО выше, чем в оз. Байкал, на 1–2 порядка.

В водной толще исследуемых районов оз. Байкал, различающихся экологическими условиями, выявлены метанотрофные бактерии как I, так II типов. Их распределение не всегда коррелировало с концентрацией  $\text{CH}_4$  и интенсивностью его окисления. Вклад метанотрофных бактерий ( $\leq 2.9\%$ ), определенный методом флуоресцентной *in situ* гибридизации, в общий бактериопланктон озера Байкал сопоставим с отмечаемым в оз. Киву, оз. Констанц и оз. Ротзее, но ниже, чем в оз. Танганьика и оз. Цуг. Возможно, низкая численность метанотрофов обусловлена недостатками метода FISH, т.к. используемые зонды, хотя и были разработаны для детекции метанотрофных бактерий в холодноводных экосистемах, могли не связаться с ДНК всех метанотрофов. Видимо, этим можно объяснить и отсутствие МОБ в придонных горизонтах, где отмечены повышенные концентрации  $\text{CH}_4$  и скорости его окисления.

В районах разгрузки жидких и газообразных углеводородов оз. Байкал в период различных гидрологических сезонов выявлено, что на структуру сообществ оказывает влияние глубина водной толщи. Анализ библиотек генов

16S рРНК и *pmoA* показал умеренное биологическое разнообразие метанотрофов, но высокую долю в сообществах из слоев водной толщи с высокими концентрациями  $\text{CH}_4$ . Основным компонентом метаноокисляющих сообществ водной толщи оз. Байкал – метанотрофные бактерии I типа, не имеющие культивируемых гомологов. Очевидно, что в глубоком холодноводном озере Байкал, как и в других пресноводных водоемах, метанотрофы играют важную роль в круговороте углерода, окисляя  $\text{CH}_4$ .

Метагеномный анализ геномов позволил показать эндемизм байкальских метаноокисляющих бактерий. Были получены геномы трех метаноокисляющих бактерий I типа, глубокий анализ которых позволит выявить их метаболический потенциал и подобрать оптимальные условия культивирования для получения чистых культур.

Таким образом, результаты исследования расширили знания о филогенетическом разнообразии и метаноокисляющей активности аэробных метанотрофных бактерий в водной толще оз. Байкал, а также выявили способность новых микроорганизмов участвовать в биогеохимических циклах азота и серы.

## ВЫВОДЫ

1. В придонной области водной толщи районов с различными экологическими условиями отмечено влияние глубины, температуры и типа разгружающегося углеводорода на филогенетический состав микробных сообществ (по данным анализа библиотек генов 16S рРНК). В районе нефте-метанового сипа доминировали (до 60%) представители семейства *Sphingomonadales* (*Alphaproteobacteria*), ближайшие гомологи которых являются деструкторами полициклических ароматических углеводородов. В районе грязевого вулкана доминировали метаноокисляющие бактерии I типа (до 63.7%) семейства *Methylococcaceae*.

2. В поверхностных и глубинных слоях водной толщи районов разгрузки углеводородов таксономический состав метаноокисляющих бактерий различался, по данным анализа библиотек функциональных генов, ответственных за разные стадии окисления  $\text{CH}_4$ . Ген *pmoA*, кодирующий мембранную метанмонооксигеназу, выявлен у метанотрофов II типа в сообществах нефте-метанового сипа (до глубины 300 м), а метанотрофы I типа отмечены в глубинных слоях водной толщи грязевого вулкана. Ген *mxaF*, кодирующий метанолдегидрогеназу, выявлен только у представителей рода *Methylobacterium* во всех сообществах.

3. Вклад метанотрофных бактерий в общий бактериопланктон озера Байкал в районах с различным гидрологическим режимом не превышал 3% от ОЧМ (при использовании метода FISH), что сопоставимо с отмечаемым в озерах Киву, Констанц и Ротзее.

4. В придонных слоях водной толщи районов разгрузки углеводородов оз. Байкал отмечены наиболее высокие скорости метаноокисления (до  $7.87 \times 10^{-1}$  нл/(л сут)) при максимальных концентрациях метана. Повышенное содержание метана в поверхностных слоях водной толщи может свидетельствовать о

наличии в Байкале явления «метанового парадокса», отмечаемого во многих водоемах.

5. Из глубинных слоев водной толщи фонового района оз. Байкал на основе глубокого метагеномного анализа образцов ДНК аннотировано три генома метанотрофных бактерий, содержащих гены, обеспечивающие участие в циклах метана и азота. Геном байкальского представителя *Methyloglobulus* sp. отличается от известного *Methyloglobulus morosus*, что может свидетельствовать об эндемичности данного микроорганизма.

6. При экспериментальном культивировании природного микробного сообщества при низких температурах в атмосфере метана показана способность культур использовать различные источники азота, с более активным развитием метанотрофных бактерий на среде с аммонийным азотом.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

г/в – грязевой вулкан;

ГГ – газовые гидраты;

ДАФИ – 4,6-диамино-2-фенилиндол

МДГ – метанолдегидрогеназа;

мММО – мембранная метанмонооксигеназа;

ММО – метанмонооксигеназа;

МО – метаноокисление;

МОБ – метаноокисляющие бактерии;

Н-м/с – метановый сип;

оз. – озеро

ОТЕ – операционная таксономическая единица;

ОЧМ – общая численность микроорганизмов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

рММО – растворимая метанмонооксигеназа;

РМФ – рибулозомонофосфатный путь;

ФДГ – формиатдегидрогеназа;

СН<sub>4</sub> – метан.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Атлас Байкала; под ред. Г. И. Галазия. – Омск: Роскартография, 1993. – 160 с.
2. Бекман М. Ю. Распределение и продукция макрогектопуса / М. Ю. Бекман, Э. Л. Афанасьева // Биологическая продуктивность пелагиали и ее изменчивость. – Новосибирск: Наука, 1977. – С. 76–98.
3. Белькова Н. Л. Характеристика биоразнообразия микробного сообщества водной толщи озера Байкал / Н. Л. Белькова [и др.] // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 2. – С. 239–249.
4. Блинов В. В. Сегонные изменения вертикальной структуры водной толщи пелагиали Южного Байкала / В. В. Блинов [и др.] // Водные ресурсы. – Т. 44, № 3. – С. 285–295.
5. Большаков А. М. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях / А. М. Большаков, А. В. Егоров // Океанология. – 1987. – Т. 27, № 5. – С. 861–862.
6. Воробьев А. В. Использование накопительных культур для оценки структуры сообществ метанотрофов в торфяной почве: проблема репрезентативности результатов / А. В. Воробьев, С. Н. Дедыш // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 4. – С. 566–569.
7. Гайнутдинова Е. А. Аэробные метанотрофные сообщества донных осадков озера Байкал / Е. А. Гайнутдинова [и др.] // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 4. – С. 562–571.
8. Гайнутдинова Е. А. Бактериальное окисление метана в озере Байкал: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Е. А. Гайнутдинова; У.-У., 2005. – 24 с.
9. Гальченко В. Ф. Метанотрофные бактерии / В. Ф. Гальченко. – Москва: ГЕОС, 2001. – 500 с.
10. Гальченко В. Ф. Сульфатредукция, метанобразование и метаноокисление в различных водоемах оазиса Бангер Хилл, Антарктида / В. Ф. Гальченко // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 4. – С. 388–396.
11. Голубев В. А. Геотермический прогноз запасов газогидратов в донных

- осадках Байкала / В. А. Голубев // Матер. Всеросс. науч. конф. «Геология и нефтегазаность западносибирского мегабассейна» [Тюмень, 14-17 ноября 2000 г.]. – С. 14–17.
12. Горшков А. Г. Современный уровень нефтепродуктов в воде озера Байкал и его притоков / А. Г. Горшков [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – № 18. – С. 711–718.
  13. Гранин Н. Г. Изменение концентрации метана в озере Байкал: возможная причина // Н. Г. Гранин [и др.] // Матер. конф. «Газовые гидраты в экосистеме Земли'2014» [Новосибирск, 7–10 апреля 2014 г.]. – Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2014. – С. 25.
  14. Гранин Н. Г. Окисление метана в водной толще озера Байкал / Н. Г. Гранин [и др.] // ДАН. – 2013. – Т. 451, № 3. – С. 332–335.
  15. Дагурова О. П. Геохимическая деятельность метанотрофных бактерий в озере Байкал / О. П. Дагурова [и др.] // Матер. конф. «Микроорганизмы и биосфера» [Москва, 19–20 ноября 2007 г.]. – М.: МАКС Пресс, 2007. – С. 39–40.
  16. Денисова Л. Я. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК / Л. Я. Денисова [и др.] // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 4. – С. 547–556.
  17. Дзюбан А. Н. Деструкция органического вещества и цикл метана в донных отложениях внутренних водоемов / А. Н. Дзюбан; под ред. А. И. Копылова. – Ярославль: Принтхаус, 2010. 192 с.
  18. Егоров А. В. Наблюдения за образованием и разложением газовых гидратов с борта глубоководного обитаемого аппарата «МИР» / А. В. Егоров, Р. И. Нигматулин, А. Н. Рожков // Матер. конф. «Газовые гидраты в экосистеме Земли'2014» [Новосибирск, 7–10 апреля 2014 г.]. – Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2014. – С. 27.
  19. Егоров А. В. Основные закономерности распределения метана в воде и осадках озера Байкал / А. В. Егоров, Т. И. Земская, М. А. Грачев // Геология морей и океанов: тезисы докладов XV Международной школы

