

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА В ПРЕСНОМ ОЗЕРЕ УМЕРЕННОГО ПОЯСА В ПЕРИОД ИНТЕНСИВНОГО ЦВЕТЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ¹

© 2023 г. А. Ю. Каллистова^{a, *}, А. И. Косякова^a, И. И. Русанов^a, В. В. Кадников^a,
А. В. Белецкий^a, Д. Д. Коваль^a, С. К. Юсупов^a, И. Зеккер^b, Н. В. Пименов^a

^aФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^bУниверситет Тарту, Тарту, 50411 Эстония

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Сезонное цветение цианобактерий оказывает негативное влияние на пресноводные экосистемы. Участие цианобактерий в образовании метана и их взаимоотношения с метаногенными археями к настоящему времени изучены недостаточно. Целью работы было выявление особенностей процесса метаногенеза в водной толще и осадках центральной части пресного оз. Сенеж (Московская область) в период активного цветения цианобактерий. В работе использовали аналитические, радиоизотопные, микроскопические, молекулярно-биологические и инкубационные методы. Выявлено зашлачивание и перенасыщение кислородом водного слоя 0–2 м за счет интенсивного фотосинтеза. В придонной воде (4 м) условия были рН-нейтральные и гипоксидные; осадки были восстановленные. Метан детектировался по всему профилю водной толщи: его концентрация в поверхностном водном слое была на порядок ниже, чем в придонной воде и на 4 порядка ниже, чем в осадках. В фотической зоне доминировали цианобактерии вида *Microcystis aeruginosa* (до 30% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК). Также детектированы последовательности цианобактерий и пресноводных представителей клады SAR11, которые потенциально могут участвовать в аэробном метаногенезе при разложении метилфосфонатов (MPn). В перенасыщенных кислородом водах выявлены последовательности гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoregula*, которые потенциально могут осуществлять метаногенез в кооперации с цианобактериями. В восстановленных осадках преобладали гидрогенотрофный и ацетокластический пути метаногенеза. Детектированы последовательности метаногенов порядков *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales* и *Methanomassiliicoccales*. Цветение цианобактерий способствовало процессу метаногенеза как в фотической зоне оз. Сенеж за счет разложения MPn и ассоциированного с цианобактериальными агрегатами анаэробного метаногенеза, так и в придонной воде и осадках за счет создания дефицита кислорода и избытка субстратов при осаждении и разложении цианобактериальной биомассы.

Ключевые слова: пресные озера, цветение цианобактерий, *Microcystis*, метаногенез, разложение метилфосфоната, *Methanoregula*

DOI: 10.31857/S0026365623600256, EDN: KAVSYX

Сезонное цветение фитопланктона оказывает негативное воздействие на пресноводные экосистемы, т.к. приводит к образованию избыточного количества органического вещества (ОВ) и токсинов, снижению освещенности и дефициту кислорода в водной толще, расположенной ниже фотической зоны. Источником токсинов являются цианобактерии, которые имеют более высокие температурные оптимумы роста и более толерантны к повышенным температурам, чем другие представители фитопланктона (Wetzel, 2001), по-

этому повышение температуры водоемов, происходящее в результате изменения климата, вызывает большое беспокойство (Huisman et al., 2018; Smucker et al., 2021). Интенсивное цветение цианобактерий может происходить и при пониженных температурах (<15°C), в том числе, в подледный сезон (Reinl et al., 2023).

Известно, что в водных экосистемах цианобактерии опосредовано и напрямую участвуют в круговороте парникового газа метана. В первую очередь, это связано с включением их биомассы в микробную пищевую цепь. Осаждение и интенсивное разложение избыточного ОВ биомассы цианобактерий приводит к быстрому истощению

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365623600256 для авторизованных пользователей.

растворенного кислорода и созданию гипоксидных и анаэробных условий ниже фотической зоны (Diaz, Rosenberg, 2008). В анаэробных условиях ОВ продолжает разлагаться до субстратов — непосредственных предшественников метаногенеза (Xu et al., 2020). Таким образом, цветение цианобактерий создает в воде и верхнем слое осадков благоприятные условия для метаногенеза — анаэробии и доступности субстратов. Цианобактерии могут также напрямую снабжать метаногенов субстратами, например, водородом (Berg et al., 2014; Bizik, 2020; Самылина и соавт., 2023) и C1-метилированными соединениями (Zhu et al., 2022). Этот процесс может происходить, в том числе, в бескислородных микронишах внутри плавающих цианобактериальных (*Microcystis* sp.) агрегатов, где выявлено одновременное присутствие и активность метаногенных и метанотрофных сообществ (Li et al., 2021).

Помимо стимуляции классического анаэробного метаногенеза, цианобактерии способны самостоятельно осуществлять аэробный метаногенез путем деметилирования метилфосфонатов (MPn) (Bizik, 2020). Гены, отвечающие за разложение фосфонатов (*phn*), широко распространены у filamentных цианобактерий, в том числе, и у представителей, вызывающих цветение водоемов. MPn является альтернативным источником фосфора для цианобактерий, имеющих *phn* гены. Выделение метана в присутствии MPn в основном происходит в световой период и подавляется ортофосфатом (Zhao et al., 2022). В последние годы появляется все больше данных о том, что цианобактерии могут образовывать метан и по другим, неизвестным механизмам, непосредственно связанным с их основным фототрофным метаболизмом (Bizik, 2020).

Таким образом, интенсивное цветение цианобактерий должно приводить к усилению как анаэробного, так и аэробного метаногенеза. Существуют, однако, данные о том, что токсины цианобактерий оказывают ингибирующее влияние на микробные сообщества. Например, среди цианобактерий рода *Microcystis* (*M. aeruginosa*) — наиболее распространенных в мире агентов цветения пресных водоемов (Wilhelm et al., 2020) — встречаются как токсичные, так и нетоксичные штаммы, и их соотношение в водоеме динамично меняется. Токсичные штаммы образуют микроцистины, которые подавляют метаногенез: в присутствии токсичных штаммов *M. aeruginosa* относительное обилие метаногенов и образование метана на единицу общего углерода заметно ниже, чем в присутствии нетоксичных штаммов (Xu et al., 2020). При этом известно, что цианобактерии рода *Microcystis* образуют меньше токсинов на клетку, когда растут при более высоких температурах (около 25°C). При более низких температурах (около 18°C) скорости роста ниже, образуется

меньше биомассы, но клетки, тем не менее, образуют больше токсинов (Wilhelm et al., 2020). Образование токсинов у многих цианобактерий также снижается при дефиците фосфора (Zhao et al., 2022).

Целью настоящей работы было исследование особенностей процесса метаногенеза в водной толще и осадках пресного озера умеренного пояса в период интенсивного цветения цианобактерий рода *Microcystis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и пробоотбор. Объектами исследования являлись образцы воды и осадков по профилю экспериментальной точки (глубина 4 м), расположенной в центральной части пресного оз. Сенеж (56°12'34.6" N, 36°59'53.0" E). Характеристика оз. Сенеж (Солнечногорский район, Московская обл.) приведена в предыдущей публикации (Kallistova et al., 2023). Отбор проб и полевые измерения проводили в августе 2022 г. Воду отбирали с помощью 1 л стеклянного батометра Руттнера, осадки — лимнологическим стратометром. Для большинства лабораторных исследований (химический и молекулярный анализ, определение потенциальных активностей) использовали интегральные пробы воды с глубин 0, 2, 4 м и осадков с глубин 0–10, 10–20 и 20–30 см, т.е. 3 образца (биологические повторности) отбирали с конкретной глубины на площади 1 м² и сливали в одну склянку. Образцы хранили без доступа воздуха при 15°C в течение 24 ч до начала всех анализов.

