

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

НОВАЯ МЕТАНОБРАЗУЮЩАЯ ВОДОРОДИСПОЛЬЗУЮЩАЯ
АРХЕЯ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ
О. ЗАПАДНЫЙ ШПИЦБЕРГЕН

© 2023 г. В. Э. Трубицын^а, *, Н. Е. Сузина^а, Е. М. Ривкина^б, В. А. Щербакова^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, ФИЦ “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, 142290 Россия

^бИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения, ФИЦ “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 26.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Из образца многолетнемерзлых отложений о. Западный Шпицберген выделен новый штамм метанобразующих архей, названный нами VT^T. Клетки штамма представлены изогнутыми неподвижными палочками размером 2.7–5.3 × 0.3 мкм. Оптимальными условиями для роста были температура 20°C, pH 6.6, содержание NaCl 0.03–0.05 М. Единственным используемым субстратом являлась газовая смесь H₂/CO₂. В присутствии H₂/CO₂ рост стимулировался добавлением дрожжевого экстракта и жидкости рубца. По результатам филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК штамм VT^T отнесен к роду *Methanobacterium* с ближайшим родственником *M. lacus* 17A1^T (сходство 97.02%). Сравнение секвенированного и собранного генома штамма VT^T с геномами других видов рода подтвердило эти данные, а также показало их отличия на видовом уровне. По результатам проведенных исследований мы полагаем, что выделенный нами метаноген является представителем нового вида метанобразующих архей, для которого предложено название *Methanobacterium spitsbergense* sp. nov. с типовым штаммом VT^T (=VKM B-3566^T = JCM 39284^T).

Ключевые слова: метанобразующие археи, *Methanobacterium spitsbergense*, Западный Шпицберген, многолетнемерзлые отложения, филогенетический анализ, секвенирование генома

DOI: 10.31857/S002636562260064X, EDN: ATFLJN

Метанобразующие археи — это таксономически разнородные хемолитоавтотрофные облигатно анаэробные микроорганизмы, получающие энергию в процессе метаногенеза. Эта небольшая полифилетическая группа ответственна за продукцию большей части биогенного метана на планете. Культивируемые и некультивируемые представители этой группы прокариот распространены почти во всех известных биотопах и могут составлять до половины организмов сообществ экстремальных местообитаний (Кадников и соавт., 2017; Vishivetskaya et al., 2018). Они играют ключевую роль в анаэробном разложении биомассы и глобальном углеродном цикле Земли, в том числе, в постоянно холодных местах обитания (Каллистова и соавт., 2017).

Многолетнемерзлые отложения (ММО) содержат в себе, по разным оценкам, от 25 до 50% мирового пула углерода, при их таянии активизируются процессы образования метана, увеличивается его эмиссия в атмосферу, что вносит до-

полнительный вклад в глобальное потепление (Hugelius et al., 2014; Schuur et al., 2015).

Биология микроорганизмов — обитателей вечной мерзлоты — остается относительно неисследованной, однако недавние находки показывают, что метаногенные сообщества в этой экстремальной среде включают в себя представителей наиболее распространенных родов метаногенных архей с общей биомассой, сопоставимой с почвенными экосистемами умеренного климата (Wagner, Lieber, 2010). В ММО были обнаружены гены представителей порядков *Methanobacteriales*, *Methanopyrales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* и *Methanosarcinales* (Garcia et al., 2000; Hultman et al., 2015; Shcherbakova et al., 2016; Rivkina et al., 2016).

ДНК, выделяемая из мерзлых почв и ММО, по большей части, принадлежит некультивируемым представителям микробных сообществ, и количество выделенных чистых культур остается достаточно скромным. Из ММО выделены всего три новых вида: *Methanobacterium arcticum* M2^T (Shcherbakova

et al., 2011), *Methanobacterium veterum* МК4^T (Krivushin et al., 2010) и *Methanosarcina soligelidi* SMA-21^T (Wagner et al., 2013), а также новые штаммы уже известных видов *Methanosarcina mazei* JL01 (Oshurkova et al., 2020), *Methanosarcina mazei* MT (Simankova et al., 2003). Таким образом, микроорганизмы вечной мерзлоты остаются крайне мало изученными, и потенциал поиска в ней новых видов и штаммов метанобразующих архей далеко не исчерпан.

Архипелаг Шпицберген представляет собой уникальный объект с ММО, расположенный на границе Арктики и Атлантического океана. Около 60% суши покрыто ледниками, но остальная территория содержит самую большую площадь ММО в Европе за пределами России. В отличие от других регионов с обширными площадями ММО, таких как Сибирь и Северная Аляска, вечная мерзлота на Шпицбергене, предположительно, имеет молодой возраст (голоцен), особенно в низкогорных районах вокруг центрального острова Шпицберген (Humlum et al., 2003).

Несмотря на постоянные отрицательные температуры (от -2.6 до -1.7°C), в ММО Шпицбергена обнаружена микробная активность и определена скорость сульфатредукции (Knoblauch et al., 1999), сравнимая с таковой в отложениях умеренных широт. Однако изучение биогеохимических процессов, в основном, ограничивалось экосистемами фьордов, торфяников и почв (Buongiorno et al., 2019; Jørgensen et al., 2021). Исследованию микробных сообществ ММО архипелага Шпицберген посвящено лишь несколько работ (Hansen et al., 2007; Singh et al., 2017; Xue et al., 2020).

Ранее нами в процессе микробиологического исследования проб мерзлых отложений о. Западный Шпицберген, отобранных вблизи пос. Баренцбург, была определена численность культивируемых аэробных и анаэробных микроорганизмов, выделены 60 штаммов психрофильных и психротолерантных бактерий. Впервые в исследованных образцах ММО было обнаружено присутствие метаногенных архей и бактерий, образующих ацетат из H_2 и CO_2 (Трубицын и соавт., 2019).

Целью данной работы было исследование морфологических, физиологических, филогенетических и геномных характеристик нового водород-использующего штамма VT^T, выделенного из образца многолетнемерзлых пород о. Западный Шпицберген и описание нового вида метанобразующих архей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и хранение образцов. Образцы многолетнемерзлых отложений были отобраны в 2016 г. вблизи пос. Баренцбург на побережье Гринфьорда сотрудниками лаборатории криологии почв Инсти-

тута физико-химических и биологических проблем почвоведения ПНЦБИ РАН. Геологическое описание района исследования проведено сотрудником ИФХиБПП РАН Н.Э. Демидовым (Демидов и соавт., 2016). Предварительный газовый анализ показал, что в некоторых образцах присутствовали следовые количества метана, что указывало на возможное наличие метанобразующих архей.

