

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Метанотрофные ассоцианты мхов и лишайников экосистем Восточной  
Сибири

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	к.б.н., доцент	С.Ю. Евграфова
Выпускник	_____		В.К. Кадуцкий
Рецензент	_____	д.б.н., доцент	И.Д. Гродницкая

Красноярск 2021

## Оглавление

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	7
1.1 Метан как парниковый газ	7
1.2 Понятие метанотрофии	8
1.3 История открытия метанотрофных бактерий	11
1.4 Метанотрофные бактерии и их таксономия	12
1.5 Морфология и свойства метанотрофных бактерий	12
1.6 Экология метанотрофных мхов	14
1.7 Экология метанотрофных бактерий	15
1.8 Идентификация метанотрофных бактерий	19
Глава 2. Объект и методы исследования	21
2.1 Описание объекта исследований, отбор образцов	21
2.2 Лабораторные инкубационные эксперименты	24
2.3 Выделение метанотрофных микроорганизмов и оценка их метанотрофной активности	27
2.3.1 Получение накопительных и чистых культур	27
2.3.2 Измерение метанотрофной активности выделанных культур	29
Глава 3 Результаты исследований	30
3.1 Динамика потребления метана ассоциантами мхов и лишайников экосистем Прибайкалья	30

3.2	Оценка зависимости интенсивности метанотрофной активности от мощности сезонно-талого слоя	32
3.2	Оценка метанотрофной активности чистых культур	34
3.3	Характеристика полученных штаммов и их молекулярный анализ на основе 16S рРНК	35
3.4	Выявление альфа-субъединица гена <i>pmoA</i> метанмонооксигеназы	38
3.4.1	ПЦР с праймерами A189F-A682R	38
3.4.2	ПЦР с праймерами A189F-A682R и подбором условий вариация T отжига праймеров	39
3.5	"Nested" ПЦР с альтернативными праймерами	39
	Выводы	41
	Список литературы	43

## Введение

Повышение средней температуры на Земле, как результат глобального потепления, приводит к стремительной деградации вечной мерзлоты. Этот процесс во многом происходит за счет эмиссии парниковых газов, таких как водяной пар, углекислый газ ( $\text{CO}_2$ ), метан ( $\text{CH}_4$ ) и закись азота ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Knoblauch et al., 2018). Парниковые газы отличаются по своему потенциалу влиять на глобальное потепление, это значение равно 1 для  $\text{CO}_2$ , для метана и  $\text{N}_2\text{O}$  - 25 и 298, соответственно [51,1]. Тот факт, что эмиссия метана растет с каждым годом, делает его значительным и наиболее важным парниковым газом в данный момент и будущем. Основными природными источниками метана являются: арктические экосистемы, болота, крупнорогатый скот, рисовые поля. Среди этих источников наиболее значительными являются криогенные экосистемы и болота. Криогенные экосистемы сконцентрированы в основном в Северном полушарии и покрывают до 25% поверхности суши и содержат 1330–1580 Пг или 50% мирового органического углерода [48].

Глобальное экологическое значение мерзлотных Северного полушария заключается в поддержании биологического разнообразия и регулирования климата, благодаря адаптивным способностям биоты существовать в экстремальных условиях и влиянии на нее глобальных климатических изменений [48]. Выделяющийся метан в зонах вечной мерзлоты по происхождению в основном является биологическим, как результат жизнедеятельности метаногенных микроорганизмов. Образование метана происходит в анаэробных условиях, метаногенные археи, потребляя захороненное органические вещество, выделяют метан в качестве побочного продукта. Данный процесс имеет огромную положительную обратную связь, так повышение концентрации метана в атмосфере приводит к дальнейшему таянию вечной мерзлоты, что делает замороженное органическое вещество более доступным для метаногенов [36]. Этот процесс вызовет

катастрофические последствия как для арктических экосистем, так и для всей биосферы в целом. Однако, в природе существует противоположный процесс – процесс окисления метана. Поток метана в атмосферу контролируется аэробными метанотрофными бактериями, населяющие верхние слои почв, растения, морские осадки, мхи и лишайники [35]. Метанотрофные бактерии способны окислять метан благодаря уникальному ферменту метанмонооксигеназа [17]. Бактерии могут использовать метан как единственный источник углерода и энергии. Благодаря этим свойствам, метанотрофные бактерии действуют как природный фильтр на пути эмиссии метана. Феномен метанотрофии в криогенных экосистемах тесно связан с ассоциацией мхов и лишайников с метанотрофными бактериями [5]. В результате этого сотрудничества мхи или лишайники получают углекислый газ в результате окисления метана; метанотрофные бактерии приобретают место обитания и защиту [37]. В таком случае метанотрофные бактерии играют важную роль в понимании процессов эмиссии метана и регулирования цикла метана благодаря своей уникальной способности окислять атмосферный метан [36]. Известно, что от 1 до 90% выделяемого метана окисляется метанотрофными бактериями в верхних слоях почв [35].

