

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

METHYLOMONAS MONTANA SP. NOV., ПЕРВЫЙ НЕПИГМЕНТИРОВАННЫЙ МЕТАНОТРОФ РОДА METHYLOMONAS, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ГОРНОЙ РЕКИ

© 2023 г. Р. З. Сулейманов^а, Е. Н. Тихонова^а, И. Ю. Ошкин^а, О. В. Данилова^а, С. Н. Дедыш^{а, *}

^а Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dedysh@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Аэробные метанотрофные бактерии рода *Methylomonas* населяют широкий спектр местообитаний, включающий пресноводные водоемы, осадки рек, болота, рисовые чеки, покрывающие почвы свалок и переувлажненные почвы. Подавляющее большинство ныне описанных видов этого рода представлены нейтрофильными, подвижными, растущими на метане палочковидными бактериями, пигментация которых варьирует от желтой до розовой и красной. В настоящей работе описан новый, непигментированный изолят этих бактерий, штамм MW1^T, который был выделен из донных отложений горной реки Хоста (Краснодарский край, Россия). Штамм MW1^T рос на метане и метаноле в диапазоне температур от 8 до 37°C (с оптимумом 25–30°C) и диапазоне pH 5.5–7.5 (с оптимумом 6.3–7.0). Последовательность гена 16S рРНК штамма MW1^T обнаруживала 95.48–98.47% сходства с таковыми у ранее описанных видов *Methylomonas*. Ближайшим таксономически охарактеризованным филогенетическим родственником штамма MW1^T являлся *M. fluvii* EbB^T, выделенный из осадков реки Эльба. Полная последовательность генома, определенная для штамма MW1^T, имела размер 4.6 млн нт., содержала 3 оперона рРНК и около 4200 белок-кодирующих генов, включая кластер генов *pmoCAB* мембранной метанмонооксигеназы. Растворимая метанмонооксигеназа в геноме не закодирована. Содержание пар Г + Ц в ДНК составило 52.4%. Сходство нуклеотидной последовательности генома штамма MW1^T с последовательностями геномов ранее описанных представителей рода *Methylomonas* составило от 79.4 до 82.1%. Мы предлагаем классифицировать этот штамм как представителя нового вида рода *Methylomonas*, *M. montana* sp. nov. Штамм MW1^T (=VKM 3737^T = UQM 41536^T) является типовым штаммом нового вида.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии, род *Methylomonas*, *Methylomonas montana*, рост на метане, пресноводные осадки, анализ генома

DOI: 10.31857/S0026365623600426, **EDN:** BPCTBQ

Род *Methylomonas* принадлежит к семейству *Methylococcaceae* класса *Gammaproteobacteria* и объединяет аэробных метанотрофных бактерий, единственными источниками углерода и энергии которых являются метан и метанол (Bowman, 2016). Ключевым ферментом этих бактерий является мембранная метанмонооксигеназа (мММО), осуществляющая окисление метана в метанол, которая локализуется во внутрицитоплазматических мембранах (ВЦМ) I типа, характерных для метанотрофных представителей *Gammaproteobacteria*. Растворимая метанмонооксигеназа (рММО) также присутствует у некоторых штаммов рода *Methylomonas*, однако примеры таких организмов немногочисленны (Auman, Lidstrom, 2002; Bussmann et al., 2021). Ассимиляция углерода у *Methylomonas* spp. осуществляется по рибулозомунофосфатному пути

(Bowman et al., 1993). В качестве источников азота эти метанотрофы используют нитрат, нитрит, аммоний и мочевины; некоторые представители рода способны фиксировать атмосферный азот (Auman et al., 2001; Ogiso et al., 2012; Danilova et al., 2013).

Метанотрофные бактерии рода *Methylomonas* населяют широкий спектр местообитаний, включающий пресноводные водоемы (Auman, Lidstrom, 2002), осадки рек (Bussmann et al., 2021), болотные экосистемы (Kip et al., 2011; Данилова, Дедыш, 2014), рисовые чеки (Dianou et al., 2012), воды шахт (Bowman et al., 1990; Kalyuzhnaya et al., 1999), покрывающие почвы свалок (Chen et al., 2007) и очистные сооружения (Hoefman et al., 2014; Chang et al., 2021).

В настоящее время род *Methylobomonas* включает 10 видов с валидно опубликованными именами: *M. methanica* (Whittenbury, Krieg, 1984), *M. aurantiaca*, *M. fodinarum* (Bowman et al., 1990), *M. scandinavica* (Kalyuzhnaya et al., 1999), *M. koyamae* (Ogiso et al., 2012), *M. lenta* (Hoefman et al., 2014), *M. paludis* (Danilova et al., 2014), *M. albis*, *M. fluvii* (Bussmann et al., 2021) и *M. rapida* (Tikhonova et al., 2023). Еще два вида этого рода, “*M. denitrificans*” (Kits et al., 2015) и “*M. rhizoryzae*” (Zhu et al., 2020), также были предложены, но пока не вошли в число валидированных. Подавляющее большинство ныне охарактеризованных изолятов этого рода являются подвижными палочковидными бактериями, оптимально растущими в нейтральном диапазоне значений pH и температур от 25 до 35°C. Исключения составляют умеренно ацидофильный *M. paludis* (Danilova et al., 2014), а также психротолерантные *M. scandinavica* (Kalyuzhnaya et al., 1999), *M. albis* и *M. fluvii* (Bussmann et al., 2021).