Аналитические методы. Температуру воды, концентрацию растворенного кислорода и процент насыщения воды кислородом определяли *in situ* на глубинах 0, 1, 2, 3, 4 м с помощью портативного оксиметра Oxi 340i ("WTW", Германия), оснащенного кислородным датчиком CellOx 325 ("WTW", Германия). Освещенность воды определяли на тех же глубинах с использованием люксметра ТКА-ПКМ (Россия). Для определения концентрации метана по профилю воды (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 м) и осадков (0–2, 2–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25, 25–30 см) использовали метод фазово-равновесной дегазации (McAuliffe, 1971). Содержание метана в газовой фазе определяли на газовом хроматографе Кристалл 2000 ("Хромат-эк", Россия) с пламенно-ионизационным детектором и 3-х м колонкой с сорбентом Hayesep N (температура инжектора — 100°C, температура колонки — 60°C, расход газа-носителя азота — 30 мл/мин). Измерение pH проводили с помощью pH-метра SevenCompact pH/Ion S220 ("Mettler-Toledo AG", Швейцария). Eh осадков определяли с помощью портативного ионометра WTW 3310 (Германия). Общую щелочность определяли набором стандартных реактивов ("Aquamerck", Герма-

ния). Концентрацию PO_4^{3-} определяли фотометрическим методом с восстановлением аскорбиновой кислотой с использованием спектрофотометра UNICO 1200/1201 (“United Products & Instruments, Inc.”, США). Содержание хлорофилла *a* (хл *a*) в интегральных пробах воды (0, 2 и 4 м) определяли с помощью спектрофотометра Nano-Photometer NP80 (“Implen”, Германия). Для этого образцы воды фильтровали через фильтры GF/F, хл *a* экстрагировали 90% раствором ацетона в течение 24 ч при 5°C; расчет (в мкг/л) производили по формулам (Намсараев, 2009).

Микроскопия. Состав природных фототрофных сообществ изучали в нативных препаратах (“раздавленная капля”) под световым микроскопом JenaVal с фотоустановкой Zeiss Bundle Canon PS G9 (“Carl Zeiss”, Jena, Германия).

Молекулярные методы. Таксономический состав микробных сообществ определяли в интегральных образцах воды (0, 2, 4 м) и осадков (0–10, 10–20 и 20–30 см). Клетки микроорганизмов из образцов воды предварительно концентрировали на фильтрах с диаметром пор 0.22 мкм, фильтр гомогенизировали, растирая с жидким азотом. Препарат метагеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, США). Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, США). Затем ПЦР фрагменты были смешаны в эквимоллярных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 × 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации.

Таксономическая идентификация ОТЕ была выполнена по базе SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Для образцов воды с глубин 0, 2 и 4 м было получено 9927, 39270 и 51430 последовательностей соответственно. Для образцов осадков с глубин 0–10, 10–20 и 20–30 см было получено 4306, 43766, 58516 последовательностей соответственно. По-

лученные последовательности были депонированы в базе данных NCBI Sequence Read Archive (SRA) в рамках проекта PRJNA972532.

Проведен поиск генов синтеза (*pepM*, *ppd*), транспорта и разложения (*phnC-P*) МРп в геноме *Ca. “Fonsibacter ubiquis”* (номер в Генбанке CP024034.1). Гены *pepM*, *ppd*, *phnC-P* идентифицировали с помощью поиска gpsblast v.2.9.0 с пороговым значением *e-value* — $1e-10$ по базе данных консервативных доменов (Conserved Domain Database, CDD).

Радиоизотопные методы. Для измерения интенсивности процесса фотосинтеза использовали радиоуглеродный метод с добавлением $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, в соответствии со стандартной методикой (Sorokin, Kadota, 1972). Радиоактивность конечных продуктов определяли на сцинтилляционном счетчике TRI-Carb TR2400 (“Packard”, США). Пробы воды отбирали батометром Руттнера и сразу наливали в стеклянные флаконы объемом 120 мл с помощью силиконовой трубки с двойной промывкой и с изливом половины объема склянки. Флаконы закрывали пенициллиновой пробкой без пузырька воздуха, закрепляя их алюминиевым колпачком с перфорацией для ввода реактивов. Все склянки при отборе были затемнены. Для определения первичной продукции использовали две прозрачные склянки и две темные, покрытые алюминиевой фольгой. В затемненном помещении во все флаконы добавляли 100 мкл стерильного раствора $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (специфическая активность 2.04 ГБк ммоль; 1.5 мКи/проба). Затем последовательно снимали общие затемняющие чехлы и каждую склянку помещали в индивидуальный чехол, калиброванный по степени пропускания фотосинтетически активной радиации, соответствующей освещенности на горизонте отбора пробы. Флаконы с пробами инкубировали в течение 24 ч в специальном бассейне с водой, при освещенности и температуре, близким к условиям *in situ*. По завершении экспозиции содержимое флаконов фиксировали 1 мл 0.05 н HCl. Интенсивность суммарного фотосинтеза ($I_{\text{фот}}$) рассчитывали по разнице интенсивностей в светлой и темной склянках. Интегральную продукцию фотосинтеза под квадратным метром рассчитывали как сумму величин активности в каждом кубометре водного столба, от поверхности до дна водоема.

Инкубационные эксперименты. Потенциальную метаногенную активность определяли в интегральных образцах осадков (0–10 и 10–20 см) путем инкубации осадков с субстратами, обеспечивающими ацетокластический (ацетат), гидрогенотрофный (формиат), метилотрофный (триметиламин, ТМА; метанол, MeOH; диметилсульфоксид, ДМСО) и метил-редуцирующий (смесь ТМА + H_2 ; MeOH + H_2 ; ДМСО + H_2). Го-

Таблица 1. Физико-химические параметры, активность и доля фототрофных микроорганизмов в водной толще оз. Сенеж

Параметр	Глубина, м		
	0 м	2 м	4 м
Температура, °C	24	23	22.5
Освещенность, лк	15560	805	20
O ₂ , мг/дм ³	17	14.6	2.5
pH	9.25	9.2	7.5
PO ₄ ³⁻ , мг/дм ³	<0.05	0.06	0.18
хл <i>a</i> , мкг/дм ³	43.3	40.6	20.3
<i>I</i> _{фот} , мкг С/дм ³ /сут	351.6	224.2	194.6
Доля <i>Cyanobacteriota</i> , % от общего количества последовательностей 16S рРНК	24.6	30.1	14.4
Доля аноксигенных фототрофов, % от общего количества последовательностей 16S рРНК	2.02	1.39	0.81

товили серию из девяти параллельных инкубаций с добавлением различных субстратов из расчета конечной концентрации каждого субстрата (ацетат, формиат, MeOH, ДМСО, ТМА) — 10 мМ. Смеси с водородом содержали по 10 мМ MeOH, ДМСО, ТМА и 1.5 об. % H₂. По мере исчерпания H₂ из газовой фазы, его добавляли во флаконы с помощью шприца. В контрольный вариант, показывающий эндогенный метаногенез в осадках, субстраты не вносили. Подробная методика описана в предыдущей публикации (Kallistova et al., 2023). Количество образованного метана рассчитывали на 1 г сухого вещества (СВ) осадка; СВ определяли высушиванием образца до постоянного веса при 105°C. Все инкубации проводили при комнатной температуре (25.3 ± 1.3°C) в течение месяца. Потенциальные скорости метаногенеза оценивали как количество метана, образованное на 3, 7, 13 и 17 сут с начала инкубации. Результаты представлены как средние значения для 3-х повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические параметры. Свет проникал до дна водоема, однако освещенность придонной воды составляла всего 0.13% от поверхностной. Слой воды 0–2 м был перенасыщен (до 200%) кислородом, за счет активности оксигенных фототрофов. Ниже 2 м концентрация кислорода резко падала до 30% насыщения, и, начиная с 3 м, в толще воды создавались гипоксидные условия (2.7–2.5 мг O₂/дм³). Осадки (0–30 см) были восстановленные: величина *Eh* изменялась от –188 до –358 мВ вниз по профилю. Следствием интенсивного фотосинтеза являлось защелачивание (pH > 9) слоя воды 0–2 м; в придонной воде pH