Получение чистой культуры. Накопительная культура с метаногенной активностью была получена при 20°C из образца, отобранного из скважины 3 ($78^{\circ}01'48''\text{N}$, $14^{\circ}19'25''\text{E}$) с глубины 1.5 м (Трубицын и соавт., 2019). Для этого использовали среду DSMZ 141 с добавлением формата и H_2/CO_2 . Культивирование проводили с использованием техники Хангейта (Hungate, 1969). Чистая культура штамма VT^T выделена при использовании метода десятикратных разведений с антибиотиками (ванкомицином и стрептомицином, 0.5 и 0.2 мг/мл соответственно).

Культивирование. Для культивирования штамма VT^T была использована среда следующего состава (г/л): $\text{KCl} - 0.03$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.345$, $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.025$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.014$, $\text{CaCl}_2 - 0.14$ мл 10% р-ра, $\text{NaCl} - 0.2$, $\text{NH}_2\text{CO}_3 - 0.5$, дрожжевой экстракт — 0.2, триптиказа — 0.2, раствор резазурина — 1 мл 0.2% р-ра, раствор витаминов по Волину — 10 мл, раствор микроэлементов — 10 мл.

Раствор микроэлементов включал в себя (г/л): нитрилотриуксусную кислоту — 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 3$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.5$, $\text{NaCl} - 1$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.1$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.18$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0.1$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.18$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.01$, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - 0.02$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0.01$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0.01$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.03$, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.3$ мг, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0.4$ мг.

Состав раствора витаминов (мг/л): биотин — 2, фолиевая кислота — 2, пиридоксин- HCl — 10, тиамин- HCl — 5, рибофлавин — 5, никотиновая кислота — 5, Ca-D -пантотенат — 5, витамин B_{12} — 0.1, p -аминобензойная кислота — 5, α -липоевая кислота — 5.

Приготовление и разлив среды осуществляли под током газовой смеси Ag/CO_2 (при соотношении газов 3 : 1). Восстановитель готовили по стандартной методике (Bryant, Boone, 1987) и добавляли перед посевом из расчета 0.2 мл на 10 мл питательной среды. Субстрат (смесь H_2/CO_2 в соотношении 4 : 1) подавали через бактериальный фильтр во флаконы или пробирки Хангейта после инокуляции среды, создавая давление 1–1.5 атм.

Для получения колоний на питательных средах использовали описанную выше среду с добавлением 1.5% (в/в) агара и метод вращающихся пробирок (Hungate, 1969).

Определение чистоты культуры. Для определения чистоты полученных культур использовали разбавленный триптиказо-соевый бульон 1/4TSB (“Difco”) или стандартные среды с добавлением смеси глюкозы (10%) и пептона (10%) в объеме 0.1 мл на 10 мл среды. Чистоту культур определяли визуально под микроскопом.

Микроскопические исследования. Прямое наблюдение за клеточными культурами проводилось в режиме фазового контраста на микроскопе Axiostar PLUS (“Carl Zeiss”, Германия) при увеличении 1000×. Для дифференциального окрашивания клеток использовали метод Грама.

Ультратонкие срезы клеток получали по модифицированному методу Рейнольдса, как было описано ранее (Shcherbakova et al., 2005). Их исследование проводили на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100 (“Jeol”, Япония).

Содержание метана в газовой фазе измеряли на газовом хроматографе Pye Unicam 304 (Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором. Для определения была использована стеклянная колонка (длина 1 м, внутренний диаметр 2 мм), заполненная Парапаком Q, 80–100 меш (“Fluka”, Германия). Температура колонки, инжектора и детектора были 90, 150 и 180°C соответственно. Газ-носитель – азот, скорость потока – 20 мл/мин.

Исследования физиологии. Способность штамма использовать для роста различные субстраты исследовали на характерном для гидрогенотрофных метаногенных микроорганизмов ряде субстратов. Жидкие субстраты добавляли в среды после стерилизации из стоковых растворов до конечных концентраций 0.1% (об./об.). Газы задували до давления 1 атм. Нейтральный уровень pH в пробах поддерживали с помощью гидрокарбонатного (в случае с субстратами, компонентом которых был углекислый газ) либо фосфатного буферов.

Для исследования влияния температуры культивирования проводили при температурах 0, 10, 20, 28, 36, 45°C. Оптимум pH был определен при использовании K/Na фосфатного буфера в диапазоне pH от 6.3 до 6.8. Исследование зависимости роста штамма VT^T от солёности проводилось путем варьирования содержания NaCl в среде культивирования. Результаты учитывались на третьем пересеве культур.

Для проверки стимуляции роста в минеральную питательную среду помимо основного субстрата H₂/CO₂ вносили формиат, ацетат, казаминовые кислоты, дрожжевой экстракт, жидкость рубца, кофермент М (CoM), триптиказный пептон. Жидкость рубца вносили в количестве 20 мл/л, конечная концентрация остальных стимулирующих веществ в пробах составляла 0.1% (об./об.). Стимулирующий эффект устанавливали во втором посеве на основании сравнения с контрольной пробой, растущей без добавок.

Для определения устойчивости использовали антибиотики различной химической природы в следующих конечных концентрациях: амикацин – 0.001 мг/мл, бацитрацин – 0.005 мг/мл, ванкомицин – 0.5 мг/мл, канамицин – 0.1 мг/мл, метицилин – 1 мг/мл, стрептомицин – 0.2 мг/мл, тетрациклин – 6.25×10^{-5} и эритромицин – 0.05 мг/мл.

Способность клеток штаммов к лизису оценивалась несколькими способами: экспозицией культуры в 1% раствор SDS в течение 10 мин, центрифугированием при 12000 g в течение 5 мин, помещением клеток в гипотонические условия.