Специфической особенностью всех охарактеризованных к настоящему времени *Methylobomonas* spp. является наличие пигментации клеток, которая варьирует от желтой до розовой и красной. У представителей видов *M. paludis*, *M. lenta* и *M. albis* пигментация выражена слабо, но, тем не менее, она имеется (Danilova et al., 2014; Hoefman et al., 2014; Bussmann et al., 2021). Анализ состава каротиноидных пигментов у *M. rapida* показал, что они представлены ликопином и его производными (Tikhonova et al., 2023).

Настоящая работа была посвящена изучению морфологических, физиологических, ростовых и геномных характеристик нового непигментированного изолята рода *Methylobomonas*, штамм MW1^T, выделенного из донных отложений горной реки Хоста, Краснодарский край. На основании результатов проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм MW1^T к новому виду рода *Methylobomonas*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения и условия культивирования. Штамм MW1^T был выделен в 2021 г. из проб донных отложений реки Хоста, Краснодарский край, Россия (43°53'33.48" N, 39°87'82.47" E), отобранных в небольшой заводи.

Для получения накопительных культур аликвоту донных отложений (20 мл) вносили во флаконы объемом 500 мл, добавляя 100 мл разбавленной минеральной среды NMS (dNMS) следующего состава (г л⁻¹): KNO₃ — 0.4; MgSO₄ · 7H₂O — 0.4; CaCl₂ · 2H₂O — 0.08; 1% (об./об.) 0.2 М фосфатного буфера (pH 6.5) и 0.1% (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001) следующего состава (г/л): ЭДТА — 5; FeSO₄ · 7H₂O — 2; ZnSO₄ · 7H₂O — 0.1; MnCl₂ · 4H₂O — 0.03; CoCl₂ ·

· H₂O — 0.2; CuCl₂ · 5H₂O — 0.1; NiCl₂ · 6H₂O — 0.02; Na₂MoO₄ — 0.03. Содержание метана в газовой фазе доводили до 30 об. %. Культивирование проводили на шейкере-инкубаторе Biosan ES-20/60 при 150 об./мин при 25°C. Мониторинг роста метанотрофов в накопительных культурах осуществляли визуально и с использованием фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Axioplan 2 (“Zeiss”, Йена, Германия), с увеличением ×1000. Через 10 сут инкубации обогащенную метанотрофными бактериями накопительную культуру подвергали предельным разведениям: 0.5 мл суспензии клеток смешанной культуры последовательно разводили во флаконах общим объемом 60 мл, с добавлением 5 мл среды dNMS. Флаконы герметично закрывали, вводили метан шприцем с бактериальным фильтром 0.22 мкм до 30% CH₄ в газовой фазе и инкубировали на качалке (150 об./мин) при комнатной температуре в течение 2 сут. Культуру, выросшую во флаконе с наибольшим разведением, анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии и подвергали последующему рассеву. Процедуру повторяли до получения культуры, состоящей из морфологически одинаковых клеток, после чего клеточные суспензии высеивали на аналогичную агаризованную среду dNMS. Чашки Петри инкубировали при комнатной температуре в эксикаторах, содержащих около 30% (об./об.) метана в газовой фазе. Колонии, появляющиеся на чашках, отбирали и повторно рассевали на агаризованную среду. Чистоту полученных изолятов проверяли с помощью фазово-контрастной микроскопии и рассевом на разбавленный в 10 раз агар Лурия—Бертани (1.0% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1.0% NaCl).

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии клетки экспоненциально растущей культуры осаждали центрифугированием и фиксировали 2.5% (вес/об.) раствором глутаральдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 1 ч при 4°C, а затем фиксировали в OsO₄ (1% раствор; вес/об.) с добавлением рутениевого красного (конечная концентрация в растворе 0.5% (вес/об.) в том же буфере в течение 4 ч при 20°C. После фиксации образцы последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этаноле в течение 4 ч, затем в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96%-ном этиловом спирте (2 обработки по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 обработки по 10 мин). Образцы заливали в эпоксидную смолу Epon 812 (Epoxy Embedding Medium Epon® 812, “Sigma-Aldrich”, США). Ультратонкие срезы делали на микротоме LKB-III (“LKB”, Швеция), контрастировали 3% водным раствором уранилацетата (при 37°C, 20 мин), затем цитратом свинца при 37°C в течение 20 мин (Reynolds, 1963). Электрон-

но-микроскопические исследования проводили на базе ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM 100CXII (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотодокументирование материалов осуществляли с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2 (“Olympus”, Япония).

Экстракция ДНК. Культуру штамма MW1^T выращивали в жидкой среде dNMS в течение 24 ч при 25°C на шейкер-инкубаторе при 150 об./мин. Суспензию клеток центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант сливали, а осадок использовали для экстракции геномной ДНК по стандартному протоколу с использованием СТАВ – фенол/хлороформ (Wilson, 2001).

Идентификация изолята. Идентификацию штамма MW1^T проводили путем анализа последовательности гена 16S рРНК, ПЦР-амплификацию которого осуществляли с использованием универсальных для бактерий праймеров 9F/1492R (Weisburg et al., 1991). Для очистки ПЦР-амплифицированных фрагментов использовали набор Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Секвенирование гена 16S рРНК проводили на базе ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН. Редактирование полученных последовательностей осуществляли в программе BioEdit. Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета MEGAX (Kumar et al., 2018) методом максимального правдоподобия. Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывали с помощью “bootstrap”-анализа путем построения 1000 альтернативных деревьев.

