

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

**МЕТАНОТРОФНЫЕ АССОЦИАНТЫ МХОВ И ЛИШАЙНИКОВ**

|                        |                      |                 |
|------------------------|----------------------|-----------------|
| Руководитель           | _____ д.б.н          | С.В. Прудникова |
| Научный<br>консультант | _____ к.б.н., доцент | С.Ю. Евграфова  |
| Студент                | _____                | В.К. Кадуцкий   |

Красноярск 2019

## Оглавление

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Введение.....                                                                                          | 4  |
| Глава 1. Обзор литературы.....                                                                         | 6  |
| 1.1 Метан как парниковый газ.....                                                                      | 6  |
| 1.2 Понятие метанотрофии .....                                                                         | 6  |
| 1.3 История открытия метанотрофных бактерий .....                                                      | 9  |
| 1.4 Метанотрофные бактерии и их таксономия .....                                                       | 10 |
| 1.5 Морфология и свойства метанотрофных бактерий.....                                                  | 10 |
| 1.6 Экология метанотрофных мхов.....                                                                   | 11 |
| 1.7 Экология метанотрофных бактерий.....                                                               | 13 |
| Глава 2. Объект и методы исследования .....                                                            | 18 |
| 2.1 Описание объекта исследований, отбор образцов.....                                                 | 18 |
| 2.2. Лабораторные инкубационные эксперименты .....                                                     | 21 |
| 2.3 Выделение метанотрофных микроорганизмов и оценка их<br>метанотрофной активности.....               | 24 |
| 2.3.1 Получение накопительных и чистых культур .....                                                   | 24 |
| 2.3.2 Измерение метанотрофной активности выделанных культур .....                                      | 25 |
| Глава 3. Результаты исследований.....                                                                  | 27 |
| 3.1. Динамика потребления метана ассоциантами мхов и лишайников<br>экосистем Прибайкалья .....         | 27 |
| 3.2. Оценка зависимости интенсивности метанотрофной активности от<br>мощности сезонно-талого слоя..... | 28 |
| 3.3 Оценка метанотрофной активности чистых культур .....                                               | 30 |
| 3.4. Характеристика полученных штаммов и их молекулярный анализ<br>на основе 16S рРНК .....            | 30 |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| Выводы .....            | 34 |
| Список литературы ..... | 35 |

## Введение

Метан – это предельно восстановленное органическое соединение, и наиболее значимый представитель органических веществ в атмосфере [51]. Метан недоступен для живых организмов, исключение составляют метаноксиляющую бактерии (метанотрофы) – единственная биологическая система, которая использует метан в качестве единственного источника энергии и углерода.

Повышение концентрации метана в атмосфере вызывает усиление парникового эффекта, так как метан активно поглощает тепловое излучение Земли в инфракрасном спектре. Метан является вторым по важности парниковым газом после углекислого газа, вклад метана в парниковый эффект равен, по разным оценкам, от 21 до 30% от величины, принятой для углекислого газа [1]. В связи с этим, метанотрофы являются своего рода биологическим фильтром, препятствующим избыточной эмиссии метана в атмосферу.

В настоящее время множество моделей, прогнозирующих изменения климата, демонстрируют, что наиболее значимые изменения произойдут в бореальных и тундровых экосистемах, подстилаемых многолетнемерзлыми грунтами [42].

Многолетняя мерзлота сосредоточена главным образом в Северном полушарии и покрывает до 25% поверхности суши. Глобальное экологическое значение мерзлотных экосистем Северного полушария в сохранении биологического разнообразия и регулировании климата заключается в адаптационных возможностях биоты к существованию в экстремальных условиях и воздействию на них глобальных климатических изменений [48].

Понимание угрозы изменения климата в течение трех-пяти веков, а может и одного столетия, в результате изменения растительного покрова и

загрязнения биосферы побудило научный мир заняться изучением роли метаногенных и метанотрофных микроорганизмов в глобальных процессах потепления, которые, несомненно, вносят существенный вклад в регуляцию метанового цикла на Земле. [2].

Целью данных исследований являлась оценка потребления метана консорциумами мхов и лишайников при концентрациях, близких к атмосферным, в лесных экосистемах Прибайкалья и мерзлотных экосистемах дельты реки Лена, остров Самойловский.

В задачи исследования входило:

1. Исследовать метанооксиляющую способность в консорциумах мхов и лишайников в экосистемах Прибайкалья
2. Сравнить метанооксиляющую способность консорциумов мхов и лишайников мерзлотных и немерзлотных экосистем Прибайкалья.
3. Исследовать зависимость интенсивности метанотрофной активности ассоциантов мхов и лишайников от мощности сезонно-талого слоя мерзлотных почв Северной Якутии.
4. Выделить и идентифицировать метанотрофные микроорганизмы-ассоцианты мхов и лишайников исследуемых регионов.
5. Определить метанотрофную способность выделенных штаммов микроорганизмов.

## **Глава 1. Обзор литературы**

### **1.1 Метан как парниковый газ**

Метан является одним из основных газов, вызывающих парниковый эффект. Показано, что с 1970 года, концентрация метана повышалась со скоростью 0,8–1,2% в год, что эквивалентно увеличению концентрации на 16,5 ppbv (ppbv – одна часть на миллиард) в год, а увеличение его массы составляло 45 Тг/год. В настоящее время концентрация метана равна 1,8 ppm, а его эмиссия по разным оценкам составляет от 550 до 678 Тг в год [23, 1].

Образование метана происходит как внутри, так и на поверхности Земли. По происхождению метан условно разделяется на абиогенный (термокаталитический) и биогенный. Выделение абиогенного метана носит условный характер, образуящегося из “мертвого углерода”, который унаследован в результате жизнедеятельности когда-то живых организмов (нефть, каменный уголь, природный газ), исключение составляет каталитический синтез метана из газов  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$  в нижней части земной коры или верхней мантии. Биогенный метан образуется как результат комплекса биохимических реакций, осуществляемых метаногенными микроорганизмами в разнообразных средах обитания (рубцы жвачных животных, болота, рисовые чеки, органические отходы) в строго анаэробных условиях [23, 12].

### **1.2 Понятие метанотрофии**

Метанотрофные бактерии являются единственной группой микроорганизмов, приспособленных к окислению метана, благодаря уникальному ферменту метанмонооксигеназе, и использованию метана в качестве единственного источника углерода и энергии. Метанотрофные бактерии потребляют до 80% биогенного метана, что вызывает повышенный

интерес вследствие их способности компенсировать эмиссию метана [5, 14, 26]

Метанотрофные бактерии окисляют метан до углекислоты и воды, с образованием промежуточных метаболитов, таких как метанол, формальдегид и формиат. Первый шаг окисления метана, катализируется мультикомпонентным ферментным комплексом – метанмонооксигеназа (ММО), существующая в двух формах – мембран связанная (pММО), и растворимая (sММО) локализирующаяся в цитоплазме (рис. 1) [15, 31]. Мембран связанная метанмонооксигеназа присутствует у всех известных метанотрофов, кроме бактерий рода *Methylocella*, у которых при высокой доле меди (> 2.5мкмоль/г клеток) синтезируется мембранная форма фермента – pММО, при низком – sММО [15, 24].

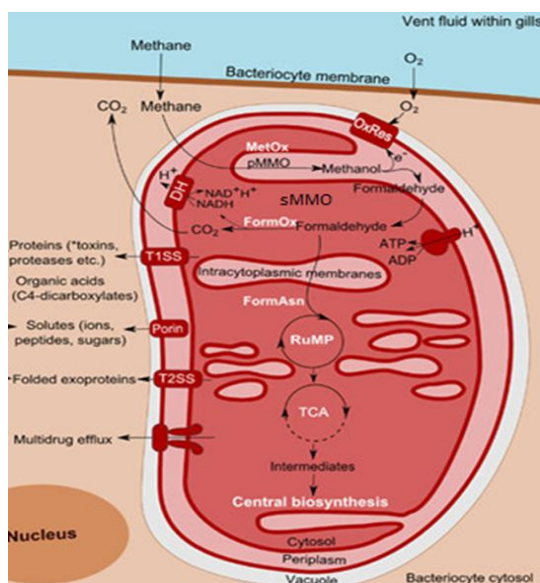


Рисунок 1 – Метаболические пути и положение метанмонооксигеназ, мембрансвязанной (pММО), и растворимой (sММО) [21].

Особое внимание заслуживает процесс ассимиляции формальдегида, так как у разных метанотрофов он протекает в разных биохимических циклах [46].

Так у метанотрофов I типа этот процесс проходит по рибулозомонофосфатному пути (РМФ), у метанотрофов II типа – по сериновому, а еще ряд метанотрофов объединен в так называемую группу X, поскольку помимо РМФ-пути они используют еще и цикл Кальвина (рис. 2) [46].