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 и севера Якутии;
2. Сравнить метанооксиляющую способность консорциумов мхов и лишайников мерзлотных и немерзлотных экосистем Прибайкалья и севера Якутии;

3. Исследовать зависимость интенсивности метанотрофной активности ассоциантов мхов и лишайников от мощности сезонно-талого слоя мерзлотных почв Восточной Сибири;

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;

5. Определить метанотрофную способность выделенных штаммов микроорганизмов;

6. Идентифицировать выделенные штаммы микроорганизмов;

7. Доказать наличие метанмонооксигеназы у выделенных штаммов микроорганизмов.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1 Метан как парниковый газ

Метан как самый распространённый органический газ является одним из основных газов, вызывающих парниковый эффект. Атмосферный метан оказывает влияние на климат на земле прямыми и косвенными путями. Наиболее прямым действием является задерживание планетарного инфракрасного излучения, нагревания поверхности земли, приповерхностной атмосферы и охлаждения стратосферы. Не смотря на меньшую концентрацию метана по сравнению с углекислым газом, метан обладает большей способностью задерживать инфракрасное излучение, так повышение концентрации метана на 0.7 ppm сравнимо с увеличением концентрации углекислого газа порядка на 70 ppm. Говоря о косвенном действии, стоит отметить что метан вовлекается в реакции с молекулами CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>, и CH<sub>2</sub>O, тем самым оказывая влияние на количество тропосферного и атмосферного озона, увеличивая его, и преобразуясь в водяной пар. Мало уделяется внимания процессу образования CO при окислении и последующим синтезе CO<sub>2</sub>, в результате в глобальном масштабе образуется около 0.34 x 10<sup>15</sup> г C/год. Показано, что начиная 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 около 1,8 ppm, а его эмиссия по разным оценкам составляет от 550 до 678 Тг в год [2, 9]. Образование метана происходит как внутри, так и на поверхности Земли. По происхождению метан условно разделяется на abiогенный (термокаталитический) и биогенный. Выделение abiогенного метана носит условный характер, он образуется 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, осуществляемыми метаногенными микроорганизмами в разнообразных средах обитания (рубцы жвачных животных, болота, рисовые чеки, органические отходы) в строго анаэробных условиях [3, 9].

## 1.2 Понятие метанотрофии

Метанотрофные бактерии – особая группа прокариот, адаптированных к окислению метана, при помощи уникального фермента метанмонооксигеназы, и использованию метана в качестве единственного источника углерода и энергии. Метанотрофные бактерии способны окислять от 20 до 80% выделенного метана поверхности почв мерзлотных экосистем, что вызывает повышенное внимание международного научного сообщества, вследствие их способности нивелировать последствия влияния эмиссии метана на формирования парникового эффекта [5, 14, 26]

Метан окисляется метанотрофными бактериями до углекислоты и воды, с образованием промежуточных метаболитов, таких как метиловый спирт, формальдегид и формиат. Начальная стадия окисления метана, катализируется мульти-компонентным ферментным комплексом – метанмонооксигеназой (ММО), которая существует в двух формах – мембран-связанная (pММО), и растворимая (sММО) находящееся в цитоплазме клетки (рис. 1) [15, 31]. Мембран-связанная форма метанмонооксигеназы присутствует во всех известных метан окисляющих бактериях, за исключением бактерий рода *Methylocella*, у которых при достаточном количестве меди в среде ( $> 2.5$



мкмоль/г клеток) синтезируется мембрансвязанная метанмонооксигеназа – рММО, при низком – sММО [15, 24].

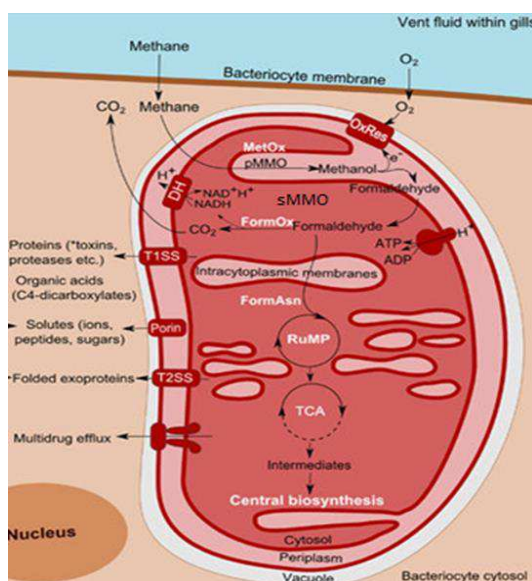


Рисунок 1 – Метаболические пути и положение метанмонооксигеназ, мембрансвязанной (рММО), и растворимой (sММО) [21].