Физиологические характеристики. Физиологические тесты проводили в жидкой среде dNMS с метаном в газовой фазе. Рост штамма MW1^T контролировали путем измерения OD₆₀₀ в течение 2 сут в различных условиях, включая температуру 4–40°C, pH 5.0–8.0 и концентрации NaCl 0–3.0% (вес/об.). Варьирование pH достигали смешиванием 0.1 М растворов H₃PO₄, KH₂PO₄ и K₂HPO₄. Диапазон потенциальных ростовых субстратов исследовали путем внесения в среду следующих источников углерода в концентрации 0.05% (вес/об.): метанол, этанол, формиат, глюкоза, фруктоза, галактоза, ацетат, пируват, малат, сукцинат, цитрат, глутамин, пропионат, казаминовые кислоты, дрожжевой экстракт. Способность штамма MW1^T к росту на метаноле тестировали на жидкой среде dNMS, содержащей 0.05–3% (об./об.) метанола. Источники азота тестировали путем замены KNO₃ в dNMS на следующие соединения в концентрации 0.01% (вес указанных со-

единений/об.): (NH₄)₂SO₄, NaNO₂, мочевины, аланин, серин, глицин, глутамин, формамид, дрожжевой экстракт, казаминовые кислоты, пептон. Проверку способности к фиксации атмосферного азота проводили на жидкой среде dNMS без источника азота во флаконах с пониженным содержанием O₂ в газовой фазе (2 об. %).

Геномное секвенирование и аннотирование. Секвенирование ДНК проводили с использованием технологий Illumina и Oxford Nanopore. Библиотеку для секвенирования на приборе MiSeq (“Illumina”, США) готовили с помощью набора NEB-Next ultra II DNA Library kit (“New England Biolabs”, США). Для секвенирования на приборе MinIon (“Oxford Nanopore”, Великобритания) геномную библиотеку готовили с помощью набора 1D Ligation Sequencing Kit SQK-LSK108 (“Oxford Nanopore Technologies”, Великобритания) и секвенировали с использованием ячейки FLO-MIN106 v R9.4.1. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений была выполнена с использованием программы Unicycler (Wick et al., 2017).

Аннотацию генома проводили с помощью программы PROKKA (Seemann et al., 2014) и веб-ресурса GhostKOALA (Kanehisa et al., 2016). Построение геномного дерева производили в программе GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2020) посредством множественного выравнивания геномов бактерий семейства *Methylococcaceae* и *Methylocystaceae* по 120 маркерным белкам. Величины сходства последовательностей геномов штамма MW1^T и близкородственных к нему видов проводили с использованием ANI calculator (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2014) и Genome-to-Genome-Distance-Calculator (Meier-Kolthoff et al., 2013).

Определенные в работе нуклеотидные последовательности. Полученные в работе последовательности гена 16S рРНК и генома штамма MW1^T депонированы в GenBank под номерами OR237191 и CP129884 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология, ультраструктура клеток и идентификация нового изолята. Штамм MW1^T формировал на агаризованной среде dNMS слизистые разрастания белого цвета (рис. 1а) или же белые круглые выпуклые колонии слизистой консистенции 2–3 мм в диаметре. В жидкой среде изолят рос в виде гомогенной суспензии белого цвета. При росте культур на жидкой среде в статических условиях образования поверхностной пленки не происходило.

Клетки штамма MW1^T были представлены подвижными короткими палочками размером $0.9 \pm 0.04 \times 1.5 \pm 0.2$ мкм (рис. 1б). Образование цепочек клеток не наблюдалось. При переходе в стационарную фазу роста клетки обнаруживали