снижалась до нейтральных значений. Дефицит фосфата также наблюдался в слое воды 0–2 м; его концентрация увеличивалась в 3 раза на глубине 4 м (табл. 1). Концентрация CH₄ в водном слое 0–3.5 м изменялась в диапазоне 1.5–2.4 мкг/дм³. Небольшое увеличение концентрации CH₄ (с 1.6 до 2.4 мкг/дм³) наблюдалось в интервале глубин 2–3 м. На глубине 3.5 м концентрация CH₄ снижалась до 1.8 мкг/дм³, а на глубине 4 м (придонная вода) возрастала более чем в 5 раз, достигая 10.7 мкг/дм³ (рис. 1а). Концентрация CH₄ в восстановленных осадках была в среднем в 500 раз выше, чем в придонной воде (средняя по профилю 0–30 см — 5.2 ± 1.95 мг/дм³). Профиль CH₄ в осадках имел волнообразный характер: минимальные значения наблюдались в поверхностном слое 0–2 см, что может быть связано как с окислением, так и с диффузией в водную толщу; в слое осадков 2–5 см концентрация метана увеличивалась в 2 раза; ниже — постепенно снижалась до минимальных значений на глубине 15–20 см; затем снова увеличивалась и оставалась постоянной до глубины 30 см (рис. 1б).

Активность фотосинтеза. Средняя величина суммарной интенсивности фотосинтеза оксигенных и аноксигенных фототрофов (*I*_{фот}) по профилю водной толщи составляла 256.8 ± 83.4 мкг С/дм³/сут. Интегральная величина первичной продукции составляла 994.6 мг С/м²/сут, что позволяет отнести оз. Сенеж к мезотрофно-евтрофному трофическому статусу. *I*_{фот} в поверхностном водном слое (0 м) была в 1.8 раз выше, чем в придонной воде (351.6 vs 194.6 мкг С/дм³/сут). Содержание хл *a* в водных пробах также снижалось в 2 раза на глубине 4 м по сравнению с поверхно-

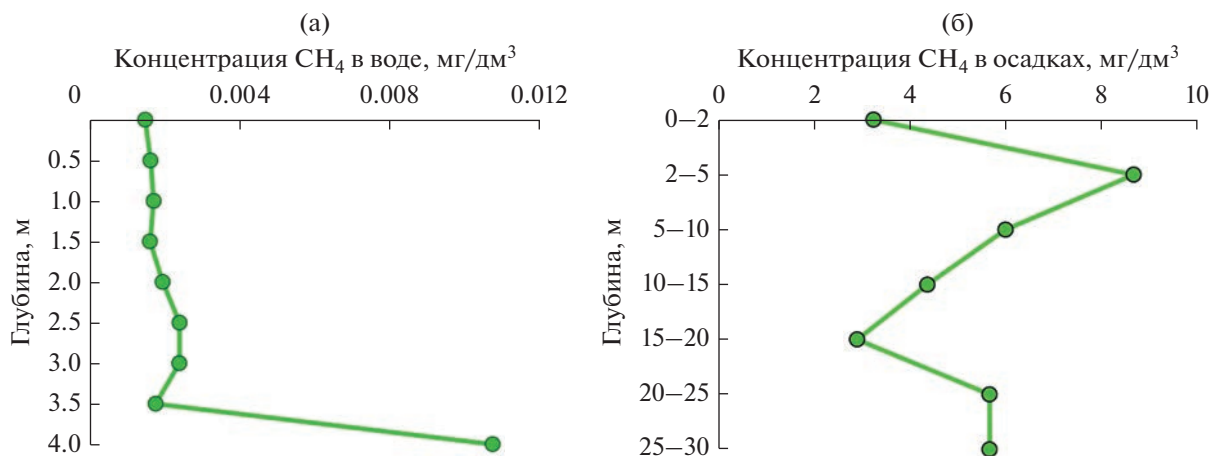


Рис. 1. Концентрация метана в воде (а) и осадках (б) по профилю экспериментальной точки глубоководной части оз. Сенеж.

стью, а общая доля представителей филума *Cyanobacteriota* — в 1.7 раз (табл. 1). На глубине 2 м интенсивность фотосинтеза была в 1.5 раза ниже, чем у поверхности (0 м), однако концентрация хл *a* снижалась незначительно (43.3 vs 40.6 мкг/л), а доля цианобактерий, наоборот, возрастала (24.6 vs 30.1%). Содержание хл *a* по профилю водной толщи довольно хорошо коррелировало с относительным количеством цианобактерий (коэффициент корреляции Пирсона, $r = 0.8986$) и хуже с $I_{\text{фот}}$ ($r = 0.7223$). Коэффициент корреляции между $I_{\text{фот}}$ и долей цианобактерий был низким ($r = 0.3456$), что может быть связано с тем, что часть ДНК была выделена из физиологически неактивных или мертвых клеток цианобактерий. В фотической зоне также детектированы последовательности, аффилированные с различными таксонами анаэробных фототрофов (пурпурных серных и несерных, а также зеленых серных бактерий). При этом, несмотря на перенасыщение воды кислородом, суммарное относительное количество анаэробных фототрофов было максимальным (2%) в поверхностном слое (табл. 1) и лучше коррелировало с $I_{\text{фот}}$ ($r = 0.9476$), чем количество цианобактерий.

Разнообразие окислительных и анаэробных фототрофов. Общее разнообразие микроорганизмов в воде и осадках оз. Сенеж будет представлено в другой публикации (готовится к печати). Преобладающие в водной толще оз. Сенеж морфологические формы цианобактерий представлены на рис. 2. По данным анализа фрагментов генов 16S рРНК цианобактерии составляли абсолютное большинство в микробном сообществе водной толщи озера (до 30% в фотической зоне; табл. 1). В воде доминировали (11.9–26.5%) цианобактерии, близкородственные (99.2% сходства) представителям вида *Microcystis aeruginosa* (LC557463.1); их доля

превышала долю остальных микроорганизмов в 4–20 раз. Помимо микроцистисов в воде детектированы последовательности, близкородственные (>98% сходства) цианобактериям видов *Aphanizomenon flos-aquae* (0.45–2%), *Cuspidothrix (Anabaena) issatschenkoi* (0.3–1%), *Planktothrix agardhii* (0.2–0.7%), *Woronichinia naegelianii* (0.2–0.5%), *Synechococcus* sp. (0.3–0.4%) и *Pseudanabaena mucicola* (0.06–0.11%). Доля представителей видов *Dolichospermum (Anabaena) lemmermannii*, *D. brachiatum*, *Radiocystis geminata*, *Synechococcus rubescens*, *Snowella* sp., а также некультивируемых представителей порядка *Chroococcales* и неидентифицированных цианобактерий была <0.1% для каждого из таксонов. Перечисленные цианобактерии были также детектированы в осадках (0–30 см), где их доля снижалась вниз по профилю с 0.7 до 0.14%.

Последовательности анаэробных фототрофов, детектированные в оз. Сенеж, были аффилированы с пурпурными несерными бактериями семейств *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Cotamnadaceae* (род *Rhodoferrax*), пурпурными серными бактериями семейства *Chromatiaceae* и факультативными фототрофами семейства *Roseiflexaceae*. Выявлены последовательности некультивируемых представителей филума *Chlorobiota* (0.4–1.2%, максимум на глубине 0 м), который включает зеленых серных бактерий. Суммарная доля анаэробных фототрофов в воде составляла 0.8–2% (максимум на глубине 0 м, табл. 1), в осадках — 0.06–0.4% (максимум в слое 0–10 см).

Разнообразие метаногенов. По всему профилю водной толщи (0–4 м) выявлены последовательности (5–6%), близкородственные (99.25% сходства) пресноводным представителям клады SAR11 (*Pelagibacteriales*) — *Ca. "Fonsibacter ubiqus"* (CP024034.1), которые, возможно, участвуют в аэробном образовании метана (Carini et al., 2014).