Особое внимание заслуживает процесс усваивания формальдегида, он проходит у разных метанотрофных бактерий в отличных биохимических циклах [46].

Так метанотрофы I типа, данный процесс осуществляют в рибулозомонофосфатном пути (РМФ), метанотрофы II типа – в сериновом, а целый ряд метанотрофов образует так называемую группу X, так-как помимо РМФ-пути они могут использовать цикл Кальвина (рис. 2) [46].

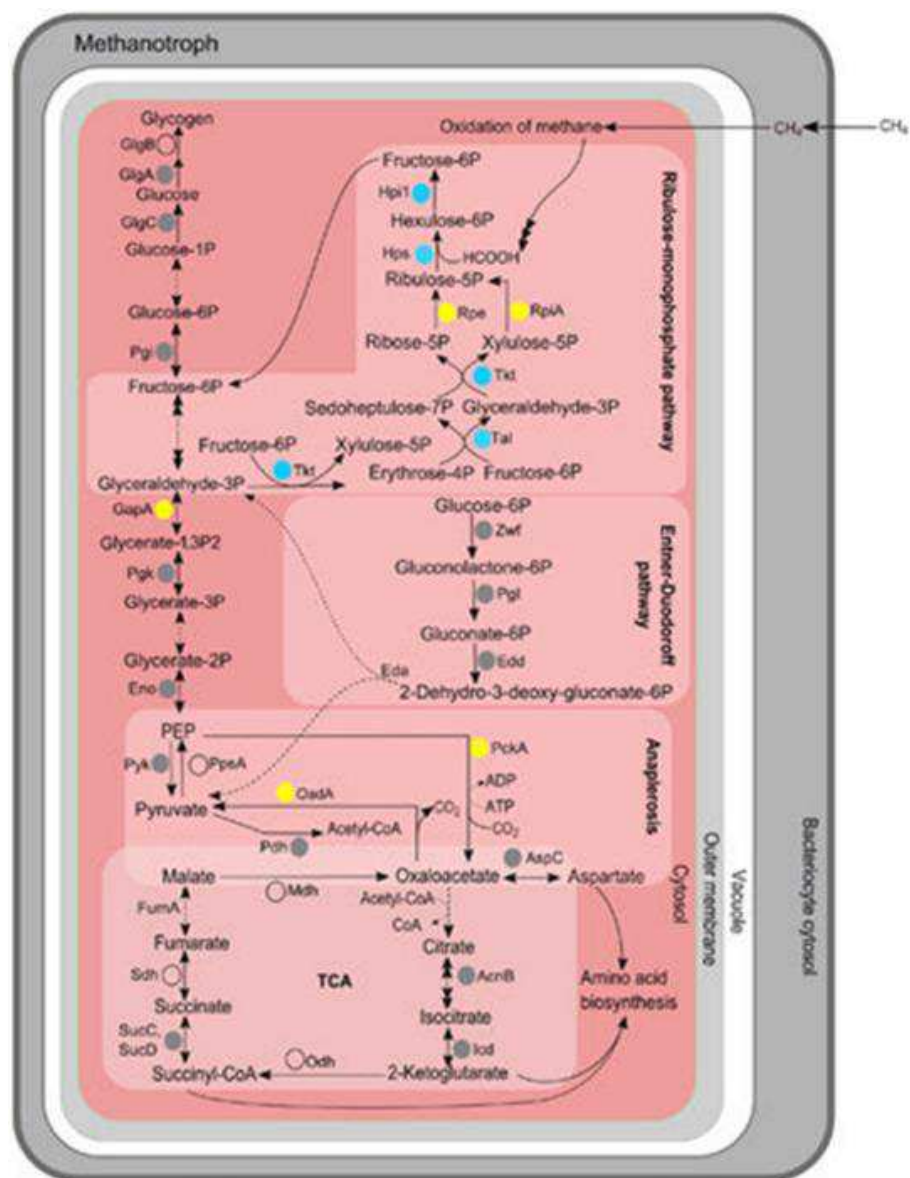
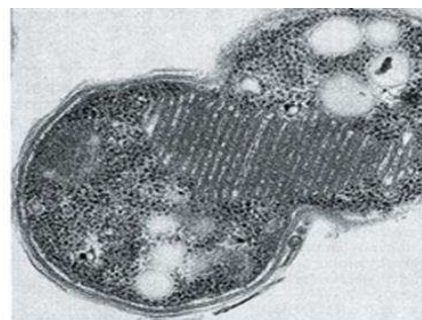


Рисунок 2 - Метаболические пути метаноокисляющих бактерий [22].