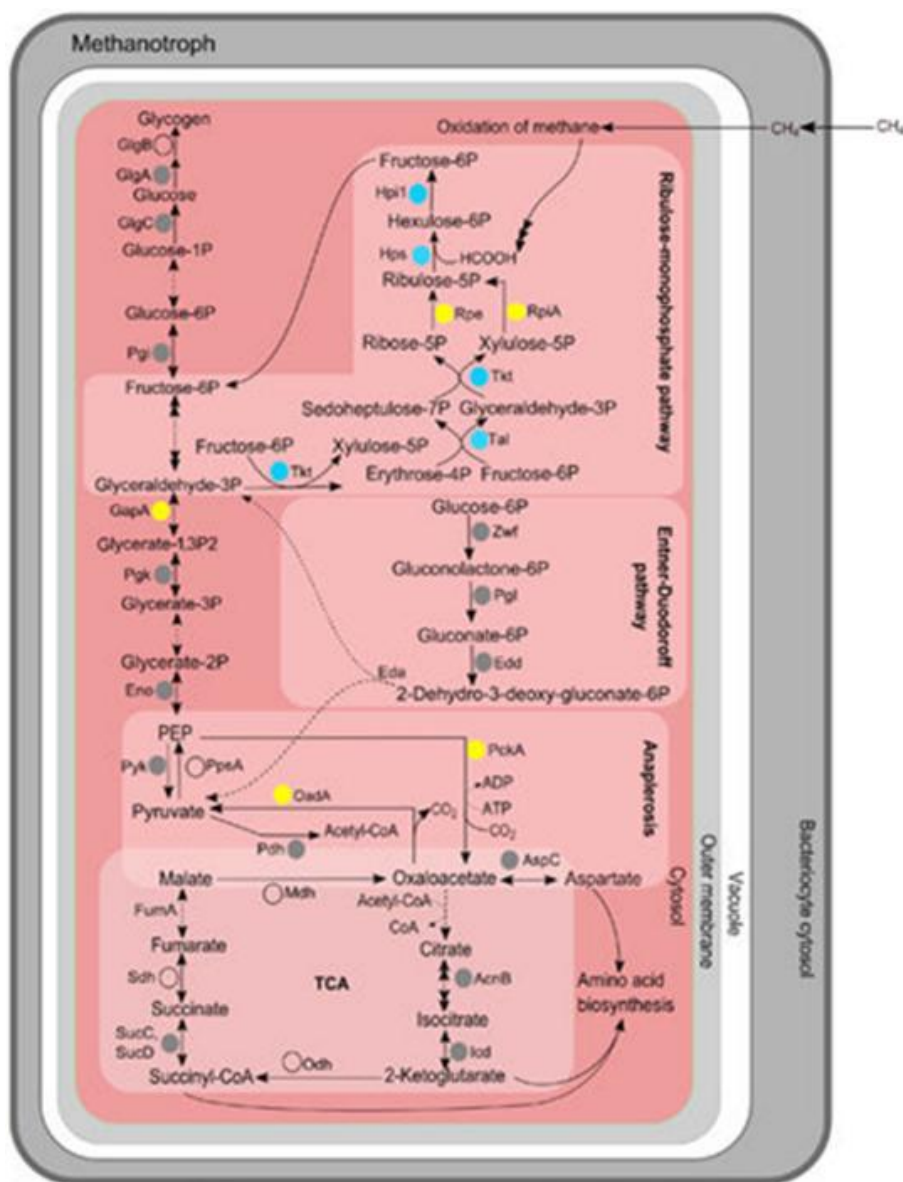


Рисунок 2 - Метаболические пути метаноокисляющих бактерий [22].

Одной из характерных особенностей метанотрофных бактерий является наличие развитой системы внутрицитоплазматических мембран. У метанотрофов I и X имеется ВЦМ в форме уплотненных везикул,



занимающих большую часть содержимого клетки и ориентированных перпендикулярно клеточной мембране, а у II типа – в виде везикул ориентированных параллельно внешней мембране. Тип расположения является таксономическим признаком (рис. 3) [48, 17].

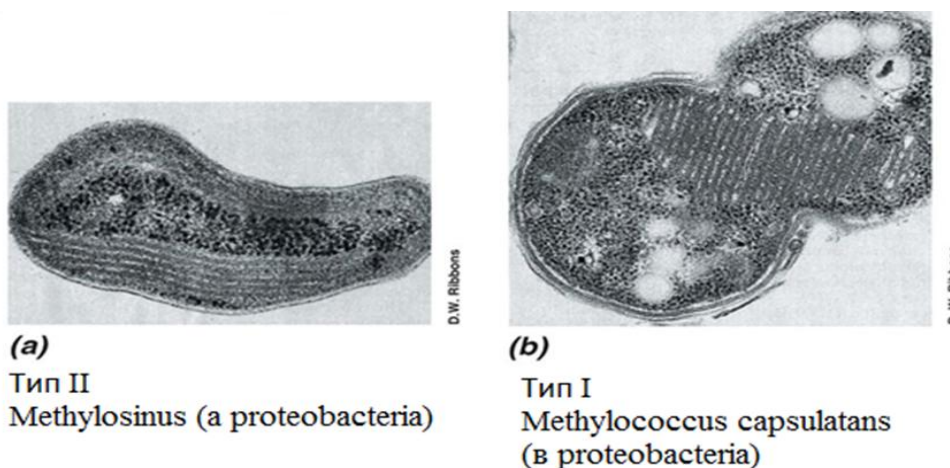


Рисунок 3 - Варианты расположения внутрицитоплазматических мембран метанотрофных бактерий ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?scale=0.35&query=methylocystis&map=map01100&scale=0.35&auto\\_image=&show\\_description=hide&multi\\_query=&show\\_module\\_ist](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=0.35&query=methylocystis&map=map01100&scale=0.35&auto_image=&show_description=hide&multi_query=&show_module_ist))

### 1.3 История открытия метанотрофных бактерий

Со времени открытия первых метанотрофных бактерий прошло уже более ста лет. Первооткрывателями метанотрофов стали – Зёнген и Казере [34, 40].

Однако, только в 1970 году труды ученых из США и Великобритании придали новый толчок для изучения процесса метанотрофии, были получены ответы на многие концептуальные вопросы связанные с процессом окисления метана. После крупнейшей работы по выделению и описанию более 100 изолятов была создана первая классификация метанотрофных бактерий [52]. Все описанные метанотрофы (роды *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus* и *Methylocystis*) были разделены на 2 группы (I и II типы).

Признаком, послужившим основой для разделения на два типа, было расположение внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ).

В последующие годы с появлением молекулярных методов были открыты новые рода метанотрофов, и был пересмотрен таксономический статус некоторых ранее описанных бактерий [20].

#### **1.4 Метанотрофные бактерии и их таксономия**

За последнее десятилетие, оказавшееся наиболее успешным в поиске новых метанотрофных микроорганизмов, число известных родов и видов было удвоено [35]. В настоящее время описано 18 родов аэробных метанотрофов из класса *Gamma*proteobacteria: *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylogaea*, *Methylohalobius*, *Methylomarinum*, *Methylosarcina*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*, *Methylovulum*, *Methylothermus*, *Methyloprofundus*, *Methyloglobulus*, *Methylomagnum*, *Methyloparacoccus*, *Methylomicrobium* и *Methylomarinovum* [20].

В пределах класса *Alphaproteobacteria* описано 5 родов метанотрофных бактерий: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methyloferula* и *Methylocapsa* [20].

Также на сегодняшнее время известно о существовании факультативных метанотрофных бактерий, таких как: *Methylocella silvestris*, *Methylocapsa aurea* sp., *Methylocystis strain SB2* [14].

#### **1.5 Морфология и свойства метанотрофных бактерий**

Метанотрофные бактерии обладают широкой изменчивостью размера клеток, формы и пигментации колоний. [14] Метанотрофы имеют форму грамотрицательные палочек, вибриоидов или кокков, многие подвижны благодаря наличию жгутиков, для большинства штаммов характерен полиморфизм. В естественной среде обитания, метанотрофы находятся в разноречивых условиях. Так метанотрофы имеют разнообразие споровых форм: экзоспоры, липидные цисты, цисты типа *Azotobacter*. Как следствие

высокой специализации метаболизма для окисления метана, бактерии имеют сложную систему внутрицитоплазматических мембран, главной функцией которых является окисление метана. Внутрицитоплазматических мембраны обеспечивая сопряжённость, для получения энергии для использования в окислении стабильной молекулы метана. [14, 19].

Первый тип имеет стопки дисковидных везикул, формирующихся путём инвагинации цитоплазматической мембраны и занимающих значительное пространство внутри клетки. Второй тип имеет систему парных периферических мембран. Большинство метанотрофов подвижны в определенный этап роста, за счет полярных жгутиков. Содержание гуанина-цитазина ДНК варьирует в пределах 46-65 мол %. Метанотрофы, в большинстве, являются строгими аэробами, каталазо- и оксидоположительные, обладают цитохромами с, b, а. [17, 48].

Метанотрофы синтезируют широкий спектр запасных веществ, таких как полисахариды, полигидроксibuтираты и полифосфаты, так же характерно образование экзополисахаридов. Пигменты представлены каротиноидами, продигининами и меланином, служащие видовой характеристикой и выполняющие в основном защитную функцию [6].

Клеточные стенки метанотрофов при типичном строении, характерном для граммотрицательных бактерий, имеют ряд особенностей. Так метанотрофы I типа имеют от 5 до 7 слоев. Стоит отметить, что бактерии обладают сложными и разнообразными поверхностными образованиями. Метанотрофные бактерии II типа обладают капсулами, состоящими из микрофибрил, различной структуры. По морфологии капсулы могут быть зубчатыми, мозаичными и исчезающими. Часто присутствуют гликопротеиновые S-слои на поверхности клеточных конвертов [15, 16].

## **1.6 Экология метанотрофных мхов**

В настоящее время известно, что процесс метанотрофии связан со мхами, которые вступают в симбиоз с метанотрофными бактериями,

обеспечивая их местом обитания и защитой, в свою очередь получая взамен от данной кооперации углекислый газ, выделяемый метанотрофами в результате окисления метана, содержание которого в тканях мха может достигать 32% [36].