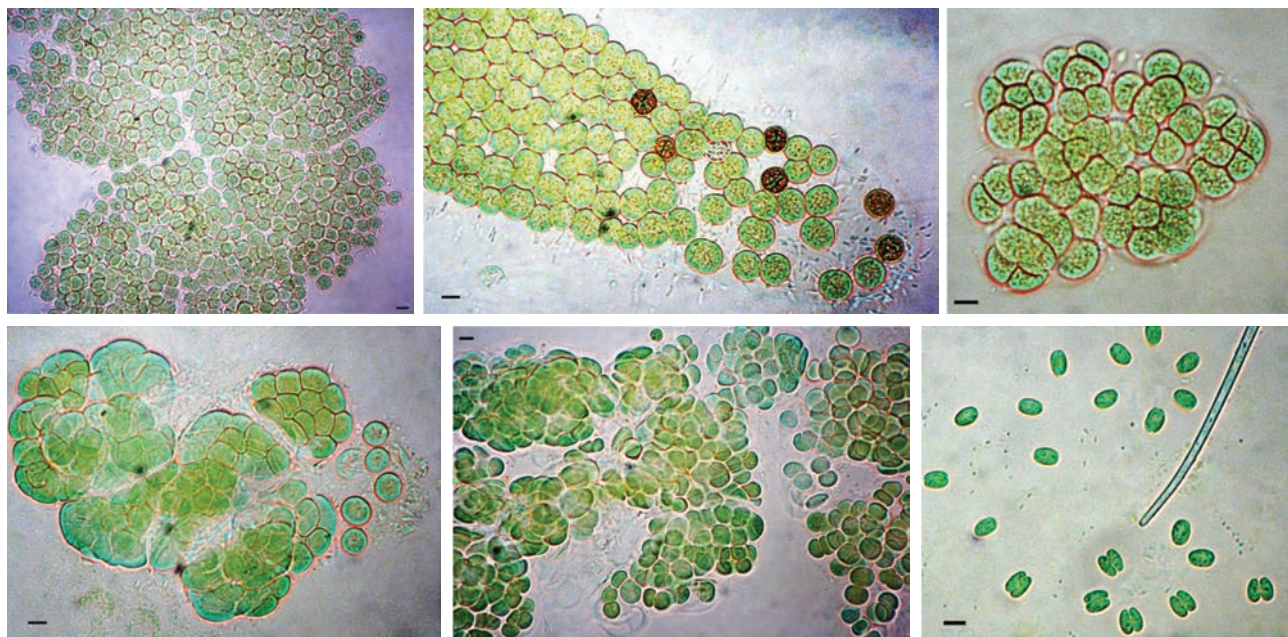


Рис. 2. Преобладающие в водной толще оз. Сенеж морфологические формы цианобактерий. Масштабная метка соответствует 5 мкм.

Их доля в осадках составляла 0.02–0.12%. В геноме *Ca. "Fonsibacter ubiquis"* выявлены потенциальные гомологи генов синтеза, транспорта и разложения МРп (*pepM*, *phnC*, *phnK*, *phnL*, *phnP*). Гомология *grpsblast* (с консенсусной последовательностью домена из базы CDD) варьировала от 25 до 46% (табл. S1).

В перенасыщенных кислородом водах (0–2 м) детектированы последовательности (0.01–0.024%) классических анаэробных гидрогенотрофных метаногенных архей рода *Methanoregula* и порядка *Methanomicrobiales*. Наибольшего разнообразия метаногены достигали в гипоксидном слое (4 м), где наряду с гидрогенотрофными появлялись ацетокластические, метилотрофные и метил-редуцирующие метаногены. В слое осадков 0–10 см гидрогенотрофные и ацетокластические метаногены присутствовали в одинаковом соотношении 1 : 1 (доля каждой группы около 2%). На нижних горизонтах осадков доля ацетокластических метаногенов оставалась на том же уровне, а гидрогенотрофных — увеличивалась до 6.2%. По профилю осадков (0–30 см) доминировали представители гидрогенотрофных метаногенов родов *Methanoregula* (1.2–2.5%), *Methanolinea* (0.4–1.2%), *Methanobacterium* (0.2–1.1%), а также некультивируемые представители порядка *Methanomicrobiales* (0.1–1.1%). Доля ацетокластических метаногенов рода *Methanotrix* возрастала с 0.66 до 1.84% в диапазоне глубин 4 м–30 см. Метилотрофные метаногены были представлены последовательностями, близкородственными (98.9% сходства) метаногенам вида *Methanosarcina subterranea* (NR_134763.1), кото-

рые используют C1-метилованные соединения, но не ацетат, формиат и H_2/CO_2 . Метилотрофы могли также присутствовать среди детектированных последовательностей некультивируемых представителей порядка *Methanosarciniales*. Доля метилотрофных метаногенов в оз. Сенеж была очень низкой (<0.05%). Доля последовательностей некультивируемых метил-редуцирующих метаногенов порядка *Methanomassiliicoccales* увеличивалась с 0.2 до 0.5% в диапазоне глубин 4 м–30 см (рис. 3).

Потенциальная активность метаногенеза. Потенциальную метаногенную активность в осадках определяли на разных субстратах метаногенеза в инкубационных экспериментах (рис. 4а). В контроле без добавления субстратов (эндогенный метаногенез) в образце осадка с глубины 0–10 см наблюдалось стабильное образование метана с постоянной скоростью (3.25 ± 0.16 мкмоль CH_4 /г СВ/сут) в течение всего периода инкубации (27 сут). При добавлении субстратов потенциальная скорость метаногенеза зависела от времени инкубации (табл. 2). Так, в первые 3 сут с начала инкубации максимальная скорость метаногенеза наблюдалась на формиате (6.1 мкмоль CH_4 /г СВ/сут), что было в 2 раза выше, чем в контроле и на ацетате. Поскольку образование метана при добавлении формиата начиналось сразу (без лаг-фазы) и с высокой скоростью (рис. 4б), то, вероятно, гидрогенотрофные метаногены были наиболее активны в осадках *in situ*. В процессе инкубации скорость гидрогенотрофного метаногенеза сначала снизилась (на 7 сут), затем процесс прекратился, что вероятнее всего связано с исчерпанием субстрата.

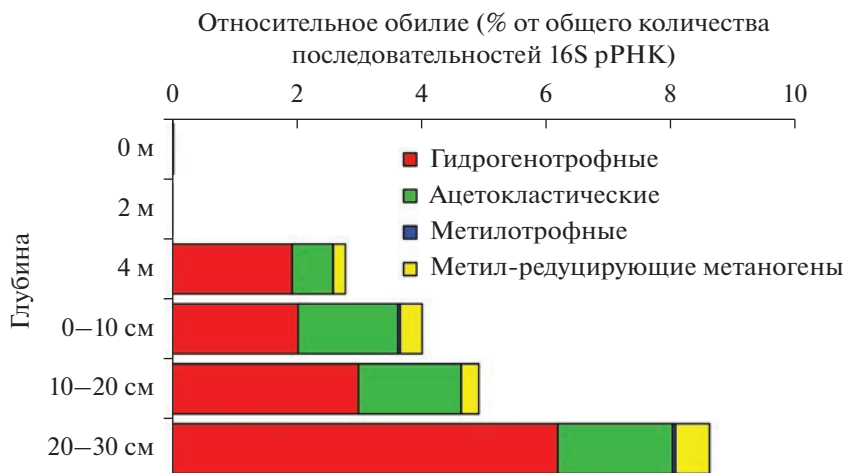


Рис. 3. Относительная численность последовательностей, относящихся к разным группам метаногенов, по профилю воды и осадков оз. Сенеж.