Одной из основных особенностей метанотрофов является наличие развитой системы внутрицитоплазматических мембран. Метанотрофы I и X типа имеют ВЦМ в виде уплощенных везикул, покрывающих большую часть содержимого клетки и перпендикулярно направленных клеточной мемbrane, а у II типа – в форме везикул направленных параллельно внешней мемbrane. Особенность расположения внутрицитоплазматических мембран является таксономическим признаком (рис. 3) [48, 17].



(a)  
Тип II  
Methylosinus (a proteobacteria)



(b)  
Тип I  
Methylococcus capsulatus  
(в proteobacteria)

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 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, когда были получены ответы на многие концептуальные вопросы связанные с процессом окисления метана. После крупнейшей работы по выделению и описанию более 100 изолированных штаммов появилась первая на тот момент классификация метан-окисляющих бактерий [52]. Все изученные рода метанотрофных бактерий (*Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus* и *Methylocystis*) были разделены на 2 типа.

Базовой характеристикой, ставшей основой для деления на два типа, было особенность размещения внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ).

С появлением и развитием методов и инструментов молекулярной биологии были обнаружены новые рода метанотрофных бактерий,

пересмотрены подходы к таксономии, обновлен таксономический статус некоторых ранее описанных штаммов [20].

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

В прошедшее десятилетие, ставшее наиболее успешным в поиске новых метанотрофных микроорганизмов, количество известных родов и видов было удвоено [35]. На данный момент изучено и описано 18 родов аэробных метанотрофных бактерий из класса *Gamma*proteobacteria: *Methylosoma*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylogaea*, *Methylohalobius*, *Methylomarinum*, *Methylosarcina*, *Methylosphaera*, *Methylovulum*, *Methylothermus*, *Methyloprofundus*, *Methylomagnum*, *Methyloglobulus*, *Methyloparacoccus*, *Methylomicrobium* и *Methylomarinovum* [20].

В пределах класса *Alphaproteobacteria* описано 5 родов метанотрофных бактерий: *Methylosinus*, *Methylocella*, *Methylocystis*, *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 микроорганизмы характеризуются широкой изменчивостью размера клеток, формой и пигментацией колоний. [14] Метанотрофы обладают формой палочек, вибриоидов или кокков, большинство способны к движению, благодаря наличию жгутиков, для большинства штаммов характерен полиморфизм. В естественной среде обитания, метанотрофы находятся в совершенно разнообразных условиях. Так метанотрофы имеют разнообразные формы спор: экзоспоры, липидные цисты,

цисты типа *Azotobacter*. Как результат высокой специализации метаболизма для окисления метана, бактерии имеют сложную систему внутрицитоплазматических мембран, главной функцией которых является окисление метана. Внутрицитоплазматические мембраны создают сопряжённость, для получения энергии для использования в окислении стабильной молекулы метана. [14, 19].

Первый тип представлен в виде стопки диско-подобных везикул, образующихся путём инвагинации цитоплазматической мембраны и занимающих значительное пространство внутри клетки. Второй тип обладает систему парных периферических мембран. Большинство метанотрофов подвижны только в определенный этап роста, за счет полярных жгутиков. Содержание гуанина-цитазина ДНК варьирует в границах 46-65 мол %. Метанотрофы, как правило, являются строгими аэробами, каталазо- и оксидоположительные, обладают цитохромами с, b, a. [17, 48].

Метанотрофы синтезируют широкий спектр запасных веществ, таких как полисахариды, полигидроксibuтираты и полифосфаты, так же характерно продуцирование экзополисахаридов. Пигменты представлены каротиноидами, продигенинами и меланином, которые в основном выполняют защитную функцию, служат видовой характеристикой [6].

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

## **1.6 Экология метанотрофных мхов**

На данный момент хорошо 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**

Наиболее широко представленным типом северных болотных экосистем являются верховые сфагновые болота.

Верховые болота располагаются на водоразделах и в своем питании зависимы от атмосферных осадков и поступления минеральных веществ с пылью. От минерального вещества в грунте они изолированы слоем торфа. Вода верховых болот характеризуется низкой минерализацией, в среднем равняющейся 5-100 мг/л, низкой кондуктивностью, низким значением водородного показателя от 3 до 5, обусловленным повышенным содержанием органических кислот, углекислот и окислительно-восстановительными реакциями [14]. Основную часть вегетационного периода уровень воды находится у границы или на поверхности почвы, что приводит к торможению процессов аэробного разложения растительных остатков. Таким образом, северные сфагновые болота являются глобальным хранилищем органического углерода, со скоростью процессов депонирования углерода около 10-30 мг С

в год на один квадратный метр. Северные торфяники покрывают от 3 до 5% общей площади поверхности суши и вмещают до 33% мирового запаса органического углерода [25]. В то же время, сфагновые болота являются одним из основных источников парникового газа метана [38].

