

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« _____ » _____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Метаногенный потенциал микробных сообществ донных отложений реки

Енисей и его притоков

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный
руководитель

подпись

к.б.н., доцент

должность, учёная степень

Евграфова С.Ю.

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись

Децура А.Е.

инициалы, фамилия

Рецензент

подпись

с.н.с., к.б.н.

Мухоргова Л.В.

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Метаногенный потенциал микробных сообществ донных отложений реки Енисей и его притоков» содержит 54 страницы текстового документа, 12 иллюстраций, 4 таблицы, 1 приложение, 58 использованных источников.

Ключевые слова: метаногенез, метаногенные археи, речные донные отложения, р. Енисей.

Целью данной работы являлась оценка метаногенной активности и структуры сообществ архей донных отложений реки Енисей и его притоков.

В задачи исследования входило:

1. Изучить потенциальную способность выделения метана и изотопный состав углерода в метане, выделяемом микробными сообществами донных отложений реки Енисей.

2. Определить таксономическую структуру сообщества архей в исследуемых осадках

3. Исследовать количественные характеристики эмиссии метана с поверхности тундры побережья Енисейского залива.

Актуальность исследований метаногенной активности донных отложений обусловлена потенциальной возможностью эмиссии метана в атмосферу при трансформации органического вещества в анаэробных условиях речных экосистем, что может влиять на климат.

Благодарности:

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 18-05-60203 Арктика, в международной лаборатории «Экофизиология биогеоценозов криолитозоны» Института леса им. В.Н. Сукачева (ИЛ ФИЦ КНЦ СО РАН).

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Литературный обзор.....	7
1. 1. Таксономия метаногенных архей	7
1.2. Метаногенез. Механизм и типы метаногенеза.....	9
1.3. Метаногенез в пресноводных донных отложениях.....	14
1.4. Метагеномика в исследовании биоразнообразия	16
1.4.1. 16S рРНК в метагеномике	17
1.5. Метод анализа стабильных изотопов углерода в исследованиях динамики трансформации органического вещества	19
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	21
2.1. Объекты исследования	21
2.1.1. Донные отложения р. Енисей	21
2.1.2. Газовые образцы с побережья Енисейского залива	22
2.2. Метод отбора газовых проб с территории пробных площадей.....	24
2.3. Инкубационный эксперимент	26
2.4. Метаногеномный анализ	27
2.4.1. Выделение и очистка ДНК.....	28
2.4.2. Секвенирование ДНК.	28
2.4.3. Биоинформационный анализ полученных данных	29
2.4.4. Анализ первичных данных результатов секвенирования.....	29
2.4.5. ПЦР в реальном времени.....	30
Глава 3. Результаты и обсуждения.....	31
3.1. Потенциальная скорость выделения CH_4 донными отложениями	31
3.2. Анализ таксономической структуры сообществ архей донных отложений	36
3.2. Выделение метана почвенными сообществами с побережья Енисейского залива.....	40
3.3. Сравнение скорости эмиссии метана сообществами донных отложений и почв прибрежной зоны	44

ВЫВОДЫ:.....	45
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ.....	46
ПРИЛОЖЕНИЕ А	52

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается обострение проблемы глобального потепления климата, что является следствием увеличения концентрации парниковых газов в атмосфере. Метан (CH_4) является вторым наиболее распространенным парниковым газом после CO_2 , а парниковый эффект, вызываемый метаном, превышает таковой вызванный углекислым газом в 25 раз [1,2]. По данной причине все больше внимания уделяется изучению закономерностей распространения парниковых газов в различных экосистемах – в почвах вечной мерзлоты, болотах, рисовых полях, донных отложениях и во многих других экосистемах, где наблюдается поступление, накопление и трансформация большого количества органического вещества [3]. Речные донные отложения являются одним из примеров таких экосистем. Там, где отсутствуют окислители, большая часть поступившего органического вещества в анаэробных условиях разлагается метаногенными археями с образованием метана как побочного продукта метаболизма [4].

Из литературных источников известно, что около трети речных водоемов планеты продуцируют до 20% мирового потока метана, но природа этого явления и роль в нем микробных сообществ до сих пор мало изучена [5]. Так, проблема особенностей биологических процессов трансформации терригенного, то есть привнесенного (аллохтонного) органического вещества в речном стоке и прибрежных зонах, как компонента функционирования водных систем, в настоящее время до сих пор остается одним из вопросов научных дебатов [6]. Трансформация терригенного органического вещества подразумевает изменения его качественного и количественного состава. Так, с увеличением в водотоке концентрации растворимого органического углерода, доля высокомолекулярных соединений и степень ароматизации, как правило, снижаются, что обусловлено микробиологической минерализацией «свежего» аллохтонного органического углерода до неорганических форм (CO_2 и CH_4). Как следствие, поверхностные воды, чаще всего «сверхобогатены» CO_2 и CH_4 и являются их источниками в

атмосферу [7,8,9]. Также прибрежные зоны рек вносят весомый вклад в эмиссию парниковых газов, т.к. почвенное дыхание является одним из мощнейших потоков, выводящих углекислый газ и метан в атмосферу.

Вопросу поведения в речном стоке Сибири растворенных углеродсодержащих газов, как продуктов минерализации терригенного углерода, уделено явно недостаточное внимание. Исследования их концентрации и эмиссии приурочены лишь к эстуариям крупнейших рек Сибири, в то время как анализ в пресноводных водоемах, как правило, ограничивается работами на термокарстовых озерах [10].

Одной из наименее исследованных рек арктического бассейна, с позиций формирования потоков углерода, остается р. Енисей. При этом разнообразие геоморфологического строения бассейна р. Енисей, растительного и почвенного покрова позволяет использовать его в качестве природной лаборатории для выявления общих механизмов, регулирующих потоки терригенного углерода в наземных ландшафтах и его вынос в Северный Ледовитый океан.

Актуальность исследований метаногенной активности донных отложений обусловлена потенциальной возможностью эмиссии метана в атмосферу при трансформации органического вещества в анаэробных условиях речных экосистем, что может влиять на климат.

Целью данной работы являлась оценка метаногенной активности и структуры сообществ архей донных отложений реки Енисей и его притоков.

В задачи исследования входило:

1. Изучить потенциальную способность выделения метана и изотопный состав углерода в метане, выделяемом микробными сообществами донных отложений реки Енисей.

2. Определить таксономическую структуру сообщества архей в исследуемых осадках

3. Исследовать количественные характеристики эмиссии метана с поверхности тундры побережья Енисейского залива.

Глава 1. Литературный обзор

1. 1. Таксономия метаногенных архей

На протяжении десятилетий все известные метаногенные археи относили исключительно к типу *Euryarchaeota* и классифицированы вначале по пяти порядкам, а именно: *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* и *Methanopyrales*. В период между 2008 и 2012 годами к типу *Euryarchaeota* были добавлены еще два порядка метаногенов, а именно *Methanocellales* и *Methanomassiliicoccales* [11]. Метаногены, принадлежащие к разным порядкам, имеют различия в структуре клеточной стенки, составе липидов, диапазоне потребляемых субстратов и других биологических свойствах [12].

Анализ гена 16S рРНК показал, что в эволюционную ветвь метаногенов, в которую входят микроорганизмы типа *Euryarchaeota*, также входят представители порядков *Archaeoglobales*, *Halobacteriales* и *Thermoplasmatales*, которые, вероятно, произошли от общего метаногенного предка. Филогения метаногенных микроорганизмов представлены на рисунке 1; таксоны *Candidatus*, сокращенно – префикс *Ca.*, обнаружены в метагеномных последовательностях проб окружающей среды, но никогда не были культивированны [13].