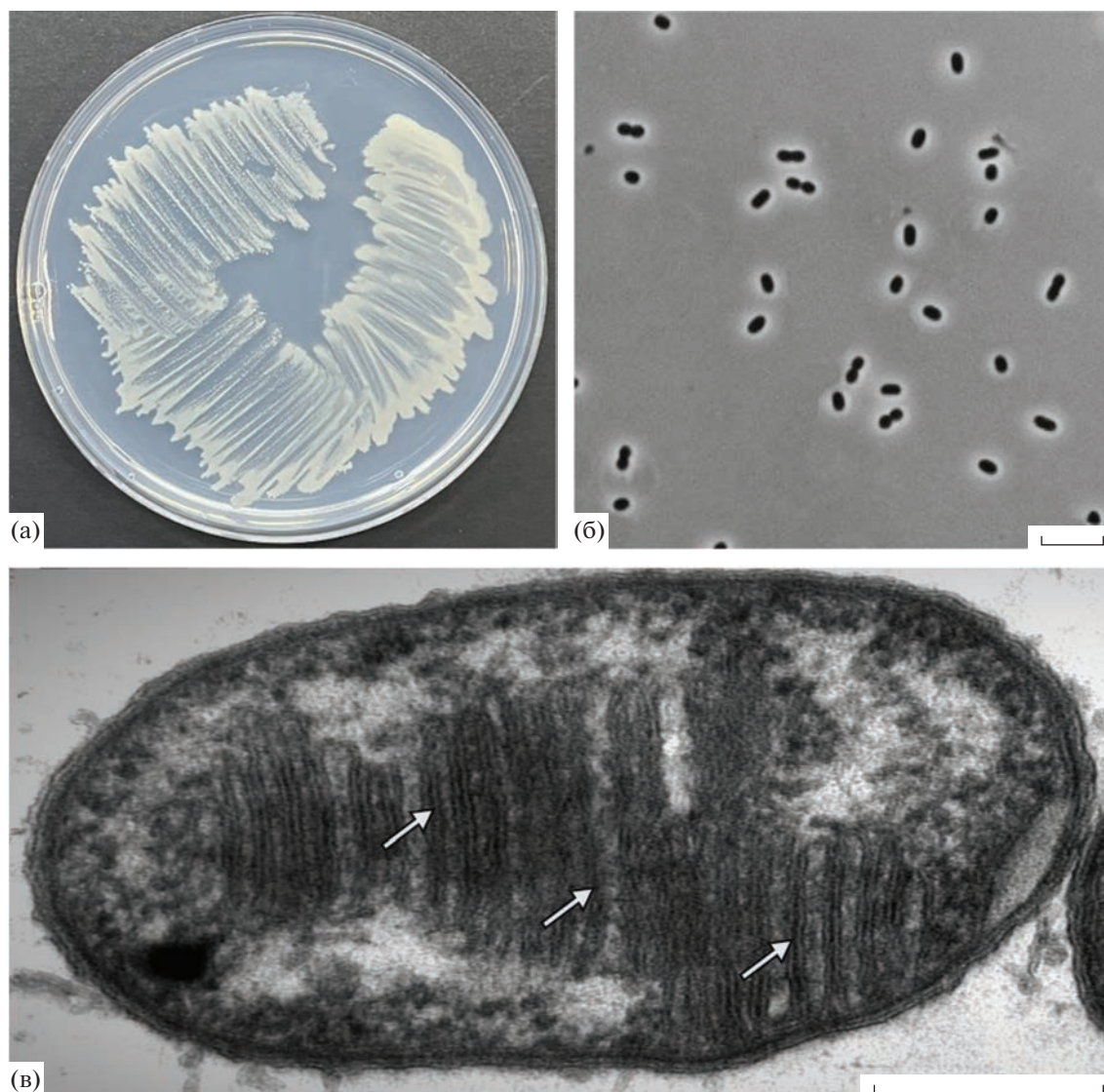


Рис. 1. (а) — Рост штамма MW1^T на агаризованной минеральной среде после недели инкубации в эксикаторах с 30% (об./об.) метана в газовой фазе. (б) — Фазово-контрастные микрофотографии клеток штамма MW1^T; масштабная метка — 5 мкм. (в) — Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки штамма MW1^T; масштабная метка — 0.2 мкм. Стопки внутрицитоплазматических мембран указаны белыми стрелками.

тенденцию к образованию крупных (до нескольких мм) агрегатов.

Анализ ультратонких срезов показал типичное строение клеточной стенки грамотрицательных клеток и наличие внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) в виде стопок везикулярных дисков, расположенных перпендикулярно клеточной стенке (рис. 1в). Такое расположение ВЦМ характерно для метанотрофов I типа.

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма MW1^T показало его принадлежность к роду *Methylomonas* семейства *Methylococcaceae* класса *Gamma*proteobacteria (рис. 2). Ближайшим таксономически охарактеризованным филогенетическим родственником штамма

MW1^T является *M. fluvii* EbB^T, выделенный из осадков реки Эльба (98.47% сходства последовательностей генов 16S рРНК). Сходство последовательности гена 16S рРНК штамма MW1^T с таковыми у других представителей рода *Methylomonas* составило 95.48–98.47%, что позволило сделать предположение о его принадлежности к новому виду этого рода.

Физиологические характеристики. Метан и метанол были единственными субстратами, используемыми штаммом MW1^T. Метанол поддерживал рост в диапазоне концентраций до 3% (об./об.). В качестве источников азота новый изолят использовал нитраты, сульфат аммония, формамид, глутамин, серин, аланин, пептон, казеиновые кис-

