

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского
Российской академии наук

при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований



МЕТАН В МОРСКИХ ЭКОСИСТЕМАХ
тезисы и программа
Всероссийской научно-практической конференции,
посвящённой 25-летию обнаружения струйных метановых
газовыделений в Чёрном море

13–15 октября 2014 г.
Севастополь, Россия

МЕТАНОГЕННЫЕ АРХЕИ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ ГЛУБОКОВОДНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ

Брюханов А.Л.^{1,2}, Меркель А.Ю.¹, Корнеева В.А.^{1,2}, Косогова Н.М.²,
Пименов Н.В.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия,
npimenov@mail.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия, brjuchanov@mail.ru

Черное море является крупнейшим в мире меромиктическим водоемом. В центральной части моря окисленные воды (фотическая зона, холодный промежуточный слой, хемоклин) лежат от поверхности до глубины 90-100 м, но исчезновение кислорода в водной толще континентального склона наблюдается на больших глубинах – 140-175 м. Ниже кислородной зоны воды Черного моря содержат свободный сероводород, концентрация которого на глубинах 1500-2000 м достигает 370 мкМ. Наряду с H₂S глубинные черноморские воды содержат до 15 мкМ растворенного метана, основной вклад в образование которого (до 62.9×10^{10} моль/год) вносят метаногенные археи. Благодаря активности анаэробных и аэробных метанотрофных микроорганизмов концентрация CH₄ может снижаться до 56-250 нМ в зоне хемоклина (редокс-зона, граница между окисленными и бескислородными водами) и до 1-20 нМ в поверхностных окисленных водах [1]. Особый интерес при исследовании микробиологических процессов в водной толще Черного моря представляет именно зона хемоклина, где активность различных физиологических групп микроорганизмов определяется, в том числе, и разнонаправленным потоком окисленных и восстановленных газов. Показано, что в зоне хемоклина наблюдается возрастание численности микроорганизмов, а также обнаруживаются значительные активности биогеохимических процессов круговорота серы и метана [2].

Метаногенные археи являются строго анаэробными микроорганизмами. Однако некоторые представители метаногенов, обладая различными ферментативными механизмами антиокислительной защиты, способны выживать относительно длительное время при низких концентрациях кислорода [3-5] и сохранять свою активность в анаэробных микронивах, образующихся в клеточных агрегатах, панцирях диатомовых микроводорослей, фекальных пеллетах копепод и т.д. [6].

Ранее, основываясь на газохроматографических профилях содержания метана и радиоизотопном измерении скоростей метанообразования, было показано существование процесса метаногенеза не только в глубинных анаэробных, но и в поверхностных кислородсодержащих водах Черного моря [7, 8].

В данной работе было проведено определение численности и таксономического разнообразия метаногенных архей в кислородсодержащей водной толще и в зоне хемоклина Черного моря на глубинах 30-200 м в летний период (станция с координатами 44°29.85' N, 37°55.24' E на континентальном склоне в 10 милях от Голубой бухты, г. Геленджик Краснодарского края) с использованием основных молекулярно-биологических методов экологии микроорганизмов.

Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с 16S рРНК-специфичными олигонуклеотидными зондами MB1174 и MG1200b было показано присутствие в поверхностных водах Черного моря физиологически активных метаногенов, принадлежащих к подгруппам I (рода *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera* порядка *Methanobacteriales*) и II (представители порядка *Methanomicrobiales*). В нижней зоне хемоклина на глубине 167.5 м численности клеток архей этих подгрупп составляли 11 и 7.3% от всех клеток архей, соответственно [8].

При проведении ПЦР использовали олигонуклеотидные праймеры, специфичные к гену 16S рРНК архей и метаногенных архей, а также к гену *mcrA*, кодирующему α -субъединицу метилкофермент М-редуктазы и являющемуся ключевым генетическим маркером присутствия метаногенных и метанотрофных архей. Поскольку известно [6], что метаногенные археи в водной толще могут быть не только свободноживущими, но и ассоциированными с микрочастицами взвеси, то для их обнаружения методом ПЦР водные пробы, из которых впоследствии выделяли тотальную ДНК, последовательно фильтровали через крупнопористые стекловолоконные фильтры GF/C и мембранные фильтры "Millipore" с диаметром пор 0.22 мкм. По гену 16S рРНК свободноживущие и ассоциированные со взвесью представители метаногенных архей были детектированы как в поверхностных кислородсодержащих водах, так и в зоне хемоклина [9]. Однако ПЦР с более специфичными праймерами на ген *mcrA* выявила свободноживущих метаногенов только на глубинах 90, 165 и 180 м; в водных пробах из поверхностной фотической зоны (глубина 14 м) ПЦР-сигнал был получен только с ДНК, выделенной из фракции взвеси, где возможно формирование анаэробных микрониш. Это предположение

полностью подтверждается результатами измерений профиля содержания метана в водной толще, отмечающих локальные увеличения концентрации CH_4 на глубинах 14 и 90 м [8]. Вероятно, что крупные частицы взвеси являются пеллетами зоопланктона. Наличие сигнала продукта амплификации гена *mcrA* в нижней части хемоклина на глубине 165 м вполне согласуется с данными предыдущего исследования [1], в котором отмечалось присутствие анаэробных метанотрофных эвриархей групп ANME-1 и ANME-2 на этом горизонте.