- морской геологии. – М.: ГЕОС, 2003. – Т. 2. – С. 169–170.
20. Земская Т. И. Комплексные исследования проявлений газовых гидратов в осадках озера Байкал / Т. И. Земская [и др.] // Изменение окружающей среды и климата. Т. 4. Процессы в биосфере: изменения почвенно-растительного покрова и территориальных вод РФ, круговорот веществ под влиянием глобальных изменений климата и катастрофических процессов; под ред. Г. А. Заварзина, В. Н. Кудеярова. – М.: ИФХ и БПП РАН, 2008. – С. 125–152.
  21. Калмычков Г. В. Генетические типы метана озера Байкал / Г. В. Калмычков [и др.] // ДАН. – 2006. – Т. 411. – № 5. – С. 672–675.
  22. Калюжная О. В. Влияние обесцвечивания байкальской губки на таксономический состав симбиотических микроорганизмов / О. В. Калюжная, В. Б. Ицкович // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 11. – С. 1335–1340.
  23. Квасников Е. И. Методы выделения и некоторые особенности биологии микроорганизмов, окисляющих газообразные углеводороды / Е. И. Квасников, Ю. Р. Малашенко, В. А. Романенко // Микробиология. – 1969. – Т. 38, № 6. – С. 968–974.
  24. Клеркс Я. Гидраты метана в поверхностном слое глубоководных осадков озера Байкал / Я. Клеркс [и др.] // ДАН. – 2003. – Т. 393, № 6. – С. 822–826.
  25. Кузьмин М. И. Первая находка газогидратов в осадочной толще озера Байкал / М. И. Кузьмин [и др.] // ДАН. – 1998. – Т. 362, № 4. – С. 541–543.
  26. Намсараев Б. Б. Бактериальное окисление метана в озере Байкал / Б. Б. Намсараев [и др.] // Труды института микробиологии им. С. Н. Виноградского. – 2006. – Т. XIII. – С. 113–146.
  27. Намсараев Б. Б. Бактериальные сообщества донных осадков в районе гидротермального источника бухты Фролиха / Б. Б. Намсараев [и др.] // Геология и геофизика. – 2002. – Т. 43, № 7. – С. 644–647.
  28. Намсараев Б. Б. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал / Б. Б. Намсараев, Т. И. Земская; под ред. В. М. Горленко. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, Филиал 'ГЕО', 2000. – 160 с.

29. Мизандронцев И. Б. Вертикальное распределение метана в водной толще Байкала / И. Б. Мизандронцев [и др.] // Водные ресурсы. – 2020. – Т. 47, № 1. – С. 78–85.
30. Михайлов И. С. Об однородности таксономического состава бактериальных сообществ фотического слоя трех котловин озера Байкал, различающихся по составу и обилию весеннего фитопланктона / И. С. Михайлов [и др.] // ДАН. – 2015. – Т. 465, № 5. – С. 620–626.
31. Максимова Э. А. Микробиология вод Байкала / Э. А. Максимова, В. Н. Максимов. – Иркутск: Изд-во Иркут. Гос. ун-та, 1989. – 168 с.
32. Обжиров А. И. Распределение метана в воде озера Байкал / А. И. Обжиров [и др.] // Матер. Четвертой Верещагинской Байкальской конф. [Иркутск, 26 сентября – 1 октября 2005 г.]. – Иркутск: Изд-во Ин-та геогр. СО РАН, 2005. – С. 141–142.
33. Парфенова В. В. О вертикальном распределении микроорганизмов в озере Байкал в период весеннего обновления глубинных вод / В. В. Парфенова [и др.] // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 433–440.
34. Парфенова В. В. Сравнительный анализ биоразнообразия бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал / В. В. Парфенова, А. С. Гладких, О. И. Белых // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 1. – С. 94–105.
35. Пестунов Д. А. Пространственное распределение направления потоков  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$  по акватории озера Байкал (кругобайкальская экспедиция, июнь 2013г / Д. А. Пестунов [и др.] // Оптика атмосферы и океана. – 2015. – Т. 28, № 9. – С. 792–799.
36. Пименов Н. В. Образование и окисление метана в меромиктическом озере Гек-Гель (Азербайджан) / Н. В. Пименов [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 2. – С. 270–276.
37. Троценко Ю. А. Эстремофильные метанотрофы / Ю. А. Троценко, В. Н. Хмеленина; под ред. В. Ф. Гальченко. – Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. – 206 с.
38. Хлыстов О. М. Нефть в озере мирового наследия / О. М. Хлыстов [и др.] //

- ДАН. – 2007. – Т. 414, № 5. – С. 656–659.
39. Хлыстов О. М. Опыт картирования кровли приповерхностных газовых гидратов озера Байкал и извлечение газа из них / О. М. Хлыстов [и др.] // Геология и геофизика. – 2014. – Т. 55, № 9. – С. 1415–1425.
  40. Хлыстов О. М. Прогнозная оценка запасов метана в газовых гидратах озера Байкал / О. М. Хлыстов [и др.] // Сборник избр. трудов науч.-технич. конф. «Геология, поиски и разведка полезных ископаемых и методы геологических исследований», Вып. 2. – Иркутск: ИГТУ, 2002. – С. 71–79.
  41. Хмеленина В. Н. Особенности метаболизма облигатных метанотрофов / В. Н. Хмеленина, Ю. А. Троценко // Труды Института микробиологии им. С. Н. Виноградского. – 2006. – Т. 13. – С. 24–44.
  42. Шимараев М. Н. Процессы обмена и распределение микроорганизмов в глубинной зоне озера Байкал / М. Н. Шимараев [и др.] // ДАН. – 2000. – Т. 372, № 1. – С. 138–141.
  43. Шубенкова О. В. Биоразнообразие микробного сообщества районов залегания газовых гидратов и бухты Фролиха озера Байкал: дисс. ... канд. биол. наук / О. В. Шубенкова; ИГУ. – Иркутск, 2006. – 127 с.
  44. Шубенкова О. В. Динамика процессов цикла метана в осадках озера Байкал / О. В. Шубенкова [и др.] // Матер. 3-го Байкальского Микробиол. симпозиума с межд. уч. BSM-2011. [Иркутск, 3–8 октября 2011 г.]. – Иркутск: Изд-во Ин-та геогр. им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2011. – С. 162–163.
  45. Шубенкова О. В. Метанотрофные бактерии озера Байкал в районах залегания газовых гидратов / О. В. Шубенкова [и др.] // Матер. 2-го Байкальского Микробиол. Симпозиума с межд. уч. «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ». [Иркутск, 10–15 сентября 2007 г.]. – Иркутск: Изд-во Ин-та геогр. СО РАН, 2007. – С. 255–256.
  46. Шубенкова О. В. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана / О. В. Шубенкова [и др.] // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 370–377.

47. Abdallah R. Z. Aerobic methanotrophic communities at the Red Sea brine-seawater interface / R. Z. Abdallah [et al.] // *Front. microbiol.* –2014. – V. 5. – Art. № 487.
48. Akberdin I. R. Methane utilization in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z<sup>R</sup>: a systems approach / I. R. Akberdin [et al.] // *Sci. Rep.* –2018 – V. 8, № 1. – P. 2512.
49. Altschul S. F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* –1990. – 215. – P. 403–410.
50. Altschul S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – P. 3389–3402.
51. Amann R. I. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations / R. I. Amann [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56, № 6. – P. 1919–1925.
52. Amann R. I. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation / R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer // *Microbiol. Rev.* – 1995. – V. 59, № 1. – P. 143–169.
53. Amaral J. A. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients / J. A. Amaral, R. Knowles // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – V. 126. – P. 215–220.
54. Amodeo C. Environmental factors influencing landfill gas biofiltration: Lab scale study on methanotrophic bacteria growth / C. Amodeo [et al.] // *J. Environ. Sci. Health A.* – 2018. – V. 53, № 9. – P. 825–831.
55. Anantharaman K. Metagenomic resolution of microbial functions in deep-sea hydrothermal plumes across the Eastern Lau Spreading Center / K. Anantharaman, J. A. Breier, G. J. Dick // *ISME J.* – 2016. – V. 10, № 1. – P. 225–239.
56. Anthony C. *The Biochemistry of Methylotrophs* / C. Anthony // New York: Academic Press Inc, 1982. – XV + 431 pp.
57. Anthony C. *The biochemistry of methanol dehydrogenase* / C. Anthony, S. L. Dales // *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds*; eds M. E. Lidstrom, F. R. Tabita. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. – P. 213–219.
58. Auman A. J. Analysis of sMMO-containing type I methanotrophs in Lake

- Washington sediment / A. J. Auman, M. E. Lidstrom // *Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 4, – № 9. – P. 517–524.
59. Auman A. J. Molecular characterisation of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment / A. J. Auman [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 5259–5266.
60. Baani M. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2 / M. Baani, W. Liesack // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – V. 105. – P. 10203–10208.
61. Bastviken D. Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH<sub>4</sub> emissions / D. Bastviken [et al.] // *J. Geophys. Res.* – 2008. – V. 113, №. G2. – Art. № G02024.
62. Bastviken D. Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink / D. Bastviken [et al.] // *Science.* – 2011. – V. 331. – P. 50.
63. Bastviken D. Measurement of methane oxidation in lakes: a comparison of methods / D. Bastviken, J. Ejlertsson, L. Tranvik // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – V. 36. – P. 3354–3361.
64. Bastviken D. Methane emissions from lakes: dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate / D. Bastviken [et al.] // *Glob. Biogeochem. Cycles.* – 2004. – V. 18, № 4. – P. 1–12.
65. Beaulieu J. J. Eutrophication will increase methane emissions from lakes and impoundments during the 21st century / J. J. Beaulieu, T. DelSontro, J. A. Downing // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10, № 1. – Art. № 1375.
66. Beck D. A. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae* / D. A. Beck [et al.] // *PeerJ.* – 2013. – V. 1. – Art. № e23.
67. Belykh O. I. Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: abundance, dynamics, and distribution / O. I. Belykh, E. G. Sorokovikova // *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* – 2003. – V. 6. – P. 251–261.
68. Belykh O. I. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: composition, abundance and structure / O. I. Belykh [et al.] // *Hydrobiologia.* – 2006. – V. 568. – P. 9–17.