Выделение ДНК и анализ генов 16S рРНК и *mcrA*. Клеточную биомассу отбирали в экспоненциальной фазе роста культуры и осаждали на центрифуге при 6000 g. Выделение и очистку хромосомной ДНК проводили по модифицированному методу Мармура (Marmur, 1961).

Аmplификация целевых генов проводилась на амплификаторе Терцик (“ДНК-Технология”, Россия). Суммарный объем реакционной смеси составлял 25 мкл, в ее состав входили следующие компоненты: 1× буфер для *Taq*-полимеразы (“Fermentas”, Литва); 10 нг ДНК-матрицы; 50 мкМ каждого dNTP (“Fermentas”, Литва); 0.25 мкМ каждого праймера.

Для амплификации фрагментов гена 16S рРНК использовали универсальные архейные праймеры 21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') (DeLong, 1992) и 1378r (5'-TGTGCAAGGAGCAGGGAC-3'). Для амплификации фрагментов гена *mcrA* использовали праймеры MCRF (5'-TAYGAYCAR-ATHTGGYT-3') и MCRR (5'-ACRTTCATNG-CRTARTT-3').

Успешность проведения ПЦР оценивали с помощью горизонтального гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Для переосаждения ДНК использовался раствор следующего состава (мкл): деионизованная вода – 4.7, 5 M CH₃COONa – 1.5, 96% этанол – 43.8. Раствор нагревали до комнатной температуры и добавляли в соотношении 50 мкл на 10 мкл ПЦР-продукта, перемешивали покачиванием и оставляли при комнатной температуре в течение 20 мин. Получившийся осадок отделяли от супернатанта центрифугированием (12000 g, 20 мин), промывали охлажденным 96% этанолом и высушивали. После высыхания ПЦР-продукт растворяли в деионизованной воде.

Полученные фрагменты ДНК были секвенированы в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Анализ продуктов реакции производился на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems. Подготовку ДНК для секвенирования проводили согласно инструкциям по пробоподготовке ЦКП “Геном”.

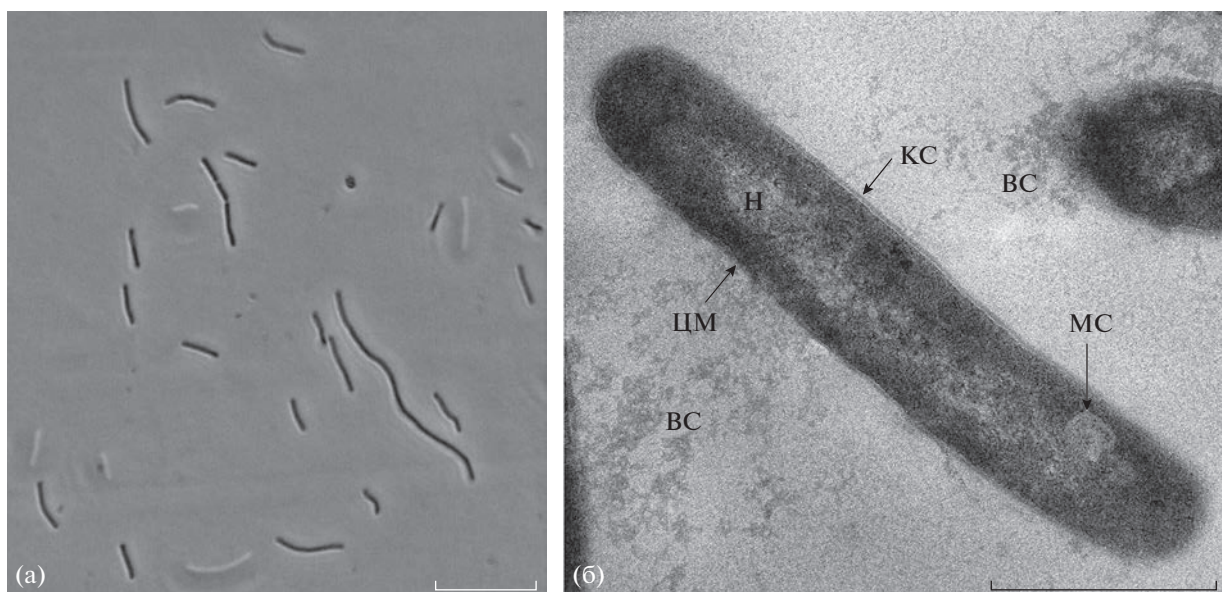


Рис. 1. Микрофотографии клеток штамма VT^T: (а) — фазово-контрастная микроскопия, видны делящиеся клетки с перетяжкой; (б) — ультратонкий срез клетки, трансмиссионная электронная микроскопия. Обозначения: Н — нуклеоид; ЦМ — цитоплазматическая мембрана; КС — клеточная стенка; МС — мезосомоподобные мембранные структуры; ВС — внеклеточная слизь. Размер масштабной линейки: (а) — 10 мкм; (б) — 0.5 мкм.

Результаты секвенирования обрабатывали с помощью пакета программ MEGA11. Для выравнивания последовательностей использовали алгоритмы ClustalW и Muscle, для улучшения качества выравнивания использовался алгоритм Gblocks. Построение филогенетических деревьев по фрагментам генов проводили тремя методами: Neighbour Joining, Maximum Likelihood и Minimum Evolution. Построенные древа были подвергнуты тестированию по методам Maximum Composite Likelihood и “Tamura-Nei” с количеством циклов 1000 (“bootstrap”). Вероятность положения более 70% являлась значимой и указывалась у мест расхождения ветвей. Полученные последовательности 16S рРНК и *mcrA* депонированы в базе данных NCBI под номерами OK037044 и OM927980 соответственно.

Сравнительный геномный анализ. Сборку и анализ генома проводили на сервере Kbase, как было описано ранее (Trubitsyn et al., 2022). Геном и библиотеки ридов были депонированы в базе данных NCBI под номерами GCA_019931065.1 и SRA SRX12179610 соответственно.