Были получены профили денатурирующего градиентного гелеэлектрофореза (ДГГЭ) сообществ архей из поверхностных кислородсодержащих вод и зоны хемоклина, заметно отличающиеся количеством, расположением и интенсивностью полос амплифицированных участков гена 16S рРНК, что хорошо коррелирует с неоднородностью гидрохимических условий в верхних водных слоях Черного моря. Анализ последовательностей участков гена 16S рРНК, выделенных и реамплифицированных из отдельных ДГГЭ-полос, показал наиболее высокую гомологию (98-99%) большинства образцов с некультивируемыми морскими археями филумов *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota* [9], а также 90-92%-ную гомологию с представителями порядков *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*, что свидетельствует, по всей видимости, о минорном количестве метаногенов (относящихся к филуму *Euryarchaeota*) в поверхностной водной толще Черного моря.

Результаты ПЦР-детекции метаногенных и метанотрофных архей в поверхностных водах Черного моря.

Праймеры	Филогенетическая специфичность	Фильтр	Глубина, м						
			14	30	90-100	130-145	165	180-190	200
ARCH 344F ARCH 915R	<i>Archaea</i> (ген 16S рРНК)	GF/C	+	+	+	+	+	+	+
		Millipore	-	+	+	+	+	+	+
Met 146F Met 1324R	Метаногенные <i>Archaea</i> (ген 16S рРНК)	GF/C	н.о	+	-	+	+	+	-
		Millipore	н.о	+	+	+	+	+	-
Mlas	Метаногенн	GF/C	+	-	-	-	-	+	-

McrA-R	ые и метанотрофные <i>Archaea</i> (ген <i>mcrA</i>)	Millipore	-	-	+	-	+	+	-
ANME-1-25F ANME-1-1406R	Метанотрофные <i>Archaea</i> ANME-1 (ген 16S рРНК)	GF/C	-	н.о	-	-	+	-	-
		Millipore	-	н.о	-	-	+	-	-

Выражаем благодарность руководителю лаборатории химии Южного отделения Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН к.г.н. Часовникову В.К. за помощь при отборе черноморских водных проб.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-00033 А.

1. Durisch-Kaiser E., Klausner L., Wehrli B., Schubert C. Evidence of intense archaeal and bacterial methanotrophic activity in the Black Sea water column // Appl. Environ. Microbiol., 2005. – 71, № 12. – P. 8099-8106.
2. Пименов Н.В., Русанов И.И., Юсупов С.К., Фридрих Я., Леин А.Ю., Верли Б., Иванов М.В. Микробиологические процессы на границе аэробных и анаэробных вод в глубоководной зоне Черного моря // Микробиология, 2000. – 69, № 4. – С. 527-540.
3. Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Аэротолерантность строго анаэробных микроорганизмов: факторы защиты от окислительного стресса (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология, 2007. – 43, № 6. – С. 637-654.
4. Shima S., Sordel-Klippert M., Brioukhanov A., Netrusov A., Linder D., Thauer R.K. Characterization of a heme-dependent catalase from *Methanobrevibacter arboriphilus* // Appl. Environ. Microbiol., 2001. – 67, № 7. – P. 3041-3045.
5. Brioukhanov A.L., Netrusov A.I., Eggen R.I.L. The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri* // Microbiology, 2006. – 152, № 6. – P. 1671-1677.
6. Fuchsman C.A., Kirkpatrick J.B., Brazelton W.J., Murray J.W., Staley J.T. Metabolic strategies of free-living and aggregate-associated bacterial communities inferred from biologic and chemical profiles in the Black Sea suboxic zone // FEMS Microbiol. Ecol., 2011. – 78, № 3. – P. 586-603.
7. Русанов И.И., Юсупов С.К., Саввичев А.С., Леин А.Ю., Пименов Н.В., Иванов М.В. Микробное образование метана в аэробной зоне Черного моря // ДАН, 2004. – 399, № 4. – С. 571-573.
8. Pimenov N.V., Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Zakharova E.E., Sigalevich P.A., Rusanov I.I., Yakushev E.V., Chasovnikov V.K. Anaerobic microbial community in the aerobic water and at the oxic/anoxic interface in the Black Sea // Chemical Structure of

Pelagic Redox Interfaces: Observation and Modelling. Handbook of Environmental Chemistry Series. – Ed. Yakushev E.V. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. – 22. – P. 27-46.

9. *Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В.* Молекулярно-биологическая детекция метаногенных архей в окисленных водах Черного моря // *Микробиология*, 2013. – 82, № 4. – С. 510-512.