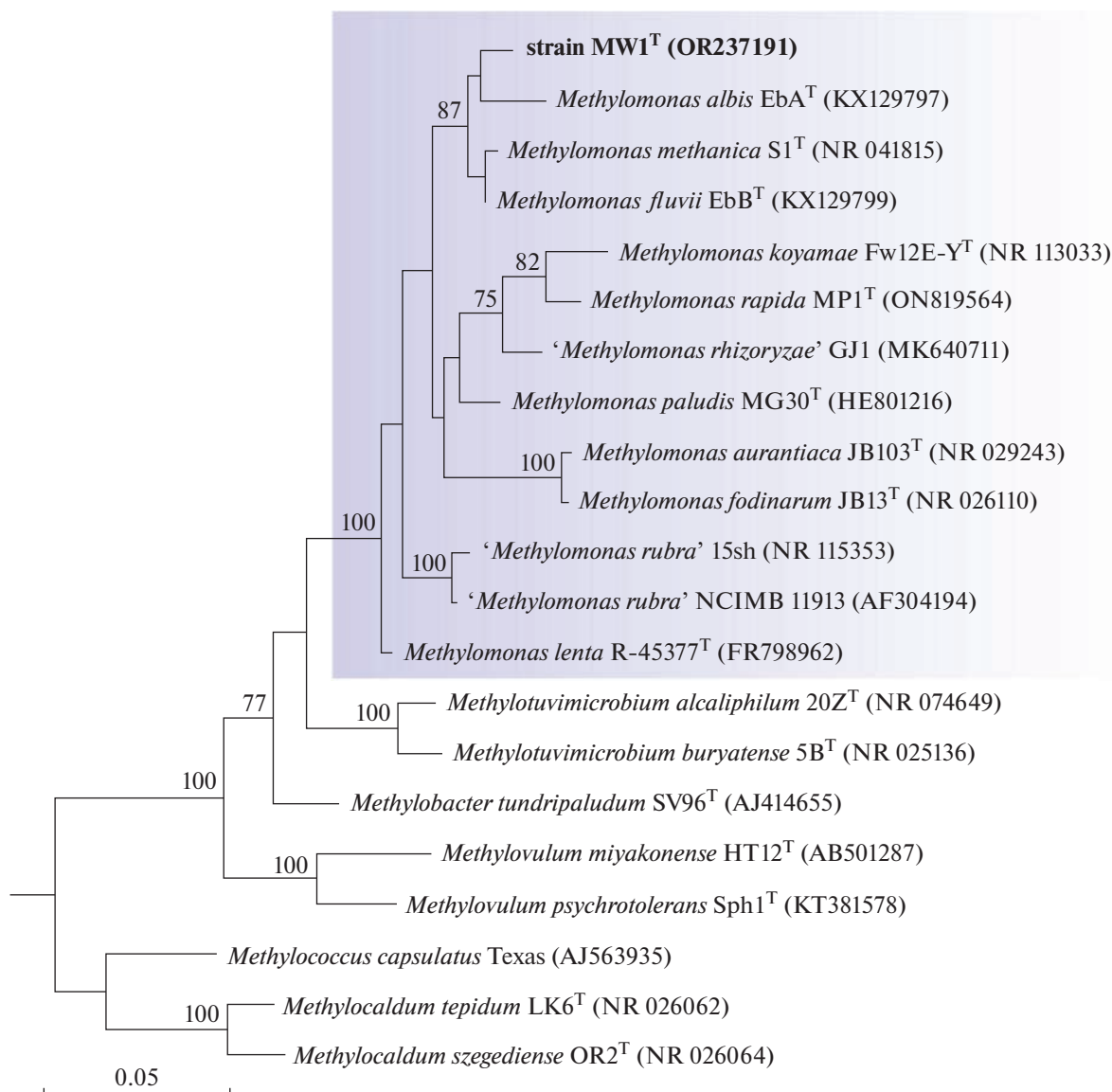


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе результатов сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штамма MW1^T, таксономически описанных представителей рода *Methylomonas* и некоторых других метанотрофных бактерий семейства *Methylococcaceae*. Филогенетический кластер рода *Methylomonas* выделен синим цветом. Маркер — 0.05 замен на нуклеотидную позицию.

лоты, мочевины. Слабый рост наблюдался также в микроаэробных условиях на среде без источника связанного азота, свидетельствуя о способности штамма MW1^T к фиксации атмосферного азота.

Штамм MW1^T рос в диапазоне pH 5.5–7.5 с оптимумом при pH 6.3–7.0. Температурный диапазон роста этой метанотрофной бактерии составлял 8–37°C с оптимумом при 25–30°C. Содержание NaCl в среде выше 1% (вес/об.) ингибировало рост. Максимальная удельная скорость роста штамма MW1^T составляла 0.13 ч⁻¹. В оптимальных условиях культура достигла OD_{600max} = 1.2 через 4 сут инкубации.

Анализ генома. В результате секвенирования ДНК штамма MW1^T на приборе MiSeq (“Illumina”, Сан-Диего, Калифорния, США) было получено 3.6 млн парных прочтений (2×300 нт.), суммарная длина которых составила 1.1×10^9 нт. Дополнительно с помощью технологии Nanopore было получено 266 тыс. нуклеотидных последовательностей со средней длиной 6126 нт. Суммарная длина чтений составила 1.6×10^9 нт. В результате гибридной сборки был сформирован один контиг длиной 4634080 нт. С помощью геномного аннотатора Prokka в геноме штамма MW1^T было предсказано 4240 белок-кодирующих генов, 3 копии оперона рРНК и 47 копий гена тРНК. Содержание