Для сравнительного анализа полученных сборок вычисляли сравнительные коэффициенты ANI, AAI и DDH. Для подтверждения филогенетического положения и поиска ближайших родственных штаммов использовалась программа GTDBtk. Филогенетические деревья с использованием 49 house-keeping генов были построены в программе SpiecesTree v.2.2.0 (<https://github.com/kbaseapps/SpeciesTreeBuilder>) из набора Kbase с

применением алгоритма Gblocks и метода Maximum Likelihood для построения деревьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология, ультраструктурная организация клеток и культуральные свойства. Клетки штамма VT^T представляли собой неподвижные изогнутые палочки размером $2.7\text{--}5.3 \times 0.3$ мкм, растущие одиночно, парно, или формирующие нити из 10–12 палочек (рис. 1а). Деление происходило путем образования перетяжек. По Граму окрашивались отрицательно. Клеточная стенка, как следует из анализа ультратонких срезов, у большинства клеток популяции очень тонкая, иногда ее толщина составляет около 7 нм. Клеточная стенка штамма VT^T структурирована таким образом, что имеет некоторое сходство с наружной мембраной грамотрицательных бактерий, однако при этом не имеет характерных извилистых контуров (рис. 1б). Для клеток этого штамма характерно образование внеклеточной слизи (ВС) и внутрицитоплазматических мезосомоподобных мембранных структур (МС) (рис. 1б). Клеточная стенка была устойчива к лизису в гипотонических условиях, центрифугированию и экспозиции в 0.1% растворе SDS в течение 1 мин.

На жидких питательных средах культура росла с образованием белого мутного осадка. На плотной питательной среде в анаэробных условиях были получены точечные (диаметр 0.4–0.8 мм) беловатые полупрозрачные колонии выпуклой

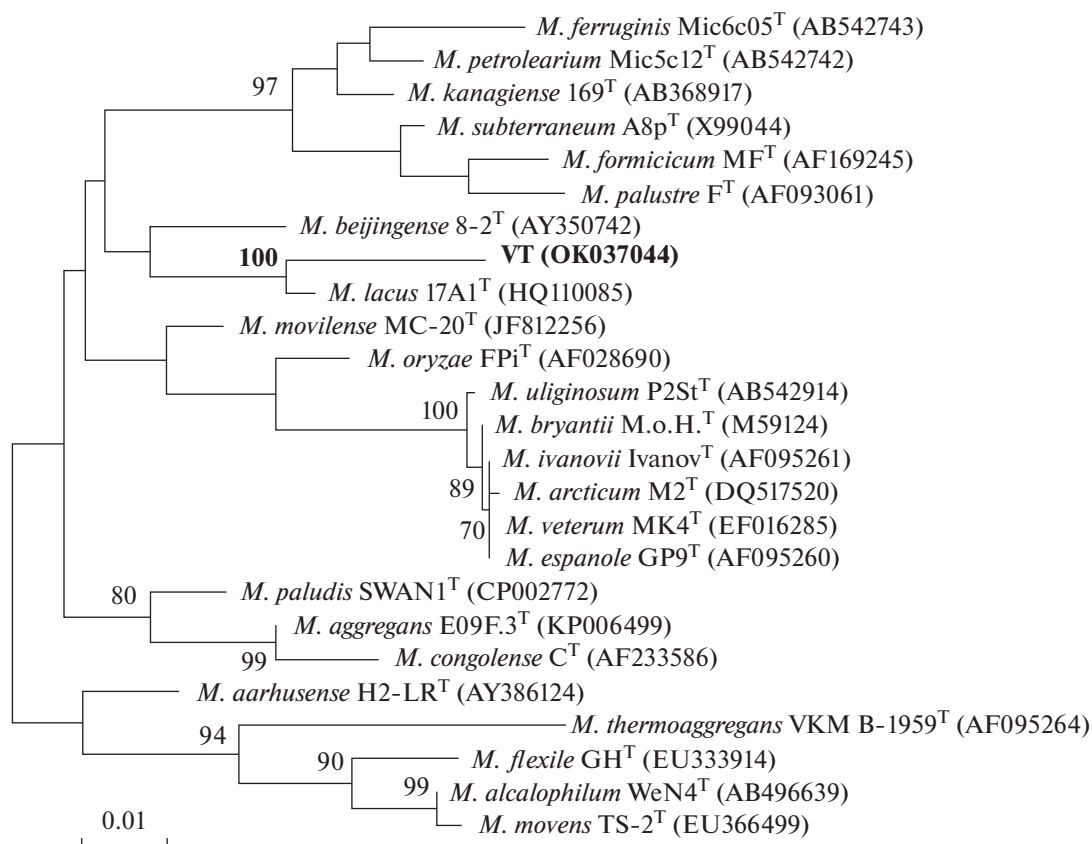


Рис. 2. Филогенетическое бескорневое древо рода *Methanobacterium* с указанием положения нового штамма VT^T, построенное по частичным нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК (1205 п.н.). Построено по алгоритму Maximum Likelihood с повторностью 1000.

формы с ровными краями, гладкие, мягкой консистенции.

Филогенетический анализ. Для определения филогенетического положения штамма были секвенированы частичные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК длиной 1205 п.н. и гена *mcrA* длиной 503 п.н. (транслирована в аминокислотную последовательность длиной 167 а.о.).

Филогенетический анализ показал, что штамм VT^T кластеризуется с представителями рода *Methanobacterium*, ближайшим к нему типовым штаммом является *Methanobacterium lacus* 17A1^T, выделенный из донных осадков пресноводного озера Павин (Borrel et al., 2012), со сходством последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA* 97.0 и 97.6% соответственно. Филогенетические деревья, построенные тремя различными методами, имели сходную топологию, что подтверждает полученные данные (рис. 2 и 3).

Субстратная специфичность и стимулирующие добавки. *Methanobacterium* sp. VT^T использовал как единственный источник углерода и энергии только газовую смесь H₂/CO₂ и не рос на формиате, метаноле, ацетате, этаноле/CO₂, метаноле/H₂, аце-

тате/H₂, изопропанолем/CO₂ и изобутанолем/CO₂. В присутствии H₂/CO₂ рост стимулировался добавлением дрожжевого экстракта и жидкости рубца. Триптиказа, формиат, каминовые кислоты и кофермент М оказывали слабый стимулирующий эффект, а ацетат не влиял на рост.

Оптимальные для роста параметры среды. Рост штамма наблюдали в диапазоне от 10 до 37°C. Оптимальный рост отмечался при 20°C. При 0°C и температурах выше 45°C метаногенез не наблюдался. На данный момент это наименьшая оптимальная температура роста, обнаруженная среди представителей рода *Methanobacterium*. Ранее самые низкие оптимальные температуры роста 28 и 30°C были зафиксированы, соответственно, у *M. veterum* MK4^T (Krivushin et al., 2010) и *M. lacus* 17A1^T (Borrel et al., 2012).

