

УДК 57.083.18

METHANOSARCINA BAIKALICA SP. NOV., НОВАЯ МЕТАНОГЕННАЯ АРХЕЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПРИДОННЫХ ОСАДКОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ¹

© 2024 г. Т. Н. Жилина^{а, *}, А. Ю. Меркель^а, Т. В. Колганова^б, В. Э. Трубицын^{с, *},
В. А. Щербакова^с, Н. Е. Сузина^с, Н. В. Пименов^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

^бИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

^сФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com; Zhilinat@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2024 г.

После доработки 16.05.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Из донных осадков пресноводного озера Байкал (Восточная Сибирь, Россия) выделена новая метано-бразующая архея штамм Z-7115^T. Морфологически штамм представляет неподвижные кокковидные клетки 0.5–3 мкм, собранные по 2–4 в пакеты и их небольшие агрегаты. В качестве энергетических субстратов для метаногенеза штамм использует метанол, моно-, ди-, триметиламин и ацетат. Клетки растут при температуре 15–35°C (оптимум 25°C), pH 6.3–7.5 (оптимум pH 7.3) и толерантны к концентрации NaCl < 0.1 М. Содержание Г + Ц геномной ДНК – 40.76 мол. %. По данным анализа гена 16S рРНК новый изолят принадлежит к роду *Methanosarcina*, имея с ближайшим к нему видом этого рода *M. sicilae* T4/M^T уровень сходства этого гена 98.51%. Среднее нуклеотидное сходство (ANI) между геномами штаммов Z-7115^T и *M. sicilae* T4/M^T составило 83.8%. Виртуальная оценка гибридизации геномов этих двух штаммов составила 23.3%. На основании данных филогенетического анализа и морфо-физиологических свойств предлагается отнести выделенный штамм Z-7115^T (=JCM 39438, =VKM B-3565) к новому виду *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

Ключевые слова: *Methanosarcina baikalica* sp. nov., археи, метаногены, Байкал, осадки пресных озер

DOI: 10.31857/S0026365624060021

Озеро Байкал – самое древнее, глубокое и крупное по объему пресных вод озеро на Земле. Оно расположено в тектонически активной рифтовой зоне Восточной Сибири, что способствует созданию в нем своеобразных биотопов, развитие которых в значительной степени обусловлено наличием в тектонически ослабленных зонах дна озера метановых и нефтяных высачиваний разного генезиса. Вся многокилометровая толща донных отложений обитаема для микроорганизмов (Намсараев, Земская, 2000). Микробиологические исследования озера Байкал проводились с 20-х годов XX столетия, но в последние десятилетия с развитием молекулярных методов основное внимание было уделено изучению биоразнообразия разных групп микроорганизмов-деструкторов в составе микробных сообществ

донных осадков, в том числе анаэробных (Земская и соавт., 2021), а также оценке скоростей процессов деструкции органического вещества (Намсараев, Земская, 2000; Пименов и соавт., 2014). Было установлено, что из-за дефицита сульфата в воде озера Байкал процесс сульфатредукции, обнаруженный в осадках озера, имеет второстепенное значение (Пименов и соавт., 2014), а основным конечным продуктом микробного разложения органического вещества является метан (Намсараев и Земская, 2000; Дагурова и соавт., 2004).

В анаэробных сообществах донных отложений оз. Байкал, в том числе приуроченных к разгрузкам газо- и нефтенасыщенных флюидов, присутствие и разнообразие метаногенных архей было выявлено на основе иммунофлуоресцентного окрашивания

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060021>

(Намсараев, Земская, 2000), получения накопительных культур с использованием основных субстратов метаногенеза (Павлова и соавт., 2014; Букин и соавт., 2018) и секвенирования генов 16S рРНК и *mcrA* (Шубенкова и соавт., 2005; Lomakina et al., 2014, 2018; Kadnikov et al., 2012; Черницына и соавт., 2016; Bukin et al., 2020). В донных осадках было выявлено присутствие метаногенов всех известных путей метаногенеза — гидрогенотрофного, ацетокластического, метилотрофного и водород-зависимого метилотрофного, с доминированием в глубоководных донных отложениях гидрогенотрофного метаногенеза (Земская и соавт., 2021). Примененные экологические и молекулярно-биологические методы для изучения скоростей процесса метаногенеза и разнообразия метаногенов донных осадков оз. Байкал не исключают выделения и изучения их чистых культур, необходимых как для прямого доказательства функционирования того или иного пути метаногенеза, осуществляемого метаногенными археями в анаэробном сообществе, так и для выявления их физиологических особенностей, связанных с местом обитания.