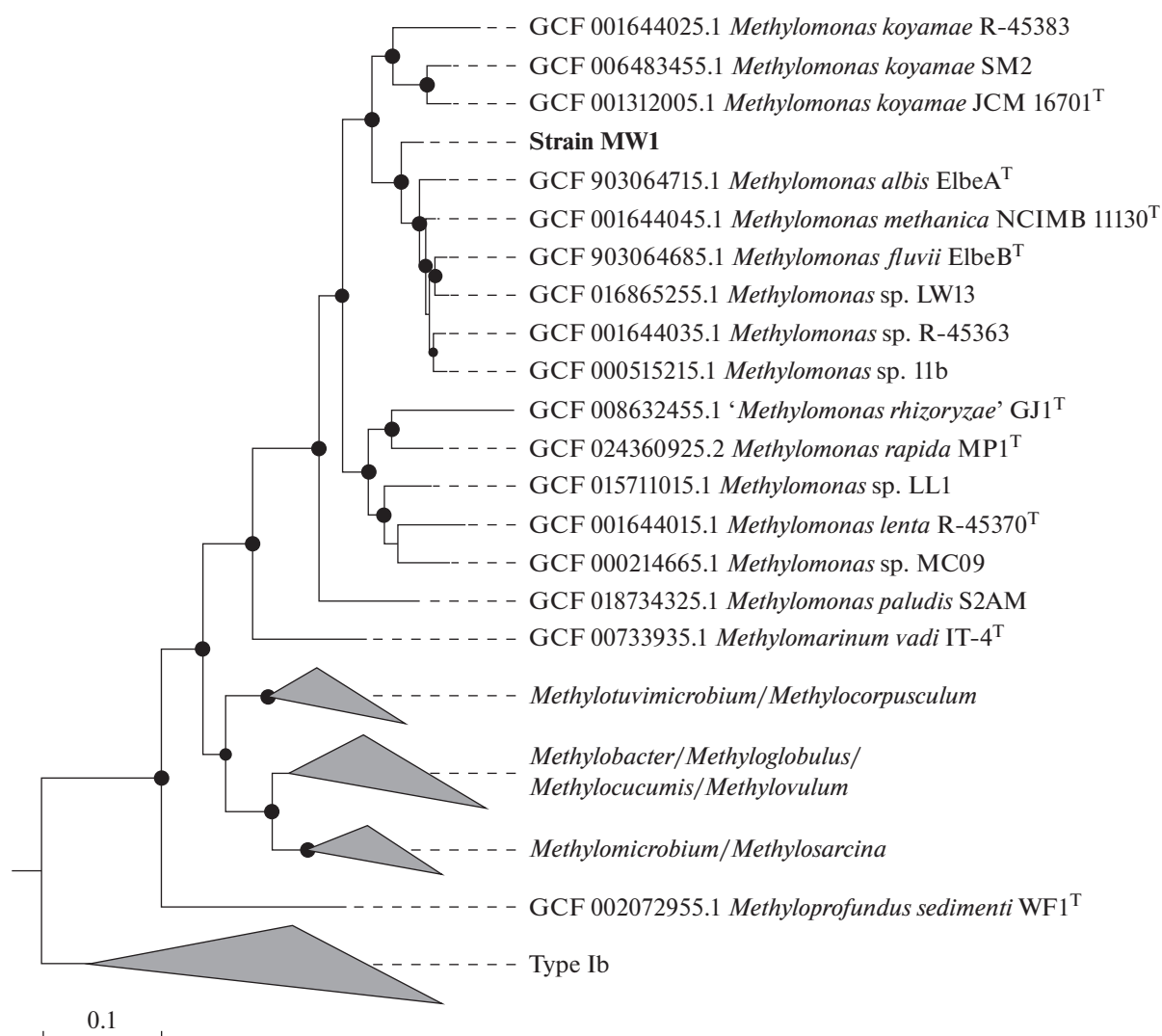


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа геномов представителей семейства *Methylococcaceae*. Бутстрэпы рассчитаны методом максимального подобия путем построения 100 альтернативных дендрограмм. Показаны значения бутстрэп-анализа >60. В качестве внешней группы использованы геномы метанотрофов семейства *Methylocystaceae*. Маркер — 0.1 замена на одну аминокислотную позицию.

пар Г + Ц в ДНК составило 52.4%. ДНК : ДНК гибридизация *in silico* генома штамма MW1^T с такими у филогенетически близких видов рода *Methylobacterium* с помощью Genome-to-Genome-Distance-Calculator выявила менее 25% сходства. Наиболее близким организмом являлся *M. fluvii* EbB^T с уровнем сходства $24.7 \pm 2.4\%$. Оценка уровня подобия геномных последовательностей с помощью калькулятора ANI показала 79.4–82.1% сходства штамма MW1^T с представителями других видов рода *Methylobacterium*. Полученные величины свидетельствуют о принадлежности MW1^T к новому виду рода *Methylobacterium* (рис. 3).

Клетки штамма MW1^T содержали только мембранную форму ключевого фермента окисления метана — метанмонооксигеназы, которая кодиро-

вана единичной копией генного кластера *pmoCAB*. Растворимая ММО в геноме не представлена. Последовательность PmoA штамма MW1^T обнаруживала 95.5–98.8% идентичности с последовательностями PmoA видов *Methylobacterium*, ближайшим из которых являлся *M. albis* EbA^T. В геноме штамма MW1^T был идентифицирован полный кластер генов, необходимых для функционирования Ca²⁺-зависимой метанолдегидрогеназы (МДГ) — MxaFI. МДГ катализирует окисление метанола, образующегося в результате монооксигенирования метана. Штамм MW1^T обладал также альтернативной односубъединичной метанолдегидрогеназой (HoxF), которая содержит редкоземельные элементы в активном центре (Hibi et al., 2011). Наряду с некоторыми видами рода *Methylobacterium*, новый

Таблица 1. Основные характеристики, отличающие штамм MW1^T от других видов рода *Methylomonas*: 1 – штамм MW1^T; 2 – *M. rapida* MP1^T (Tikhonova et al., 2023); 3 – *M. paludis* MG30^T (Danilova et al., 2013); 4 – *M. albis* EbA^T; 5 – *M. fluvii* EbB^T; 6 – *M. methanica* S1^T (Bowman et al., 1993); 7 – *M. fodinarum* UQM3268^T (Bowman et al., 1990); 8 – *M. aurantiaca* UQM3406^T (Bowman et al., 1990); 9 – *M. scandinavica* SR5^T (Kalyuzhnaya et al., 1999); 10 – *M. koyamae* Fw12E-Y^T (Ogiso et al., 2012); 11 – *M. lenta* R-45377^T (Hoefman et al., 2014)