Особенно выражено данное сотрудничество во мхах, которые погружены в воду, так как в данных условиях, поглощение растворенного углекислого газа в воде, является затруднительным, и получение углекислоты от метанотрофных бактерий становится выгоднее [36]. Наиболее распространенными являются сфагновые мхи. Сфагновый мох – типичный представитель верховых и переходных болот, образует верховой торф [45].

### **Болотные экосистемы**

Одним из наиболее распространенных типов северных болотных экосистем являются верховые сфагновые болота. Это типичные представители автономных ландшафтов.

Верховые болота развиваются на водоразделах и в своем питании ограничены тем, что поступает к ним из воздуха с атмосферными осадками и пылью. От минерального грунта они отделены слоем торфа. Вода в верховых болотах отличается низкой минерализацией, составляющей 5-100 мг/л, низкой электропроводностью, низким значением pH 3-5, обусловленным органическими кислотами, углекислотой и ионным обменом на поверхности растений [14]. Большую часть вегетационного сезона уровень воды находится вблизи или на поверхности почвы, что приводит к стагнации процессов аэробного разложения растительных остатков. В результате, северные сфагновые болота представляют собой глобальный сток CO<sub>2</sub>, со скоростью процессов захоронения углерода около 10-30 мг С в год на один квадратный метр. Северные торфяники занимают около 3-5% общей площади поверхности суши и содержат в себе одну треть мирового запаса органического углерода [25]. В то же время, сфагновые болота являются одними из важнейших источников парникового газа метана [38].

## 1.7 Экология метанотрофных бактерий

Метанотрофы широко распространены и встречаются в различных экосистемах. Большинство метанотрофов являются мезофилами, хорошо растущими при температуре от 20 до 35°C и предпочтительно около нейтральными значениями pH (5). Однако, среди них также встречаются термофильные (> 40°C) и психрофильные (9.0), тогда как другие представители этих бактерий обитают в кислых условиях (pH 2.5) [39].

Продолжительное время считалось, что процесс метанотрофии происходит только в аэробных условиях. Однако в середине 80-х гг. прошлого века, исследователи стали обнаруживать анаэробный процесс окисления метана. Через несколько десятков лет было выявлено, что в морских отложениях процесс метанотрофии осуществляется сообществом архей и сульфатредуцирующих бактерий [19].

В пресноводных поверхностных отложениях существуют несколько источников метанотрофии, сообществом архей и бактерий-денитрификаторов; и бактериями-метаногенами, которые при определенных концентрациях метана изменяют свой метаболизм, переходя на процесс метанотрофии [48]. В лабораторных условиях пока не удалось получить культуры микроорганизмов, способных окислять метан в анаэробных условиях, и ученые всего мира продолжают заниматься решением этой проблемы [19].

Основная часть метанотрофов предпочитает оптимальные условия окружающей среды, однако существуют метанотрофные бактерии, прекрасно приспособленные к экстремальным условиям. Так метнаноокисляющие бактерии даже после продолжительного пребывания в мерзлотных почвах, способны к активной жизнедеятельности и могут окислять и ассимилировать метан, в том числе при температурах близких к 0. [14].

По местообитанию, метанотрофов можно разделить на следующие группы:

- а) термофильные и термотолерантные метанотрофы.

На земле широко распространены биотопы с высокой температурой. В таких высокотемпературных зонах как вулканы, горячие источники, гейзеры, термальные выходы, содержится наряду с углекислым газом и сероводородом значительное количество метана, что объясняет существование наличие термофильных метанотрофных бактерий в данных экосистемах [30, 14, 50].

Все известные на настоящий момент метанотрофы-термофилы относятся к классу *Gammaproteobacteria*. Первый описанный из них - *Methylococcus capsulatus* предпочитает расти при температуре 45°C и является одним из наиболее изученных метанотрофных организмов. Обычно термофильные метанотрофы предпочитают обитать при температурах 25-30 °C в условиях около-нейтрального значения pH. Однако известен ряд метанотрофных бактерий, оптимально растущих при повышенных температурах. Так их термальных источников Японии и Венгрии был изолирован штамм NB, растущий в дипозоне от 40-70°C при оптимуме 55-62 °C, отнесенный к новому роду *Methylothermus* [18].

б) психрофильные и психротерантные метанотрофные организмы.

Экосистемы с преобладающими в них низкими температурами, занимают относительно большую площадь поверхности земли. К крупнейшим из них относятся обширные тундровые и северные болотные экосистемы, а также большая часть мирового океана, где средняя температура воды держится на уровне +5 – 7°C. Несмотря на низкие температуры данные экосистемы являются источником значительных объёмов метана, однако он не накапливается, благодаря деятельности метанотрофных бактерий [3, 4, 50].

Все психрофильные метанотрофы относятся к классу *Gammaproteobacteria* и предпочитают расти при температурах ниже 15°C. В донных осадках антарктических озер обнаружены метанотрофы, развивающиеся при 2°C [21, 14]. К метанотрофам-психрофилам относят *Methylobacter psychrophilus*, выделенный из почв криолита зоны России,

также *Methylosphaera hansonii* и *Methylomonas scandinavica*, изолированные из антарктического озера и холодных глубоководных вод вблизи побережья Балтийского моря [47].

в) Метанотрофы соленых и щелочных экосистем.

На земле широко распространены экосистемы с повышенной концентрацией солей. К ним относятся моря, прибрежные морские лагуны, эстуарии, некоторые арктические почвы, соленые водоемы, а также содовые озера. За исключением содовых озер, они характеризуются нейтральными значениями pH среды. Продолжительное время не удавалось доказать о существовании галофильных метанотрофных бактерий, что было вызвано рядом причин. Ранее существовали противоречивые данные о путях стока метана в гиперсоленых экосистемах, считалось, что потребление метана в этих зонах осуществляется в цианобактериальных матах и существование в условиях до 100% насыщенности кислородом не являются благоприятными для микроаэрофильных метанотрофов [22]. При попытках обнаружения метанотрофной активности использовали низко чувствительный газохроматографический метод. Что в последствие привело к необходимости использования специфичных и высоко чувствительных методов [13].

Первым доказательством существования метанотрофных бактерий в гиперсоленых водоемах, стало обнаружение метанотрофной активности в донных осадках и воде лиманов Крыма, благодаря использованию радиоизотопного метода [41]. По отношению к солености среды метанотрофные организмы были разделены на галотолерантов и галофилов. Последние облигатно зависят от присутствия NaCl в среде.

Среди галофилов следует отдельно выделить экстремальных галлофилов, способных расти при очень высокой концентрации NaCl в среде [28]. Так *Methylohalobius crimeensis*, выделенный из гиперсоленого озера полуострова Крым, развивается при концентрации 5.8 – 8.7 % NaCl в среде. Максимальная же концентрация соли, происходит рост, составляет 15%, что

является верхним пределом для известных метанотрофных бактерий на сегодняшний день [28].

В большинстве своем, галофильные и галотолерантные метанотрофные бактерии, принадлежат к классу *Gammaproteobacteria*. К ним относятся представители родов *Methylobacter* и *Methylomicrobium*, выделенные из различных соленых экосистем [20].

К галофильным метанотрофам относится также описанная ранее психрофильная метанотрофная бактерия *Methylosphaera hansonii*, требующая для роста присутствия в среде культивирования морской воды, что соответствует около 3.5 % [20]. Недавно из морской гидротермы был изолирован еще один представитель галофильных метанотрофов – *Methylomarinum vadi*, развивающийся оптимально при 3% NaCl [29]. Большинство морских метанотрофов предпочитают нейтральные значения среды. Содовые озера занимают до 80% внутренних водоемов [27].

Щелочные значения среды и высокая минерализация способствует широкому развитию алкалофильных микроорганизмов, которые представлены почти всеми физиологическими группами прокариот [9, 10].

Одной из главных особенностей содовых озер является то, что в них не происходит накопления органического материала, так как присутствует полный цикл деструкции органики в анаэробных условиях, здесь протекают процессы круговорота углерода, от фиксации углекислоты до продуцирования метана [7].

Из содовых озер был выделен также ряд галофильных метанотрофных бактерий, развивающихся при высоких значениях pH среды. Благодаря особенности большинства метанотрофов фиксировать атмосферный азот, для их активного развития в содовых озерах практически отсутствуют лимитирующие факторы [14]. Из содовых озер были изолированы представители рода *Methylomicrobium* – *M. alcaliphilum*, *M. buryatense* и *M. kenyense* [14]. *M. kenyense*, выделенный из содовых озер Кении, был способен



расти при рН 10, тем самым являясь истинным алкалофильным метанотрофом [42].

Наличие метанотрофов класса *Alphaproteobacteria* в щелочных озерах было неоднократно подтверждено с помощью методов молекулярной экологии [33]. Однако, попытки выделить алкалофильных метанотрофов II типа в чистую культуру остаются малоэффективными, и, на данный момент, удалось поучить только один изолят таких метанотрофов, относящихся к роду *Methylocystis* и способных, развиваться при высоких значениях рН (6.0 – 9.7) [8].

## Глава 2. Объект и методы исследования

### 2.1 Описание объекта исследований, отбор образцов

Объектом исследований служили мерзлотные и немерзлотные местообитания в окрестностях оз. Байкал и мерзлотные экосистемы северной Якутии: дельта реки Лена, острова Самойловский и о. Тит-Ары.