Ранее из зоны нефтепроявления центральной части Байкала были выделены первые представители метаногенных архей — использующий водород *Methanobacterium flexile* Z-7215 и *Methanosarcina* sp., штамм Z-7115^T (Жилина и соавт., 2017). В этой работе мы приводим полное филогенетическое и фенотипическое описание выделенного штамма *Methanosarcina* и на основании проведенных исследований предлагаем отнести его к новому виду — *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения. Исходным материалом для накопления и выделения метаногенных архей служили пробы глубоководных донных осадков пресноводного оз. Байкал (Восточная Сибирь, Россия). Пробы были отобраны Н.В. Пименовым в Кукуйском каньоне с разных горизонтов над газогидратами (GR-1; GR-2) и зонами нефтепроявления (BC-6; GG-6 “черпак”) центральной части оз. Байкал (Горевой утес) с борта научного судна “Г.Ю. Верещагин” в июле 2013 г. Источником для выделения штамма Z-7115^T послужила проба BC-6 (E 105°23.4670, N 52°18.2656) восстановленного ила темно-серого цвета маслянистой консистенции с глубины 5–10 см от поверхности донных отложений.

Накопительные культуры и условия культивирования. Для выявления метаногенов в исследуемых пробах и получения накопительных культур была использована низкоминерализованная среда Пфеннига, которая содержала (г/л): NH_4Cl — 0.33; KH_2PO_4 — 0.33; $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.33; CaCl_2 —

$2\text{H}_2\text{O}$ — 0.33; KCl — 0.33; NaHCO_3 — 1; раствор микроэлементов — 1 мл/л; раствор витаминов по Волину — 10 мл/л; ацетат натрия — 2 мМ; цистеин-хлорид — 0.3; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.4. После стерилизации среды ее pH составлял 6.8–7.0. В качестве субстратов были использованы следующие варианты: смесь H_2/CO_2 (80 : 20); ацетат 20 мМ; метанол 40 мМ + триметиламин (ТМА) 10 мМ; формиат натрия 40 мМ. Приготовление среды и культивирование проводили в строго анаэробных условиях в атмосфере N_2/CO_2 (80 : 20) в случае использования органических субстратов.

Для накопительных культур использовали герметически закрытые флаконы объемом 100 мл с 50 мл среды на органических субстратах и 20 мл среды с H_2/CO_2 в газовой фазе, в которые вносили 1 мл суспензии ила из исследуемых проб. Суспензия была приготовлена добавлением во флакон объемом 100 мл 5 г ила и 50 мл анаэробной минеральной среды со стеклянными шариками под током N_2/CO_2 (80 : 20).

Инкубацию проводили при 6 и 18°C. О развитии двух конкурирующих за водород и метильные соединения метаболических групп анаэробов — метаногенов и ацетогенов — судили по образованию метана или ацетата после 3-х и 12-ти месяцев инкубации.

Состав среды для выделения и пересевов исследуемого в работе штамма Z-7115^T в основном соответствовал составу среды для накопительных культур, но дополнительно содержал (г/л): дрожжевой экстракт Bacto (“BD”) — 0.05 (вместо раствора витаминов); резазурин — 0.02; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; метанол — 30 мМ.

Физиологические характеристики. Зависимости скорости метаногенеза от pH и температуры определяли на среде с метанолом как субстратом в пробирках Хангейта в двух повторностях. Зависимость роста микроорганизма от pH определяли при 25°C. Значения pH устанавливали добавлением растворов 6 н HCl или 6 н NaOH. Температурную зависимость роста штамма определяли в области от 5 до 40°C с шагом в 5°C.

Для определения спектра используемых субстратов для метаногенеза их вносили из стерильных концентрированных растворов в среду перед засе-вом в следующих конечных концентрациях (мМ): метанол — 30; ТМА, диметиламин (ДМА), монометиламин (ММА), ацетат, формиат, пируват, пропанол, изопропанол — 20; н-бутанол — 10; диметилсульфид (DMS) — 2. Использование молекулярного водорода тестировали в смеси H_2/CO_2 (80 : 20).

Аналитические методы. Метан, водород и ацетат определяли на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия). Разделение метана и водорода проводили на стеклянной колонке длиной 1 м, заполненной фазой CarboxenTM 1000 (“Supelco”, США) и присоединенной к детектору ДТП. Ацетат определяли на колонке,

заполненной фазой Carborpack C + 0.3% Carbowax 20M + 0.1% H₃PO₄ (“Supelco”).