Археи порядка *Methanobacteriales* широко распространены в анаэробных средах обитания – морские и пресноводные отложения, почва, желудочно-кишечные тракты животных, сточные воды и геотермальные источники. Они производят метан, используя CO_2 в качестве акцептора электрона и H_2 в качестве донора, некоторые виды могут использовать формиат. Порядок *Methanobacteriales* разделен на два семейства – *Methanobacteriaceae* и *Methanothermaceae*. Семейство *Methanobacteriaceae* состоит из трех мезофильных родов – *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera*, и одного термофильного – *Methanothermobacter* [14]. Семейство

Methanothermaceae представлено одним гипертермофильным родом *Methanothermus*, который был выделен только из термальных источников [15].

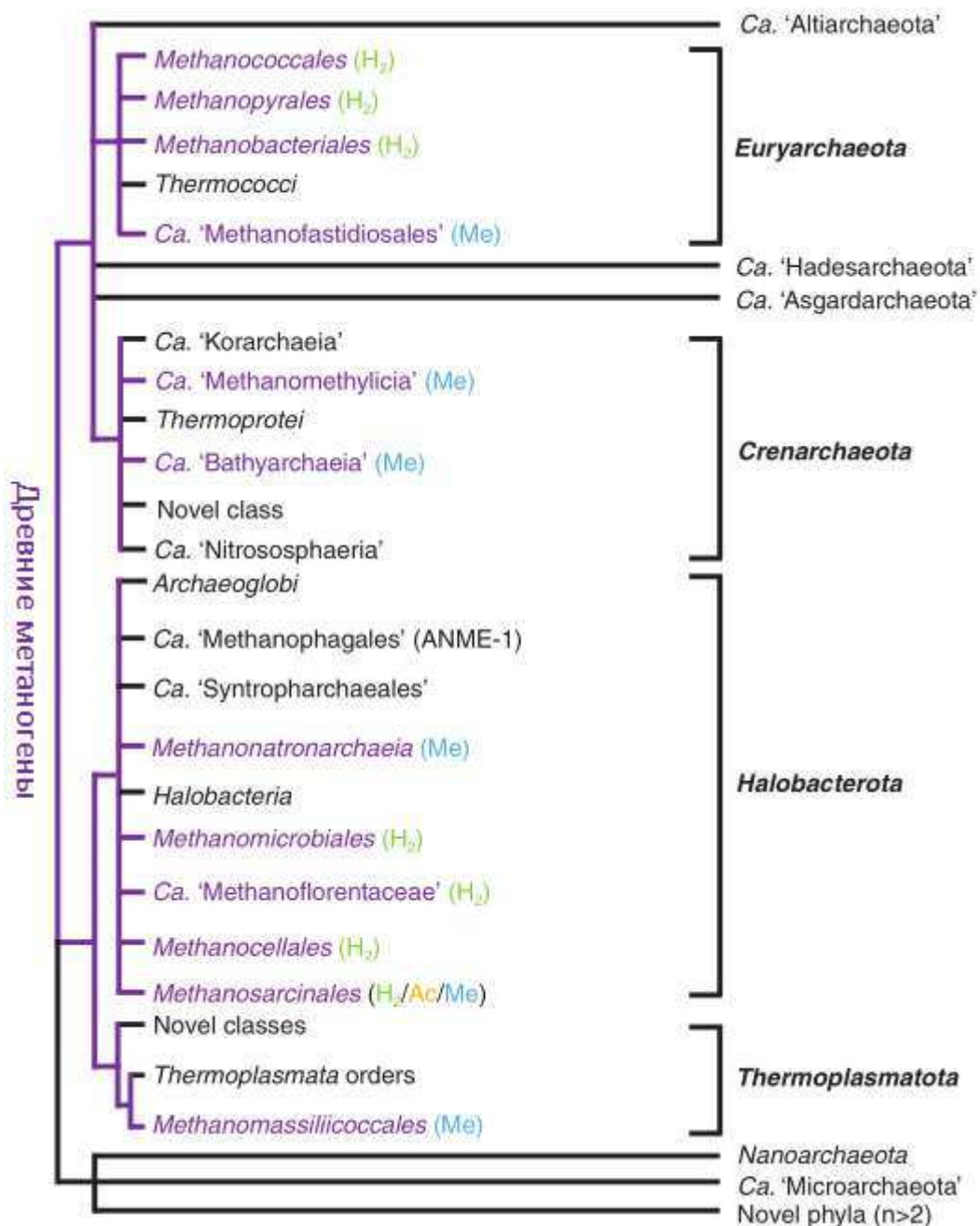


Рисунок 1 – метаногены в филогенетическом древе архей: H₂ – гидрогенотрофный; Ac – ацетокластический; Me – метилотрофный метаногенез [Lyu Z., 2018]

Представители порядка *Methanococcales* были выделены из морских сред обитания и для оптимального роста требуют присутствие морской соли. Члены

данного порядка осуществляют метаногенез, используя CO_2 как акцептор электронов и H_2 или формиат как донор. Порядок *Methanococcales* разделен на два семейства: семейство *Methanocaldococcaceae* включает два гипертермофильных рода – *Methanocaldococcus* и *Methanotorris* [14, 15]; семейство *Methanococcaceae* представлено мезофильным родом *Methanococcus* и чрезвычайно термофильным родом *Methanothermococcus* [16].

Члены порядка *Methanomicrobiales* используют CO_2/H_2 , большинство видов также способны использовать формиат и вторичные спирты в качестве доноров электронов. Они широко распространены в анаэробных средах обитания, включая морские и пресноводные отложения, сточные воды и ЖКТ животных. Порядок *Methanomicrobiales* делится на три семейства, *Methanomicrobiaceae*, *Methanospirillaceae* и *Methanocorpusculaceae* [14,15].

Члены отряда *Methanosarcinales* имеют самый широкий диапазон субстратов среди метаногенов. Они широко распространены в большинстве анаэробных сред обитания. Порядок *Methanosarcinales* делится на два семейства, *Methanosarcinaceae* и *Methanosaetaceae*. Все члены семейства *Methanosarcinaceae* способны расти с соединениями, содержащими метильную группу. Семейство *Methanosaetaceae* представлено только одним родом, *Methanosaeta*, который производит метан путем расщепления ацетатом [15].

Порядок *Methanopyrales* представлен только одним видом - *Methanopyrus kandleri*, который использует CO_2 и H_2 для метаногенеза, является гипертермофильным и обитает в морских гидротермальных системах [17].

1.2. Метаногенез. Механизм и типы метаногенеза

Образование метана является одним из доминирующих конечных путей распада органического вещества и важным биологическим процессом в круговороте веществ [3]. Все изученные метаногенные археи являются строгими анаэробами, метаногенез для них является единственным путем получения энергии. Несмотря на то, что метаболическая специализация их крайне

специфична, филогенетическая структура данных архей очень разнообразна, они представлены психрофильными, мезофильными, термофильными, галофильными и галоалкалофильными родами с различной биохимией катаболических путей [18]. Метаногенные археи завершают сложный процесс распада органического вещества в анаэробных условиях, используя в качестве основных субстратов для метаногенеза ацетат, метилированные соединения (метанол, метиламины, метилтиолы), формиат и H_2/CO_2 [18]. Таким образом в зависимости от субстрата, метаногенез может идти по следующим катаболическим путям: гидрогенотрофному, ацетокластическому и метилотрофному.

Метаногенные археи широко распространены в местах обитания, где такие акцепторы электронов, как O_2 , NO_3^- , Fe^{3+} и SO_4^{2-} , лимитированы [24]. В тех средах, где данные акцепторы присутствуют в достаточных количествах, бактерии, использующие эти субстраты, (сульфатредукторы, денитрификаторы, железоредуцирующие бактерии) вытесняют метаногенные археи [25]. Это явление, вероятно, объясняется тем, что эти соединения являются лучшими акцепторами электронов, и их восстановление термодинамически более выгодно, чем восстановление CO_2 до метана. Так в средах обитания, где высокопотенциальные акцепторы электрона присутствуют в недостаточном для микробного дыхания количестве, субстраты метаногенеза (H_2 , ацетат, формиат и др.) быстро накапливаются, как продукты брожения микроорганизмов [27]. Метаногены не позволяют этим токсичным продуктам брожения накапливаться в среде, катализируя терминальный шаг анаэробной пищевой цепи, разлагая сложные органические полимеры до CH_4 и CO_2 [26, 27]. При этом сначала сложные полимеры разлагаются первичными бродильщиками (прим. целлюлолитические бактерии), в результате чего образуются простые сахара, дисахариды, лактат, летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират) и спирты, которые затем ферментируются синтрофными бактериями до основных субстратов метаногенеза – ацетата, формиата, H_2 и CO_2 [24, 27].