Скорость ацетокластического метаногенеза в начале инкубации также была высокой (2.9 мкмоль $\text{CH}_4/\text{г СВ/сут}$) и увеличивалась со временем, что указывает на прирост ацетокластических метаногенов в процессе культивирования. Полученные результаты согласуются с данными молекулярного анализа, выявившими преобладание гидрогенотрофных и ацетокластических метаногенов в слое осадков 0–10 см (рис. 3). Фаза задержки в образовании метана наблюдалась при инкубации с С1-метилированными соединениями, в течение которой предположительно происходила адаптация сообщества и постепенное (в течение 2-х нед.) накопление метилотрофных метаногенов. Вероятно, в условиях *in situ* в осадках имелся недостаток С1-метилированных субстратов, что согласуется с крайне низким относительным обилием метилотрофных метаногенов. При добавлении ДМСО лимитирующей стадией, очевидно, являлась стадия перехода ДМСО в диметилсульфид (ДМС) — непосредственный субстрат метаногенеза, для которой необходимо присутствие в сообществе определенных сульфатредуцирующих бактерий. Этим объясняется длительная задержка (больше 2-х нед.) начала образования метана из ДМСО. Небольшая скорость метаногенеза на ТМА (0.88 мкмоль $\text{CH}_4/\text{г СВ/сут}$) в первые сутки инкубации, далее снижение потенциальной активности, а затем резкое увеличение может быть связано с присутствием в сообществе метаногенов с разным отношением к ТМА: в первые сутки инкубации были активны организмы, использующие разные С1-метилированные соединения, ко второй неделе инкубации накопились метаногены, предпочитающие в качестве субстрата ТМА. Динамика образования метана на смеси С1-метилированных соединений с H_2 указывает скорее на отсутствие метил-редуцирующего метаногенеза.

При добавлении $\text{MeOH} + \text{H}_2$ наблюдалась та же тенденция, что и при добавлении MeOH без водорода, что может быть связано с активностью исключительно метилотрофных метаногенов, потребляющих MeOH . В случае с $\text{DMSO} + \text{H}_2$, относительно высокая активность в первые 3 сут, вероятнее всего, связана с гидрогенотрофным метаногенезом на добавленном H_2 и эндогенно образованном CO_2 . Затем происходило переключение на метилотрофный метаногенез. При добавлении $\text{TMA} + \text{H}_2$, вероятнее всего, метилотрофный метаногенез протекал одновременно с гидрогенотрофным. Для более точных выводов о соотношении метил-редуцирующего, гидрогенотрофного и метилотрофного путей метаногенеза в условиях одновременного присутствия С1-метилированных субстратов и H_2 необходим анализ динамики изменения таксономического состава метаногенной популяции в процессе инкубации обогащенных субстратами образцов осадков.

В нижнем слое осадков (10–20 см) как эндогенная, так и потенциальные активности метаногенеза на разных субстратах были ниже, чем в верхнем слое (0–10 см) (рис. 4а, 4в), несмотря на довольно близкое относительное количество метаногенов в этих слоях (4 и 4.9% соответственно). Отличия нижнего слоя осадков от верхнего касались динамики метаногенеза на С1-метилированных соединениях в присутствии и отсутствии H_2 . Метилотрофный метаногенез имел большую задержку на MeOH и ТМА в нижнем слое осадков по сравнению с верхним, а также полностью отсутствовал на ДМСО. Метил-редуцирующий метаногенез можно с определенной долей вероятности предположить в варианте инкубации с добавлением $\text{MeOH} + \text{H}_2$, т.к. скорость метаногенеза в этом варианте, начиная с 7 сут инкубации и до конца

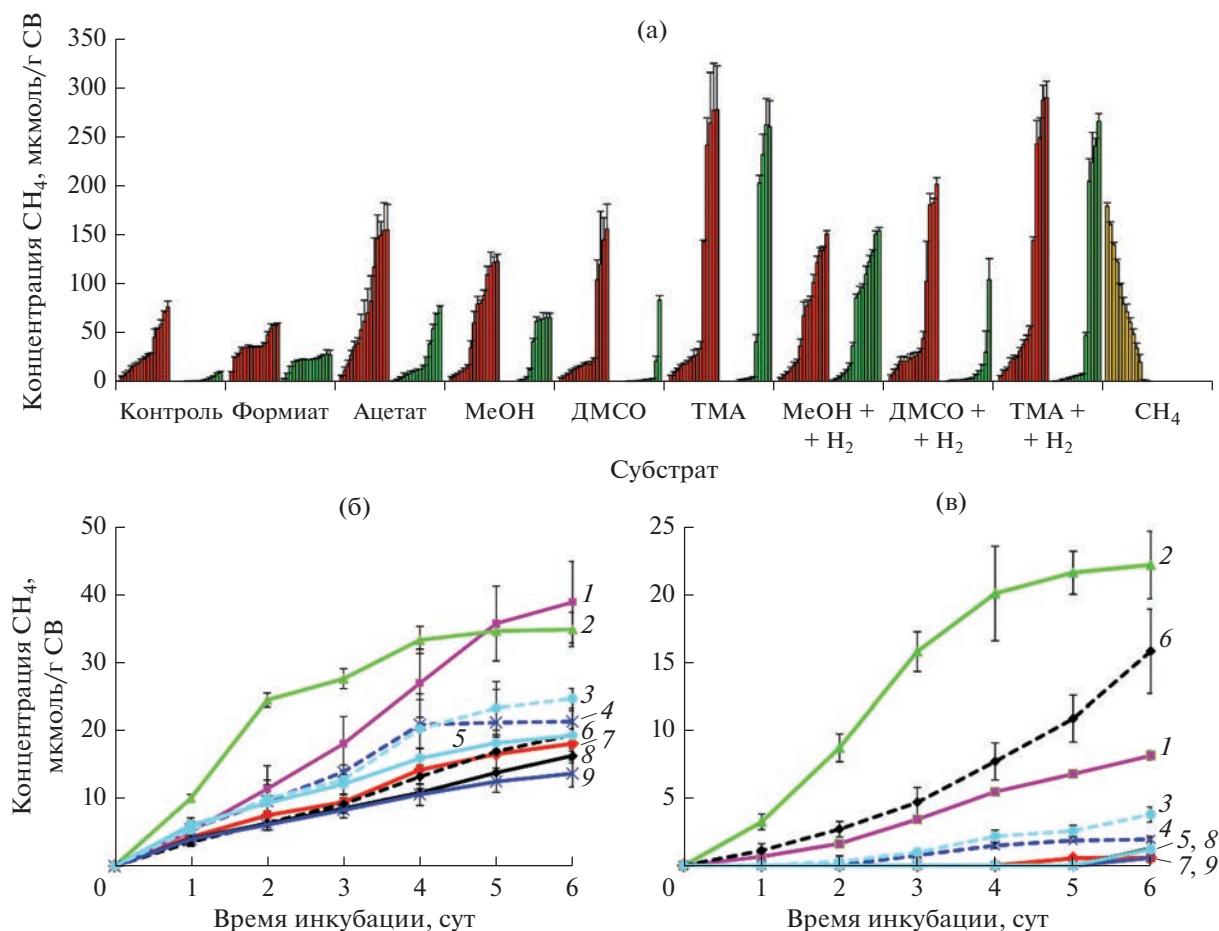


Рис. 4. Образование метана при инкубации осадков на разных субстратах метаногенеза: (а) — инкубация в течение 27 сут (красным цветом обозначены осадки с глубины 0–10 см, зеленым — 10–20 см, желтым — аэробное окисление метана в осадках с глубины 0–10 см); (б) — инкубация образцов осадков с глубины 0–10 см в течение первых 6 сут; (в) — инкубация образцов осадков с глубины 10–20 см в течение первых 6 сут. Номера кривых соответствуют: 1 — ацетат; 2 — формиат; 3 — TMA + H_2 ; 4 — DMSO + H_2 ; 5 — TMA; 6 — MeOH + H_2 ; 7 — контроль (без добавления субстрата); 8 — MeOH; 9 — DMSO.

эксперимента, превышала суммарную скорость на MeOH, формиате и в эндогенном контроле (табл. 2).