В лесных экосистемах Прибайкалья образцы мхов и лишайников были собраны сотрудниками Института леса им. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН, на четырех пробных площадях, с учетом их зонально-высотного распределения (рис. 4). Пробные площади описаны сотрудниками ИЛ СО РАН Кривобоковым Л.В. и Мухортовой Л. В,

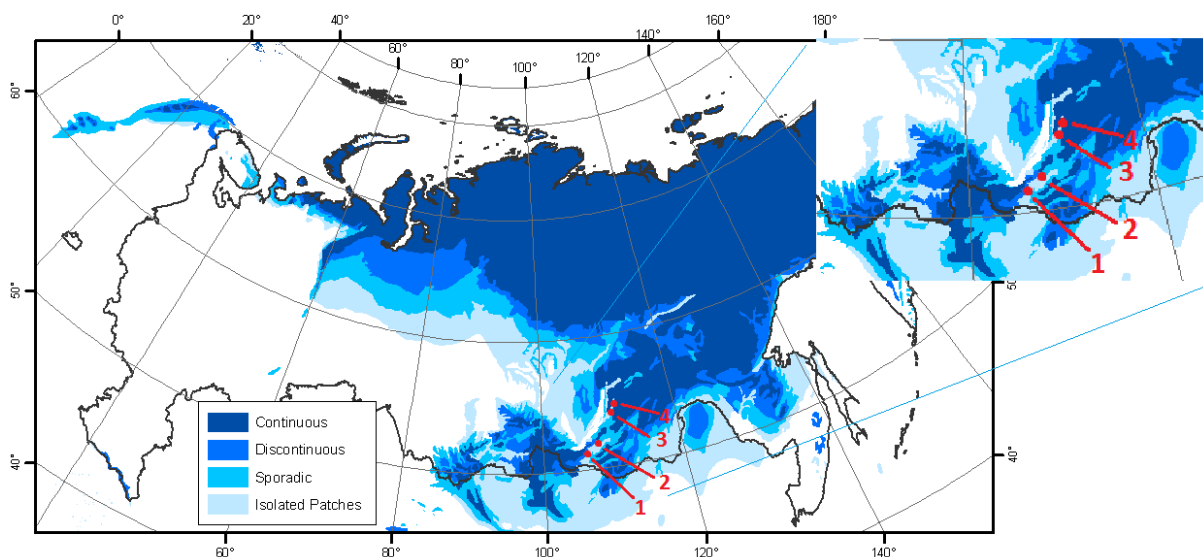


Рисунок 4 – Расположение пробных площадей (пп) на карте распространения вечной мерзлоты на территории России. Пп 1, 3, 4 расположены на мерзлотных почвах, пп 2 – на немерзлотных

Пробная площадь № 1 (образцы № 3, 7) заложена в урочище Бушелай Бабушкинского лесхоза ( $51^{\circ} 32'$  с.ш.;  $105^{\circ} 51'$  в.д.) Хамар-Дабанского лесорастительного округа. Округ представлен 180-летним пихтарником

чернично-зеленомошным, в мохово-лишайниковом покрове (проективное покрытие 60%) доминирует дикранум многоножковый (*Dicranum polysetum* Sw.) – 40%, содоминируют (*P. schreberi*) и кукушкин лен обыкновенный (*Polytrichum commune* Hedw.).

Пробная площадь №2 (образцы № 1, 2) заложена в Улан-Бургасском округе подтаежных сосново-лиственничных и горно-таежных темнохвойных лесов (52° 32' с.ш.; 107° 58' в.д.), который представляет собой сосняк рододендрово-бруснично-лишайниковый 180-летнего возраста. Мохово-лишайниковый покров – проективное покрытие менее 5%. Преобладают кустистые лишайники рода *Cladonia* (*C. rangiferina* L. Web., *C. amaurocraea* (Flk.) Schaer.) и др. Почва – подзол грубогумусированный.

Пробная площадь № 3 (образцы № 4, 5) заложена в лиственничнике голубично-бруснично-зеленомошном (55°13' с.ш., 111°30' в.д., высота 1035 м. над уровнем моря), который расположен в пойме ручья, ровное место, нанорельеф слабо выражен. Древесный ярус делится на два подъяруса. Первый представлен *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr., возраст 120 лет, сомкнутость крон 50%, высота древостоя 18 м, в напочвенном покрове доминирует *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt., в примеси встречаются другие мхи и лишайники родов *Cladonia* и *Peltigera*: *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *C. amaurocraea* (Flörke) Schaer., *C. chlorophaea* (Flörke ex Sommerf.) Spreng., *C. pyxidata* (L.) Fr., *C. rangiferina* (L.) Weber ex F. H. Wigg., *C. stellaris* (Opiz) Pouzar et Vězda, *C. subulata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., *Peltigera aphthosa* (L.) Willd., *P. canina* (L.) Willd., *P. malacea* (Ach.) Funck, *Stereocaulon alpinum* Laurer.

Пробная площадь № 4 (образец №6) заложена в лиственничнике бруснично-зеленомошном (55°13' с.ш., 111°28' в.д., высота 972 м. над уровнем моря), расположенном в нижней части ровного склона южной-юго-восточной экспозиции крутизной 8–10°, нанорельеф бугристо-западинный, слабо выражен. Древесный ярус делится на два подъяруса. Первый представлен *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr., возраст 100–150 лет, сомкнутость

крон 40%, высота древостоя 15–20 м. Мохово-лишайниковый покров развит куртинами, с общим проективным покрытием 40%. Доминирует *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt., в примеси другие мхи и лишайники родов *Cladonia* и *Peltigera*: *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *C. amaurocraea* (Flörke) Schaer., *C. chlorophaea* (Flörke ex Sommerf.) Spreng., *C. pyxidata* (L.) Fr., *C. rangiferina* (L.) Weber ex F. H. Wigg., *C. stellaris* (Opiz) Pouzar et Vězda, *C. subulata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., *Peltigera apthosa* (L.) Willd., *P. canina* (L.) Willd., *P. malacea* (Ach.) Funck, *Stereocaulon alpinum*.

Образцы мхов и лишайников отбирались в местах доминирования в напочвенном покрове, также на пробной площади №1 были отобраны эпифиты на деревьях; и хранились при 4°C вплоть до транспортировки в лабораторию ИЛ СО РАН для проведения анализа.

Вторым объектом исследования были выбраны мерзлотные местообитания мхов и лишайников в области высоких широт, дельта реки Лена, о. Самойловский (72°22'25.3"с.ш.;126°29'35.6"в.д.), о.Тит-Ары(71°58'48.0"с.ш.127°02'28.7" в.д.) (рис.5).

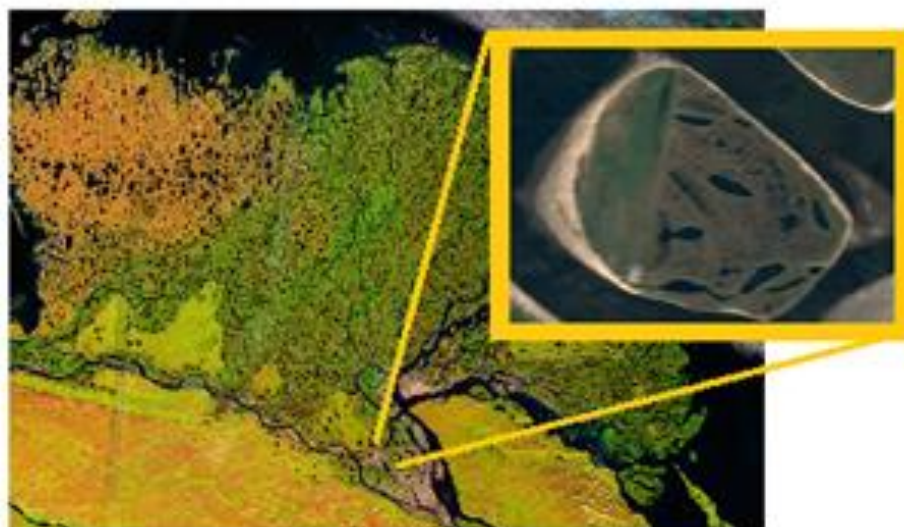


Рисунок 5 – Дельта реки Лена, о. Самойловский.

Было выбрано 6 пробных площадей из которых 5 находилось на острове Самойловский и одна на острове Тит-Ары

Пробная площадь № 1 заложена на о.Самойловском (N 72°22'7.25 E 126°29'63.66), в области сухой тундры с преобладанием *Dryas punctata*. Мохово-лишайниковый покров – проективное покрытие 70%. Средняя глубина сезонно-талого слоя составляет 50 см.

Пробная площадь №2 заложена на о. Самойловском (N 72°22'11.6 E 126°30'13.7), в области влажной тундры с преобладанием *Vaccinium uliginosum*, *Salix polaris*. Мохово-лишайниковый покров – проективное покрытие менее 20%. Средняя глубина активного слоя 70 см.

Пробная площадь № 3 заложена на о. Самойловском (N 72°22'12.92 E 126°30'3.07), в области влажной тундры, окружающей полигон с низким центром, занятым водой. С преобладанием *Carex rariflora*. Мохово-лишайниковый покров – проективное покрытие менее 15%. Средняя глубина активного слоя 40 см.

Пробная площадь № 4 заложена на о. Самойловском (N 72°22'48.1 E 126°28'44.3), в области осоко-зеленомошной топи. С преобладанием *Carex rariflora*. Мохово-лишайниковый покров – проективное покрытие менее 10%. Средняя глубина активного слоя 60 см.

Пробная площадь № 5 заложена на о. Самойловском (N 72°22'42.1 E 126°28'28.8), в области кустарничковых зарослей, умеренно увлажненной тундры. С преобладанием *Salix polari*. Мохово-лишайниковый покров – проективное покрытие менее 10%. Средняя глубина активного слоя 40 см.

Пробная площадь № 6 заложена на о. Тит-Ары.

Глубина активного слоя измерялся отдельно для каждого образца в месте его произрастания с помощью металлического щупа.