В анаэробных средах водород является ключевым интермедиатом. В стандартных условиях (парциальное давление водорода равно одной атмосфере) окисление летучих жирных кислот и спиртов до ацетата и водорода является термодинамически невыгодным в сравнении с другими субстратами, и микроорганизмы, катализирующие эти реакции, не растут, а жирные кислоты и спирты могут накапливаться до токсичных концентраций. Однако, в присутствии метаногенов водород метаболизируется, что снижает его парциальное давление до 10^{-3} - 10^{-4} атмосферы и летучие жирные кислоты и спирты быстро метаболизируются. Следовательно, синтрофные бактерии зависят от ассоциации с метаногенами или другими гидрогенотрофными организмами для производства энергии. Такое взаимодействие между вторичными бродильщиками и гидрогенотрофными метаногенами является примером межвидового переноса водорода. Во многих анаэробных сообществах данный процесс является ключевым регуляторным механизмом [28].

Гидрогенотрофный метаногенез из H_2 и CO_2 обнаружен почти во всех метаногенных отрядах, за исключением *Methanomassiliicoccales*. Из-за его широкого распространения предполагается, что этот тип метаногенеза является исконной формой производства микробного метана. Археи порядков *Methanopyrales*, *Methanococcales* и *Methanobacteriales* и большинство архей порядков *Methanomicrobiales* и *Methanocellales* в основном являются гидрогенотрофами. Эти метаногены восстанавливают CO_2 до CH_4 , используя как донор электронов H_2 или формиат [18, 19].

Метаногены, метаболизирующие ацетат, являются источником 70% микробного метана [29]. Хотя основная часть микробного метана образуется из ацетата, ацетокластический метаногенез способны осуществлять представители лишь двух родов порядка *Methanosarcinales* – *Methanosarcina* и *Methanosaeta*. Археи рода *Methanosarcina* способны существовать на большинстве известных субстратах метаногенеза, что делает их в этом отношении универсалами [18]. Члены рода *Methanosaeta* напротив используют ацетат как единственный субстрат роста, к которому они имеют высокое сродство, это позволяет им

использовать ацетатный субстрат в очень низких концентрациях, поэтому зачастую они имеют высокие удельные скорости роста при пониженном содержании ацетата в среде [18, 20]. В более ранних исследованиях сообщалось, что метаногены, использующие ацетат, более чувствительны к высоким концентрациям аммиака, чем гидрогенотрофные метаногены, которые способны предотвращать рост видов *Methanosaeta*, что приводит к ингибированию образования ацетокластического метана [22]. Низкие концентрации аммиака в донных отложениях могут способствовать росту видов *Methanosaeta*. [5]

В противоположность этому метилотрофный метаногенез, который представляет собой образование метана из различных метилированных соединений, таких как метанол и метиламины, обнаружен в отрядах *Methanomassiliicoccales*, *Methanobacteriales* и *Methanosarcinales*. [11]. Классический метилотрофный метаногенез с использованием метилированных C1-соединений осуществляют археи семейства *Methanosarcinaceae*. Данный тип метаногенеза обычно преобладает в соленых местах обитания, т.к. он не способен конкурировать с сульфатредукцией (сульфатредуцирующие бактерии вытесняют метилотрофные метаногены при конкуренции за субстрат в обогащенных сульфатом соленых местообитаниях) [18]. Археи семейства *Methanosarcinaceae* являются также миксотрофами и способны использовать не только ацетат, но также H_2/CO_2 , метанол и метиламины [5].

Многие метаногенные археи полагаются на синтрофные организмы, катализирующие начальные стадии разложения CH_4 и предоставляющие CO_2/H_2 , ацетат или метилированные соединения в качестве субстратов метаногенеза [19].

Большинство ранних исследований сообщают, что ацетокластический метаногенез является доминирующим процессом образования метана в речных отложениях. Тем не менее, новые исследования показывают, что в некоторых случаях гидрогенотрофный и ацетокластический метаногенез доминируют одинаково [19], в других случаях имело место полное отсутствие образования ацетокластического метана [23]. Подобный разброс в показаниях свидетельствует о неоднозначности процессов метаногенеза.

Образующийся в анаэробных почвах и отложениях метан, должен мигрировать через кислородсодержащие среды перед выходом в атмосферу. Даже при низких концентрациях кислорода метанотрофные бактерии окисляют CH_4 до CO_2 , тем самым уменьшая выбросы CH_4 в атмосферу. Следовательно, общий поток CH_4 из водно-болотных угодий в атмосферу определяется разницей между образованием и потреблением микробного CH_4 в аэробных почвах и отложениях [16].

Основные пути образования метана, субстраты метаногенеза и осуществляющие его представители архей представлены в таблице 1.

Таблица 1 Субстраты метаногенеза

Катаболический путь образования метана	Субстрат	Представители, изотопная подпись, ‰
Гидрогенотрофный (формиатный)	Восстановление CO_2 используя H_2 , формиат, C_2 -спирты, монооксид углерода	семейства <i>Methanopyrales</i> , <i>Methanobacteriales</i> , <i>Methanococcales</i> , <i>Methanomicrobiales</i> и др
		-60 -100 ‰
Гидрогенотрофный (водородотрофный)	восстановление метильной группы с использованием H_2	Большинство метаногенов: <i>Methanocorpusculum</i> , <i>Methanothermococcus</i> , <i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanococcus</i> , <i>Methanotorris</i>
		-60 -100 ‰

Окончание таблицы 1

Катаболический путь образования метана	Субстрат	Представители, изотопная подпись, ‰
Ацетокластический (наибольший вклад метана – 70% от готовой продукции метана на Земле)	Метильная группа ацетата (карбонильная группа ацетата выступает в качестве источника электронов для восстановления метильной группы до метана)	Только представители родов <i>Methanosarcina</i> и <i>Methanosaeta</i>
		-65 -80 ‰
Метилотрофный	Диспропорционирование метилированных соединений (метильная группа окисляется до CO ₂ , являясь источником электронов для восстановления другой метильной группы)	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methermicoccus</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Methanomethylovorans</i> , <i>Methanothermobacter</i> ,
		-50 -70 ‰

1.3. Метаногенез в пресноводных донных отложениях

В донных отложениях органическое вещество часто реминерализируется в ходе сменяющихся процессов дыхания цепочкой акцепторов электронов, выстроенных в необходимой последовательности окислительных потенциалов [28]. Так сначала один акцептор (например, сульфат) почти полностью исчерпывается до того, как в весомых количествах начнет использоваться следующий (например, CO₂). Так практически все высокопотенциальные

акцепторы электрона заканчиваются сравнительно быстро, за исключением CO_2 , который редко является лимитирующим фактором, так как он является одним из основных продуктов брожения и присутствует в среде всегда в достаточном объеме. А так как многие метаногены способны использовать CO_2 в качестве субстрата метаногенеза, данное обстоятельство позволяет им доминировать во многих анаэробных средах обитания с постоянным притоком свежего органического вещества, где с его разложением в среду выделяется CO_2 [14].

Пресноводные донные осадки имеют более низкие концентрации сульфатов (100–200 мкМ), чем морские [30]. Таким образом, в пресноводных отложениях метаногенез протекает в бескислородных зонах без ингибирования и заменяет сульфатредукцию как наиболее важный конечный процесс в анаэробной деградации органического вещества. Из-за отсутствия конкуренции со стороны сульфатовосстанавливающих бактерий ацетатпщры доступны для метаногенеза и являются доминирующим субстратом.