Зависимость роста от pH среды была определена на узком диапазоне (от 6.2 до 7.2) с оптимумом при 6.6. Близкие значения оптимумов pH наблюдаются у *M. petrolearium* Mic5c12^T (6.5) и *M. lacus* 17A1^T (6.5), ближайшего типового штамма.

Было показано, что VT^T способен расти на используемой среде без дополнительного внесения

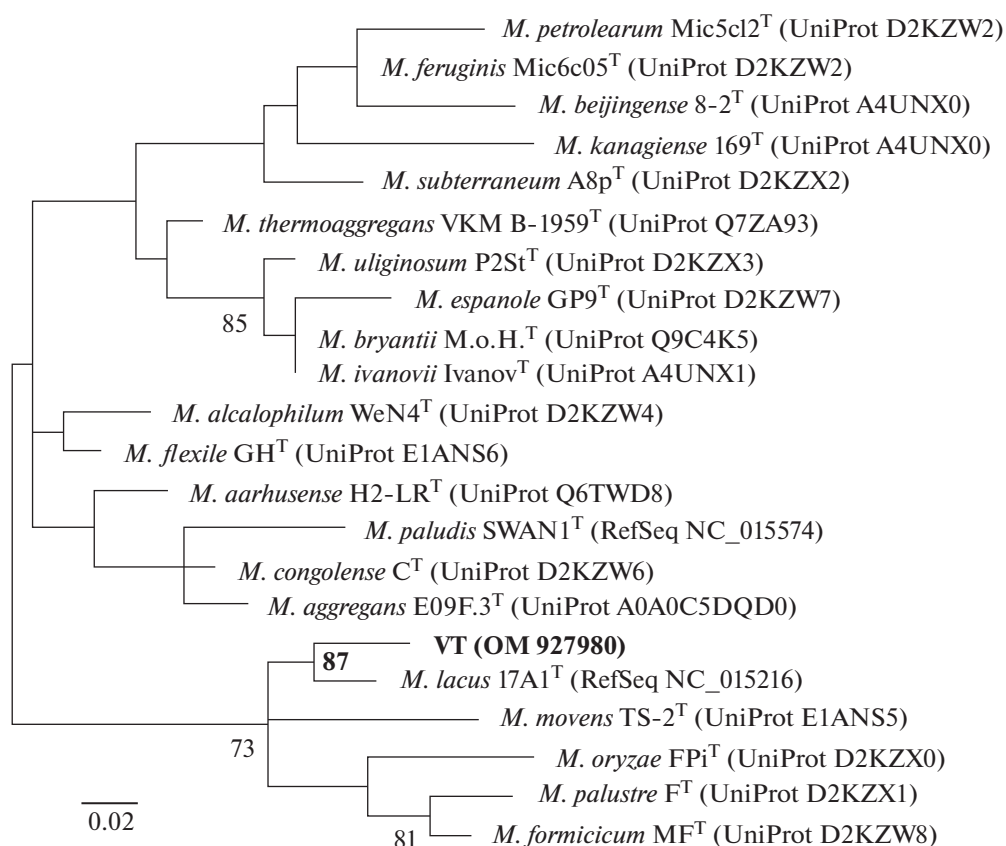


Рис. 3. Филогенетическое бескорневое древо рода *Methanobacterium* с указанием положения нового штамма VT^T, построенное по частичным аминокислотным последовательностям С-концевого домена белка McrA (127 а.о.). Построено по алгоритму Maximum Likelihood с повторностью 1000.

NaCl, максимальная концентрация, при которой происходил рост, составила 0.4 М (25 г/л). Наибольшей скорости роста (0.48 сут⁻¹) штамм достигал при концентрации NaCl 0.03–0.05 М (2–3 г/л).

Чувствительность к антибиотикам. Новый штамм был устойчив к действию метицилина, ванкомицина и стрептомицина. Канамицин и эритромицин вызывали угнетение роста; бацитрацин, амикацин и тетрациклин полностью его ингибировали.

Анализ последовательности генома. Полученная последовательность имела длину 2662706 п.н., включая 600 пропусков, и состояла из 18 скаффолдов (24 контигов) с N50, равным 340628 п.н., и L50, равным 3. Среднее покрытие составило 709.5 ± 147.9 при 87.38% картированных прочтений. В геноме обнаружено 2788 генов, включая 2699 белок-кодирующих последовательностей, 39 псевдогенов, 44 тРНК, 4 рРНК (2 5S, 1 16S, 1 23S) и 2 нкРНК. Коэффициент кодирования составил 82.03%, завершенность генома по CheckM 98.8%, контаминация отсутствовала.

С помощью GTDBtk было показано, что наиболее близким к VT^T является таксономически не

описанный *Methanobacterium* sp. SMA-27 (Serrano et al., 2014), выделенный в 2014 г. из мерзлых почв о-ва Самойловский на побережье моря Лаптевых. Сравнение репрезентативных геномов рода *Methanobacterium* по коэффициентам ANI, AAI, DDH и проценту пар G + C показало, что VT^T намного ближе штамму SMA-27 (табл. 1), чем другим организмам, в том числе используемому в исследованиях вместо типового *M. lacus* AL-21.

При этом значения сравнительных коэффициентов находятся ниже границы межвидовых различий, и новый штамм не может быть отнесен к какому-либо из представленных в табл. 1 видов. Это наглядно видно по филогенетическому дереву, построенному на основе сравнения отдельных групп house-keeping генов (рис. 4).