## **2.2. Лабораторные инкубационные эксперименты**

Потребление метана в консорциумах мхов и лишайников и ассоциированных с ними микроорганизмов исследовали в лабораторных условиях, в инкубационных экспериментах, с использованием газового

анализатора Picarro 2201-i (Picarro Inc., USA). Метанотрофная активность контролировалась по смещению изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане.

Образцы помещались в отдельные контейнеры, которые подключались к газоанализатору Picarro 2201-i (Picarro Inc., USA). Забор образцов воздуха из контейнеров проводился в 3 этапа, непосредственно сразу после помещения образца в контейнер, через 4 и 24 часа.

При исследовании экосистем Прибайкалья в предварительном эксперименте мхи и лишайники из исследуемых пробных площадей были разделены на консорциумы мхов и лишайников, произрастающих на мерзлотных и не мерзлотных почвах, всего 7 образцов (табл. 1).

Таблица 1 – Описание образцов по местообитаниям

| № образца | Пробная площадь (Пп) | Описание                          |
|-----------|----------------------|-----------------------------------|
| 1         | 2                    | Лишайники на не мерзлотных почвах |
| 2         | 2                    | Мхи на не мерзлотных почвах       |
| 3         | 1                    | Мхи на мерзлотных почвах          |
| 4         | 3                    | Мхи на мерзлотных почвах          |
| 5         | 3                    | Лишайники на мерзлотных почвах    |
| 6         | 4                    | Мхи на мерзлотных почвах          |
| 7         | 1                    | Эпифиты на деревьях               |

После определения метанотрофной способности исследуемых образцов, был произведено разделение образцов по видовому составу мхов и лишайников. Видовая принадлежность проводилась старшим научным сотрудником ИЛ СО РАН, к.б.н. Кривоноговым Л.В. Были определены *Dicranum polysetum*, *Pleurozium schreberi*, *Cladonia rangiferina*, *Cladonia arbuscula*, *Cetraria laevigata*, *Rhytidium rugosum*, *Dicranium sp.* Некоторые виды повторялись в образцах с разных пробных площадей, так что всего

было выделено 14 образцов (табл. 2), которые также исследовались в инкубационных экспериментах, описанных выше.

Таблица 2 – Встречаемость мхов и лишайников на пробных площадях.

| Виды<br>Образец, описание         | <i>Dicranum polysetum</i> | <i>Pleurozium schreberi</i> | <i>Cladonia rangiferina</i> | <i>Cladonia arbuscula</i> | <i>Cladonia stellaris</i> | <i>Cetraria laevigata</i> | <i>Rhytidium rugosum</i> | <i>Dicranium sp</i> |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|
| Лишайники на не мерзлотных почвах |                           |                             | +                           | +                         | +                         |                           |                          |                     |
| Мхи на не мерзлотных почвах       | +                         | +                           |                             |                           |                           |                           |                          |                     |
| Мхи на мерзлотных почвах          | +                         |                             |                             |                           |                           |                           |                          |                     |
| Мхи на мерзлотных почвах          | +                         | +                           |                             |                           |                           |                           |                          |                     |
| Лишайники на мерзлотных почвах    |                           |                             |                             | +                         |                           | +                         |                          | +                   |
| Мхи на мерзлотных почвах          |                           | +                           |                             |                           |                           |                           | +                        |                     |
| Эпифиты на деревьях               |                           |                             |                             |                           |                           |                           |                          |                     |

Образцы, собранные на пробных площадях в дельте р. Лена также были разделены на отдельные виды мхов и лишайников. Определены *Aulacomnium palustre*, *Hylocomium alaskensis*, *Rhytidium rugosum*, *Flavocetraria cucullata*. Некоторые виды повторялись в образцах с разных пробных площадей, в общей сложности было выделено 15 образцов.

## 2.3 Выделение метанотрофных микроорганизмов и оценка их метанотрофной активности

### 2.3.1 Получение накопительных и чистых культур

Было приготовлено 7 накопительных культур с образцами мхов и лишайников (табл. 3), собранных в Прибайкалье и дельте реки Лена, островах Самойловский и Тит-Ары.

Таблица 3 – Виды мхов и лишайников использованных для приготовления накопительных культур

| Образец мха/лишайника        | Регион сбора    |
|------------------------------|-----------------|
| <i>Cetraria cuculata</i>     | о. Самойловский |
| <i>Cladonia stellaris</i>    | Прибайкалье     |
| <i>Dicranum sp.</i>          | Прибайкалье     |
| <i>Rhytidium rugosum</i>     | Прибайкалье     |
| <i>Sphagnum compactum</i>    | о. Тит-Ары      |
| <i>Dicranum polisetum</i>    | о. Самойловский |
| <i>Tomenthypnum Ivitnens</i> | о. Самойловский |

В качестве накопительной среды использовалась среда “К” [14], состава: (г/л)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 2,  $\text{NaCl}$  - 0,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,025,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,002, вода дистиллированная

Среду разливали по 200 мл в колбы Эрленмейера (500 мл), и стерилизовали при 1 атм. 1 ч. После стерилизации в колбы в асептических условиях вносился метанол (0,5 % об. /об.). После чего в колбы в асептических условиях помещались образцы мхов и лишайников.

Колбы инкубировались при 29°C на роторной качалке (180 об/мин), в течение 14 дней.

Полученная культуральная жидкость высевалась методом истощающего посева на чашки Петри на плотную питательную среду, основой которой являлась агаризованная среда К с добавлением метанола. Чашки инкубировались при температуре 29°C в течение 2-3 дней.



Выросшие на чашках колонии микроскопировались (рис. 6). Грам-принадлежность определялась методом Греггерсена.

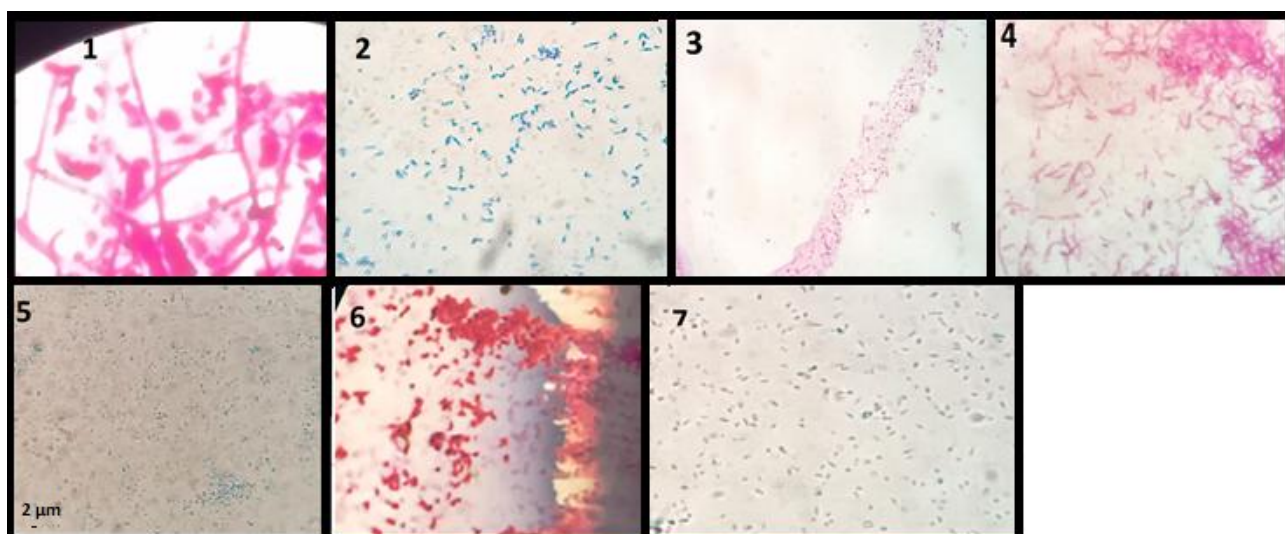


Рисунок - 6 Микроскопия культур метанотрофных бактерий. Штаммы: 1 - Cetr 1, 2 - Sp H2, 3 - D 3, 4 - RH 4, 5 - SP H5Б, 6 - D P6, 7 - TI 7

Видовая принадлежность выделенных штаммов проводилась в ЦКП "Геномика" СО РАН (ИХБФМ, г. Новосибирск) методом исследования первичной структуры участка гена 16S прокариот методом Сэнгера.

### **2.3.2 Измерение метанотрофной активности выделанных культур**

Потребление метана чистыми культурами исследовали в лабораторных условиях, в инкубационных экспериментах, с использованием газового анализатора Picarro 2201-i (Picarro Inc., USA). Метанотрофная активность контролировалась по смещению изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане.

Колонии смывались с поверхности агара дистиллированной водой объёмом 20 мл во флаконы объёмом 400 мл, которые затем подсоединялись к газоанализатору Picarro 2201-i (Picarro Inc., USA). Забор образцов воздуха из флаконов проводился в 4 этапа: непосредственно сразу после помещения образца в контейнер и через 2,5, 5.0 и 7,5 минут.

Помимо исходных чистых культур, в целях контроля были произведены измерения чистой дистиллированной воды, дистиллированной воды после ее контакта с чистой плотной агаризованной средой, содержащей метанол, и двух заведомо известных штаммов бактерий не способных в метанотрофии (*Bacillus cereus*, *Kocurita rosea*).

## Глава 3. Результаты исследований

### 3.1. Динамика потребления метана ассоциантами мхов и лишайников экосистем Прибайкалья

В ходе проведения лабораторных инкубационных экспериментов были получены количественные оценки скорости потребления метана микроорганизмами, ассоциированными со мхами и лишайниками.