### **1.7 Экология метанотрофных бактерий**

Экология метанотрофных бактерий чрезвычайно широка, метанотрофы повсеместно распространены и встречаются в различных экосистемах. Основная часть метанотрофов являются мезофилами, хорошо растущими при температуре от 20 до 35°C и предпочтительно к близко-нейтральным значениям водородного показателя (5). Также, являются не исключением среди метанотрофных бактерий термофильные, обитающие в гидротермах (> 40°C) и психрофильные, кроме того существуют представители этих бактерий, которые обитают в кислых условиях (pH 2.5) [39].

Долгое время было принято, что процесс окисления метана бактериями протекает только в аэробных условиях. Однако в середине 80-х гг. прошлого века, были обнаружены бактерии осуществляющие анаэробный процесс окисления метана [19].

Большая доля метанотрофных бактерий растут и развиваются при оптимальных условиях окружающей среды, но также существуют метанотрофные бактерии, отлично адаптированные к экстремальным факторам. Так, метнаноокисляющие бактерии даже после длительного пребывания в мерзлотных почвах, не теряют своей способности к активной жизнедеятельности и могут окислять и ассимилировать метан при температурах близких к 0°C. [14].

Метанотрофные бактерии могут быть разделены по их местообитанию на следующие группы:

а) термофильные и термотолерантные метанотрофы.

На нашей планете являются не редкостью биотопы с высокой температурой. В таких высокотемпературных экосистемах как вулканы, термальные выходы, гейзеры, горячие источники, выделяется вместе с углекислым газом и сероводородом значительные объемы метана, что объясняет существование термофильных метанотрофных бактерий в данных системах [30, 14, 50].

Все известные в настоящее время метанотрофы-термофилы принадлежат к классу *Gamma*proteobacteria. Первый описанный вид термофильных метанотрофов – *Methylococcus capsulatus* предпочитает обитать при температурах близких к 45°C и является одним из достаточно хорошо изученных метанотрофных организмов. Как правило, термофильные метанотрофы обитают при температурах 25-30 °C в условиях около-нейтрального значения водородного показателя. Однако известен ряд метанотрофных бактерий, стабильно развивающихся при повышенных температурах. Так в термальных источниках Японии и Венгрии был изолирован штамм НВ, развивающейся и ведущий свой обычный метаболизм в границах от 40 до 70°C при оптимуме в 55-62 °C, был отнесен к новому роду *Methylothermus* [18].

б) психрофильные и психротолерантные метанотрофные бактерии.

Экосистемы, характеризующиеся низкими температурами, покрывают значительную площадь поверхности земли. Наиболее типичными такими экосистемами являются обширные тундровые и северные болотные зоны, а также большая часть мирового океана, где средняя температура воды находится на уровне от +5 до – 7°C. Такие экосистемы являются основным источником эмиссии метана, однако этот процесс нивелируется, за счет окисления метана метанотрофными бактериями [3, 4, 50].



Все психрофильные метанотрофы относятся к классу *Gammaproteobacteria* и предпочитают развиваться при температурах ниже 15°C. В донных отложениях пресных антарктических озер найдены метанотрофы, хорошо растущие при температуре 2°C [21, 14]. К метанотрофам-психрофилам также относят *Methylobacter psychrophilus*, выделенный из почв криолита зоны России, *Methylosphaera hansonii* и *Methylomonas scandinavica*, выделенных из антарктического озера и холодных глубоководных вод вблизи побережья Балтийского моря [47].

в) метанотрофы соленых и щелочных экосистем.

На земле широко представлены экосистемы с повышенным содержанием солей. Такими являются моря, прибрежные морские лагуны, соленые водоемы, эстуарии, некоторые арктические почвы, а также содовые озера. Все эти природные зоны характеризуются нейтральными значениями pH среды, за исключением содовых озер. Долгое время не было доказательств существования галофильных метанотрофных бактерий, ввиду разнообразных причин. Существовали данные противоречащие друг другу о путях потока метана в гиперсоленых экосистемах, было принято, что потребление метана в данных экосистемах происходило в цианобактериальных матах и в условиях до 100% сатурации кислородом, что не является благоприятным фактором для развития микроаэрофильных метанотрофов [22]. С целью выявления метанотрофной активности использовали высокочувствительный газохроматографический метод. Что в последствие показало необходимость использования специфичных и высокочувствительных методов [13].

Первым доказательством протекания процессов метанотрофии в гиперсоленых водоемах, было обнаружение окисления метана в донных отложениях и воде лиманов Крыма, с помощью использования радиоизотопного метода [41]. По отношению к солености среды

метанотрофные организмы разделяются на галотолерантов и галофилов. Галофилы облигатно относятся к присутствию NaCl в среде.