69. Belykh O. I. Picoplankton *Cyanoprokaryota* of genera *Synechococcus* Nageli and *Cyanobium* Rippka et Cohen-baz. from Lake Baikal / O. I. Belykh [et al.] // International Journal on Algae. – 2011. – V. 13, № 2. – P. 149–163.
70. Bessette S. Relative abundance and diversity of bacterial methanotrophs at the oxic–anoxic interface of the Congo deep-sea fan / S. Bessette [et al.] // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – Art. № 715.
71. Bergmann G. T. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities / G. T. Bergmann [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 2011. – V. 43, № 7. – P. 1450–1455.
72. Biderre-Petit C. Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake / C. Biderre-Petit [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2011. – V. 77, № 3. – P. 533–545.
73. Bižić-Ionescu M. Widespread methane formation by *Cyanobacteria* in aquatic and terrestrial ecosystems / M. Bižić-Ionescu [et al.] // bioRxiv. – 2019. – Art. № 398958.
74. Blees J. Spatial variations in surface water methane super-saturation and emission in Lake Lugano, southern Switzerland / J. Blees [et al.] // Aquat. Sci. – 2015. – V. 77. – P. 535–545.
75. Bodelier P. L. E. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments / P. L. E. Bodelier, H. J. Laanbroek // FEMS Microbiol. Ecol. – 2004. – V. 47. – P. 265–277.
76. Boden R. Complete genome sequence of the aerobic marine methanotroph *Methylomonas methanica* MC09 / R. Boden [et al.] // J. Bacteriol. – 2011. – V. 193, № 24. – P. 7001–7002.
77. Bogard M. J. Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH<sub>4</sub> fluxes / M. J. Bogard [et al.] // Nat. Commun. – 2014. – V. 5. – Art. № 5350.
78. Borges A. V. Diffusive methane emissions to the atmosphere from Lake Kivu (Eastern Africa) / A. V. Borges [et al.] // J. Geophys. Res. – 2011. – V. 116. – Art. № G03032.
79. Börjesson G. Microbial oxidation of CH<sub>4</sub> at different temperatures in landfill cover soils / G. Börjesson, I. Sundh, B. Svensson // FEMS Microbiol. Ecol. –

2004. – V. 48. – P. 305–312.
80. Bornemann M. Methane release from sediment seeps to the atmosphere is counteracted by highly active *Methylococcaceae* in the water column of deep oligotrophic Lake Constance / M. Bornemann [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2016. – V. 92, № 8. – Art. № fiw123.
81. Borowski W. S. A review of methane and gas hydrates in the dynamic, stratified system of the Blake Ridge region, offshore southeastern North America / W. S. Borowski // Chem. Geol. – 2004. – V. 205. – P. 311–346.
82. Borrel G. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems / G. Borrel [et al.] // Res. Microbiol. – 2011. – V. 162, № 9. – P. 832–847.
83. Bowman J. P. *Methylococcales* / J. P. Bowman // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria; eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. De Vos, B. Hedlund, S. Dedysh. – Hoboken: John Wiley & Sons, 2019. – P. 1–4.
84. Bowman J. P. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes / J. P. Bowman, S. A. McCammon, J. H. Skerratt // Microbiology. – 1997. – V. 143. – P. 1451–1459.
85. Bowman J. P. The methanotrophs – the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae* / J. P. Bowman // The prokaryotes; eds M. Dworkin [et al.]. – New York: Springer, 2006. – V. 5. – P. 266–289.
86. Bowman J. P. The phylogenetic position of the *Methylococcaceae* / J. P. Bowman, L. I. Sly, E. Stackebrandt // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – V. 45. – P. 182–185.
87. Brankovits D. Methane- and dissolved organic carbon-fueled microbial loop supports a tropical subterranean estuary ecosystem / D. Brankovits [et al.] // Nat Commun. – 2017. – V. 8. – Art. № 1835.
88. Bussmann I. Cultivation of methanotrophic bacteria in opposing gradients of methane and oxygen / I. Bussmann, M. Rahalkar, B. Schink // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V. 56, № 3. – P. 331–344.
89. Bussmann I. Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from

- littoral sediments (Lake Constance) / I. Bussmann [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2004. – V. 47. – P. 179–189.
90. Cabello-Yeves P. J. Reconstruction of diverse verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs / P. J. Cabello-Yeves [et al.] // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – Art. № 2131.
91. Cai Y. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils / Y. Cai [et al.] // Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – Art. № 11728.
92. Cantera S. Novel haloalkaliphilic methanotrophic bacteria: An attempt for enhancing methane bio-refinery / S. Cantera [et al.] // J. Environ. Manage. – 2019. – V. 231. – P. 1091–1099.
93. Cardman Z. *Verrucomicrobia* are candidates for polysaccharide-degrading bacterioplankton in an arctic fjord of Svalbard / Z. Cardman [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – P. 3749–3756.
94. Carini P. Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria / P. Carini [et al.] // Nat. Comm. – 2014. – V. 5. – Art. № 4346.
95. Carini S. Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Mono Lake, California (USA) / S. Carini [et al.] // Environ. Microbiol. – 2005. – T. 7, № 8. – P. 1127–1138.
96. Chaudhary D. K. *Sphingomonas naphtha* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil / D. K. Chaudhary, J. Kim // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2016. – V. 66. – P. 4621–4627.
97. Chen Y. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stableisotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands / Y. Chen [et al.] // Environ. Microbiol. – 2008. – V. 10. – P. 2609–2622.
98. Chistoserdova L. Aerobic Methylophilic Prokaryotes / L. Chistoserdova, M. E. Lidstrom // The Prokaryotes; eds. E. Rosenberg [et al.]. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. – P. 267–285.
99. Chistoserdova L. Methylophilicity in a lake: from metagenomics to single

- organism physiology / L. Chistoserdova // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – P. 4705–4711.
100. Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited / L. Chistoserdova // Environ. Microbiol. – 2011a. – V. 13. – P. 2603–2622.
101. Chu F. *XoxF* acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* / F. Chu, M. E. Lidstrom // J. Bacteriol. – 2016. – V. 198, № 8. – P. 1317–1325.
102. Clilverd H. Chemical and physical controls on the oxygen regime of ice-covered arctic lakes and reservoirs / H. Clilverd, D. White, M. Lilly // J. Am. Water Resources Ass. – 2009. – V. 45. – P. 500–511.
103. Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments / R. Conrad // FEMS Microbiol. Ecol. – 1999. – V. 28. – P. 193–202.
104. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved / R. Conrad // Environ. Microbiol. Rep. – 2009. – V. 1. – P. 285–292.
105. Corder R. E. Biological production of methanol from methane / R. E. Corder [et al.] // Abs. Pap. Am. Chem. Soc. – 1986. – V. 196. – P. 231–234.
106. Costello A. M. Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment / A. M. Costello [et al.] // Environ. Microbiol. – 2002. – V. 4. – P. 443–450.
107. Costello A. M. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments / A. M. Costello, M. E. Lidstrom // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 5066–5074.
108. Crevecoeur S. Diversity and potential activity of methanotrophs in high methane-emitting permafrost thaw ponds / S. Crevecoeur [et al.] // PLoS One. – 2017. – V. 12. – Art. № e0188223.
109. Crowe S. The methane cycle in ferruginous Lake Matano / S. Crowe [et al.] // Geobiology. – 2011. – V. 9. – P. 61–78.
110. Damm E. Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the

- central Arctic Ocean / E. Damm [et al.] // *Biogeosciences*. – 2010. – V. 7. – P. 1099–1108.
111. Davidson T. A. Synergy between nutrients and warming enhances methane ebullition from experimental lakes / T. A. Davidson [et al.] // *Nature Clim. Change*. – 2018. – V. 8. – P. 156–160.
112. Dean J. F. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world / J. F. Dean [et al.] // *Rev. Geophys.* – 2018. – V. 56. – P. 207–250.
113. Dedysh S. N. Cultivation of methanotrophs / S. N. Dedysh, P. F. Dunfield // *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols. Springer protocols handbooks*; eds T. McGenity, K. Timmis, B. Nogales. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. – P. 231–247.
114. Dedysh S. N. Detection and enumeration of methanotrophs in acidic *Sphagnum* peat by 16S rRNA fluorescence *in situ* hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris* / S. N. Dedysh, M. Derakshani, W. Liesack // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 4850–4857.
115. Dedysh S. N. Draft genome sequence of *Methyloferula stellata* AR4, an obligate methanotroph possessing only a soluble methane monooxygenase / S. N. Dedysh [et al.] // *Genome Announc.* – 2015. – V. 3, № 2. – Art. № e01555-14.
116. Dedysh S. N. Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: molecular and cultivation-based studies / S. N. Dedysh // *Microbiology*. – 2009. – V. 78. – P. 655–669.
117. Dedysh S. N. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands / S. N. Dedysh [et al.] // *Science*. – 1998. – V. 282. – P. 281–284.
118. Dedysh S. N. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from *Sphagnum* bog / S. N. Dedysh [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 251–261.
119. Dedysh S. N. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel

- subtype of serine-pathway methanotrophs / S. N. Dedysh [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – V. 50. – P. 955–969.
120. Dedysh S. N. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic / S. N. Dedysh, C. Knief, P. F. Dunfield // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187. – P. 4665–4670.
121. Denfeld B. A. Constraints on methane oxidation in ice-covered boreal lakes / B. A. Denfeld [et al.] // *J. Geophys. Res. Biogeosci.* – 2016. – V. 121. – P. 1924–1933.
122. Deng Y. Aerobic methanotroph diversity in Riganqiao peatlands on the Qinghai-Tibetan Plateau / Y. Deng [et al.] // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2013. – V. 5. – P. 566–574.
123. Deutzmann J. S. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake / J. S. Deutzmann, B. Schink // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77, № 13. – P. 4429–4436.
124. Deutzmann J. S. Characterization and phylogeny of a novel methanotroph, *Methyloglobulus morosus* gen. nov., spec. nov. / J. S. Deutzmann, M. Hoppert, B. Schink // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2014. – V. 37. – P. 165–169.
125. Dlugokencky E. Observational constraints on recent increases in the atmospheric CH<sub>4</sub> burden / E. Dlugokencky [et al.] // *Geophys. Res. Lett.* – 2009. – V. 36. – Art. № L18803.
126. Dlugokencky E. Trends in atmospheric methane. Available at NOAA/ESRL ([www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends\\_ch4/](http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends_ch4/)). 2019.
127. Downing J. The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments / J. Downing [et al.] // *Limnol. Oceanogr.* – 2006. – V. 51. – P. 2388–2397.
128. Dubinsky E. A. Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico / E. A. Dubinsky [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2013. – V. 47. – P. 10860–10867.
129. Dumont M. G. Classification of *pmoA* amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN / M. G. Dumont [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2014. – V. 5. – Art. № 34.
130. Dumont M. G. Community-level analysis: key genes of aerobic methane

- oxidation / M. G. Dumont, J. C. Murrell // *Methods Enzymol.* – 2005. – V. 397. – P. 413–427.
131. Dumont M. G. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment / M. G. Dumont [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 13, № 5. – P. 1153–1167.
132. Dumont M. G. Using stable isotope probing to obtain a targeted metatranscriptome of aerobic methanotrophs in lake sediment / M. G. Dumont, B. Pommerenke, P. Casper // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2013. – V. 5, № 5. – P. 757–764.
133. Dunfield P. F. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph / P. F. Dunfield [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 1009–1014.
134. Dunfield P. F. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia* / P. F. Dunfield [et al.] // *Nature.* – 2007. – V. 450. – P. 879–882.
135. Dunfield P. F. *Methylocella silvestris* sp nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol / P. F. Dunfield [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53. – P. 1231–1239.
136. Durisch-Kaiser E. What prevents outgassing of methane to the atmosphere in Lake Tanganyika? / E. Durisch-Kaiser [et al.] // *J. Geophys. Res.* – 2011. – V. 116. – Art. № G02022.
137. Edwards C. R. Draft genome sequence of uncultured upland soil cluster *Gammaproteobacteria* gives molecular insights into high-affinity methanotrophy / C. R. Edwards [et al.] // *Genome Announc.* – 2017. – V. 5, № 17. – Art. № e00047-17.
138. Eller G. Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plußsee / G. Eller, L. Känel, M. Krüger // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, № 12. – P. 8925–8928.
139. Eller G. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridization / G. Eller, S. Stubner, P. Frenzel // *FEMS Microbiol. Letters.* – 2001. – V. 198. – P. 91–97.

140. Eller G. Methane cycling in lake sediments and its influence on chironomid larval partial derivative  $\delta^{13}\text{C}$  / G. Eller [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005a. – V. 54. – P. 339–350.
141. Emilson E. J. S. Climate-driven shifts in sediment chemistry enhance methane production in northern lakes / E. J. S. Emilson [et al.] // Nat. Commun. – 2018. – V. 9. – Art. № 1801.
142. Erikstad H. A. Draft genome sequence of “*Candidatus* Methylacidiphilum kamchatkense” strain Kam1, a thermoacidophilic methanotrophic verrucomicrobium / H. A. Erikstad, N. K. Birkeland // Genome Announc. – 2015. – V. 3, № 2. – Art. № e00065–15.
143. Ettwig K. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria / K. Ettwig [et al.] // Nature. – 2010. – V. 464. – P. 543–548.
144. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – V. 39. – P. 783–791.
145. Fernández J. E. On the methane paradox: Transport from shallow water zones rather than in situ methanogenesis is the major source of  $\text{CH}_4$  in the open surface water of lakes / J. E. Fernández, F. Peeters, H. Hofmann // J. Geophys. Res. Biogeosci. – 2016. – V. 121. – P. 2717–2726.
146. Flynn J. D. Draft genome sequences of gammaproteobacterial methanotrophs isolated from marine ecosystems / J. D. Flynn [et al.] // Genome Announc. – 2016. – V. 4, № 1. – Art. № e01629-15.
147. Forster P. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing / P. Forster [et al.] // Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change; eds. S. Solomon [et al.]. – Cambridge, New York: Cambridge Univ Press, 2007. – P. 130–234.
148. Frankenberg C. Global column averaged methane mixing ratios from 2003 to 2009 as derived from SCIAMACHY: Trends and variability / C. Frankenberg [et al.] // J. Geophys. Res. – 2011. – V. 116. – Art. № D04302.
149. Frenzel P. Oxidation of methane in the oxic surface-layer of a deep lake

- sediment (Lake Constance) / P. Frenzel, B. Thebrath, R. Conrad // FEMS Microbiol. Ecol. – 1990. – V. 73. – P. 149–158.
150. Fu L. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data / L. Fu [et al.] // Bioinformatics. – 2012. – V. 28. – P. 3150–3152.
151. Garrity G. M. A new genomics-driven taxonomy of Bacteria and Archaea: are we there yet? / G. M. Garrity // J. Clin. Microbiol. – 2016. – V. 54. – P. 1956–1963.
152. Gerhardt P. Manual of methods for general bacteriology / P. Gerhardt [et al.] // Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1981. – 524 pp.
153. Ghashghavi M. Survey of methanotrophic diversity in various ecosystems by degenerate methane monooxygenase gene primers / M. Ghashghavi, M. Jetten, C. Lüke // AMB Express. – 2017. – V. 7, № 1. – Art. № 162.
154. Giovannoni S. J. The small genome of an abundant coastal ocean methylotroph / S. J. Giovannoni [et al.] // Environ. Microbiol. – 2008. – V. 10. – P. 1771–1782.
155. Glöeckner F. O. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria / F. O. Glöeckner [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. – 1996. – V 19. – P. 403–406.
156. Graham D. W. Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors / D. W. Graham [et al.] // Microb. Ecol. – 1993. – V. 25. – P. 1–17.
157. Granin N. G. Gas seeps in Lake Baikal-detection, distribution, and implications for water column mixing / N. G. Granin [et al.] // Geo-Mar. Lett. – 2010. – V. 30. – P. 399–409.
158. Granin N.G. Methane hydrate emergence from Lake Baikal: direct observations, modelling, and hydrate footprints in seasonal ice cover / N. G. Granin [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – V. 9. –Art. № 19361. – P. 1–10.
159. Grossart H.-P. Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake / H.-P. Grossart [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2011. – V. 108. – P. 19657–19661.
160. Gupta A. Genome-scale metabolic reconstruction and metabolic versatility of an obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus* str. Bath / A. Gupta [et al.] //

- PeerJ. – 2019. – V. 7. – Art. № e6685.
161. Haft D. H. TIGRFAMs: a protein family resource for the functional identification of proteins / D. H. Haft [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. 41–43.
  162. Haggblom M. M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds / M. M. Haggblom // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 103. – P. 29–72.
  163. Hamilton R. Draft genomes of gammaproteobacterial methanotrophs isolated from terrestrial ecosystems / R. Hamilton [et al.] // *Genome Announc.* – 2015. – V. 3, № 3. – Art. № e00515-15.
  164. Hanson R. S. Methanotrophic bacteria / R. S. Hanson, T. E. Hanson // *Microbiol. Rev.* – 1996. – V. 60. – P. 439–471.
  165. Håvelsrud O. E. A metagenomic study of methanotrophic microorganisms in Coal Oil Point seep sediments / O. E. Håvelsrud [et al.] // *BMC microbiology.* – 2011. – V. 11. – Art. № 221.
  166. He D. The response of methanotrophs to additions of either ammonium, nitrate or urea in alpine swamp meadow soil as revealed by stable isotope probing / D. He [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2019. – V. 95, № 7. – Art. № fiz077.
  167. He R. Diversity of active aerobic methanotrophs along depth profiles of arctic and subarctic lake water column and sediments / R. He [et al.] // *ISME J.* – 2012. – V. 6. – P. 1937–1948.
  168. Hecky R. E. The pelagic ecosystem / R. E. Hecky // *Lake Tanganyika and Its Life*; ed. G. W. Coulter. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1991. – P. 90–110.
  169. Hedderich R. Physiology and biochemistry of the methane-producing Archaea / R. Hedderich, W. Whitman // *The prokaryotes*; eds M. Dworkin [et al.]. – New York: Springer Verlag, 2006. – P. 1050–1079.
  170. Henckel T. Effects of O<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil / T. Henckel, P. Roslev, R. Conrad // *Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 2. – P. 666–679.
  171. Hernandez M. E. Oxygen availability is a major factor in determining the