В большинстве исследованных пресноводных средах на ацетокластический и гидрогенотрофный метаногенез приходится около 70% и 30% продукции CH_4 соответственно [31, 32]. Метаногенез из метилированных соединений незначителен, что, возможно, отражает отсутствие этих субстратов в пресноводных отложениях. В метаногенных сообществах обычно преобладают семейства *Methanosaetaceae* (ацетокластический метаногенз) и *Methanomicrobiaceae* и *Methanobacteriaceae* (гидрогенотрофный). Также могут присутствовать *Methanosarcinaceae*, использующие либо H_2 / CO_2 , либо ацетат [33].

Было исследовано несколько факторов, которые влияют на относительный вклад ацетокластического и гидрогенотрофного метаногенеза, а также на относительное содержание различных типов метаногенов в пресноводных отложениях. Во-первых, доля гидрогенотрофного метаногенеза уменьшается при низком значении pH [34]. Например, в отложениях озера Наек (pH 6,8) только 4% продукции CH_4 происходит из H_2 / CO_2 . Низкий pH дает преимущество ацетогенам, которые снижают содержание CO_2 , что ограничивает

водородотрофный метаногенез. Во-вторых, относительный вклад водородотрофного метаногенеза уменьшается с температурой, хотя абсолютная скорость ацетокластического метаногенеза также уменьшается. Этот эффект можно объяснить лучшей адаптацией ацетогенов к низким температурам. Кроме того, продуцирование H_2 синтрофными бактериями уменьшается при низкой температуре, следовательно, водородотрофный метаногенез ингибируется при из-за недостаточного количества субстрата [35]. В-третьих, относительный вклад водородотрофного метаногенеза в ряде случаев увеличивается с глубиной. Также с глубиной увеличивается относительное содержание *Methanomicrobiales*, в то время как содержание *Methanosaetaceae* уменьшается. В-четвертых, обилие других потребителей H_2 и ацетата в значительной степени влияет на метаногенные сообщества [36]. В отложениях Боденского озера присутствие сульфатовосстанавливающих бактерий, потребляющих H_2 , и отсутствие ацетогенов, вместе с низкой температурой ($4^\circ C$) приводит к 100% образованию CH_4 по ацетокластическому пути метаногенеза [37].

1.4. Метагеномика в исследовании биоразнообразия

Выделение чистых культур микроорганизмов, как правило, является первым шагом в большинстве микробиологических исследованиях. В настоящее время хорошо известно, что стандартные методы культивирования позволяют выявлять менее 1% микробного разнообразия при работе с образцами, полученными из окружающей среды (образцы почв, донных отложений, речных вод и т.п.) [38]. Из этого можно сделать вывод, что около 99% представителей природных микробных сообществ и их биогеохимические и экологические характеристики остаются неизвестными переменными в микробиологических исследованиях.

Преодолеть эту проблему удалось при помощи стремительно развивающихся молекулярно-биологических методов, которые позволяют исследовать микробиоту *in situ*, минуя шаг выделения чистых культур, в

результате этого метагеномика, как метод анализа коллективного генома сообществ микроорганизмов, смогла занять свое место в современном научном мире [39]. Главным шагом на пути развития метагеномики стала разработка методов секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), которые превосходят стандартный метод Сэнгера, предложенный в 1970-х годах по ряду показателей. Начиная с 2005-го года революционные усовершенствования технологий и методов секвенирования (разработка алгоритмов для анализа большого объема данных, развитие нанобиотехнологии, робототехники, информационных технологий, биоинформатики) способствовали развитию NGS, увеличению производительности и скорость прочтения до миллиардов пар оснований, значительно снизить стоимость, трудоемкость и время анализа [40].

1.4.1. 16S рРНК в метагеномике

У прокариот ген 16S рибосомальной РНК (рРНК) является универсальным, в геноме микроорганизмов встречается как минимум одна его копия. Он также присутствуют во всех митохондриальных геномах. Универсальность генов делает их идеальной мишенью для филогенетических исследований и таксономической классификации [41]. Вторичная структура формирует петли, последовательности некоторых из петель являются консервативными практически для всех видов бактерий, т.к. они несут жизненно важные функций, в то время как особенности гипервариабельных участков в значительной степени изменчивы и специфичны для одного или нескольких классов. Со времени изобретения ПЦР, гипервариабельные участки V1-V9 генов 16S рРНК используются для идентификации видов [42].

Принимая во внимание универсальность, уровень консервативности и всеобщую высокую популярность 16S рРНК, можно прийти к заключению, что на сегодняшний день данный ген можно считать самым исследованным геном, так несколько крупнейших международных баз данных посвящены

исключительно этому гену - RDP – Ribosomal Database Project и Silva (Pruesse, Quast, Knittel, 2007) [43].

При использовании в NGS универсальных праймеров, как правило, допускается нацеливание на один или несколько гипервариабельных областей гена 16S рРНК в одной реакции ПЦР, которая выполняется для микробной популяции в целом. Этот подход позволил охарактеризовать микробные сообщества без их выделения и культивирования. Благодаря методу глубокого секвенирования, профилирование 16S рРНК в корне изменило понимание структуры бесчисленных микробных сообществ и оказалось важным инструментом открытий, раскрывающим «микробную темную материю» нашей планеты из-за сложности или невозможности культивирования большинства видов бактерий [44].

Перечисленные выше особенности гена 16S рРНК делают его важным филогенетическим инструментом: а) он присутствует во всех микроорганизмах, что делает его универсальной мишенью для их идентификации; б) функции 16S рРНК остаются неизменными в течение длительного периода, поэтому изменения последовательности с большей вероятностью отражают случайные изменения, чем конкретные изменения, которые могут повлиять на функции молекулы, случайные изменения последовательности являются более точной мерой времени; в) ген 16S рРНК достаточно велик (приблизительно 1500 п.н.), он содержит статистически значимую информацию и состоит примерно из 50 функциональных доменов [45].

Количество доменов имеет принципиальную значимость, т.к. изменения в одном домене не сильно влияют на последовательности в других доменах. По мере увеличения количества доменов, конкретные изменения оказывают меньшее влияние на филогенетические отношения. Эти характеристики являются одной из причин, по которым Вёзе назвал рРНК «идеальными молекулярным хронометром» [46].

1.5. Метод анализа стабильных изотопов углерода в исследованиях динамики трансформации органического вещества

Углерод имеет два стабильных изотопа: “легкий” изотоп, в ядре атома которого содержится меньшее число нейтронов (C^{12}), и “тяжелый” (C^{13}). Распределение легких и тяжелых изотопов в природе равно 98,93 % и 1,07 % соответственно. Анализ изотопного состава метана (соотношение $^{12}C/^{13}C$) дает возможность оценить скорость трансформации соединения, проследить причины увеличения или снижения концентрации CH_4 в атмосфере и определить источники его поступления – будь то микробный метан или метан, образующийся в геологических процессах. Такое специфическое соотношение различных изотопов называется изотопной подписью [47].

Изотопная подпись как характеристика изотопного состава углерода представляется в виде относительной величины $\delta^{13}C$, выраженной в промилле (‰), которая рассчитывается по формуле 1 [48]:

$$\delta = (R \text{ образца} - R \text{ стандарта}) \cdot 1000 / R \text{ стандарта} \quad (1)$$

где R – отношение $^{13}C/^{12}C$ относительно международных эталонов.

Для углерода данный эталон – карбонат VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite, $\delta^{13}C = 0$). Из выражения для $\delta(^{13}C/^{12}C)$ следует, что при нулевом содержании тяжелого изотопа в смеси величина $\delta^{13}C$ будет равняться -1000‰ , а при удвоенном количестве по сравнению со стандартом $+1000\text{‰}$. Таким образом, содержание тяжелого изотопа будет выше тогда, когда величина $\delta(^{13}C/^{12}C)$ больше. Положительная величина означает обогащение образца тяжелым изотопом относительно стандарта, отрицательная – обеднение [48].