Среди галофилов необходимо отдельно обособить экстремальных галлофилов, развивающихся при экстремальных концентрациях NaCl в среде [28]. Например, *Methylohalobius crimeensis*, изолированный в гиперсоленом озере полуострова Крым, способен развиваться при концентрации от 5.7 до 8.7 % NaCl в среде. Максимальная же концентрация соли, при которой могут развиваться метанотрофы, составляет 15%, что является верхним пределом для известных на данное время метанотрофных бактерий [28].

В основном, галотолерантные и галофильные и метанотрофные бактерии, относятся к классу *Gammaproteobacteria*. Это представители родов *Methylobacter* и *Methylomicrobium*, изолированные из разнообразных соленых экосистем [20].

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 изолированы целый ряд галофильных метанотрофных бактерий, требующих для своего развития высоких значений pH среды. Ими являются представители рода метанотрофных бактерий *Methylomicrobium* – *M. Buryatense*, *M. alcaliphilum* и *M. kenyense* [14]. *M. kenyense*, был изолирован из содовых озер Кении, и способен развиваться при водородном показателе равным 10 [42].

Наличие метанотрофных бактерий I класса *Alphaproteobacteria* в щелочных озерах было неоднократно доказано при помощи использования инструментов молекулярной биологии [33]. Но попытки изолировать

алкалофильных представителей метанотрофов II типа до настоящего времени не увенчались успехом. К настоящему времени получилось изолировать лишь один штамм метанотрофов, рода *Methylocystis*, приспособленных расти при высоких значениях pH от 6.0 до 9.7 [8]. Ввиду способности большинства метанотрофных бактерий фиксировать атмосферный азот, для их нормального развития в щелочных условиях практически отсутствуют ограничивающие факторы [14].

### 1.8 Идентификация метанотрофных бактерий

Долгое время считалось что факультативной метанотрофии не существует, однако было выяснено что бактерии родов *Methylocella*, *Methylocystis* являются факультативными метанотрофами, и способны расти на разнообразных много углеродных субстратах. В настоящее время существует проблема идентификации и дифференцировки облигатных и факультативных метанотрофных бактерий. Их диагностика требует большой осторожности, так-как нередко происходит путаница и ошибки, поскольку метанотрофные культуры могут послужить пищей для гетеротрофных штаммов, существующих за счет выделения первыми интермедиатов в среду. Так, наличие только нескольких клеток ассоциантов, может привести к ложным выводам. Также довольно часто происходит путаница между факультативными метилотрофами и факультативными метанотрофами [24].

На данный момент идентификация метанотрофных бактерий основывается на целом ряде подходов, это и оценка потребления метана культурами при их культивировании, изучение внутрицитоплазматических мембран, и, пожалуй, самый точный и быстрый метод – это определение наличия мембрансвязанной или растворимой метанмонооксигеназы [24].

Факультативные метанотрофные бактерии могут обладать как одной, так и обоими формами метан окисляющего фермента.

Мембрансвязанная метанмонооксигеназа кодируется *pmoCAB* опероном, в то время как растворимая метанмонооксигеназа целым комплексом генов, включая *pmoXYBZDC*. Гены *pmoA* и *pmoX* кодируют  $\beta$ -субъединицу мембрансвязанной и  $\alpha$ -субъединицу гидролазы растворимой метанмонооксигеназы, широко используются как маркеры метанотрофных микроорганизмов, довольно объёмные базы с вариантами последовательностей данных генов, позволяют создать универсальные праймеры. Большинство штаммов, имеющих мембрансвязанную метанмонооксигеназу, обладают также последовательностью фрагмента *pmoA*, длиной 525 п.н. который можно амплифицировать с помощью праймеров A189 + A682. Для амплификации фрагмента гена *pmoX* растворимой метанмонооксигеназы, длиной 1230 п.н. обычно используют праймеры *pmoXA* + *pmoXD* [24].

## Глава 2. Объект и методы исследования

### 2.1 Описание объекта исследований, отбор образцов

Регионом исследований были мерзлотные и немерзлотные экосистемы в окрестностях оз. Байкал и мерзлотные экосистемы северной Якутии: дельта реки Лена, остров Самойловский и остров 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 Кривобоквым Л.В. и Мухортовой Л. В.