- composition of microbial communities involved in methane oxidation / M. E. Hernandez [et al.] // PeerJ. – 2015. – V. 3. – Art. № e801.
172. Ho A. Biotic interactions in microbial communities as modulators of biogeochemical processes: methanotrophy as a model system / A. Ho [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – Art. № 1285.
173. Ho A. The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity / A. Ho [et al.] // ISME J. – 2014. – V. 8. – P. 1945–1948.
174. Holmes A. J. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake / A. J. Holmes [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 3312–3318.
175. Holmes A. J. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related / A. J. Holmes [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – V. 132. – P. 203–208.
176. Hopcroft P. Ancient ice and the global methane cycle / P. Hopcroft // Nature. – 2017. – V. 548. – P. 403–404.
177. Horz H. P. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil / H. P. Horz [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2002. – V. 41. – P. 247–257.
178. Houghton K. M. Thermophilic methanotrophs: in hot pursuit / K. M. Houghton [et al.] // FEMS Microbiol. Ecology. – 2019. – V. 95, № 9. – Art. № fiz125.
179. Hu A. The differential effects of ammonium and nitrate on methanotrophs in rice field soil / A. Hu, Y. Lu // Soil Biol. Biochem. – 2015. – V. 85. – P. 31–38.
180. Hug L. A. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the *Chloroflexi* phylum and indicate roles in sediment carbon cycling / L. A. Hug [et al.] // Microbiome. – 2013. – V. 1. – Art. № 22.
181. Hutton W. E. The occurrence and characteristics of methaneoxidizing bacteria in marine sediments / W. E. Hutton, C. E. ZoBell // J. Bacteriol. – 1949. – V. 58. – P. 463–473.
182. Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2014: synthesis, report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report

- of the intergovernmental panel on climate change; eds. C. W. Team, R. K. Pachauri, L. A. Meyer. – Geneva: IPCC, 2015. – 151 pp.
183. Islam T. Acid-tolerant moderately thermophilic methanotrophs of the class *Gammaproteobacteria* isolated from tropical topsoil with methane seeps / T. Islam [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. – Art. № 851.
184. Islam T. Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum / T. Islam [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – V. 105, № 1. – P. 300–304.
185. Ivanov M. V. The oceanic global methane cycle / M. V. Ivanov, A. Y. Lein, V. F. Galchenko // *Biogeochemistry of Global Change*; ed. R. S. Oremland. – Boston: Springer, 1993. – P. 505–520.
186. Jannasch H. W. Methane oxidation in Lake Kivu (central Africa) / H. W. Jannasch // *Limnol. Oceanogr.* – 1975. – V. 20. – P. 860–864.
187. Jensen S. Insight into the microbial community structure of a Norwegian deep-water coral reef environment / S. Jensen [et al.] // *Deep-Sea Res. I Oceanogr. Res. Pap.* – 2008. – V. 55, № 11. – P. 1554–1563.
188. Jiang H. Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering / H. Jiang [et al.] // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – V. 49. – P. 277–288.
189. Kallistova A. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake / A. Kallistova [et al.] // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2019. – V. 82, № 1. – P. 1–18.
190. Kalyuzhnaya M. G. Draft genome sequences of gammaproteobacterial methanotrophs isolated from lake washington sediment / M. G. Kalyuzhnaya [et al.] // *Genome announc.* – 2015. – V. 3, № 2. – Art. № e00103-15.
191. Kalyuzhnaya M. G. High resolution metagenomics targets major functional types in complex microbial communities / M. G. Kalyuzhnaya [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – V. 26. – P. 1029–1034.
192. Kalyuzhnaya M. G. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium / M. G. Kalyuzhnaya [et al.] // *Nat. Commun.* – 2013.

– V. 4. – Art. № 2785.

193. Kalyuzhnaya M. G. *Methylophilaceae* link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis / M. G. Kalyuzhnaya [et al.] // Environ. Microbiol. Rep. – 2009. – V. 1. – P. 385–392.
194. Kalyuzhnaya M. G. The Methane-oxidizing bacteria (methanotrophs) / M. G. Kalyuzhnaya, O. A. Gomez, J. C. Murrell // Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology; ed. T. McGenity. – Cham: Springer Nature, 2019. – P. 1–34.
195. Kalyuzhnaya M. G. Utility of environmental primers targeting ancient enzymes: methylotroph detection in Lake Washington / M. G. Kalyuzhnaya, M. E. Lidstrom, L. Chistoserdova // Microb. Ecol. – 2004. – V. 48. – P. 463–472.
196. Kanehisa M. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes / M. Kanehisa, S. Goto // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28. – P. 27–30.
197. Kanehisa M. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences / M. Kanehisa, Y. Sato, K. Morishima // J. Mol. Biol. – 2016. – V. 428. – P. 726–731.
198. Kankaala P. Methanotrophic activity in relation to methane efflux and total heterotrophic bacterial production in a stratified, humic, boreal lake / P. Kankaala [et al.] // Limnol. Oceanogr. – 2006. – V. 51. – P. 1195–1204.
199. Kankaala P. Oxidation, efflux, and isotopic fractionation of methane during autumnal turnover in a polyhumic, boreal lake / P. Kankaala [et al.] // J. Geophys Res Biogeosciences. – 2007. – V. 112. – P. 1–7.
200. Karl D. M. Aerobic production of methane in the sea / D. M. Karl [et al.] // Nat. Geosci. – 2008. – V. 1. – P. 473–478.
201. Kaserer H. Über die oxydation des wasserstoffes und des methans durch mikroben / H. Kaserer // Z. Landwirt. Versuchs. Deut. Oesterr. – 1905. – V. 8. – P. 789–794.
202. Keltjens J. T. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference / J. T. Keltjens [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014.

- V. 98. – P. 6163–6183.
203. Khadem A. F. Autotrophic methanotrophy in *Verrucomicrobia*: *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation / A. F. Khadem [et al.] // J. bacteriol. – 2011. – V. 193. – P. 4438–4446.
204. Khatri K. A novel gammaproteobacterial methanotroph from *Methylococccaeae*; strain FWC3, isolated from canal sediment from Western India / K. Khatri [et al.] // bioRxiv. – 2019. – Art. № 696807.
205. Khlystov O. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties / O. Khlystov [et al.] // J.Asian Earth Sci. – 2013. – V. 62, № 1. – P. 162–166.
206. Khmelenina V. N. Draft genome sequence of *Methylomicrobium buryatense* strain 5G, a haloalkaline-tolerant methanotrophic bacterium / V. N. Khmelenina [et al.] // Genome Announc. – 2013. – V. 1, № 4. – Art. № e00053-13.
207. King G. M. Effect of increasing atmospheric methane concentration on ammonium inhibition of soil methane consumption / G. M. King, S. Schnell // Nature. – 1994. – V. 370. – P. 282–284.
208. Kim J. Rapid isolation of fast-growing methanotrophs from environmental samples using continuous cultivation with gradually increased dilution rates / J. Kim, D. D. Kim, S. Yoon // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – V. 102. – P. 5707–5715.
209. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // J. Mol. Evol. – 1980. – V. 16. – P. 111–120.
210. Kip N. Ultra-deep pyrosequencing of *pmoA* amplicons confirms the prevalence of *Methylomonas* and *Methylocystis* in *Sphagnum* mosses from a Dutch peat bog / N. Kip [et al.] // Environ. Microbiol. Rep. – 2011. – V 3. – P. 667–673.
211. Kits K. D. Genome sequence of the obligate gammaproteobacterial methanotroph *Methylomicrobium album* strain BG8 / K. D. Kits [et al.] // Genome Announc. – 2013. – V. 1, № 2. – Art. № e0017013.
212. Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic

- methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker / C. Knief // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6. – Art. № 1346.
213. Knief C. Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios / C. Knief, P. F. Dunfield // *Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 7. – P. 1307–1317.
214. Knief C. The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration / C. Knief [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 8. – P. 321–333.
215. Knittel K. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process / K. Knittel, A. Boetius // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2009. – V. 63. – P. 311–334.
216. Kolb S. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays / S. Kolb [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 2423–2429.
217. Kosolapov D. B. Methane formation and consumption processes in the littoral zone of the Rybinsk Reservoir / D. B. Kosolapov // *Water Resources.* – 2002. – V. 29. – P. 174–180.
218. Kozich J. J. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform / J. J. Kozich [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79. – P. 5112–5120.
219. Krause S. M. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions / S. M. Krause [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2017. – V. 114. – P. 358–363.
220. Kumar S. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V. 33. – P. 1870–1874.
221. Kurilkina M. I. Bacterial community composition in the water column of the deepest freshwater Lake Baikal as determined by next-generation sequencing / M. I. Kurilkina [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2016. – V. 92. – Art. № fiw094.
222. Kwon M. Novel approaches and reasons to isolate methanotrophic bacteria with

- biotechnological potentials: recent achievements and perspectives / M. Kwon, A. Ho, S. Yoon // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – V. 103, № 1. – P. 1–8.
223. Lau E. The methanol dehydrogenase gene, *mxoF*, as a functional and phylogenetic marker for proteobacterial methanotrophs in natural environments / E. Lau [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – Art. № e56993.
224. Leahy J. G. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment / J. G. Leahy, R. R. Colwell // *Microbiol. Rev.* – 1990. – V. 54. – P. 305–315.
225. Le Mer J. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review / J. Le Mer, P. Roger // *Eur. J. Soil Biol.* – 2001. – V. 37. – P. 25–50.
226. Lenhart K. Evidence for methane production by the marine algae *Emiliania huxleyi* / K. Lenhart [et al.] // *Biogeosciences.* – 2016. – V. 13. – P. 3163–3174.
227. Lidstrom M. E. Seasonal study of methane oxidation in Lake Washington / M. E. Lidstrom, L. Somers // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – V. 47, № 6. – P. 1255–1260.
228. Lieberman R. L. Biological methane oxidation: Regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase / R. L. Lieberman, A. C. Rosenzweig // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2004. – V. 39, № 3. – P. 147–164.
229. Liebner S. Abundance, distribution and potential activity of methane oxidizing bacteria in permafrost soils from the Lena Delta, Siberia / S. Liebner, D. Wagner // *Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 9. – P. 107–117.
230. Liebner S. Diversity of aerobic methanotrophic bacteria in a permafrost active layer soil of the Lena Delta, Siberia / S. Liebner [et al.] // *Microb. Ecol.* – 2009. – V. 57. – P. 25–35.
231. Liu Y. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5 / Y. Liu, J. Zhang, Z. Zhang // *Biodegradation.* – 2004. – V. 15. – P. 205–212.
232. Lowe T. M. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence / T. M. Lowe, S. R. Eddy // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – P. 955–964.