В ходе некоторых биохимических реакций происходит фракционирование (разделение) изотопов – так в процессе метаболизма происходит обогащение метана легким изотопом углерода. По мере старения исходного биологического субстрата и его химической и биологической трансформации происходит

постепенное накопление более тяжелого изотопа ^{13}C в его составе, в связи с этим законсервированный метан, поступающий с глубин 3-10 км, имеет более высокие значения величины δ . Очень высокие значения δ наблюдаются и у метана, выделяющегося при сжигании биомассы [49]. Абиогенный (образующийся при химических реакциях неорганических соединений) метан обычно обогащен, по сравнению с биогенным, изотопами ^{13}C . Среднее содержание ^{13}C в метане из различных источников представлено в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 2 – Содержание ^{13}C в метане из различных источников [Бажин, 2010]

Источник метана	Средние значения $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) \text{‰}$
Озера	-40
Рисовые поля	-62
Болота	-61
Термиты	-60
Крупный рогатый скот	-60
Добыча газа	-41
Геотермальный источник	-27
Свалки	-51
Угольные шахты	-41
Горение биомассы	-25
Метангидраты	-65

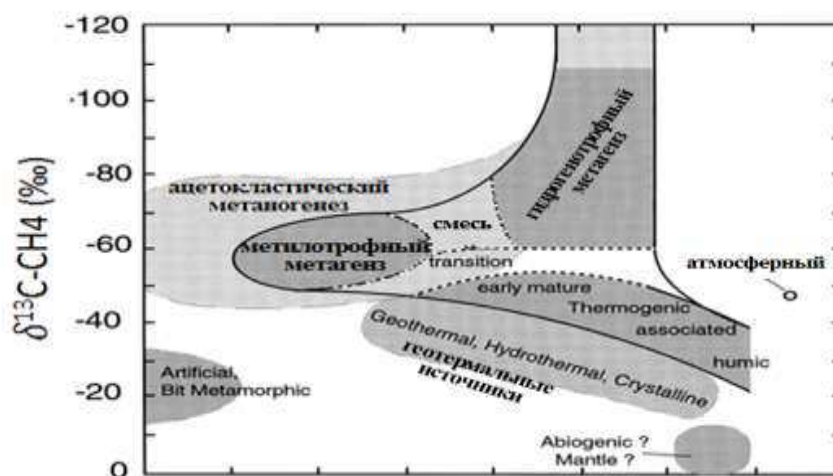


Рисунок 2 – диаграмма классификации бактериального и термогенного природного газа [Whiticar, 1999]

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Донные отложения р. Енисей

Данная работа является частью коллективного проекта РФФИ, в котором для первого этапа исследования в качестве объектов были выбраны ключевые участки в контрастных биоклиматических зонах в среднем и нижнем течении бассейна р. Енисей. Авторским коллективом проекта осуществлялся сравнительный мониторинг гидрохимического состава руслового стока водотоков и почвенные физико-химические процессы (сорбция), приводящие к иммобилизации почвенного органического вещества.

В ходе проведения экспедиционных работ, в сентябре 2018 года, было выбрано 18 ключевых участков в среднем и нижнем течении р. Енисей (рисунок 3), где были отобраны образцы донных отложений с правого и левого берегов для проведения инкубационных экспериментов и по выявлению потенциальной способности микробных сообществ донных отложений к метаногенезу, а также для метагеномного анализа.

Отобранные образцы были заморожены и транспортированы в лабораторию «Экофизиология биогеоценозов криолитозоны» в Институте леса им. Сукачёва СО РАН.

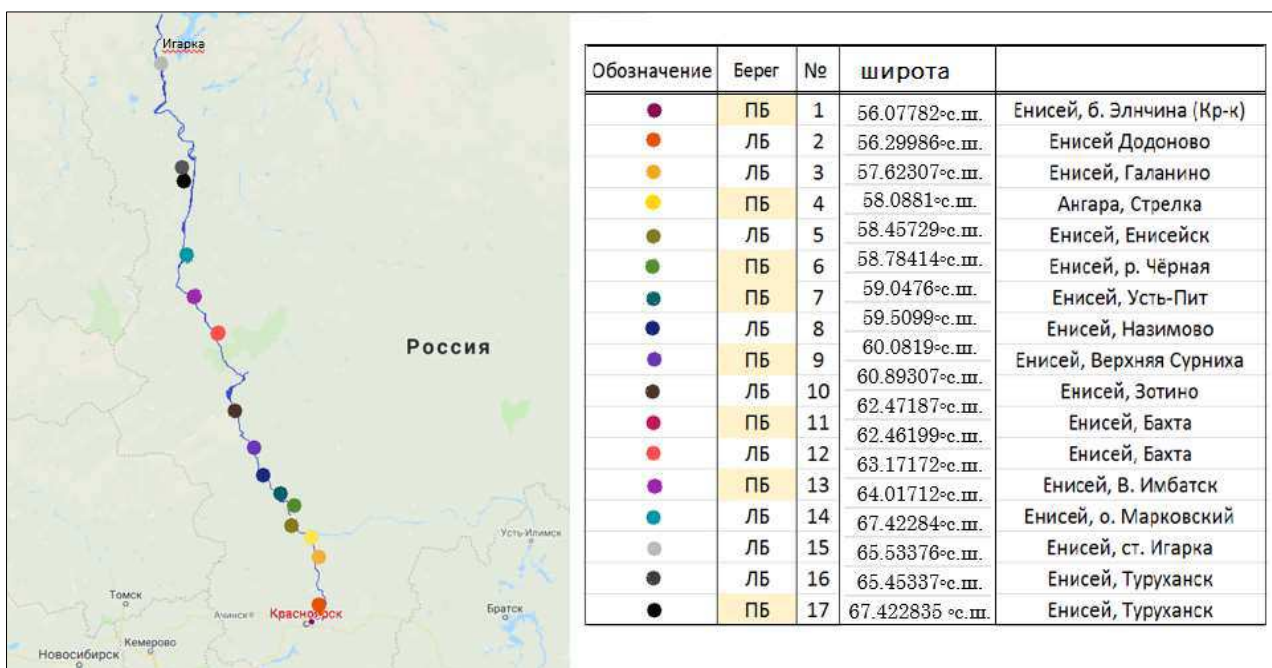


Рисунок 3 - Расположение ключевых точек, в которых были отобраны образцы донных отложений для проведения инкубационных экспериментов, в среднем и нижнем течении р. Енисей.

2.1.2. Газовые образцы с побережья Енисейского залива

Следующий этап исследования был проведен в августе 2019 года на территории Большого арктического заповедника, на станции расположенной в бухте Медуза, Енисейского залива на Карское море, Диксонский район, Северо-Западный Таймыр. Площади отбора проб были расположены на побережье залива. Образцы газов отбирались с пяти пробных площадей в нескольких (от 5 до 10) повторностях.

Характеристика пробных площадей:

Пробная площадь №1 (представлена на рисунке 4а, 4б) характеризовалась как горная тундра. В составе растительности преобладали осоки и сфагнум, местами встречались зоны криотурбации без растительного покрова.

Пробная площадь №2 (представлена на рисунке 4в) характеризовалась как низинная тундра. Растительный покров состоял из осоки, сфагнума, коричневых МХОВ и ИВЫ.

Пробная площадь №3 (представлена на рисунке 4г) характеризовалась как низинная тундра или «palsa» – мерзлотные бугры. В растительном покрове преобладали осоки, зеленые и коричневые мхи.

Пробная площадь №4 (представлена на рисунке 4д) характеризовалась как маршевая тундра, растительный покров состоял в основном из коричневых мхов и сухой травы.