В предварительных экспериментах показано, что наибольшей метанотрофной способностью обладали консорциумы мхов с микроорганизмами с пробных площадей, расположенных на мерзлотных почвах, а также эпифитные консорциумы (табл. 3).

Таблица 3 - Динамика выделения-потребления метана и смещения изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане в консорциумах мхов и лишайников исследуемых пробных площадей

| Пп | Образец, описание                 | $\text{CH}_4$ , ppm |      |      | $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ , ‰ |     |      |
|----|-----------------------------------|---------------------|------|------|---------------------------------------|-----|------|
|    |                                   | 0 ч                 | 4 ч  | 24 ч | 0 ч                                   | 4 ч | 24 ч |
| 2  | Лишайники на не мерзлотных почвах | 1,97                | 1,96 | 2,00 | -53                                   | -31 | -15  |
| 2  | Мхи на не мерзлотных почвах       | 1,97                | 1,95 | 1,88 | -57                                   | -30 | -19  |
| 1  | Мхи на мерзлотных почвах          | 1,97                | 1,98 | 1,90 | -47                                   | -14 | 156  |
| 3  | Мхи на мерзлотных почвах          | 1,97                | 1,96 | 1,93 | -51                                   | -22 | 118  |
| 3  | Лишайники на мерзлотных почвах    | 1,97                | 1,98 | 1,90 | -54                                   | -42 | -26  |
| 4  | Мхи на мерзлотных почвах          | 1,97                | 1,89 | 1,90 | -48                                   | -40 | -30  |
| 1  | Эпифиты на деревьях               | 1,97                | 1,93 | 1,54 | -46                                   | 15  | 205  |

Исследования метанотрофной способности консорциумов микроорганизмов и отдельных видов мхов и лишайников, на которые были разделены все исследуемые образцы (кроме эпифитов на деревьях) показали, что наряду с микроорганизмами-ассоциантами мхов *Rhytidium rugosum* и

*Dicranum polysetum* высокой метанотрофной способностью обладали ассоцианты лишайников *Cladonia stelar* и *Cetraria laevigata* (табл. 4).

Таблица 4 - Динамика выделения-потребления метана и смещения изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане в консорциумах отдельных представителей мхов и лишайников исследуемых пробных площадей

| Пп | Образец                     | CH <sub>4</sub> , ppm |      |      | $\delta^{13}\text{C}$ -CH <sub>4</sub> , ‰ |     |      |
|----|-----------------------------|-----------------------|------|------|--------------------------------------------|-----|------|
|    |                             | 0 ч                   | 4 ч  | 24 ч | 0 ч                                        | 4 ч | 24 ч |
| 2  | <i>Cladonia stelar</i>      | 1,90                  | 1,83 | 1,82 | -41                                        | -11 | -5   |
| 3  | <i>Cetraria laevigata</i>   | 1,90                  | 1,07 | 1,12 | 73                                         | 780 | 6900 |
| 4  | <i>Rhytidium rugosum</i>    | 1,90                  | 1,92 | 1,88 | -60                                        | -58 | -47  |
| 2  | <i>Dicranum polysetum</i>   | 1,90                  | 1,84 | 1,81 | -59                                        | -55 | -42  |
| 1  | Эпифиты на деревьях         | 1,90                  | 1,88 | 1,87 | -56                                        | -58 | -22  |
|    | Контроль (пустой контейнер) | 2,00                  | 2,00 | 1,91 | -50                                        | -51 | -52  |

### 3.2. Оценка зависимости интенсивности метанотрофной активности от мощности сезонно-талого слоя

В ходе проведения лабораторных инкубационных экспериментов были получены количественные оценки скорости потребления метана микроорганизмами, ассоциированными со мхами и лишайниками, в зависимости от глубины активного слоя почвы, на которой они произрастали.

В предварительных экспериментах показано, что существует зависимость степени метанотрофии в некоторых видах мхов и лишайников, от глубины активного слоя почвы, на которой они произрастали. Так при исследовании *Rhytidium rugosum*, имеется четкая зависимость увеличения степени метанотрофии от глубины активного слоя (Табл. 5). Напротив, исследование мха *Hylocomium alaskensis*, не показало зависимости величины метанотрофии от глубины активного слоя (Табл. 6).

В образцах лишайника *Flavocetraria cucullata* так же не было продемонстрировано зависимости метанотрофной активности от мощности

сезонно-талого слоя, как и выраженной метанотрофной активности в целом (Табл. 7).

Таблица 5 – Динамика выделения-потребления метана и смещения изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане, в *Rhytidium rugosum*

| Глубина сезонно-талого слоя, см | CH <sub>4</sub> , ppm |      |      | $\delta^{13}\text{C}$ -CH <sub>4</sub> , ‰ |     |      |
|---------------------------------|-----------------------|------|------|--------------------------------------------|-----|------|
|                                 | 0 ч                   | 4 ч  | 24 ч | 0 ч                                        | 4 ч | 24 ч |
| 45                              | 1,88                  | 1,87 | 1,87 | -58                                        | -55 | -10  |
| 56                              | 1,87                  | 1,87 | 1,78 | -57                                        | -50 | 2    |
| 82                              | 1,88                  | 1,90 | 1,87 | -55                                        | -44 | 15   |

Таблица 6 – Динамика выделения-потребления метана и смещения изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане, в *Hylocomium alaskensis*

| Глубина активного слоя, см | CH <sub>4</sub> , ppm |      |      | $\delta^{13}\text{C}$ -CH <sub>4</sub> , ‰ |     |      |
|----------------------------|-----------------------|------|------|--------------------------------------------|-----|------|
|                            | 0 ч                   | 4 ч  | 24 ч | 0 ч                                        | 4 ч | 24 ч |
| 22                         | 1,92                  | 1,92 | 1,89 | -50                                        | -46 | -22  |
| 40                         | 1,92                  | 1,93 | 1,89 | -56                                        | -46 | -26  |
| 45                         | 1,91                  | 1,91 | 1,88 | -58                                        | -49 | -26  |

Таблица 7 – Динамика выделения-потребления метана и смещения изотопного состава  $\delta^{13}\text{C}$  в метане, в *Flavocetraria cucullata*

| Глубина активного слоя, см | CH <sub>4</sub> , ppm |      |      | $\delta^{13}\text{C}$ -CH <sub>4</sub> , ‰ |     |      |
|----------------------------|-----------------------|------|------|--------------------------------------------|-----|------|
|                            | 0 ч                   | 4 ч  | 24 ч | 0 ч                                        | 4 ч | 24 ч |
| 45                         | 1,87                  | 2,03 | 1,98 | -54                                        | -53 | -53  |
| 48                         | 1,87                  | 1,91 | 1,99 | -56                                        | -58 | -38  |
| 55                         | 1,91                  | 1,91 | 1,88 | -58                                        | -49 | -26  |
| 80                         | 1,86                  | 1,94 | 1,96 | -51                                        | -60 | -44  |

### 3.3 Оценка метанотрофной активности чистых культур

В ходе проведения лабораторных инкубационных экспериментов были получены количественные оценки скорости потребления метана микроорганизмами. В результате измерений определено, что все выделенные штаммы обладают метанотрофной активностью. Так же было произведено измерение известного штамма *Bacillus cerves* не имеющего способности к окислению метана (рис. 7).

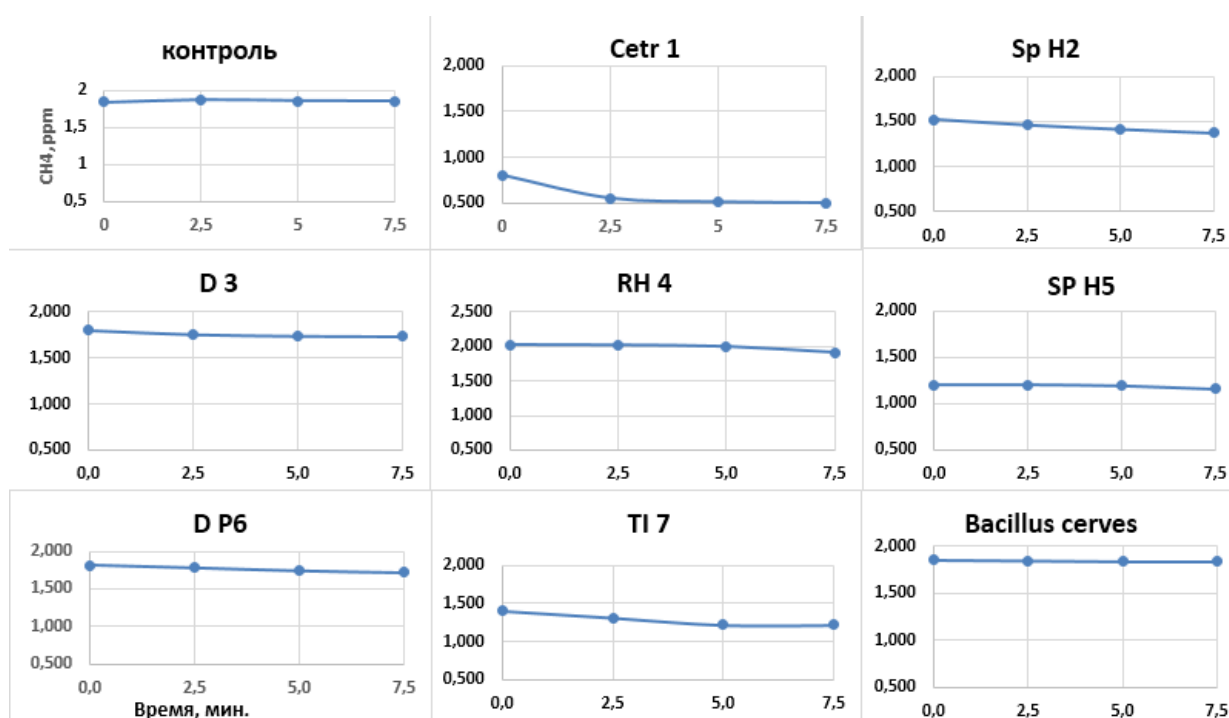


Рисунок 7 – Динамика потребления метана выделенными штаммами

### 3.4. Характеристика полученных штаммов и их молекулярный анализ на основе 16S рРНК

На основании полученных последовательностей 16S рРНК, использовались базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) найдены ближайшие гомологи, составлены характеристики штаммов (табл. 8) и построено филогенетическое дерево (рис. 8).