Фенотипическое сравнение. Штамм VT^T физиологически отличается от типовых штаммов ближайших видов, в том числе *M. lacus* 17A1^T (табл. 2). Он более холодолюбив, использует как единственный источник углерода и энергии только смесь H₂/CO₂. В отличие от *M. lacus* 17A1^T, его рост может стимулироваться дрожжевым экс-

Таблица 1. Сравнение геномов штамма VT^T и представителей рода *Methanobacterium*

Геномы (размеры, п.н.)	Завершенность	ANI*, %	AAI*, %	DDH*, %	G + C, %
Штамм VT ^T (2662706)	Скаффолды	—	—	—	32.53
<i>Methanobacterium</i> sp. SMA-27 (2490725)	Полный	95.54	94.32	65.30	32.57
<i>M. lacus</i> AL-21 (2583753)	Полный	73.94	73.24	19.00	35.83
<i>M. paludis</i> SWAN1 ^T (2546541)	Полный	73.10	69.52	20.10	35.73
<i>M. congolense</i> Buetzberg (2469575)	Полный	72.15	68.07	20.40	38.51
<i>M. formicicum</i> Mb9 (2494510)	Полный	69.52	64.30	18.80	41.14
<i>M. subterraneum</i> A8p ^T (2515817)	Полный	69.46	64.44	19.00	39.40
<i>M. arcticum</i> M2 ^T (3393923)	Скаффолды	71.07	63.91	18.30	33.17
<i>M. veterum</i> MK4 ^T (3369555)	Скаффолды	71.07	63.88	18.30	33.21
<i>M. oryzae</i> FPI ^T (2449774)	Скаффолды	71.06	64.89	17.90	31.40
<i>M. bryantii</i> M.o.H. ^T (3466370)	Контиги	71.30	64.33	18.50	33.19
<i>M. aggregans</i> E09F.3 ^T (2347771)	Контиги	72.03	68.44	19.50	38.14
<i>M. petrolearium</i> Mic5c12 ^T (2468550)	Контиги	69.52	64.22	18.30	37.77

* Указанные коэффициенты являются результатом попарного сравнения с геномом штамма VT^T.

трактом и жидкостью рубца, но не ацетатом. Кроме того, оптимальная соленость для VT^T более чем в два раза ниже, чем для 17A1^T.

На основании морфологических, физиологических, генотипических и филогенетических данных можно сделать вывод, что исследуемый

штамм является представителем нового вида рода *Methanobacterium*.

Предложение нового вида метанобразующих архей.
Methanobacterium spitsbergense (shpits.ber.gen'sis., N.L. neut. adj. spitsbergense, относящийся к Шпицбергену).

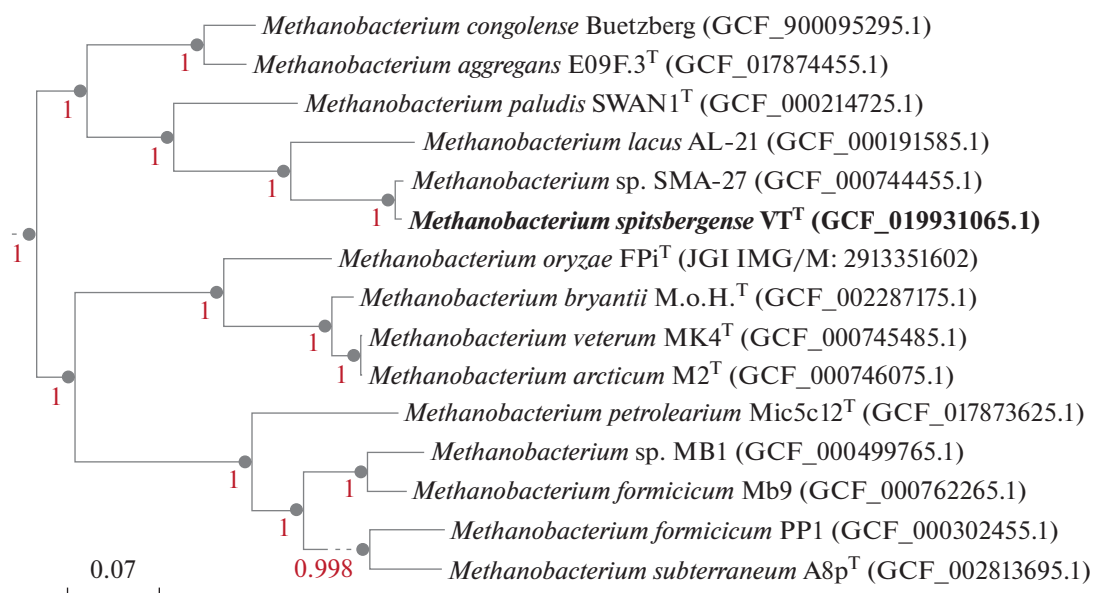

Рис. 4. Филогенетическое дерево рода *Methanobacterium*, построенное на основе сравнения 49 групп генов.

Таблица 2. Сравнение физиологических и морфологических особенностей штамма *VT^T* и типовых штаммов близкородственных видов рода *Methanobacterium*

Характеристики	<i>M. spitsbergense</i> VT ^T	<i>M. lacus</i> 17A1 ^T	<i>M. lacus</i> AL-21	<i>M. beijngense</i> 8-2 ^T	<i>M. paludis</i> F ^T	<i>M. movilense</i> MC-20 ^T
Размеры клеток, мкм	2.7–5.3 × 0.3	2–15 × 0.2–0.4	1.5–35 × 0.45–0.85	3–5 × 0.4–0.5	2–15 × 0.5	3.5–4.0 × 0.6–0.7
Окрашивание по Граму	–	–	–	–	–	–
Температурный диапазон, °C	10–37	14–41	10–37	25–50	16–40	0–44
Температурный оптимум, °C	20	30	32–37	37	32–37	30
Диапазон pH	6.2–6.8	5.0–8.5	4.7–7.1	6.5–8.0	4.8–6.6	6.2–9.9
Оптимум pH	6.6	6.5	6.2	7.2	5.4–5.7	7.4
Соленость среды, М	0–0.4	0–0.4	0–0.06	0–0.5	0–0.25	0.02–0.6
Оптимальная соленость, М	0.03–0.05	0.1	0.05	ND	ND	0.08
Субстраты	Н	Н, МН	Н	Н, F	Н	Н, F, P, B
Стимулирующие добавки	F, YE, K, T, R, C	A, R, YE	A, C	A, YE	A, C	ND
G + C в ДНК, мол. %	32.5 (Gs)	37.0 (HPLC)	35.8 (Gs)	38.9 (Tm)	35.7 (Gs)	33.0 (HPLC)
Источник	Это исследование	Borrel et al., 2012	Cadillo-Quiroz et al., 2014	Ma et al., 2005	Cadillo-Quiroz et al., 2014	Schirmack et al., 2014

Примечание. “–” – отрицательно, “+” – положительно, ND – нет данных, Н – H₂/CO₂, МН – метанол/H₂, F – формил, Р – 2-пропанол, В – 2-бутанол, А – ацетат, YE – дрожжевой экстракт, К – казеиновые кислоты, Т – триптиказный пептон, R – жидкость рубца, C – CoM; определение G + C состава: Gs – геномное секвенирование, HPLC – жидкостная хроматография, Tm – температура плавления.