Рисунок 4 – Пробные площади отбора газов: а, б – пробная площадь №1; в – №2; г – №3, с камерой для отбора проб газов; д – №4; ж – №5

Пробная площадь №5 (представлена на рисунке 4ж) характеризуется как склон маршевой низинной тундры. В составе растительного покрова по большей части преобладали осоки.

При отборе образцов воздуха с пробных площадей температура воздуха варьировала от 12 до 21 °С

2.2. Метод отбора газовых проб с территории пробных площадей

На каждой пробной площади с поверхности почвы были отобраны образцы газов методом закрытых камер с модификациями [50] в пяти-, десятикратной повторности с учетом гетерогенности напочвенного покрова. Газы отбирались в 60 мл газонепроницаемые шприцы и транспортировались в Институт леса СО РАН, г. Красноярск. Анализ концентрации и изотопной композиции парниковых газов проводился при помощи газового анализатора Picarro 2201-i.

Описание камер. Основа камеры представляет собой полый сосуд объемом 3,5 л – 4,5 л., который устанавливался в сезонно-талый слой почвы с углублением в 15 см. Каждая камера оснащена вентилятором для перемешивания газов в системе и герметично закрытой септой для отбора газовых проб. Газовые пробы отбирались из свободного пространства камеры после 30-ти минутной экспозиции, при помощи герметичного-присоединённого к системе газонепроницаемого шприца. Схема строения камеры представлена на рисунке 5. Фотография использованных камер представлена на рисунке 4г.

Потоки метана с поверхности исследуемых пробных площадей рассчитывались по формуле 2:

$$F_{CH_4} = \frac{\delta CH_4 \cdot M(CH_4) \cdot P}{10000 \cdot V} / R \cdot S \cdot t \cdot T \quad (2)$$

где F_{CH_4} – скорость эмиссии метана, мкг CH_4 m^{-2} $ч^{-1}$;

δCH_4 – концентрация CH_4 , $млн^{-1}$;

$M(\text{CH}_4)$ – молярная масса CH_4 ;

P – давление в камере, Па;

V – объем камеры, м^3 ;

R – универсальная газовая постоянная;

S – площадь поверхности под камерой, м^2 ,

T – температура воздуха, K ;

t – время экспозиции, мин.

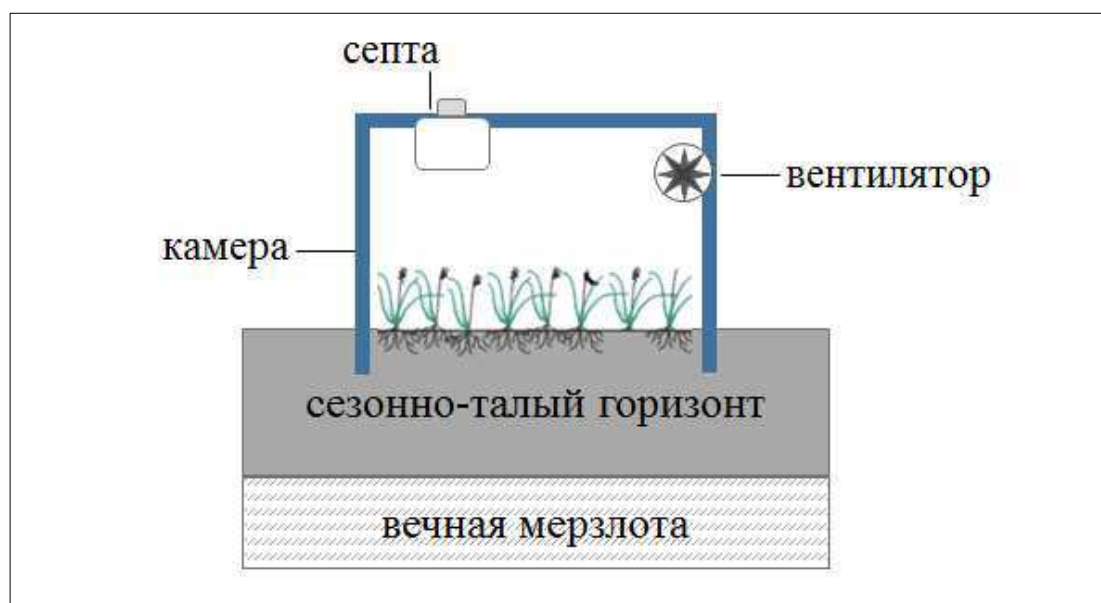


Рисунок 5 – Схема строения камеры для отбора газов с поверхности почвы

Образцы газов, отобранные в газонерпоницаемые шприцы, рекомендуется анализировать в течение нескольких дней, поскольку: а) образец может «расслаиваться» (CO_2 тяжелее воздуха и проба становится неоднородной); б) силиконовая прокладка в шприцах может выделять небольшие количества метана, что изменяет его концентрацию в шприце и изотопный состав углерода в метане.

2.3. Инкубационный эксперимент

С образцами донных отложений были проведены инкубационные эксперименты по определению потенциальной способности выделения метана, а также для определения изотопного состава углерода в метане, выделяемом микробными сообществами.

Инкубационные эксперименты были выполнены в соответствии со стандартным протоколом, принятым для инкубации почвы [51], модифицированным для инкубации жидких субстратов в анаэробных условиях.

В инкубационные сосуды объемом 150 мл помещался образец донных отложений (40 г) состоящий из твердой (минеральной) и водной фаз, затем сосуд закрывался герметичной закручивающейся крышкой с силиконовой прокладкой. Перед каждой экспозицией свободное пространство инкубационных сосудов продувалось бескислородным потоком инертного газа (азотом) через герметичный кран, расположенный на крышке сосуда, в течение минуты, что позволяло оценивать эмиссию углерода из образца без примесной составляющей углерода атмосферы лаборатории. Схема инкубационной камеры, использовавшейся в эксперименте, представлена на рисунке 6. Так как метан тяжелее воздуха и имеет тенденцию опускаться на дно сосудов, для точных измерений в крышках сосудов были предусмотрены длинные трубки, доходившие до дна.

По окончании экспозиции анализ концентрации и изотопной композиции парниковых газов проводился при помощи газового анализатора Picarro 2201-i с модулем отбора образцов малого объема (SSIM), позволяющим одновременно осуществлять регистрацию концентрации диоксида углерода и его изотопное смещение. Каждый образец инкубировался в 3-х повторностях. После каждого измерения сосуды продувались азотом в течении минуты, закрывались и отправлялись на дальнейшую инкубацию.

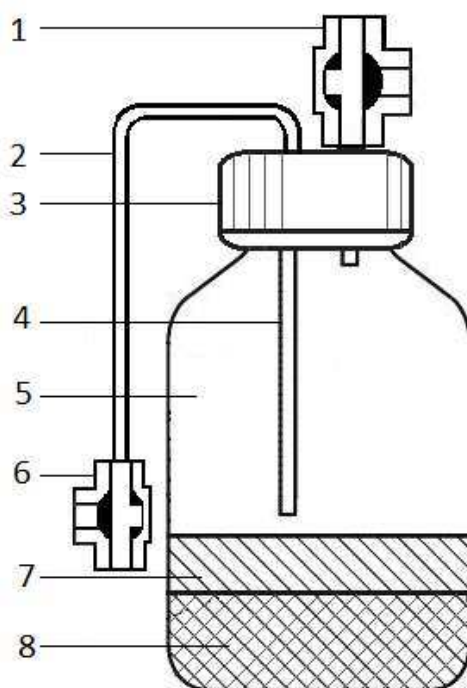


Рисунок 6 – Схема инкубационной системы для жидких субстратов в анаэробных условиях

1- кран для подачи азота; 2 – трубка для отбора образовавшихся газов; 3 – герметичная крышка; 4 – внутренняя трубка для отбора газа; 5 – инкубационный сосуд; 6 – кран для отбора газа; 7 – вода; 8 – образец донных отложений

Длительность проведения инкубационных экспериментов составила 3 месяца. Периодичность измерения эмиссии образцами донных отложений парниковых газов (CO_2 , CH_4) составляла от 3 до 7 дней в течение всего периода инкубации.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных производилась с использованием программного пакета Microsoft Excel 2013 для Windows 8.