Таким образом, основными путями метаногенеза в осадках оз. Сенеж являлись гидрогено-трофный и ацетокластический. Метилотрофные метаногены малочисленны и малоактивны *in situ*, вероятно, из-за нехватки доступного субстрата. Активность метил-редуцирующих метаногенов можно предположить в нижнем слое осадков 10–20 см. Для сравнения в табл. 2 приведена потенциальная активность аэробного метаноокисления для слоя осадков 0–10 см (подробные результаты будут представлены в другой публикации). Максимальная потенциальная активность аэробного метаноокисления наблюдалась в первые сутки инкубации (18.9 μmol CH_4 /г СВ/сут). Она превышала суммарную потенциальную скорость метаногенеза (15.5 μmol CH_4 /г СВ/сут) за тот

же период времени для того же слоя осадков, что указывает на более быстрый ответ аэробных метанотрофов на снятие лимита по субстрату (в данном случае по кислороду) по сравнению с метаногенами. Метаногенам требуется больше времени для адаптации и накопления биомассы при переходе в более благоприятные по субстрату условия. Только через 2 нед. инкубации суммарная потенциальная скорость метаногенеза стала выше потенциальной скорости аэробного метаноокисления за тот же период.

ОБСУЖДЕНИЕ

В перенасыщенной кислородом фотической зоне оз. Сенеж присутствовал метан в концентрации 1.9 ± 0.35 мкг/дм³ (среднее значение на глубине 0–3.5 м), что может быть связано: 1) с физическим транспортом из осадков в сочетании с низкой скоростью аэробного метаноокисления;

Таблица 2. Потенциальные скорости метаногенеза (мкмоль $\text{CH}_4/\text{г СВ/сут}$) при инкубации образцов осадков на разных субстратах

Субстрат	Глубина, см	Время инкубации, сут			
		3	7	13	17
Контроль (эндогенная активность)	0–10	3.13	3.23	3.48	3.15
	10–20	0	0.13	0.21	0.25
Опыт – Контроль*					
Формиат	0–10	6.05	1.75	0	0
	10–20	5.27	3.09	1.44	1.25
Ацетат	0–10	2.86	4.33	5.53	5.44
	10–20	1.14	1.30	1.72	2.03
MeOH	0–10	0	1.69	3.30	3.26
	10–20	0	0.14	4.52	3.44
ДМСО	0–10	0	0	0	2.97
	10–20	0	0	0	0
ТМА	0–10	0.88	0.12	7.51	11.05
	10–20	0	0.08	2.92	11.67
MeOH + H_2	0–10	0	1.99	4.30	4.00
	10–20	1.56	5.09	8.23	6.94
ДМСО + H_2	0–10	1.48	0.10	0	2.88
	10–20	0.25	0.17	0.32	0.40
ТМА + H_2	0–10	1.11	1.27	7.61	11.11
	10–20	0.32	0.51	3.40	11.78
Суммарный метаногенез на всех субстратах	0–10	15.52	14.47	31.72	43.86
	10–20	8.54	10.51	22.76	37.76
Аэробное метаноокисление**	0–10	18.88	16.95	13.70	10.49

* Приведенные цифры являются разностью между опытом (скорость образования CH_4 при добавлении конкретного субстрата) и контролем (без добавления субстрата).

** Аэробное окисление метана в оз. Сенеж подробно описано в другой публикации (готовится к печати).

2) с процессом метаногенеза в этой зоне. Косвенным доказательством последнего может служить локальное увеличение концентрации метана в диапазоне глубин 2–3 м (рис. 1а). Микробный метаногенез в аэробных условиях может быть связан: 1) с активностью цианобактерий и других микроорганизмов, разлагающих в условиях фосфатного голодания МРп с выделением метана в качестве побочного продукта; 2) с активностью метаногенов внутри бескислородных зон, в том числе в цианобактериальных агрегатах. Наши данные указывают на возможность протекания в аэробной зоне оз. Сенеж обоих путей метаногенеза. Способность отдельных штаммов пресноводных цианобактерий к образованию метана при разложении фосфонатов продемонстрирована в работе Zhao et al. (2022). Отвечающий за разложение фосфонатов генный кластер (*phn*), представленный *phn* опероном, который включает комплекс транспорта фосфоната (*phnC-E*), ген-регулятор транскрипции (*phnF*), С-Р-лиазный комплекс

(*phnG-M*) и несколько дополнительных генов (*phnN-P*), присутствует в основном в геномах филаментных цианобактерий (Zhao et al., 2022). В оз. Сенеж выявлены последовательности представителей как филаментных (*Aphanizomenon*, *Cuspidothrix* (*Anabaena*), *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Dolichospermum* (*Anabaena*)), так и одноклеточных колониальных (*Microcystis*, некультивируемые *Chroococcales*, *Snowella*, *Radiocystis*, *Woronichinia*) и неколониальных (*Synechococcus*) цианобактерий, а также неизвестные цианобактерии. Большинство детектированных оз. Сенеж цианобактерий, включая доминирующих представителей (*Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Woronichinia* и *Dolichospermum*), не имеют в геномах ни генов синтеза, ни генов транспорта и разложения фосфонатов (согласно списку цианобактерий из статьи Zhao et al., 2022). Из всех цианобактерий, обнаруженных в оз. Сенеж, только три рода *Pseudanabaena*, *Synechococcus* и *Planktothrix* могут потенциально участвовать в синтезе (*Synechococcus* и *Plankto-*

thrix) и разложении (*Pseudanabaena*, *Synechococcus*) фосфонатов. Их суммарная доля в фотической зоне (0–2 м) оз. Сенеж составляла 0.5–0.8% и увеличивалась до 1.2% в придонной воде за счет увеличения доли представителей рода *Planktothrix*, которые участвуют в синтезе, но не в разложении МРн.

По всей водной толще оз. Сенеж доминировали (на 3-м месте по относительному количеству среди всех прокариот) последовательности, близкородственные (99.25% сходства) *Ca. "Fonsibacter ubiquis"* (CP024034.1). Это широко распространенные в пресных водоемах аэробные хемогетеротрофы, являющиеся представителями клады SAR11 (*Pelagibacterales*) (Henson et al., 2018). У морских представителей клады SAR11 выявлены гены синтеза и разложения МРн, и в условиях фосфатного голодания они используют МРн в качестве источника фосфора с побочным выделением метана в эквимольных количествах (Carini et al., 2014). В работе Хенсона и соавт. (2018) проведен геномный анализ *Ca. "F. ubiquis"*, однако нет информации ни о наличии, ни об отсутствии генов синтеза (*pepM* и *ppd*) и разложения (*phn*) МРн у этого организма (Henson et al., 2018), а также у других представителей рода *Ca. "Fonsibacter"* (Tsementzi et al., 2019). Мы обнаружили в геноме *Ca. "Fonsibacter ubiquis"* потенциальные гомологи генов метаболизма МРн. Однако для обоснованного утверждения того, что данный организм способен к аэробному метаногенезу, необходим более детальный геномный анализ, а также физиологические эксперименты.