Клетки представляют собой граммотрицательные, неподвижные, неспорообразующие, изогнутые палочки 0.3 мкм шириной и 2.7–5.3 мкм длиной. Клетки способны формировать нити до 10–12 палочек. На плотной питательной среде растет в виде точечных (0.4–0.8 мм) беловатых полупрозрачных колоний выпуклой формы с ровными краями, гладких, мягкой консистенции. Строгий анаэроб. Хемоавтотроф. Оптимальная температура роста близка к 20°C. Рост не наблюдался при температуре ниже 10°C и выше 36°C. Оптимальное значение pH для роста и метанообразования составляет 6.6 при определенном диапазоне от 6.2 до 7.2. Оптимальная соленость среды составляет 0.03–0.05 М; способен расти без NaCl в среде культивирования. Единственным используемым субстратом является газовая смесь H₂/CO₂, не использует формиат, ацетат, метанол, ацетат/H₂, метанол/H₂, этанол/CO₂, 2-пропанол, 2-бутанол, метиламин. Добавление дрожжевого экстракта и жидкости рубца не требуется, но стимулирует рост. Устойчив к действию метициллина, ванкомицина и стрептомицина. Канамицин и эритромицин ингибируют рост, а бацитрацин, амикацин и тетрациклин полностью его подавляют.

Типовой штамм VT^T (=VKM B-3566^T = JCM 39284^T) выделен из образца многолетнемерзлых отложений, отобранного с глубины 1.5 м вблизи п. Баренцбург на территории о. Западный Шпицберген, Норвегия. Содержание Г + Ц в ДНК типового штамма составляет 32.53 мол. %.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), грант 20-34-90087 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Демидов Н.Э., Караевская Е.С., Веркулич С.Р., Никулина А.Л., Саватюгин Л.М. Первые результаты мерзлотных наблюдений на криосферном полигоне Российского научного центра на архипелаге Шпицберген (РНЦШ) // Проблемы Арктики и Антарктики. 2016. Т. 4. № 110. С. 67–79.
Demidov N.E., Karaevskaya E.S., Verkulich S.R., Nikulina A.L., Savatyugin L.M. First results of permafrost monitoring on

the cryospheric site of Russian Scientific Center on Spitsbergen (RSCS) // Problemy Arktiki i Antarkтики [Arctic and Antarctic Problems]. 2016. V. 4. № 110. P. 67–79 (in Russian).

Кадников В.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Ивасенко Д.А., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В., Франк Ю.А. Вариативность состава микробного сообщества резервуара подземных термальных вод в Западной Сибири // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 739–747.

Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ivasenko D.A., Pimenov N.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Frank Y.A. Variability of microbial community composition of the Western Siberia underground thermal waters reservoir // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 765–772.

Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 661–683.

Kallistova A.U., Merkel A.U., Tarnovetskiy I.U., Pimenov N.V. Formation and oxidation of methane by prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.

Трубицын В.Э., Рыжманова Я.В., Захарюк А.Г., Ошуркова В.И., Лауринавичюс К.С., Спирина Е.В., Щербаклова В.А., Ривкина Е.М. Разнообразие культивируемых прокариот в образцах многолетнемерзлых отложений острова Западный Шпицберген // Криосфера Земли. 2019. Т. 23. № 6. С. 37–46.

Trubitsyn V.E., Ryzhmanova Y.V., Zaharuk A.G., Oshurkova V.I., Laurinavichius K.S., Spirina E.V., Shcherbakova V.A., Rivkina E.M. Diversity of cultured prokaryotes in permafrost sediment samples of West Spitsbergen Island // Earth's Cryosph. 2019. V. 23. № 6. P. 37–46 (in Russian).

Borrel G., Joblin K., Guedon A., Colombet J., Tardy V., Lehours A.-C., Fonty G. *Methanobacterium lacus* sp. nov., isolated from the profundal sediment of a freshwater meromictic lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1625–1629.

Bryant M.P., Boone D.R. Emended description of strain MS^T (DSM 800^T), the type strain of *Methanosarcina barkeri* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 169–170.

Buonigiorno J., Herbert L.C., Wehrmann L.M., Michaud A.B., Laufer K., Roy H., Jorgensen B.B., Szynkiewicz A., Faiia A., Yeager K.M., Schindler K., Lloyd K.G. Complex microbial communities drive iron and sulfur cycling in Arctic fjord sediments // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. e00949-19.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00949-19>

Cadillo-Quiroz H., Bräuer S.L., Goodson N., Yavitt J.B., Zinder S.H. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 1473–1480.

DeLong E.F. Archaea in coastal marine environments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 5685–5689.

Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea // Anaerobe. 2000. V. 6. P. 205–226.

Hansen A.A., Herbert R.A., Mikkelsen K., Jensen L.L. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 2870–2884.