2.4. Метаногеномный анализ

Определение таксономической структуры сообществ архей в исследуемых осадках проводилось методом выделения ДНК с последующим секвенированием

и анализом полученных операционных таксономических единиц (ОТЕ) на базе Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ). Далее полученные данные анализировались автором настоящего исследования.

Выделение и очистка ДНК производились по методике, предложенной ВНИИСХМ.

2.4.1. Выделение и очистка ДНК

На первом этапе из образцов донных отложений массой 0,2 г выделяли ДНК с использованием набора реактивов MN NucleoSpin (MN, Германия). Образцы разрушали механически при помощи гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Corp, США) в течение 30 с при 6,5 м/с. Образцы гомогенизировали дважды с использованием гомогенизатора ткани Precellys 24 (Bertin США). Чистоту и количество полученной ДНК проверяли с помощью электрофореза в 0,5×ТАЕ-буфере на 1% агарозном геле и методом ПЦР (Bio-Rad T100 Thermal Cycler). Концентрацию ДНК измеряли при 260 нм с использованием спектрофотометра СРЕСТROStar Nano (BMG Labtech, Germany).

2.4.2. Секвенирование ДНК.

Очищенные ДНК-матрицы амплифицировали на платформе Illumina MiSEQ (США) с использованием универсальных мультиплексных праймеров к вариабельному участку V4 гена бактериальной и археальной 16S рРНК F515 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') и R806 (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') с реагентами, указанными в рекомендациях производителя [52].

2.4.3. Биоинформационный анализ полученных данных

Далее полученные по результатам секвенирования нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК обрабатывали с использованием программного обеспечения QIIME v1.8.0. Чтобы уменьшить количество ошибок последовательности, мультиплексированные показания сначала были отфильтрованы по качеству, а затем сгруппированы в соответствии с последовательностью идентификатора. Последовательности были исключены из анализа, если они были < 200 п.н., имели показатель качества < 25 или содержали некорректируемые идентификаторы, праймеры, неоднозначные символы или гомополимеры длиной ≥ 8 п.н. Все небактериальные и химерные последовательности также были удалены из базы данных. Обрезку некачественных последовательностей выполняли с использованием программы Trimmomatic [53]. Прямые и обратные риды были объединены с использованием пакета экспресс-анализа fastq-join [54]. Для поиска и фильтрации химерных последовательностей использовали VSEARCH [55]. Последовательности с минимальным сходством 97% были сгруппированы в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) методом близких ссылок по базе данных SILVA. ОТЕ, относящиеся к хлоропластам/митохондриям, были удалены. Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей применяли программы QIIME и UniFrac. Для наилучшей классификации ОТЕ был проведен поиск в базах данных RDP и GenBank. Поиск в GenBank был выполнен с использованием сервиса Nucleotide Blast.

2.4.4. Анализ первичных данных результатов секвенирования

В ходе данной работы анализу были подвергнуты 18 образцов донных отложений среднего и нижнего течения реки Енисей. После фильтрации данных по качеству и группирования ОТЕ было получено 453710 последовательностей.

На каждый образец пришлось от 13485 до 41366 последовательностей, в среднем на один образец пришлось 25206 нуклеотидных последовательностей.

Так как основной задачей данной работы было исследование метаногенных архей, для анализа таксономической структуры сообществ были выбраны ОТЕ, принадлежащие царству архей, их количество составило 14101 из общего числа полученных последовательностей.

2.4.5. ПЦР в реальном времени.

Для количественной ПЦР использовали праймеры для бактерий - EUB338 (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) и EUB518 (ATTACCGCGGCTGCTGG); и архей - ARC915f (AGGAATTGGCGGGGGAGCAC) и ARC1059r (GCCATGCACCCWCCTCT). Для приготовления реакционной смеси использовали набор qPCRmix-HS SYBR (Eurogen, Россия) в соответствии с руководством производителя. В качестве стандартов использовали серию десятикратных разведений фрагментов 16S (*E. coli* и *H. pilori*). ПЦР проводили на термоциклере CFX96 (BioRad, Германия), параметры цикла: 95°C в течение 3 минут, 40 циклов при 95°C в течение 20 с, 50°C в течение 20 с, 72°C в течение 20 с.

ВЫВОДЫ:

1. Исследования потенциальной способности к метанообразованию показали, что наибольшая метаногенная активность выявлена для донных отложений среднего течения реки Енисей (с 56° с.ш. по 60° с.ш.).

2. Максимальная метаногенная активность отмечена для донных отложений с наибольшим разнообразием метаногенных архей в микробном сообществе и количественным преобладанием в составе представителей *Methanosarcina* spp. и *Methanosaeta* spp.

3. Нижнее течение реки Енисей отличается наименьшей метаногенной активностью и присутствием в составе сообщества анаэробных метанотрофов *Candidatus Methanoperedens*.

4. Экосистемы тундры побережья Енисейского залива как поглощают, так и выделяют метан. Наибольшее выделение метана отмечено с участков, в проективном покрытии которых преобладают осоки, поглощение метана зарегистрировано на участках, с преобладанием сфагновых мхов. На всех пробных площадях изотопное смещение $\delta^{13}\text{C}$ находилось в промежутке от -45‰ до - 80‰, что указывало на присутствие активного сообщества архей, производящих метан по всем трем известным путям – ацетокластическому, метилотрофному и гидрогенотрофному.

5. Микробные сообщества архей донных отложений р. Енисей и его притоков потенциально приносят большой вклад в эмиссию метана, чем почвенные микробные сообщества прибрежных зон эстуария. Зарегистрированная разница между выделением метана донными отложениями в инкубационных экспериментах и эмиссией метана тундровыми экосистемами прибрежной зоны р. Енисей составляла до трех тысяч раз

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Liu Y. et al. Responses of methanogenic and methanotrophic communities to elevated atmospheric CO₂ and temperature in a paddy field //Frontiers in microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 1–14.
2. Montzka S. A., Dlugokencky E. J., Butler J. H. Non-CO₂ greenhouse gases and climate change //Nature. Nature Publishing Group. – 2011. – Т. 476. – №. 7358. – С. 43-50.
3. Egger M. et al. Rapid sediment accumulation results in high methane effluxes from coastal sediments //PloS one. – 2016. – Т. 11. – №. 8. – С. 1–22.
4. Gruca-Rokosz R., Tomaszek J. A. Methane and carbon dioxide in the sediment of a eutrophic reservoir: production pathways and diffusion fluxes at the sediment–water interface // Water Air Soil Pollut. – 2015. – Т. 226. – №. 2. – С. 16.
5. Beckmann S., Manefield M. Acetoclastic methane formation from Eucalyptus detritus in pristine hydrocarbon-rich river sediments by Methanosarcinales //FEMS microbiology ecology. – 2014. – Т. 90. – №. 3. – С. 587-598.
6. Шитиков В.К., Зинченко Т.Д., Розенберг Г.С. Макроэкология речных сообществ: концепции, методы, модели // Тольятти: Кассандра. – 2011. – 255 с.
7. Cole J. J. et al. Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget //Ecosystems. – 2007. – Т. 10. – №. 1. – С. 172-185.
8. Малахова В. В., Голубева Е. Н. Оценка устойчивости состояния мерзлоты на шельфе Восточной Арктики при экстремальном сценарии потепления в XXI в //Лёд и Снег. – 2016. – Т. 56. – №. 1. – С. 61-72.
9. Karlsson J. et al. Quantifying the relative importance of lake emissions in the carbon budget of a subarctic catchment //Journal of Geophysical Research: Biogeosciences. – 2010. – Т. 115. – №. G3. – С. 1-6.
10. Shakhova N. E., Alekseev V. A., Semiletov I. P. Predicted methane emission on the East Siberian shelf //Doklady Earth Sciences. – Springer Nature BV, 2010. – Т. 430. – №. 2. – С. 190-193..