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Размеры	0.9 × 1.5	1.1 × 2.1	1.3 × 3	0.8 × 2.5	0.8 × 2.5	0.7 × 1.6	0.7 × 1.2	0.6 × 1.3	0.8 × 1.7	0.9 × 1.7	0.9 × 2.0
Пигментация	Белая	Розовая	Бледно-розовая	Бледно-розовая	Розовая	Розовая	Оранжевая	Оранжевая	Розовая	Розово-оранжевая	Бледно-розовая
Формирование цепочек	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–
Подвижность	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Температура (оптимум)	8–37 (30)	5–45 (35)	8–30 (25)	1–30 (15)	1–30 (15)	10–37 (25)	10–35 (25)	15–40 (35)	5–30 (15)	10–40 (30)	15–28 (20)
Диапазон pH (оптимум)	5.5–7.5 (6.3–7.0)	5.5–7.8 (7.0)	3.8–7.3 (6.0)	6.0–9.0 (6.0)	5.5–9.0 (6.0)	5.5–9.0 (7.0)	5.5–9.0 (7.0)	5.0–9.0 (6.5)	5.0–9.5 (7.2)	5.5–7.0 (6.5)	6.3–7.8 (7.0)
Максимальное содержание NaCl, %	1	3	1	5	15	1.5	Н.о.	Н.о.	1	0	1
Рост на метаноле	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
pMMO	–	–	–	+	+	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	–	–
Фиксация N ₂	+	–	+	±	±	±	+	+	Н.о.	+	–
Содержание Г + Ц в ДНК, %	52.4	52.8	48.5	51.1	51.5	52.0*	58.4*	56.5*	53.3*	57.1	47.0

Примечание. Н.о. – не определено; * – по данным температуры плавления (T_m); “±” – *nif* гены в геноме присутствуют, но активность не обнаружена.

штамм MW1^T был способен к фиксации атмосферного азота, что подтверждается наличием в геноме кластера генов *nifDHK*, кодирующего Мо-Fe нитрогеназу. В геноме штамма MW1^T отсутствуют характерные для большинства представителей рода *Methylomonas* гены 4,4'-диапофитоендесатуразы (*crtN*) и 4,4-диаполикопиноксидазы (*crtP*), что объясняет неспособность штамма к синтезу каротиноидов.

Проведенный нами сравнительный анализ морфологических, физиолого-биохимических и геномных характеристик позволил выявить ряд отличий нового изолята от других представителей рода *Methylomonas* (табл. 1). Отличием штамма MW1^T от всех ранее охарактеризованных видов *Methylomonas* является отсутствие пигментации. Клетки нового изолята не синтезируют каротиноиды, присутствие которых является типичным для представителей рода *Methylomonas*. Штамм MW1^T наиболее близок к недавно описанным видам *M. fluvii* EbB^T и *M. albis* EbA^T, выделенным из речных осадков, однако отличается от них наличием подвижности, повышенной термотолерантностью и неспособностью расти при высоких концентрациях NaCl в среде. Низкие значения сходства нуклеотидной последовательности генома (ANI) и величины ДНК : ДНК гибридизации штамма MW1^T и ныне известных представителей рода *Methylomonas*, для которого предлагается видовое название *Methylomonas montana*.

Диагноз нового вида — *Methylomonas montana* sp. nov.

Methylomonas montana sp. nov. (mon.ta'na. L. fem. adj. *montana* — горная).

Одиночные, не образующие цепочек палочковидные подвижные клетки размером $0.9 \pm 0.04 \times 1.5 \pm 0.2$ мкм. Расположение внутрицитоплазматических мембран в клетках характерно для метанотрофов I типа. Колонии непигментированные, кремово-белого цвета, округлые, выпуклые, слизистые. В жидкой среде растут гомогенно, поверхностных пленок не образуют. Облигатные аэробы. Психротолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумами роста 25–30°C и pH 6.3–7.0. Единственными источниками углерода являются метан и метанол. Метанол поддерживает рост до 3% (об./об.). Не обладают растворимой метанмонооксигеназой. Источниками азота служат соли аммония, нитрат, мочевины, аланин, серин, глутамин, формамид, казиаминовые кислоты, пептон и атмосферный азот. NaCl подавляет рост при концентрации в среде выше 1%. Типовым штаммом вида является штамм MW1^T (=VKM В-3737^T = UQM 41536^T), выделенный из донных отложений реки Хоста, Краснодарский край, Россия.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00034). Секвенирование генома штамма MW1^T проведено в рамках выполнения работ по Соглашению № 075-15-2021-1051 с Министерством 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

- Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
- Данилова О.В., Дедыш С.Н. Численность и разнообразие метанотрофных представителей *Gammaproteobacteria* в северных болотных экосистемах // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 204–214.
- Danilova O.V., Dedysh S.N. Abundance and diversity of methanotrophic *Gammaproteobacteria* in northern wetlands // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 67–76.
- Auman A.J., Speake C.C., Lidstrom M.E. *nifH* sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4009–4016.
- Auman A.J., Lidstrom M.E. Analysis of sMMO-containing type I methanotrophs in Lake Washington sediment // Environ. Microbiol. 2002. V. 4. P. 517–524.
- Bowman J.P., Sly L.I., Cox J.M., Hayward A.C. *Methylomonas fodinarum* sp. nov. and *Methylomonas aurantiaca* sp. nov.: two closely related type I obligate methanotrophs // Syst. Appl. Microbiol. 1990. V. 13. P. 279–287.
- Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 43. P. 735–753.
- Bowman J.P. *Methylomonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh. 2016. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01183.pub2>
- Bussmann I., Horn F., Hoppert M., Klings K.-W., Saborowski A., Warnstedt J., Liebner S. *Methylomonas albis* sp. nov. and *Methylomonas fluvii* sp. nov.: two cold-adapted methanotrophs from the river Elbe and emended description of the species *Methylovulum psychrotolerans* // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126248.
- Chang J., Wu Q., Yan X., Wang H., Lee L.W., Liu Y., Liang P., Qiu Y., Huang X. Enhancement of nitrite reduction and enrichment of *Methylomonas* via conductive materials in a ni-