233. Lüke C. The potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies / C. Lüke, P. Frenzel // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – P. 6305–6309.
234. Macalady J. L. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils / J. L. Macalady [et al.] // Environ. Microbiol. – 2002. – V. 4. – P. 148–157.
235. Malinverno A. Testing short-range migration of microbial methane as a hydrate formation mechanism: Results from Andaman Sea and Kumano Basin drill sites and global implications / A. Malinverno, D. S. Goldberg // Earth Planet. Sci. Lett. – 2015. – V. 422. – P. 105–114.
236. Marchler-Bauer A. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures / A. Marchler-Bauer [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45, № D1. – P. D200–D203.
237. McDonald I. R. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs / I. R. McDonald [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – P. 1305–1315.
238. McDonald I. R. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs / I. R. McDonald, J. C. Murrell // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63, № 8. – P. 3218–3224.
239. Michaud A. B. Microbial oxidation as a methane sink beneath the West Antarctic Ice Sheet / A. B. Michaud [et al.] // Nat. Geosci. – 2017. – V. 10, № 8. – P. 582–586.
240. Mitsumori M. Detection of *Proteobacteria* from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers / M. Mitsumori [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2002. – V. 35, № 3. – P. 251–255.
241. Mizandroutsev I. B. Dissolved methane in Lake Baikal: a modified technique for determining concentrations and vertical distribution in the water column / I. B. Mizandroutsev [et al.] // LFWB. – 2019. – № 6. – P. 316–325.
242. Mohanty S. R. Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil / S. R. Mohanty, P. L. E. Bodelier, R.

- Conrad // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – V. 62. – P. 24–31.
243. Morana C. Methanotrophy within the water column of a large meromictic tropical lake (Lake Kivu, East Africa) / C. Morana [et al.] // Biogeosciences. – 2015. – V. 12. – P. 2077–2088.
244. Murase J. Dynamics of methane in mesotrophic Lake Biwa, Japan / J. Murase [et al.] // Ecol. Res. – 2005. – V. 20. – P. 377–385.
245. Murrell J. C. Molecular methods for the study of methanotroph ecology / J. C. Murrell, I. R. McDonald, D. G. Bourne // FEMS Microbiol. Ecol. – 1998. – V. 27. – P. 103–114.
246. Murrell J. C. Regulation of methane monooxygenase genes by copper ions / J. C. Murrell, I. R. McDonald, B. Gilbert // Trends Microbiol. – 2000. – V. 8. – P. 221–225.
247. Myhre G. Anthropogenic and natural radiative forcing / G. Myhre [et al.] // Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working Group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change; eds. T. F. Stocker [et al.]. – Cambridge, New York: Cambridge University Press, 2013. – P. 659–740.
248. Naeher S. Tracing the methane cycle with lipid biomarkers in Lake Rotsee (Switzerland) / S. Naeher [et al.] // Org. Geochem. – 2014. – V. 66. – P. 174–181.
249. Nagata T. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: abundance, growth and grazing mortality during summer / T. Nagata [et al.] // J. Plankton Res. – 1994. – V. 16. – P. 945–959.
250. Nawrocki E. P. SSU-align: a tool for structural alignment of SSU rRNA sequences / E. P. Nawrocki, S. R. Eddy // Available at <http://selab.janelia.org/software.html>. 2010.
251. Neufeld J. D. Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp and novel *Gammaproteobacteria* in marine methanol and methylamine metabolism / J. D. Neufeld [et al.] // ISME J. – 2007. – V. 1. – P. 480–491.
252. Nguyen N.-L. A novel methanotroph in the genus *Methylomonas* that contains a distinct clade of soluble methane monooxygenase / N.-L. Nguyen [et al.] // J

- Microbiol. – 2017. – V. 55, № 10. – P. 775–782.
253. Nisbet E. G. Very strong atmospheric methane growth in the 4 Years 2014–2017: Implications for the Paris agreement / E. G. Nisbet [et al.] // *Global Biogeochem. Cy.* – 2019. – V. 33, № 3. – P. 318–342.
254. Northington R. M. Factors controlling methane in arctic lakes of southwest Greenland / R. M. Northington, J. E. Saros // *PLoS One.* – 2016. – V. 11. – P. 1–17.
255. Nyerges G. Effects of ammonium and nitrite on growth and competitive fitness of cultivated methanotrophic bacteria / G. Nyerges, S. K. Han, L. Y. Stein // *Appl. Env. Microbiol.* – 2010. – V. 76. – P. 5648–5651.
256. Nyerges G. Ammonia cometabolism and product inhibition vary considerably among species of methanotrophic bacteria / G. Nyerges, L.Y. Stein // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – V. 297. – P. 131–136.
257. Oksanen J. The vegan package / J. Oksanen [et al.] // *Community ecology package.* – 2007. – V. 10. – P. 631–637.
258. Op den Camp H. J. M. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia* / H. J. M. Op den Camp [et al.] // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2009. – V. 1. – P. 293–306.
259. Op den Camp H. J. M. Verrucomicrobial methanotrophs / H. J. M. Op den Camp [et al.] // *Methane biocatalysis: Paving the way to sustainability*; eds. M. G. Kalyuzhnaya, X.-H. Xing. – Cham: Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, 2018. – P. 43–55.
260. Orata F. D. Phylogenomic analysis of the gammaproteobacterial methanotrophs (order *Methylococcales*) calls for the reclassification of members at the genus and species levels / F. D. Orata [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9. – Art. № 3162.
261. Osborne C. D. Horizontal gene transfer of three co-inherited methane monooxygenase systems gave rise to methanotrophy in the *Proteobacteria* / C. D. Osborne, V. S. Haritos // *Mol. Phyl. Evol.* – 2018. – V. 129. – P. 171–181.
262. Oshkin I. Y. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold methane seeps in floodplains of west Siberian rivers / I. Y. Oshkin [et al.] // *Appl.*

- Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – P. 5944–5954.
263. Oshkin I. Y. Methane-fed microbial microcosms show differential community dynamics and pinpoint taxa involved in communal response / I. Y. Oshkin [et al.] // ISME J. – 2015. – V. 9. – P. 1119–1129.
264. Osudar R. Methane turnover and methanotrophic communities in arctic aquatic ecosystems of the Lena Delta, Northeast Siberia / R. Osudar [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2016. – V. 92. – Art. № fiw116.
265. Oswald K. Aerobic gammaproteobacterial methanotrophs mitigate methane emissions from oxic and anoxic lake waters / K. Oswald [et al.] // Limnol. Oceanogr. – 2016. – V. 61. – P. S101–S118.
266. Oswald K. *Crenothrix* are major methane consumers in stratified lakes / K. Oswald [et al.] // ISME J. – 2017. – V. 11, № 9. – P. 2124–2140.
267. Oswald K. Light-dependent aerobic methane oxidation reduces methane emissions from seasonally stratified lakes / K. Oswald [et al.] // PLoS One. – 2015. – V. 10. – Art. № e0132574.
268. Overbeek R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) / R. Overbeek [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 42. – P. D206–D214.
269. Padilla C. C. Metagenomic binning recovers a transcriptionally active gammaproteobacterium linking methanotrophy to partial denitrification in an anoxic oxygen minimum zone / C. C. Padilla [et al.] // Front. Mar. Sci. – 2017. – V. 4. – Art. № 23.
270. Panganiban A. Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples / A. Panganiban [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – V. 37. – P. 303–309.
271. Park D. Biological conversion of methane to methanol / D. Park, J. Lee // Korean J. Chem. Eng. – 2013. – V. 30. – P. 977–987.
272. Park S. The effect of various environmental and design parameters on methane oxidation in a model biofilter / S. Park, K. W. Brown, J. C. Thomas // Waste Manag. Res. – 2002. – V. 20. – P. 434–444.