Таблица 8 – Характеристика штаммов, степень гомологии полученных штаммов с последовательностями, включенными в базу данных NCBI GenBank.

| Штаммы | Характеристика                                                                                                                                                      | Штамм, уже существующий в базе данных NCBI (код)                                                                   | Гомология |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Cetr 1 | Колонии круглые, размером от 1 до 2 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет кремовый, консистенция твердая. Нитчатая форма клеток, грамположительные.            | <i>Pantoea ananatis</i> strain 1846 (NR 026045)<br>Фитопатоген, выделен из почвы.                                  | 97.58%    |
| Sp H2  | Колонии круглые, размером от 1 до 2 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет кремовый, консистенция мягкая. Мелкие, подвижные палочки, грамотрицательные.         | <i>Paraburkholderia phenazinium</i> strain A 1 (NR 029212.1), выделена из почвы в Великобритании.                  | 98.07%    |
| D 3    | Колонии круглые, размером от 1 до 2 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет кремовый, консистенция мягкая. Мелкие, не подвижные палочки, грамотрицательные.      | <i>Caballeronia sordidicola</i> strain S5-B, (NR 104563.1), выделен из <i>Phanerochaete sordida</i> в Южной Корее. | 98.58%    |
| RH 4   | Колонии круглые, размером от 2 до 3 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет желтый, консистенция мягкая. Длинные, подвижные палочки, грамотрицательные.          | <i>Pantoea ananatis</i> strain 1846 (NR 026045)<br>Фитопатоген, выделен из почвы.                                  | 92.64%    |
| SP H5  | Колонии круглые, размером от 1 до 2 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет кремовый, консистенция мягкая. Средние, подвижные палочки, грамотрицательные.        | <i>Paraburkholderia phytofirmans</i> (NR_102845.1)<br>Эндифит, выделены из корней растений в Канаде.               | 98.30%    |
| D P6   | Колонии круглые, размером от 1 до 2 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет кремовый, консистенция мягкая. Мелкие, подвижные палочки, грамотрицательные.         | <i>Rhodanobacter spathiphylli</i> B39(NR_042434.1)<br>Выделены из почвы и растений в Бельгии.                      | 94.30%    |
| TI 7   | Колонии круглые, размером от 1 до 2 мм, края ровные, поверхность гладкая, цвет желтый, консистенция мягкая. Среднего размера, подвижные палочки, грамположительный. | <i>Caballeronia udeis</i> strain Hg2 (NR 125500.1), выделен из нафталин загрязнённых почв в США.                   | 98.65%    |

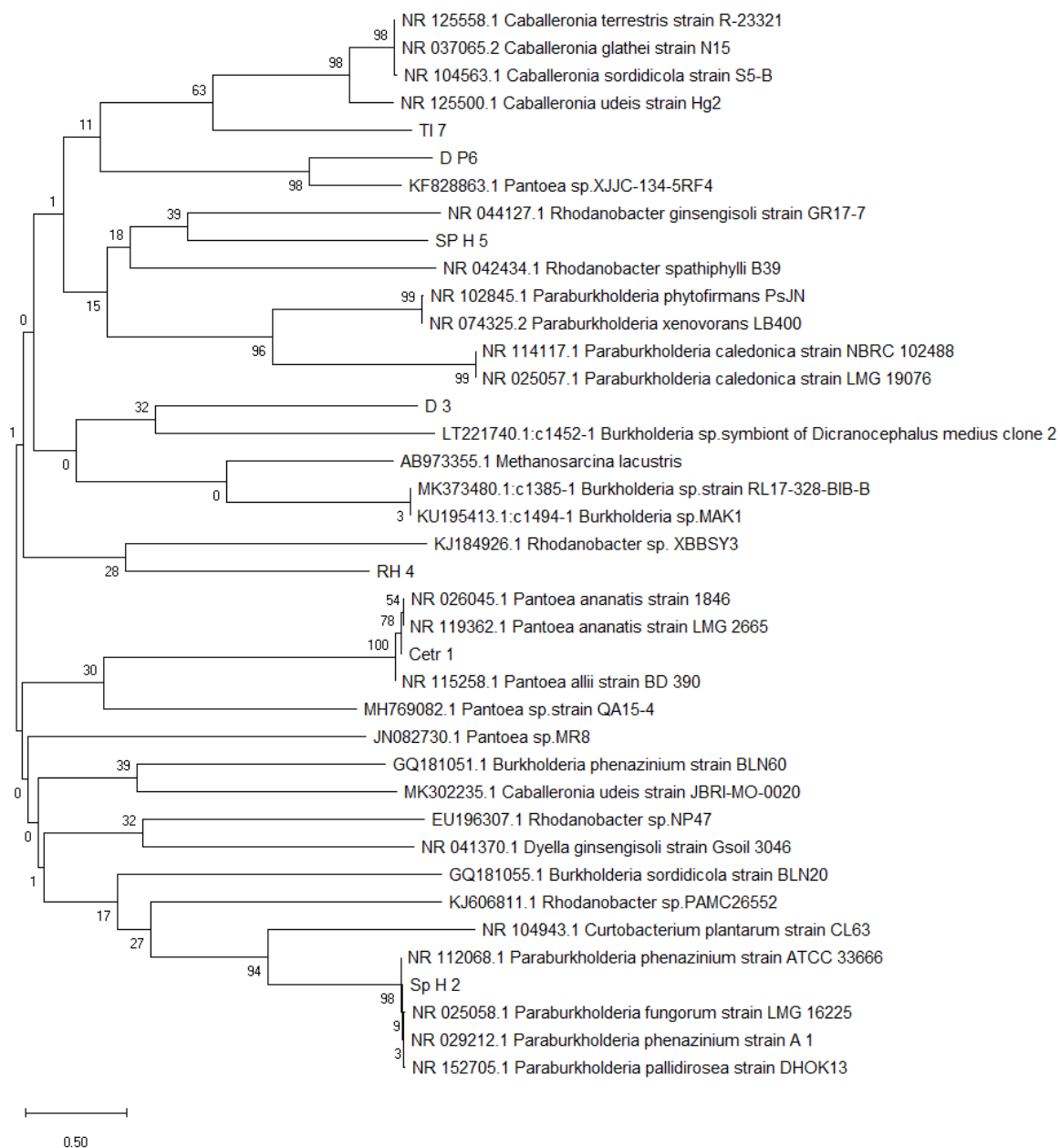


Рисунок 8 – Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. Дерево построено в программе MEGA-X

Сравнение полученных из ЦКП Геномика последовательностей с таковыми в базе данных GenBank мы осуществляли с использованием программы Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). По результатам исследования первичной структуры участка гена 16S прокариот образцов чистых культур



методом Сэнгера были идентифицированы следующие штаммы: штамм № 1 имеет ближайший гомолог *Pantoea ananatis* с процентной схожестью в 97.58%, штамм № 2 имеет ближайший гомолог *Caballeronia sordidicola* с процентной схожестью в 98.58%, штамм № 3 имеет ближайший гомолог *Rhodanobacter spathiphylli* с процентной схожестью в 94.30%, штамм № 4 имеет ближайший гомолог *Caballeronia udeis* с процентной схожестью в 98.65%.

## Выводы

1. В лабораторных инкубационных экспериментах было показано, что метанотрофной активностью в экосистемах Прибайкалья обладают как микроорганизмы-ассоцианты мхов, так и ассоцианты лишайников. Причем, метанотрофная активность консорциумов мхов выше, чем таковая консорциумов лишайников.

2. Показано, что метанотрофная активность ассоциантов мхов мерзлотных регионов Прибайкалья выше, чем немерзлотных регионов данной экосистемы.

3. Несмотря на выявленную тенденцию к росту окисления метана ассоциантами некоторых мхов с увеличением мощности деятельного слоя почв, на которых они произрастают, невозможно однозначно судить о наличии прямой зависимости метанотрофной активности в консорциумах мхов и лишайников от мощности сезонно талого слоя.

4. Было выделено и идентифицировано 7 штаммов метанотрофных бактерий-ассоциантов: штамм Cetr 1 ближайший гомолог *Pantoea ananatis* 1846 (97.58%), штамм Sp H2 - ближайший гомолог *Paraburkholderia phenazinium* A 1 (98.07%), штамм D 3 - ближайший гомолог *Caballeronia sordidicola* S5-B (98.58%), штамм RH 4 - ближайший гомолог *Pantoea ananatis* 1846 (92.64%), штамм SP H5 - ближайший гомолог *Paraburkholderia phytofirmans* (98.30%), штамм D P6 - ближайший гомолог *Rhodanobacter spathiphylli* (94.30%), штамм TI 7 - ближайший гомолог *Caballeronia udeis* Hg2 (98.65%).