Кроме того, в насыщенных кислородом водах оз. Сенеж детектированы последовательности классических анаэробных гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoregula*. Данные метаногены были выявлены ранее в аэробной водной толще пресного бореального оз. Светлое (Kallistova et al., 2018), а также в поверхностных водах пяти пресных озер, содержащих крупные агрегаты *Microcystis* sp. (Li et al., 2021). Согласно сравнительному геномному анализу, основной пул антиоксидантных генов присутствует у различных метаногенов порядков *Methanobacteriales*, *Methanocellales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* (включает род *Methanoregula*), *Methanosarcinales* и *Methanopyrales*. Этот пул в числовом выражении шире представлен у метаногенов порядков *Methanocellales*, *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*. Представители этих порядков лучше адаптированы к окисленным условиям и поэтому чаще встречаются в различных аэробных местообитаниях (Lyu, Lu, 2018). Прямая передача водорода от цианобактерий к гидрогенотрофным метаногенам выявлена как в лабораторных модельных экспериментах (Berg et al., 2014), так и в природных цианобактериальных сообществах (Самылина и соавт., 2023). Водород является облигатным продуктом нитроге-

назной активности в реакции фиксации азота цианобактериями. При этом нитрогеназа необратимо инактивируется кислородом, и поэтому для фиксации азота необходимы анаэробные условия. Диазотрофные цианобактерии по-разному решают эту проблему. У нитчатых цианобактерий, в том числе у детектированных в оз. Сенеж представителей родов *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix* и *Dolichospermum*, имеются специализированные клетки — гетероцисты, которые защищают нитрогеназу от действия кислорода, т.е. процессы фотосинтеза и азотфиксации разделены в пространстве. У многих аэробных диазотрофных негетероцистных цианобактерий фиксация N_2 с образованием H_2 может происходить как в темновой период в условиях чередования режима свет/темнота, так и при непрерывном освещении. Например, цианобактерии рода *Gloeotheca* реализуют стратегию разделения во времени процессов фотосинтеза и фиксации N_2 в условиях непрерывного освещения: активность нитрогеназы достигает пика в период, когда активность фотосинтеза снижается (подробнее см. Stal, 2015). Несмотря на то, что доминирующие в оз. Сенеж цианобактерии вида *M. aeruginosa* не способны к фиксации азота, они образуют H_2 в анаэробных условиях в темноте за счет активности гидрогеназы при разложении эндогенных запасных веществ, таких как гликоген (Asada, Kawamura, 1984; Asada et al., 1998; Rashid et al., 2009). В природе дефицит кислорода, необходимый для гидрогеназной активности цианобактерий рода *Microcystis* и гидрогенотрофной активности метаногенов рода *Methanoregula*, может наблюдаться, например, в бентосных цианобактериальных матах, где условия обычно становятся анаэробными ночью, когда фотосинтез прекращается, а высокая скорость дыхания приводит к быстрому истощению кислорода (Stal, 2015). Гидрогенотрофные и ацетокластические метаногены были также выявлены в бескислородных микронизмах внутри плавающих агрегатов цианобактерий рода *Microcystis* (Li et al., 2021). Последнее может также иметь место в оз. Сенеж, где компактные цианобактериальные агрегаты выявлены с помощью микроскопии (рис. 2). Таким образом, гидрогенотрофные метаногены рода *Methanoregula*, находясь в кооперации с цианобактериями, потенциально способны к образованию метана в аэробной водной толще.

В восстановленных осадках оз. Сенеж наблюдалась типичная для пресных озер картина образования метана — преобладание гидрогенотрофной и ацетокластического путей метаногенеза (Borrel et al., 2011; Peura et al., 2015; Rissanen et al., 2017; Kallistova et al., 2018, 2021; Lyautey et al., 2021; Li et al., 2021). Низкие скорости и низкое относительное количество метилотрофных и метил-редуцирующих метаногенов могут быть связаны с

дефицитом метилированных C1-соединений, характерных для пресных озер (Borrel et al., 2011). Однако цианобактерии в период цветения могут служить источником метилированных соединений и значительно стимулировать активность метилотрофного метаногенеза (Zhu et al., 2022). В работе Риссанена (2017) показано, что доля метаногенов в архейном сообществе зоны литорали пресного озера была выше, чем в его глубоководной части. Как следует из более низкого отношения C : N, на поросшем растительностью литоральном участке было больше доступного для микроорганизмов ОВ по сравнению с глубоководной частью озера. Этим объясняются более высокие потенциальные скорости образования метана и общего неорганического углерода, а также более высокая относительная численность метаногенов в зоне литорали. Относительное количество гидрогенотрофных представителей семейства *Methanobacteriaceae* было выше в зоне литорали, чем в глубоководной части озера, и, напротив, ацетокластические представители семейства *Methanosacetaceae* преобладали в глубоководной части (Rissanen et al., 2017). Сравнение данных 2022 г., полученных для глубоководной части оз. Сенеж (настоящая работа), и данных 2021 г., полученных для зоны литорали (Kallistova et al., 2023), показывает, что в верхнем слое осадков соотношение гидрогенотрофных и ацетокластических метаногенов, как в зоне литорали, так и в глубоководной части озера, было близким (~1 : 1). При этом, однако, концентрация метана, общее относительное количество метаногенов, скорость эндогенного метаногенеза и метаногенеза на разных субстратах были выше в глубоководной части озера по сравнению с литоралью. Мы предполагаем, что цветение цианобактерий создало благоприятные условия для метаногенеза в глубоководной части озера, т.к. способствовало анаэробизму и избыточному поступлению метаногенных субстратов. В период исследования литорали цветения цианобактерий не происходило, и основными первичными продуцентами в озере были диатомовые водоросли (Kallistova et al., 2023).

Таким образом, интенсивное цветение цианобактерий способствует усилению метаногенеза в пресном озере умеренного климата, как напрямую в водной толще за счет аэробного метаногенеза при разложении МРп и снабжения H₂ гидрогенотрофных метаногенов, ассоциированных с цианобактериальными агрегатами, так и опосредованно в придонной воде и осадках за счет создания дефицита кислорода и снабжения метаногенов субстратами при осаждении и разложении избыточной биомассы цианобактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично финансировалась из средств Российского научного фонда (грант № 22-14-00038) и Ми-

нистерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каллистова А.Ю., Кадников В.В., Саввичев А.С., Русанов И.И., Дворников Ю.А., Лейбман М.О., Хомутов А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В. Сравнительное исследование путей метаногенеза в осадках термокарстовых и полигенетических ямальских озер // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 236–242.
- Kallistova A.Yu., Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Dvornikov Yu.A., Leibman M.O., Khomutov A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Comparative study of methanogenic pathways in the sediments of thermokarst and polygenetic Yamal lakes // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 261–267.
- Намсараев З.Б. Использование коэффициентов поглощения для расчета концентрации хлорофиллов и бактериохлорофиллов // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 836–839.
- Namsaraev Z.B. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 794–797.
- Самылина О.С., Меркель А.Ю., Пименов Н.В. Суточная динамика метана в цианобактериальном сообществе содового озера Горчина 1 (Кулундинская степь, Алтайский край) // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 233–239.
- Samylyna O.S., Merkel A.Y., Pimenov N.V. Diurnal methane dynamics in the cyanobacterial community of soda Lake Bitter 1 (Kulunda Steppe, Altai Krai) // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 293–299.
- Asada Y., Kawamura S. Hydrogen evolution by *Microcystis aeruginosa* in darkness // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. P. 2595–2596.
- Asada Y., Miyake M., Koike Y., Aoyama K., Uemura I., Miyake J. Hydrogenase-mediated hydrogen metabolism in a non-nitrogen-fixing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* // BioHydrogen / Eds. Zaborsky O.R., Benemann J.R., Matsunaga T., Miyake J., San Pietro A. Boston: Springer, 1998. P. 173–179.
- https://doi.org/10.1007/978-0-585-35132-2_23
- Berg A., Lindblad P., Svensson B.H. Cyanobacteria as a source of hydrogen for methane formation // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 30. P. 539–545.
- Bižić M., Grossart H.-P., Ionescu D. Methane Paradox // eLS / Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2020. P. 1–11.
- <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028892>
- Borrel G., Jézéquel D., Biderre-Petit C., Morel-Desrosiers N., Morel J.P., Peyret P., Fonty G., Lehours A.C. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 832–847.