273. Parks D. H. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life / D. H. Parks [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2018. – V. 36, № 10. – P. 996–1004.
274. Parks D. H. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes / D. H. Parks [et al.] // Genome Res. – 2015. – V. 25. – P. 1043–1055.
275. Parte A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature / A. C. Parte // Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42. – P. D613–D616.
276. Pasche N. Methane sources and sinks in Lake Kivu / N. Pasche [et al.] // J. Geophys. Res. – 2011. – V. 116. – Art. № G03006.
277. Paul B. G. Methane-oxidizing bacteria shunt carbon to microbial mats at a marine hydrocarbon seep / B. G. Paul [et al.] // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – Art. № 186.
278. Pedron R. Genomic and metagenomic insights into the microbial community of a thermal spring / R. Pedron [et al.] // Microbiome. – 2019. – V. 7. – Art. № 8.
279. Pester M. *pmoA*-based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment / M. Pester [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 3138–3142.
280. Phelps A. R. Methane efflux from high-latitude lakes during spring ice melt / A. R. Phelps, K. M. Peterson, M. O. Jeffries // J. Geophys. Res. – 1998. – V. 103. – P. 29029–29036.
281. Pol A. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species / A. Pol [et al.] // Nature. – 2007. – V. 450. – P. 874–878.
282. Porter K. G. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora / K. G. Porter // Limnol. Oceanogr. – 1980. – V. 25. – P. 943–948.
283. Prinn R. G. Advanced global atmospheric gases experiment / R. G. Prinn [et al.] // Available at AGAGE (<https://agage.mit.edu/>). 2019.
284. Rahalkar M. Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of Lake Constance (Germany) / M. Rahalkar [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75, № 1. – P. 119–126.

285. Rahalkar M. *Methylosoma difficile* gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance / M. Rahalkar, I. Bussmann, B. Schink // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – V. 57, № 5. – P. 1073–1080.
286. Redmond M. C. Identification of novel methane-, ethane-, and propane-oxidizing bacteria at marine hydrocarbon seeps by stable isotope probing / M. C. Redmond, D. L. Valentine, A. L. Sessions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76. – P. 6412–6422.
287. Reeburgh W. S. Oceanic methane biogeochemistry / W. S. Reeburgh // *Chem. Rev.* – 2007. – V. 107. – P. 486–513.
288. Repeta D. J. Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter / D. J. Repeta [et al.] // *Nat. Geosci.* – 2016. – V. 9, № 12. – P. 884–887.
289. Rissanen A. J. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate methanotrophy in aerobic and anaerobic layers of boreal lake waters / A. J. Rissanen [et al.] // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2018. – V. 81. – P. 257–276.
290. Rivers A. R. Transcriptional response of bathypelagic marine bacterioplankton to the Deepwater Horizon oil spill / A. R. Rivers [et al.] // *ISME J.* – 2013. – V. 7. – P. 2315–2329.
291. Roland F. A. Anaerobic methane oxidation and aerobic methane production in an east African great lake (Lake Kivu) / F. A. Roland [et al.] // *J. Great Lakes Res.* – 2018. – V. 44. – P. 1183–1193.
292. Ross M. O. A tale of two methane monooxygenases / M. O. Ross, A. C. Rosenzweig // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2016. – V. 22. – P. 307–319.
293. Rudd J. W. Measurements of microbial oxidation of methane in lake water / J. W. Rudd, R. D. Hamilton, N. E. R. Campbell // *Limnol. Oceanogr.* – 1974. – V. 19. – P. 519–524.
294. Rudd J. W. Methane cycling in aquatic environments / J. W. Rudd, C. D. Taylor // *Advances of Aquatic Microbiology.* – 1980. – V. 2. – P. 77–150.
295. Saitou N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing

- phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – V. 4. – P. 406–425.
296. Sahn K. High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods / K. Sahn [et al.] // *Extremophiles.* – 2013. – V. 17. – P. 649–662.
297. Salcher M. M. The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign / M. M. Salcher [et al.] // *ISME J.* – 2015. – V. 9. – P. 2442–2453.
298. Samad M. S. Seasonal variation in abundance and diversity of bacterial methanotrophs in five temperate lakes / M. S. Samad, S. Bertilsson // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. – Art. № 142.
299. Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual* / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.–V. 2. – pp. 545.
300. Sanches L. F. Global regulation of methane emission from natural lakes / L. F. Sanches [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – Art. № 255.
301. Saunois M. The Global Methane Budget: 2000–2012 / M. Saunois [et al.] // *Earth Syst. Sci. Data.* – 2016. – V. 8. – P. 697–751.
302. Saunois M. The Global Methane Budget 2000–2017 / M. Saunois [et al.] // *Earth Syst. Sci. Data Discuss.* 2019, <https://doi.org/10.5194/essd-2019-128>, in review.
303. Schloss P. D. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P. D. Schloss [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75. – P. 7537–7541.
304. Schmid M. Sources and sinks of methane in Lake Baikal: A synthesis of measurements and modeling / M. Schmid [et al.] // *Limnol. and Oceanogr.* – 2007. – V. 52. – P. 1824–1837.
305. Schmid M. Weak mixing in Lake Kivu: New insights indicate increasing risk of uncontrolled gas eruption / M. Schmid [et al.] // *Geochem. Geophys. Geosyst.* – 2005. – V. 6. – Art. № Q07009.
306. Schubert C. J. Contribution of Methane Formation and Methane Oxidation to

- Methane Emission from Freshwater Systems / C. J. Schubert, B. Wehrli // Biogenesis of hydrocarbons. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology; eds. A. Stams, D. Sousa. – Cham: Springer, 2019. – P. 401–430.
307. Schubert C. J. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno) / C. J. Schubert [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2011. – V. 76. – P. 26–38.
308. Schubert C. J. Oxidation and emission of methane in a monomictic lake (Rotsee, Switzerland) / C. J. Schubert [et al.] // Aquat. Sci. – 2010. – V. 72. – P. 455–466.
309. Schulz S. Effect of algal deposition on acetate and methane concentrations in the profundal sediment of a deep lake (Lake Constance) / S. Schulz, R. Conrad // FEMS Microbiol. Ecol. – 1995. – V. 16. – P. 251–259.
310. Semrau J. D. Metals and methanotrophy / J. D. Semrau [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – V. 84, № 6. – Art. № e02289-17.
311. Semrau J. D. Methanotrophs and copper / J. D. Semrau, A. A. DiSpirito, S. Yoon // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – V. 34. – P. 496–531.
312. Semrau J. D. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs / J. Semrau [et al.] // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – P. 3071–3079.
313. Seto M. Potential for aerobic methanotrophic metabolism on mars / M. Seto, K. Noguchi, P. V. Cappellen // Astrobiology. – 2019. – V. 19, № 10. – P. 1187–1195.
314. Sharp C. E. Distribution and diversity of *Verrucomicrobia* methanotrophs in geothermal and acidic environments / C. E. Sharp [et al.] // Environ. Microbiol. – 2014. – V. 16, № 6. – P. 1867–1878.
315. Shi L.-D. Metagenomic evidence for a *Methylocystis* species capable of bioremediation of diverse heavy metals / L.-D. Shi [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – V. 9. – Art. № 3297.
316. Shrestha M. Effect of nitrogen fertilization on methane oxidation, abundance, community structure, and gene expression of methanotrophs in the rice rhizosphere / M. Shrestha [et al.] // ISME J. – 2010. – V. 4. – P. 1545–1556.
317. Siljanen H. M. Seasonal variation in the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal eutrophic lake / H. M. Siljanen [et al.] // FEMS

- Microbiol. Ecol. – 2012. – V. 80, № 3. – P. 548–555.
318. Skennerton C. T. Genomic reconstruction of an uncultured hydrothermal vent gammaproteobacterial methanotroph (family *Methylothermaceae*) indicates multiple adaptations to oxygen limitation / C. T. Skennerton [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6.–Art. № 1425.
319. Smith G. J. Members of the genus *Methylobacter* are Inferred to account for the majority of aerobic methane oxidation in oxic soils from a freshwater wetland / G. J. Smith [et al.] // MBio. – 2018. – V. 9, № 6. – Art. № e00815-18.
320. Söhngen N. L. Über bakterien, welche methan als Kohlenstoff nahrung und Energiequelle gebrauchen (On bacteria which use methane as a carbon and energy source) / N. L. Söhngen // Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.–1906. – V. 15. – P. 513–517.
321. Spahni R. Atmospheric methane and nitrous oxide of the late pleistocene from antarctic ice cores / R. Spahni [et al.] // Science. – 2005. – V. 310, № 5752. – P. 1317–1321.
322. Stahl D. A. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics / D. A. Stahl, R. Amann // Nucleic acid techniques in bacterial systematics; eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: – John Wiley & Sons, 1991. – P. 205–248.
323. Stein L. Y. Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria / L. Y. Stein, M. G. Klotz // Biochem. Soc. Trans. – 2011. – V. 39, № 6. – P. 1826–1831.
324. Stock M. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs / M. Stock [et al.] // Res. Microbiol. – 2013. – V. 164. – P. 1045–1054.
325. Strong P. J. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? / P. J. Strong, S. Xie, W. P. Clarke // Environ. Sci. Technol. – 2015. – V. 49. – P. 4001–4018.
326. Sturm A. Rates and pathways of CH<sub>4</sub> oxidation in ferruginous Lake Matano, Indonesia / A. Sturm [et al.] // Geobiology. – 2019. – V. 17, № 3. – P. 294–307.
327. Su G. Methane oxidation in anoxic lake waters / G. Su [et al.] // Geophysical Research Abstracts, 19th EGU General Assembly, EGU2017, Vol. 19,

- proceedings from the conference held [Vienna, Austria, 23–28 April 2017]. – P. 15059.
328. Sundh I. Abundance, activity, and community structure of pelagic methane-oxidizing bacteria in temperate lakes / I. Sundh, D. Bastviken, L. J. Tranvik // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 6746–6752.
329. Tang K. W. Methane production in oxic lake waters potentially increases aquatic methane flux to air / K. W. Tang [et al.] // *Environ. Sci. Technol. Lett.* – 2016. – V. 3. – P. 227–233.
330. Tatusov R. L. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes / R. L. Tatusov [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. 22–28.
331. Tays C. Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs / C. Tays [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9. – Art. № 2239.
332. Team R. C. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. 2018. <https://www.R-project.org/>.
333. Thomas C. Lateral variations and vertical structure of the microbial methane cycle in the sediment of Lake Onego (Russia) / C. Thomas [et al.] // *Inland Waters.* – 2019. – V. 9, № 2. – P. 205–226.
334. Tranvik L. J. Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate / L. J. Tranvik [et al.] // *Limnol. Oceanogr.* – 2009. – V. 54. – P. 2298–2314.
335. Trotsenko Y. A. Metabolic aspect of aerobic obligate methanotrophy / Y. A. Trotsenko, J. C. Murrell // *Adv. Microbiol.* – 2008. – V. 63. – P. 183–229.
336. Tsubota J. *Methylothermus thermalis* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan / J. Tsubota [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – V. 55. – P. 1877–1884.
337. Tsutsumi M. Spatiotemporal variations in an assemblage of closely related planktonic aerobic methanotrophs / M. Tsutsumi [et al.] // *Freshwater Biology.* – 2011. – V. 56. – P. 342–351.