5. Метанотрофная способность исследуемых штаммов ассоциантов мхов и лишайников составляла от 0,005 ppm CH<sub>4</sub> мин<sup>-1</sup> до 0,040 ppm CH<sub>4</sub> мин<sup>-1</sup>. Наибольшей метанотрофной способностью обладал штамм Cetr 1, а наименьшей SP H5.

## Список литературы

1. Бажин Н., М. МЕТАН В АТМОСФЕРЕ Новосибирский государственный университет // Соросовский образовательный журнал.2000.
2. Гаврилова М.К. Современный климат и вечная мерзлота на континентах // Новосибирск. Наука.1981.С.112.
3. Гальченко В.Ф. Сульфатредукция, метанообразование и метаноокисление в различных водоемах оазиса Бангер Хиллс, Антарктида // Микробиология.1994.Т.63(4).С.683- 698.
4. Гальченко В.Ф, Большианов Д.Ю, Черных Н.А, Андерсен В. Бактериальный процессы фотосинтеза и темновой ассимиляции углекислоты в озерах Оазиса Бангер Хиллс, Восточная Антарктида // Микробиология.1995.Т.64.С. 833-844.
5. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии // М.: ГЕОС. 2001. 500с.
6. Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р. Микробный синтез экзополисахаридов на основе C1-C2 соединений // Киев:Наукова думка.1992.С.212.
7. Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Кулырова А.В., Заварзина Д. Г., Жилина Т. Н. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озёр Юго-Восточного забайкалья // Микробиология.1999.Т.68.№.5.с.664-670.2.С.212.
8. Ешинимаяев Б.Ц., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Метанотроф II типа, выделенный впервые из содового озера// Микобиология. 2008. Т. 77. №5. С.704-707
9. Заварзин Г.А. Алкалофильные микробные сообщества // Труды Института микробиологии им.С.Н. Виноградского / Ред.Гальченко В.Ф.М: Наука.2007.Т14.С.58-87

10. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Кевбрин В.В. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие // Микробиология. 1999. т.68. №5. С.789-800
11. Захаренко А.С., Пименов Н.В., Иванов В.Г. и др. Окисление метана в водные толще районы газо- и нефтепроявлений Среднего и Южного Байкала // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 98—106.
12. Ривкина Е.М., Краев Г.Н., Кривушин К.В., Лауринавичюс К.С., Федоров Давыдов Д.Г., Холодов А.Л., Щербакова В.А., Гиличинский Д. А. МЕТАН В ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО СЕКТОРА АРКТИКИ // Криосфера Земли. 2006.т. X.№ 3.С. 23–41
13. Слободкин Ф.И., Заварзин Г.А. Образование метана в галофильных цианобактериальных матах лагун озера Сиваш // Микробиология. Т.61. № 2.1992.С.294-299.
14. Троценко Ю. А., Хмеленина В. Н. Экстремофильные метанотрофы // Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН.2008.С.206.
15. Тюрин В.С., Гальченко В.Ф. Субмикроскопическое строение мембранного аппарата метанотрофных бактерий // Микробиология.1976.Т.45. № 3.С.503-506.
16. Четина Е.В., Сузина Н.Е., Фихте Б.А., Троценко Ю.А. Влияние условий культивирования на организацию мембранного аппарата *Methylomonas methnaica* // микробиология.1988.Т.55. №4.С.539-542
17. Anthony C. The biochemistry of Methylootrophs // Academic Press, New York 1982.
18. Bodrossy L., Holmes E.M., Holmes A.J., Kovács K.L., Murrell J.C. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov // Archives of Microbiology. December.1997.V.168.I.6.P.493–503.
19. Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C. J. et al. // Nature. 2000. V. 407. P. 623—626.

20. Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1993. V. 43. P. 735-753.

21. Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., McMeekin T.A. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice // *Appl Environ Microbiol.* 1997. Aug. 63(8):3068-78.

22. Conrad R., Frenzel P., Cohen Y. Methane emission from hypersaline microbial mats: lack of aerobic methane oxidation activity // *FEMS Microbiol Ecology.* April. 1995. 16 (4):P.297-305.

23. Ciais P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., Chhabra A., DeFries R., Galloway J., Heimann M., Jones C., Le Quéré C., Myneni R.B., Piao S., Thornton P. Carbon and other biogeochemical cycles // *Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 2013. P 465–570.

24. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Bares A.M., Panikov N.S., Tiedje J.M., *Int J. Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs // *Evol Microbiol.* 2000. May. 50. Pt. 3:955-69.

25. Gorham E. Northern peatlands –role in the carbon –cycle and probable responses to climatic warming // *Ecological Applications.* 1991. 1. P.182-195.

26. Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // *Microbiol Rev.* 1996 Jun. 60(2):P.439-71.

27. Grant W.D., Jones B.E. Alkaline environments // *Encyclopaedia of Microbiology.* 2000. Vol 1, 2. Academic Press, New York. P126–133.

28. Heyer J., Berger U., Hardt M., Dunfield P.F. *Methylohalobius crimeensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, methanotrophic bacterium

isolated from hypersaline lakes of Crimea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1817-1826.

29. Hirayama H., Fuse H., Abe M., Miyazaki M., Nakamura T., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylomarinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1073-1082

30. Hirayama H., Sunamura M., Takai K., Nunoura T., Noguchi T., Oida H. Culture-dependent and -independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 7642-7656.

31. Hiroyuki Iguchi., Hiroya Yurimoto., Yasuyoshi Sakai. Soluble and particulate methane monooxygenase gene clusters of the type I methanotroph *Methylovulum miyakonense* HT12. // *FEMS Microbiology Letters.* V.312.1 November 2010. P.71–76.

32. Lin J.L., Radajewski S., Eshinimaev B.T., Trotsenko Y.A., McDonald I.R., Murrell J.C. Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikalian soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing // *Environ. Microbiol.* 2004. V.6. P.1049-1060.

33. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V.N., Kotelnikova S., Holmquist L., Pedersen K., Trotsenko Y.A. *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden // *Syst. Appl. Microbiol.* 1999. V. 22. P. 565-572.

34. Karser H. Über die Oxydation des Wasserstoffes und des Methans durch Mikroorganismen (the oxidation of hydrogen and methane by microorganisms) // *Ztsch. Landw. Versuchsw. in Osterreich.* 1905. V.8. P.789-792.

35. Knief C., Lipski A., Dunfield P.F. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 6703-6714

36. Knoblauch, C., O. Spott, S. Evgrafova, L. Kutzbach, and E.-M. Pfeiffer. Regulation of methane production, oxidation and emission by vascular plants and

bryophytes in ponds of the northeast Siberian polygonal tundra // J. GEOPHYS. RES. BIOGEOSCI. 2015. № 120. P. 2525-2541.

37. Liebner S., Zeyer J., Wagner D., Schubert C., Pfeiffer E., Knoblauch. Methane oxidation associated with submerged brown mosses reduces methane emissions from Siberian polygonal tundra//Journal of Ecology.2011.99.P.914–922.

38. Matthews E., Fung I. Methane emission from natural wetlands: global distribution, area, and environmental characteristics of sources. // Global Biogeochemical Cycles. 1987. V.1. P. 61-86.

39. Semrau J.D., DiSpirito A.A., Yoon S. Methanotrophs and copper.// FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. P. 496-531.

40. Sohngen N.L. Uber bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebrauchen // Parasitenkd. Infectionskr. Abt. – 1906. – No.2.15. – P.513–517.

41. Sokolov Y., A. Trotsenko A., P. Methane consumption in (hyper) saline habitats of Crimea (Ukraine)// FEMS Microbiology Ecology.V.18.I.4. December.1995.P.299–303.

42. Sorokin D.Y., Jones B.E., Kuenen J.G. (2000). A novel obligately methylotrophic, methane-oxidizing Methylomicrobium species from a highly alkaline environment. Extremophiles. V.4.P.145-155.

43. E. A. G. Schuur E. A. et al. The effect of permafrost thaw on old carbon release and net carbon exchange from tundra // Nature. 2009. -Vol. 459. P. 556-559.

44. Raghoebarsing A. A., Arjan P. et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // Nature. 2006. V. 440. P. 918—921.

45. Raghoebarsing A.A., Smolders A.J.P., Schmid M.C.,Rijpstra W.I.C., Wolters–Arts M.,Derksen J.M. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. //Nature. 2005.V.436.P.1153–1156.

46. Ruby Ponnudurai., Manuel Kleiner., Lizbeth Sayavedra. Et al. Metabolic and physiological interdependencies in the *Bathymodiolus azoricus* symbiosis // *Microbial ecology*. 2016. V.11.P. 463–477.

47. Theodose T.A., Bowman W.D. Nutrient availability, plant abundance, and species diversity in two alpine tundra communities // *Ecology*. 1997. V. 78.

48. DROZD J.W., HIGGINS I.J. Energy Coupling in *Methylosinus trichosporium* // *Journal of general microbiology*. March.1977.P.229-232.

49. Wang F. P., Zhang Y., Chen Y. et al. Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways // *ISME J*. 2014. V. 8. P. 1069—1078.

50. Wagner D. A., Gattinger A., Embacher E. M. Methanogenic activity and biomass in Holocene permafrost deposits of the Lena Delta, Siberian Arctic, and its implication for the global methane budget / D. A Wagner, // *Global Change Biology*. -2007. -Vol. 13(5). -P. 1089–1099.

51. Warneck P. *Chemistry of the Natural Atmosphere*// N.Y.: Acad. Press.1988. P.757.

52. Whittenbury R., Phillips K.C., Wilkinson J.G. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria // *J. Gen. Microbiol*. 1970. V. 61. P. 205–218.