- trite-dependent anaerobic methane oxidation system // Environ. Res. 2021. V. 193. Art. 110565.
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: A Toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848
- Chen Y., Dumont M.G., Cebon A., Murrell J.C. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 2855–2869.
- Danilova O.V., Kulichevskaya I.S., Rozova O.N., Detkova E.N., Bodelier P.L., Trotsenko Y.A., Dedysh S.N. *Methylomonas paludis* sp. nov., the first acid-tolerant member of the genus *Methylomonas*, from an acidic wetland // Syst. Appl. Microbiol. 2013. V. 63. P. 2282–2289.
- Dianou D., Ueno C., Ogiso T., Kimura M., Asakawa S. Diversity of cultivable methane-oxidizing bacteria in microsites of a rice paddy field: investigation by cultivation method and fluorescence in situ hybridization (FISH) // Microbes Environ. 2012. V. 27. P. 278–287.
- Hibi Y., Asai K., Arafuka H., Hamajima M., Iwama T., Kawai K. Molecular structure of La³⁺-induced methanol-dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans* // J. Biosci. Bioeng. 2011. V. 111. P. 547–549.
- Hoefman S., Heylen K., De Vos P. *Methylomonas lenta* sp. nov., a methanotroph isolated from manure and a denitrification tank // Syst. Appl. Microbiol. 2014. V. 64. P. 1210–1217.
- Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V.N., Kotelnikova S., Holmquist L., Pedersen K., Trotsenko Y.A. *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden // Syst. Appl. Microbiology. 1999. V. 22. P. 565–572.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Kip N., Dutilh B.E., Pan Y., Bodrossy L., Neveling K., Kwint M.P., Jetten M.S., Op den Camp H.J. Ultra-deep pyrosequencing of *pmoA* amplicons confirms the prevalence of *Methylomonas* and *Methylocystis* in *Sphagnum* mosses from a Dutch peat bog // Environ. Microbiol. Rep. 2011. V. 3. P. 667–673.
- Kits K.D., Klotz M.G., Stein L.Y. Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the *Gammaproteobacterium Methylomonas denitrificans*, sp. nov. type strain FJG1 // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. P. 3219–3232.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. 2013. V. 14. P. 60.
- Ogiso T., Ueno C., Dianou D., Van Huy T., Katayama A., Kimura M., Asakawa S. *Methylomonas koyamae* sp. nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field in Japan // Syst. Appl. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1832–1837.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208.
- Rodriguez-R. L.M., Konstantinidis K.V. Bypassing cultivation to identify bacterial species // Microbe. 2014. V. 9. P. 111–118.
- Seemann T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2068–2069.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153
- Tikhonova E.N., Suleimanov R.Z., Miroshnikov K.K., Oshkin I.Y., Belova S.E., Danilova O.V., Ashikhmin A.A., Konopkin A.A., But S.Y., Khmelenina V.N., Pimenov N.V., Dedysh S.N. *Methylomonas rapida* sp. nov., a novel species of fast-growing, carotenoid-producing obligate methanotrophs with high biotechnological potential // Syst. Appl. Microbiol. 2023. V. 46. P. 126398.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
- Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. e1005595.
https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2001. V. 56. P. 2–4. Doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00011-2
- Zhu P., Cheng M., Pei D., Liu Y., Yan X. *Methylomonas rhizoryzae* sp. nov., a type I methanotroph isolated from the rhizosphere soil of rice // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 2167–2176.

Methylomonas Montana sp. nov., the First Unpigmented Methanotroph of the Genus *Methylomonas*, Isolated from Mountain River Sediments

R. Z. Suleimanov¹, E. N. Tikhonova¹, I. Y. Oshkin¹, O. V. Danilova¹, and S. N. Dedysh^{1, *}

¹ Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: dedysh@mail.ru

Received July 19, 2023; revised July 25, 2023; accepted July 27, 2023

Abstract—Aerobic methanotrophic bacteria of the genus *Methylomonas* inhabit a wide spectrum of habitats including freshwater bodies, river sediments, wetlands, rice paddies, landfill cover soils, and hydromorphic soils. Majority of the currently described species of this genus are represented by neutrophilic, motile, grow-

ing on methane rod-shaped bacteria, whose pigmentation varies from yellow to pink and red. This study reports characterization of a novel, unpigmented isolate of these bacteria, strain MW1^T, which was obtained from sediments of the mountain river Khosta, Krasnodar region, Russia. Strain MW1^T grew on methane and methanol within a temperature range of 8–37°C (optimum at 25–30°C) and at pH 5.5–7.5 (optimum at 6.3–7.0). The 16S rRNA gene sequence of strain MW1^T displayed 95.48–98.47% similarity to those in earlier described *Methylomonas*. The closest taxonomically characterized phylogenetic relative of strain MW1^T was *M. fluvii* EbB^T, isolated from the river Elbe sediments. Complete genome sequence of strain MW1^T was 4.6 Mb in size and contained three rRNA operons and about 4200 protein-encoding genes, including the gene cluster *pmoCAB* coding for membrane methane monooxygenase. Soluble methane monooxygenase was not encoded in the genome. The G+C DNA content was 52.4%. The average nucleotide identity of the genome of strain MW1^T with those in earlier described representatives of the genus *Methylomonas* was 79.4–82.1%. We propose to classify this isolate as representing a novel species of the genus *Methylomonas*, *M. montana* sp. nov. Strain MW1^T (=VKM 3737^T = UQM 41536^T) is the type strain of the newly proposed species.

Keywords: methanotrophic bacteria, genus *Methylomonas*, *Methylomonas montana*, growth on methane, freshwater sediments, genome analysis