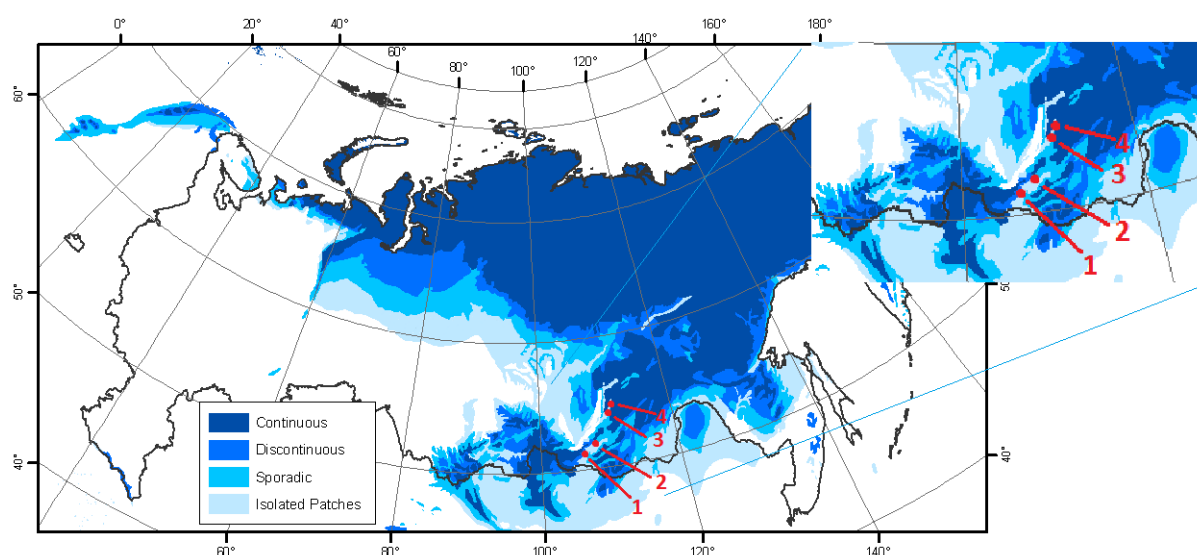


Рисунок 4 – Расположение пробных площадей (пп) на карте распространения вечной мерзлоты на территории России. Пп 1, 3, 4 расположены на мерзлотных почвах, пп 2 – на немерзлотных.

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

покрове доминирует *Dicranum polysetum*, *P. schreberi* и *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*.

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), в напочвенном покрове доминирует *Pleurozium schreberi*, в примеси встречаются другие мхи и лишайники родов *Cladonia* и *Peltigera*.

Пробная площадь № 4 (образец №6) заложена в лиственничнике бруснично-зеленомошном (55°13' с.ш., 111°28' в.д., высота 972 м. над уровнем моря). Мохово-лишайниковый покров развит куртинами, с общим проективным покрытием 40%. Доминирует *Pleurozium schreberi* в примеси другие мхи и лишайники родов *Cladonia* и *Peltigera*.

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°С вплоть до транспортировки в лабораторию ИЛ СО РАН для проведения анализа.

Вторым регионом исследования были выбраны мерзлотные местообитания мхов и лишайников в районе 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).

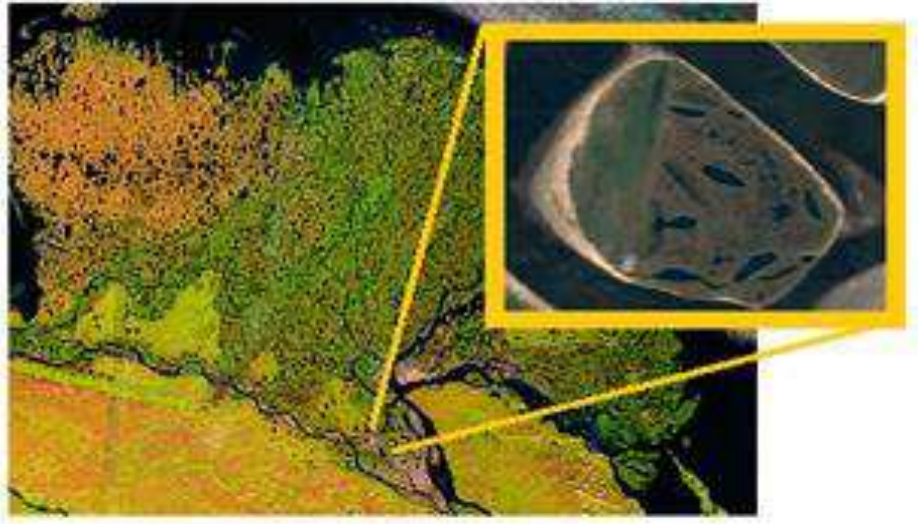


Рисунок 5 – Дельта реки Лена, о. Самойловский

Всего было заложено 6 пробных площадей из которых 5 находились на острове Самойловский и одна на острове Тит-Ары.