Hugelius G., Strauss J., Zubrzycki S., Harden J.W., Schuur E.A.G., Ping C.L., Schirmermeister L., Grosse G., Michaelson G.J.,

- Koven C.D., O'Donnell J.A., Elberling B., Mishra U., Camill P., Yu Z., Palmag J., Kuhry P. Estimated stocks of circumpolar permafrost carbon with quantified uncertainty ranges and identified data gaps // *Biogeosciences*. 2014. V. 11. P. 6573–6593.
- Hultman J., Waldrop M.P., Mackelprang R., David M.M., McFarland J., Blazewicz S.J., Harden J., Turetsky M.R., McGuire A.D., Shah M.B., VerBerkmoes N.C., Lee L.H., Mavrommatis K., Jansson J.K. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes // *Nature*. 2015. V. 521. P. 208–212.
- Humlum O., Instanes A., Sollid J.L. Permafrost in Svalbard: A review of research history, climatic background and engineering challenges // *Polar Res*. 2003. V. 22. P. 191–215.
- Hungate R.E. Chapter IV. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // *Methods in Microbiology*. 1969. P. 117–132.
- Jørgensen B.B., Laufer K., Michaud A.B., Wehrmann L.M. Biogeochemistry and microbiology of high Arctic marine sediment ecosystems – case study of Svalbard fjords // *Limnol. Oceanogr.* 2021. V. 66. P. S273–S292.
- Knoblauch C., Jørgensen B.B., Harder J. Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in Arctic marine sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 4230–4233.
- Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E., Rivkina E.M. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 455–459.
- Ma K., Liu X., Dong X. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 325–329.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 208–218.
- Oshurkova V., Troshina O., Trubitsyn V., Ryzhmanova Y., Bochkareva O., Shcherbakova V. Characterization of *Methanosarcina mazei* JL01 isolated from holocene arctic permafrost and study of the archaeon cooperation with bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2^T // The 1st International Electronic Conference on Microbiology. Basel Switzerland: MDPI, 2020. P. 4.
- Ran Y., Li X., Cheng G., Zhang T., Wu Q., Jin H., Jin R. Distribution of permafrost in China: An overview of existing permafrost maps // *Permafr. Periglac. Process*. 2012. V. 23. P. 322–333.
- Rivkina E., Petrovskaya L., Vishnivetskaya T., Krivushin K., Shmakova L., Tutukina M., Meyers A., Kondrashov F. Metagenomic analyses of the late Pleistocene permafrost – additional tools for reconstruction of environmental conditions // *Biogeosciences*. 2016. V. 13. P. 2207–2219.
- Schirmack J., Mangelsdorf K., Ganzert L., Sand W., Hillebrand-Voiculescu A., Wagner D. *Methanobacterium movilense* sp. nov., a hydrogenotrophic, secondary-alcohol-utilizing methanogen from the anoxic sediment of a subsurface lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 522–527.
- Schuur E.A.G., McGuire A.D., Schädel C., Grosse G., Harden J.W., Hayes D.J., Hugelius G., Koven C.D., Kuhry P., Lawrence D.M., Natali S.M., Olefeldt D., Romanovsky V.E., Schaefer K., Turetsky M.R., Treat C.C., Vonk J.E. Climate change and the permafrost carbon feedback // *Nature*. 2015. V. 520. P. 171–179.
- Serrano P., Hermelink A., Lasch P., de Vera J.-P., König N., Burckhardt O., Wagner D. Confocal Raman microspectroscopy reveals a convergence of the chemical composition in methanogenic archaea from a Siberian permafrost-affected soil // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2015. V. 91. fiv126.
- Shcherbakova V., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Gilichinsky D. *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 144–147.
- Shcherbakova V.A., Chuvilskaya N.A., Rivkina E.M., Pecheritsyna S.A., Laurinavichius K.S., Suzina N.E., Osipov G.A., Lysenko A.M., Gilichinsky D.A., Akimenko V.K. Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algorithum* sp. nov. // *Extremophiles*. 2005. V. 9. P. 239–246.
- Simankova M.V., Kotsyurbenko O.R., Lueders T., Nozhevnikova A.N., Wagner B., Conrad R., Friedrich M.W. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats // *Syst. Appl. Microbiol.* 2003. V. 26. P. 312–318.
- Singh P., Singh S.M., Singh R.N., Naik S., Roy U., Srivastava A., Bölter M. Bacterial communities in ancient permafrost profiles of Svalbard, Arctic // *J. Basic Microbiol.* 2017. V. 57. P. 1018–1036.
- Trubitsyn V., Rivkina E., Shcherbakova V. Draft genome sequence of a methanogenic archaeon from West Spitsbergen permafrost // *Microbiol. Resour. Announc.* 2022. V. 11. <https://doi.org/10.1128/mra.00938-21>
- Vishnivetskaya T.A., Buongiorno J., Bird J., Krivushin K., Spirina E.V., Oshurkova V., Shcherbakova V.A., Wilson G., Lloyd K.G., Rivkina E.M. Methanogens in the Antarctic Dry Valley permafrost // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018. V. 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy109>
- Wagner D., Liebner S. Methanogenesis in Arctic permafrost habitats // *Handbook of Hydrocarbon Microbiology: Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, Fats and Related Hydrophobic Substrates and Products. Section B: The Microbiology of Production of Hydrocarbons, Lipids* / Ed. Timmis K.N. Springer, 2010. P. 663–666.
- Wagner D., Schirmack J., Ganzert L., Morozova D., Mangelsdorf K. *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation- and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 2986–2991.
- Xue Y., Jonassen I., Øvreås L., Taş N. Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020. V. 96. fiae057.

A New Methanogenic, Hydrogenotrophic Archaeon from Spitsbergen Permafrost**V. E. Trubitsyn^{1,*}, N. E. Suzina¹, E. M. Rivkina², and V. A. Shcherbakova¹**¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*²*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Agriculture, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia***e-mail: lichoradkin43@gmail.com*

Received September 5, 2022; revised October 26, 2022; accepted October 27, 2022

Abstract—A new strain of methanogenic archaea, designated VT^T, was isolated from a sample of Spitsbergen permafrost. The cells were nonmotile curved rods, $2.7\text{--}5.3 \times 0.3 \mu\text{m}$. The optimal conditions for growth were 20°C, pH 6.6, and NaCl concentrations 0.03–0.05 M. The H₂/CO₂ gas mixture was the only substrate used. In the presence of H₂/CO₂, growth was stimulated by addition of yeast extract or rumen fluid. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences indicated that strain VT^T belonged to the genus *Methanobacterium* and was most closely related to *M. lacus 17A1^T* (97.02% similarity). Comparison of the sequenced and assembled genome of strain VT^T with the genomes of other members of this genus confirmed these results and revealed species-level differences. Our results indicate that this methanogenic isolate belongs to a new species of methanogenic archaea, for which the name *Methanobacterium spitsbergense* sp. nov. was proposed, with the type strain VT^T (=VKM B-3566^T = JCM 39284^T).

Keywords: methanogenic archaea, *Methanobacterium spitsbergense*, Spitsbergen, permafrost deposits, phylogenetic analysis, genome sequencing