338. Turner A. J. Interpreting contemporary trends in atmospheric methane / A. J. Turner, C. Frankenberg, E. A. Kort // PNAS. – 2019. – V. 116, № 8. – P. 2805–2813.
339. Tyson G. W. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment / G. W. Tyson [et al.] // Nature. – 2004. – V. 428. – P. 37–43.
340. Ullrich N. Proteomic evidence of methanotrophy in methane-enriched hypolimnetic lake water / N. Ullrich [et al.] // Limnol. Oceanogr. – 2016. – V. 61. – P. 1–10.
341. Valentine D. L. Emerging topics in marine methane biogeochemistry / D. L. Valentine // Annu. Rev. Mar. Sci. – 2011. – V. 3. – P. 147–171.
342. Van Bodegom P. Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere / P. Van Bodegom [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67, № 8. – P. 3586–3597.
343. Van der Ha D. Selection of associated heterotrophs by methane-oxidizing bacteria at different copper concentrations / D. Van der Ha [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2013. – V. 103. – P. 527–537.
344. Vanneste M. Multi-frequency seismic study of gas-bearing sediments in Lake Baikal, Siberia / M. Vanneste [et al.] // Mar. Geol. – 2001. – V. 172. – P. 1–21.
345. Van Teeseling M. C. F. Expanding the verrucomicrobial methanotrophic world: description of three novel species of *Methyloacidimicrobium* gen. nov. / M. C. F. Van Teeseling [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – P. 6782–6791.
346. Vekeman B. New *Methyloceanibacter* diversity from North Sea sediments includes methanotroph containing solely the soluble methane monooxygenase / B. Vekeman [et al.] // Environ. Microbiol. – 2016. – V. 18. – P. 4523–4536.
347. Veraart A. J. Living apart together—bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity / A. J. Veraart [et al.] // ISME J. – 2018. – V. 12. – P. 1163–1166.
348. Vorobev A. V. *Methyloferula stalleta* gen. nov., sp. nov., and acidophilic, obligately methanotrophic bacterium possessing only a soluble methane monooxygenase / A. V. Vorobev [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011.

- V. 61. – P. 2456–2463.
349. Walter K. M. Methane production and bubble emissions from arctic lakes: Isotopic implications for source pathways and ages / K. M. Walter [et al.] // J. Geophys. Res. – 2008. – V. 113. – Art. № G3.
350. Wang J. G. An improved protocol with a highly degenerate primer targeting copper-containing membrane-bound monooxygenase genes for community analysis of methane- and ammonia-oxidizing bacteria / J. G. Wang [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2017б. – V. 93, № 3. – Art. № fiw244.
351. Wang P. Molecular phylogeny of methylotrophs in a deep-sea sediment from a tropical west Pacific Warm Pool / P. Wang [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2004. – V. 47. – P. 77–84.
352. Wang Q. Methylphosphonate metabolism by *Pseudomonas* sp. populations contributes to the methane oversaturation paradox in an oxic freshwater lake / Q. Wang, J. E. Dore, T. R. McDermott // Environ. Microbiol. – 2017a. – V. 19, № 6. – P. 2366–2378.
353. Ward N. Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath) / N. Ward [et al.] // PLoS Biol. – 2004. – V. 2, № 10. – Art. № e303.
354. Whittenbury R. The different types of methane oxidising bacteria and some of their more unusual properties / R. Whittenbury, H. Dalton, M. Eccleston, H. L. Reed // Microbial Growth on C, Compounds: Proceedings of the International Symposium on Microbial Growth on C, Compounds; ed. G. Terui. Tokyo, Osaka: – Society of Fermentation Technology, 1975. – P. 1–9.
355. Whittenbury R. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria / R. Whittenbury, K. C. Phillips, J. F. Wilkinson // J. Gen. Microbiol. – 1970. – V. 61. – P. 205–218.
356. Wilburn P. Environmental drivers define contrasting microbial habitats, diversity and functional redundancy in Lake Baikal, Siberia / P. Wilburn [et al.] // bioRxiv. – 2019. – Art. № 605899.
357. Wilkins L. G. E. Metagenome-assembled genomes provide new insight into the

- microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka, Russia / L. G. E. Wilkins [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – Art. № 3059.
358. Wik M. Climate-sensitive northern lakes and ponds are critical components of methane release / M. Wik [et al.] // *Nat. Geosci.* – 2016. – V. 9. – P. 99–106.
359. Wrighton K. C. Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla / K. C. Wrighton [et al.] // *Science.* – 2012. – V. 337, № 6102. – P. 1661–1665.
360. Xin J.-y. Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria / J.-y. Xin [et al.] // *Biocatal. Biotransfor.* – 2004. – V. 22, № 3. – P. 225–229.
361. Xu K. Activity, distribution, and abundance of methane-oxidizing bacteria in the near surface soils of onshore oil and gas fields / K. Xu [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V. 97. – P. 7909–7918.
362. Yan T. F. Diversity of functional genes for methanotrophs in sediments associated with gas hydrates and hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico / T. F. Yan, J. Z. Zhou, C. L. L. Zhang // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2006. – V. 57. – P. 251–259.
363. Yang Y. Eutrophication influences methanotrophic activity, abundance and community structure in freshwater lakes / Y. Yang [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2019. – V. 662. – P. 863–872.
364. Yang Y. Spatio-temporal variation of sediment methanotrophic microorganisms in a Large Eutrophic Lake / Y. Yang [et al.] // *Microbiol. Ecol.* – 2016. – V. 71. – P. 9–17.
365. Yao M. Freshwater bacteria release methane as a by-product of phosphorus acquisition / M. Yao, C. Henny, J. A. Maresca // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2016. – V. 82, № 23. – P. 6994–7003.
366. Yeoh Y. K. Comparative genomics of candidate phylum TM6 suggests that parasitism is widespread and ancestral in this lineage / Y. K. Yeoh [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V. 33. – P. 915–927.
367. Zemskaya T. I. Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge / T. I. Zemskaya [et al.] // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2015. – V. 76. – P. 95–109.

368. Zhang B. Methane emissions from global rice fields: magnitude, spatiotemporal patterns, and environmental controls / B. Zhang [et al.] // *Glob. Biogeochem. Cycles*. – 2016. – V. 30. – P. 1246–1263.
369. Zhang J. Bacterioplankton communities in a high-altitude freshwater wetland / J. Zhang [et al.] // *Ann. Microbiol.* – 2014. – V. 64. – P. 1405–1411.
370. Zheng Y. A pathway for biological methane production using bacterial iron-only nitrogenase / Y. Zheng [et al.] // *Nat. Microbiol.* – 2018. – V. 3, № 3. – P. 281–286.
371. Zhou L. *Sphingomonas* from petroleum-contaminated soils in Shenfu, China and their PAHs degradation abilities / L. Zhou [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2016. – V. 47. – P. 271–278.
372. Zhuang W. Q. Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments / W. Q. Zhuang [et al.] // *Water Sci. Technol.* – 2003. – V. 47. – P. 303–308.
373. Zigah P. K. Methane oxidation pathways and associated methanotrophic communities in the water column of a tropical lake / P. K. Zigah [et al.] // *Limnol. Oceanogr.* – 2015. – V. 60. – P. 553–572.
374. Zuckerkandl E. Evolving genes and proteins / E. Zuckerkandl, L. Pauling // *Evolutionary divergence and convergence in proteins*; eds. V. Bryson, H. J. Vogel. – New York: Academic Press, 1965. – P. 97–166.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Образцы ДНК, выделенные из микробных сообществ, и локусы, выбранные для анализа

Район	Номер образца	Секвенированный фрагмент 16S рРНК и праймеры	Секвенированный фрагмент <i>ptaA</i> (праймеры)	Секвенированный фрагмент <i>mxaF</i> (праймеры)
Горевой Утес	I/0	V2–V3(16S_BV2f / 16S_BV3r)	A189 / A682	mxa_f1003 / mxa_r1555
	I/50			
	I/100			
	I/200			
	I/300			
	I/500			
	I/700			
Большой	I/855	V2–V3(16S_BV2f / 16S_BV3r)	A189 / A682	mxa_f1003 / mxa_r1555
	II/0			
	II/50			
	II/100			
Листвянка	II/700	нд	нд	нд
	II/1370			
	III/5			
	III/20			
Посольская Банка	III/1250	V2–V3(16S_BV2f / 16S_BV3r)	нд	нд
	III/1350			
	IV/1			
	IV/2			
	IV/3			