- Carini P., White A.E., Campbell E.O., Giovannoni S.J. Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria // Nat. Commun. 2014. V. 5. Art. 4346.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5346>
- Diaz R.J., Rosenberg R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems // Science. 2008. V. 321. P. 926–929.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. Art. fiw018.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018>
- Henson M.W., Lanclos V.C., Faircloth B.C., Thrash J.C. Cultivation and genomics of the first freshwater SAR11 (LD12) isolate // ISME J. 2018. V. 12. P. 1846–1860.
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W., Ibelings B.W., Verspagen J.M.H., Visser P.M. Cyanobacterial blooms // Nat. Rev. Microbiol. 2018. V. 16. P. 471–483.
- Kallistova A., Kadnikov V., Rusanov I., Kokryatskaya N., Beletsky A., Mardanov A., Savvichev A., Ravin N., Pimenov N. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake // Aquat. Microbial Ecol. 2018. V. 82. P. 1–18.
- Kallistova A.Yu., Koval D.D., Kadnikov V.V., Toshchakov S.V., Yusupov S.K., Izotova A.O., Vinogradova E.N., Zekker I., Pimenov N.V. Methane cycle in a littoral site of a temperate freshwater lake // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 153–170.
- Li C., Hambright K.D., Bowen H.G., Trammell M.A., Grosart H.P., Burford M.A., Hamilton D.P., Jiang H., Latour D., Meyer E.I., Padiśák J., Zamor R.M., Krumholz L.R. Global co-occurrence of methanogenic archaea and methanotrophic bacteria in *Microcystis* aggregates // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 6503–6519.
- Lyautey E., Billard E., Tissot N., Jacquet S., Domaizon I. Seasonal dynamics of abundance, structure, and diversity of methanogens and methanotrophs in lake sediments // Microb. Ecol. 2021. V. 82. P. 559–571.
- Lyu Z., Lu Y. Metabolic shift at the class level sheds light on adaptation of methanogens to oxidative environments // ISME J. 2018. V. 12. P. 411–423.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- McAuliffe C.C. GC determination of solutes by multiple phase equilibration // Chem. Technol. 1971. V. 1. P. 46–51.
- Peura S., Sinclair L., Bertilsson S., Eiler A. Metagenomic insights into strategies of aerobic and anaerobic carbon and nitrogen transformation in boreal lakes // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. 12102.
<https://doi.org/10.1038/srep12102>
- Rashid N., Song W., Park J., Jin H.-F., Lee K. Characteristics of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* through cycles of photosynthesis and anaerobic incubation // Ind. Eng. Chem. 2009. V. 15. P. 498–503.
- Reinl K.L., Harris T.D., North R.L., Almela P., Berger S.A., Bizic M., Burnet S.H., Grossart H.-P., Ibelings B.W., Jakobsson E., Knoll L.B., Lafrancois B.M., McElarney Y., Morales-Williams A.M., Obertegger U., Ogashawara I., Paule-Mercado M.C., Peierls B.L., Rusak J.A., Sarkar S., Sharma S., Trout-Haney J.V., Urrutia-Cordero P., Venkiteswaran J.J., Wain D.J., Warner K., Weyhenmeyer G.A., Yokota K. Blooms also like it cold // Limnol. Oceanogr. Lett. 2023.
<https://doi.org/10.1002/lol2.10316>
- Rissanen A.J., Karvinen A., Nykänen H., Peura S., Tirola M., Mäki A., Kankaala P. Effects of alternative electron acceptors on the activity and community structure of methane-producing and consuming microbes in the sediments of two shallow boreal lakes // FEMS Microbiol. Ecol. 2017. V. 93. Art. fix078.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix078>
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // PeerJ. 2016. V. 4. Art. e2584.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Smucker N.J., Beaulieu J.J., Nietch C.T., Young J.L. Increasingly severe cyanobacterial blooms and deep water hypoxia coincide with warming water temperatures in reservoirs // Glob. Change Biol. 2021. V. 27. P. 2507–2519.
- Sorokin Y.I., Kadota H. Techniques for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters // IBP Handbook 23 / Oxford and London: Blackwell Scientific Publ., 1972. 112 p.
- Stal L.J. Nitrogen fixation in cyanobacteria // eLS / Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2015. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021159.pub2>
- Tsementzi D., Rodriguez-R L.M., Ruiz-Perez C.A., Meziti A., Hatt J.K., Konstantinidis K.T. Ecogenomic characterization of widespread, closely-related SAR11 clades of the freshwater genus “*Candidatus Fonsibacter*” and proposal of *Ca. Fonsibacter lacus* sp. nov. // Syst. Appl. Microbiol. 2019. V. 42. P. 495–505.
- Wetzel R.G. Limnology: Lake and River Ecosystems // Academic Press, 2001, 3rd edn.
<https://doi.org/10.1016/C2009-0-02112-6>
- Wilhelm S.W., Bullerjahn G.S., McKay R.M.L. The complicated and confusing ecology of *Microcystis* blooms // mBio. 2020. V. 11. Art. e00529-20.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00529-20>
- Xu H., Liu Y., Tang Z., Li H., Li G., He Q. Methane production in harmful algal blooms collapsed water: The contribution of non-toxic *Microcystis aeruginosa* outweighs that of the toxic variety // J. Cleaner Product. 2020. V. 276. Art. 124280.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124280>
- Zhao L., Lin L.Z., Chen M.Y., Teng W.K., Zheng L.L., Peng L., Lv J., Brand J.J., Hu C.X., Han B.P., Song L.R., Shu W.S. The widespread capability of methylphosphonate utilization in filamentous cyanobacteria and its ecological significance // Water Res. 2022. V. 217. Art. 118385.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118385>
- Zhu Y., Chen X., Yang Y., Xie S. Impacts of cyanobacterial biomass and nitrate nitrogen on methanogens in eutrophic lakes // Sci. Total. Environ. 2022. V. 848. Art. 157570.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157570>

Methane Production in a Temperate Freshwater Lake during an Intense Cyanobacterial Bloom

A. Yu. Kallistova^{1, *}, A. I. Kosyakova¹, I. I. Rusanov¹, V. V. Kadnikov¹, A. V. Beletskii¹, D. D. Koval'¹, S. K. Yusupov¹, I. Zekker², and N. V. Pimenov¹

¹Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²University of Tartu, Tartu, 50411 Estonia

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Received May 15, 2023; revised May 18, 2023; accepted May 22, 2023

Abstract—Seasonal cyanobacterial blooms have a negative impact on freshwater ecosystems. The role of cyanobacteria in methane production and their relationship with methanogenic archaea are not yet well understood. The goal of the present work was to identify the features of methanogenesis in the water column and sediments of a profound part of the freshwater Lake Senezh (Moscow oblast) during a period of cyanobacteria over-bloom. Analytical, radiotracer, microscopic, molecular biological, and incubation techniques were used. Alkalization and oxygen oversaturation of the 0–2-m water layer were caused by intensive photosynthesis. The near-bottom water (4 m) was pH-neutral and hypoxic; the sediments were reduced. Methane was detected throughout the water column; its concentration in the surface water was an order of magnitude lower than in the near-bottom water and 4 orders of magnitude lower than in the sediments. Cyanobacteria of the species *Microcystis aeruginosa* predominated in the photic zone (up to 30% of the total number of the 16S rRNA gene fragments). The sequences of cyanobacteria and freshwater members of the SAR11 clade, which can potentially be involved in aerobic methanogenesis via decomposition of methylphosphonates (MPn), were also detected. The sequences of hydrogenotrophic methanogens of the genus *Methanoregula*, which are potentially capable of methanogenesis in cooperation with cyanobacteria, were revealed in oxygen-supersaturated water. Hydrogenotrophic and acetoclastic pathways of methanogenesis predominated in reduced sediments. Sequences of methanogens of the orders *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, and *Methanomassiliicoccales* were detected there. Cyanobacterial bloom promoted methanogenesis both in the photic zone of Lake Senezh (due to MPn decomposition and anaerobic methanogenesis in association with cyanobacterial aggregates) and in the near-bottom water and sediments (due to oxygen depletion and excessive release of substrates caused by sedimentation and degradation of cyanobacterial biomass).

Keywords: freshwater lakes, cyanobacterial bloom, *Microcystis*, methanogenesis, methylphosphonate decomposition, *Methanoregula*