Пробная площадь № 1 заложена на о. Самойловский (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. Самойловский (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. Самойловский (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. Самойловский (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. Самойловский (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 сезонно-талого слоя определялась отдельно в каждой точке отбора образца в месте его произрастания с использованием мерзлотного 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 газонепроницаемые 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	<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>
Образец, описание								
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 cucullata</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,  $\text{MgSO}_4 \cdot 07\text{H}_2\text{O}$  - 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. Грам-принадлежность определялась методом Греггера.

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

Для выявления альфа-субъединица гена rpoA метанмонооксигеназы проводили её амплификацию с использованием стандартных общепринятых праймеров a189f -a682r, подбором условий отжига праймера, и "nested" пцр с праймерами a189b-f - a682r в первой стадии и smo182-f - smo568-r во второй стадии (табл. 4).

Таблица 4 – Праймеры, использованные при проведении ПЦР

Праймер	Последовательность
Смысловые	
A189F	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'
A189b-F	5'-GGNGACTGGGACTTYTGG-3'
smo182-F	5'-TCACGTTGACGCCGATCC-3'
Антисмысловые	
A682R	5'-GAASGCNGAGAAGAASGC-3'
smo682-R	5'-AAAYCCGGCRAAGAACGA-3'
smo568-R	5'-GCACATACTCCATCCCCATC-3'

ПЦР проводилась по следующей методике: 50 мкл реакционной смеси, содержащей 30 нг геномной ДНК, 0.2 mM каждого dNTP, 0.2 мкМ смыслового и антисмыслового праймеров, 0.8 mM свободного магния в пересчете на соль

MgCl<sub>2</sub>, 14 ед/мл полимеразы Phusion® Hot Start II High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Литва), 1-кратный Phusion® GC буфер и бидистиллированную воду до конечного объема реакции. Температурные условия ПЦР составляли: 98°C (1 мин), затем 40 циклов – (98°C - 15 с, 56°C - 15 с, 72°C - 15 с), затем 72°C - 10 мин.

"Nested" ПЦР для образцов ДНК из культур бактерий проводилась с праймерами A189b-F - sto682-R (1 стадия, длина ожидаемого продукта пцр 493 н.п.) и праймерами sto182-F - sto568-R (2 стадия, длина ожидаемого продукта пцр 389 н.п., матрица - 1 мкл ПЦР смеси из первой стадии ПЦР), T отжига = 56°C.

Полученные продукты ПЦР разделяли и визуализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

### **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*).

## **Глава 3 Результаты исследований**

Изъято 11 страниц

## Выводы

1. В лабораторных инкубационных экспериментах было показано, что метанотрофной активностью в экосистемах Восточной Сибири обладают как микроорганизмы-ассоцианты мхов, так и ассоцианты лишайников. Причем, метанотрофная активность консорциумов мхов выше, чем таковая консорциумов лишайников. В целом метанотрофная активность ассоциантов мхов и лишайников в регионах Прибайкалья и северной Якутии сравнима.

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 ppmCH<sub>4</sub> мин<sup>-1</sup> до 0,040 ppmCH<sub>4</sub> мин<sup>-1</sup>.

Наибольшей метанотрофной способностью обладал штамм Cetr 1, а наименьшей SP H5.

6. Выявление методом ПЦР альфа-субъединицы гена *pmoA* метан монооксигеназы было показано наличие ее отдельных фрагментов у штаммов D3 и SP H5, что показывает, что данные штаммы являются факультативными метанотрофами. Ранее наличие метанотрофии у данных штаммов описано не было.



## 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. Бактериальныи 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. Ешинимаев 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 СЕВЕРОВОСТОЧНОГО 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., Dunfield P. F. Facultative and obligate methanotrophs: how to identify and differentiate them // *Methods in enzymology.* 2011. T.495. C.31-44.  
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. Vol1, 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. Karsner 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.

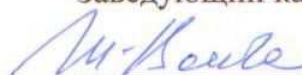
50. Wagner D. A., Gattinger A., Embacher E. M. Methanogenic activity and biomass in Holocene permafrost deposits of the Lena Delta, Siberian Arctic, and its implication for the global methane budget / D. A Wagner, // Global Change Biology. -2007. -Vol. 13(5). -P. 1089–1099.

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.

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« 18 » июня 2021 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Метанотрофные ассоцианты мхов и лишайников экосистем Восточной

Сибири

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель

 18.06.21

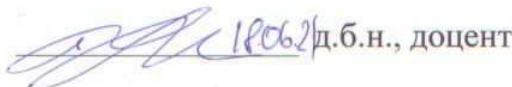
к.б.н., доцент С.Ю. Евграфова

Выпускник

 18.06.21

В.К. Кадуцкий

Рецензент

 18.06.21

И.Д. Гродницкая

Красноярск 2021