11. Enzmann F. et al. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications //AMB Express. Springer Berlin Heidelberg. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-22.
12. Whitman W. B., Bowen T. L., Boone D. R. The methanogenic bacteria // The Prokaryotes. – 2006. – Т. 3. – Гл. 9. – С. 165-207.
13. Lyu Z., Shao, N., Akinyemi, T., Whitman, W. B. Methanogenesis //Current Biology. – 2018. – Т. 28. – №. 13. – С. 727-732.
14. Liu Y., Whitman W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – Т. 1125. – №. 1. – С. 171-189.
15. Rosenberg E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. The Prokaryotes. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2014. – С. 1018.
16. Oren A. The family Methanococcaceae //The Prokaryotes–Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea. – Springer, 2014. – С. 215-224.
17. Takai K. et al. Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 31. – С. 10949-10954.
18. Каллистова А. Ю., Меркель А. Ю., Тарновецкий И. Ю., Пименов Н. В. Образование и окисление метана прокариотами //Микробиология. – 2017. – Т. 86. – №. 6. – С. 661-683.
19. Chen J., Yin X. Stratified communities of methanogens in the Jiulong River estuarine sediments, Southern China //Indian journal of microbiology. – 2013. – Т. 53. – №. 4. – С. 432-437.
20. Bridgham S. D. et al. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales //Global change biology. – 2013. – Т. 19. – №. 5. – С. 1325-1346.
21. Pavlostathis S. G., Giraldo-Gomez E. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review //Critical Reviews in Environmental Science and Technology. – 1991. – Т. 21. – №. 5-6. – С. 411-490.

22. Garcia J. L., Patel B. K. C., Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea // *Anaerobe*. – 2000. – Т. 6. – №. 4. – С. 205-226.
23. Zeleke J. et al. Methyl coenzyme M reductase A (mcrA) gene-based investigation of methanogens in the mudflat sediments of Yangtze River estuary, China // *Microbial ecology*. – 2013. – Т. 66. – №. 2. – С. 257-267.
24. Hedderich R. et al. Physiology and biochemistry of the methane-producing Archaea // *The prokaryotes*. – 2006. – Т. 2. – С. 1050-1079.
25. Lovley D. R., Goodwin S. Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta*. – 1988. – Т. 52. – №. 12. – С. 2993-3003.
26. Sowers, K. R. Methanogenesis // *Encyclopedia of Microbiology*. – 2009. – С. 265–286.
27. Меркель А. Ю. Молекулярная экология метаногенных и метанотрофных архей гидротермальных мест обитания: дис. – Институт микробиологии им. СН Виноградского Российской академии наук, 2013.
28. Hoehler T.M, Gunsalus R.P., McInerney M.J. Environmental Constraints that Limit Methanogenesis // *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer-Verlag, Heidelberg, – 2010. – С. 635-654.
29. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // *Environmental microbiology reports*. – 2009. – Т. 1. – №. 5. – С. 285-292.
30. Capone D. G., Kiene R. P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism 1 // *Limnology and oceanography*. – 1988. – Т. 33. – №. 4part2. – С. 725-749.
31. Whiticar M. J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chemical Geology*. – 1999. – Т. 161. – №. 1-3. – С. 291-314.

32. Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments //FEMS microbiology Ecology. – 1999. – Т. 28. – №. 3. – С. 193-202.
33. Chan O. C. et al. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment //Environmental Microbiology. – 2005. – Т. 7. – №. 8. – С. 1139-1149.
34. Phelps T. J., Zeikus J. G. Influence of pH on terminal carbon metabolism in anoxic sediments from a mildly acidic lake //Applied and Environmental Microbiology. – 1984. – Т. 48. – №. 6. – С. 1088-1095.
35. Schulz S., Matsuyama H., Conrad R. Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance) //FEMS Microbiology Ecology. – 1997. – Т. 22. – №. 3. – С. 207-213.
36. Falz K. Z. et al. Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland) //Applied and environmental microbiology. – 1999. – Т. 65. – №. 6. – С. 2402-2408.
37. Schulz S., Conrad R. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance //FEMS Microbiology Ecology. – 1996. – Т. 20. – №. 1. – С. 1-14.
38. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation //Microbiological reviews. – 1995. – Т. 59. – №. 1. – С. 143-169.
39. Равин Н. В., Марданов А. В., Скрыбин К. Г. Метагеномика как инструмент изучения “некультивируемых” микроорганизмов //Генетика. – 2015. – Т. 51. – №. 5. – С. 519-519.
40. Hugenholtz P., Tyson G. W. Metagenomics //Nature. – 2008. – Т. 455. – №. 7212. – С. 481-483.
41. Wang Y., Qian P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies //PloS one. – 2009. – Т. 4. – №. 10. – С. e7401.

42. Jonasson J., Olofsson M., Monstein H. J. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments // *Apmis*. – 2002. – Т. 110. – №. 3. – С. 263-272.
43. Cole J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // *Nucleic acids research*. – 2009. – Т. 37. – №. suppl_1. – С. 141-145.
44. Riesenfeld C. S., Schloss P. D., Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities // *Annu. Rev. Genet.* – 2004. – Т. 38. – С. 525-552.
45. Janda J. M., Abbott S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // *Journal of clinical microbiology*. – 2007. – Т. 45. – №. 9. – С. 2761-2764.
46. Woese C. R. Bacterial evolution // *Microbiological reviews*. – 1987. – Т. 51. – №. 2. – С. 221.
47. Burns R. et al. Direct isotopic evidence of biogenic methane production and efflux from beneath a temperate glacier // *Scientific reports*. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-8.
48. Shibistova O. et al. Rate of belowground carbon allocation differs with successional habit of two afro-montane trees // *PloS one*. – 2012. – Т. 7. – №. 9. – С. e45540.
49. Бажин Н. М. Метан в окружающей среде: аналитический обзор // Изд. ГПНТБ СО РАН. – 2010. – №. 93. – С. 56.
50. Wagner D. et al. Microbial controls on methane fluxes from a polygonal tundra of the Lena Delta, Siberia // *Permafrost and periglacial processes*. – 2003. – Т. 14. – №. 2. – С. 173-185.
51. ГОСТ Р ИСО 15473-2016 Качество почвы. Оценка анаэробной биоразлагаемости органических химических веществ в почве. – Введ. 01.02.2017. – Москва : Стандартинформ, 2017. – 11 с.
52. Bates S. T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *The ISME journal*. – 2011. – Т. 5. – №. 5. – С. 908-917.

53. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data //Bioinformatics. – 2014. – Т. 30. – №. 15. – С. 2114-2120.
54. Aronesty E. Comparison of sequencing utility programs //The open bioinformatics journal. – 2013. – Т. 7. – №. 1.
55. Rognes T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics //PeerJ. – 2016. – Т. 4. – С. 2584.
56. Oren A. The family Methanoregulaceae //The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea. – 2014. – С. 253-258.
57. Исидоров В.А. Экологическая химия. – Учебник. — СПб.: Химиздат, 2001. — С. 304.
58. Raghoebarsing A. A. et al. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs //Nature. – 2005. – Т. 436. – №. 7054. – С. 1153-1156.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
/ Заведующий кафедрой


подпись

Т. Г. Волова
инициалы, фамилия

« 6 »

июля 2020г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Метаногенный потенциал микробных сообществ донных отложений реки
Енисей и его притоков»

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный
руководитель
Выпускник



06.07.2020 к.б.н., доцент
подпись, дата должность, ученая степень

Евграфова С.Ю.
инициалы, фамилия

Рецензент


06.07.2020
подпись, дата

Децура А.Е.
инициалы, фамилия


06.07.2020 с.н.с., к.б.н.
подпись, дата должность, ученая степень

Мухортова Л.В.
инициалы, фамилия

Красноярск 2020