Морфология. Живые клетки исследовали в фазово-контрастном микроскопе ZETOPAN (“Reichert”, Австрия). Для получения ультратонких срезов осадок клеток фиксировали в 1.5%-ом растворе глутаральдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч и дополнительно фиксировали в 1%-ом растворе OsO₄ в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания в серии спиртов материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Выделение ДНК, секвенирование и анализ полногенома. Выделение ДНК проводили с помощью FastDNA Spin Kit (“MP Bio”), следуя протоколу производителя. Геном штамма Z-7115^T секвенировали, используя систему DNBSEQ-G400 (“MGI Tech”) прочтениями по 2 × 150 нуклеотидов. Сборку генома проводили с помощью ПО Unicycler 0.5.0 (Wick et al., 2017). Поиск генов и аннотацию проводили с использованием ПО PGAP (Tatusova et al., 2016). Полноту и контаминацию сборки оценивали с помощью ПО CheckM v1.2.2 (Parks et al., 2015).

Филогенетический анализ. Филогенетическую реконструкцию на основе 53 консервативных однокопийных маркерных генов проводили с помощью ПО GTDB-Tk 2.3.2 de_novo_wf (Chaumeil et al., 2022). Филогенетическую реконструкцию на основе гена 16S рРНК проводили с помощью ПО IQ-TREE 2.2.0.3 (Minh et al., 2020). Виртуальная оценка гибридизации геномов осуществлялась с помощью ПО GGDC 3.0 (Meier-Kolthoff et al., 2022) по алгоритму “identities / HSP length”. Для вычисления и построения матрицы распределения и тепловой карты bANI между геномами рода *Methanosarcina* использован набор инструментов GET_HOMOLOGUES v. 16092021 (Contreras-Moreira, Vinuesa, 2013).

Депонирование нуклеотидных последовательностей. Полногеномная последовательность штамма Z-7115^T депонирована в GenBank/EMBL под номером JAVKPK000000000. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма Z-7115^T депонирована в GenBank/EMBL под номером KY780617.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Накопительные культуры. При посеве проб на среды с вышеперечисленными субстратами метаногенеза и инкубации при температуре 6 или 18°C рост был детектирован только при 18°C. В накопительных культурах были выявлены метилотрофные и гидрогенотрофные метаногены и ацетогены. При 6°C после инкубации в течение года

роста микроорганизмов и метаногенеза не было выявлено. В пробах над газогидратами (GR-1, GR-2) водород использовался исключительно на ацетогенез. На метилированных соединениях рост был незначительным, и небольшое количество ацетата образовалось в обеих пробах, наряду с метаном в пробе GR-1. Ацетат и формиат либо не использовались (проба Gr-1), либо использовались крайне слабо (проба Gr-2), что не дало возможности получить устойчивые накопительные культуры метаногенов на этих субстратах. В пробах зоны нефтепроявления (BC-6, GG-6) метилированные соединения использовались исключительно метаногенами, но и на водороде шло их развитие, наряду с ацетогенами. Небольшое образование метана из ацетата было детектировано только в пробе BC-6. В пробе GG-6 формиат преимущественно использовался на метаногенез, а в пробе BC-6 на ацетогенез (рис. 1).

На метилированных соединениях метаногены были представлены кокковидными клетками — неподвижными и агрегированными в сарциноподобные пакеты, а на водороде и формиате — палочковидными формами или подвижными плоскими и угловатыми кокками. Ацетогены были представлены спорообразующими палочками разных морфотипов.

Для идентификации присутствующих метаногенных архей была проведена ПЦР-реакция с использованием универсальных архейных праймерных систем для амплификации генов 16S рРНК двух накопительных культур (BC-6; GG-6) на метилированных субстратах и одной (GG-6/2) на H₂/CO₂. В пробе BC-6 на метилированных субстратах была выявлена архея, имеющая 98.51% сходства с *Methanosarcina siciliae* T4/M^T и 98.4% с *Methanosarcina subterranea* HC-2^T. С водородом, как субстратом, были детектированы археи рода *Methanobacterium*, из них доминирующая была близка к *Methanobacterium flexile* с 99.9% сходства. Обе археи — *Methanosarcina* sp. Z-7115^T и гидрогенотрофная *M. flexile* Z-7215 были выделены в чистую культуру, и *Methanosarcina* sp. Z-7115^T была далее описана.

Выделение чистой культуры *Methanosarcina* sp. Рост метаносарцины в жидкой среде визуально определяли по появлению на дне флаконов желтоватого осадка, легко диспергируемого при перемешивании. На твердой среде с агаром (2%, “Bacto”) роста получено не было. Чистая культура метаносарцины, обозначенная как штамм Z-7115^T, была получена методом последовательных десятикратных разведений в жидкой среде с метанолом в присутствии смеси антибиотиков ампициллина и оксипиллина (по 500 мг/л). Чистота культуры была подтверждена микроскопически, отсутствием роста на богатых органических средах с дрожжевым экстрактом и триптиказой (по 1 г/л) или глюкозой (3 г/л), а также результатом анализа гена 16S рРНК с использованием различных праймеров.

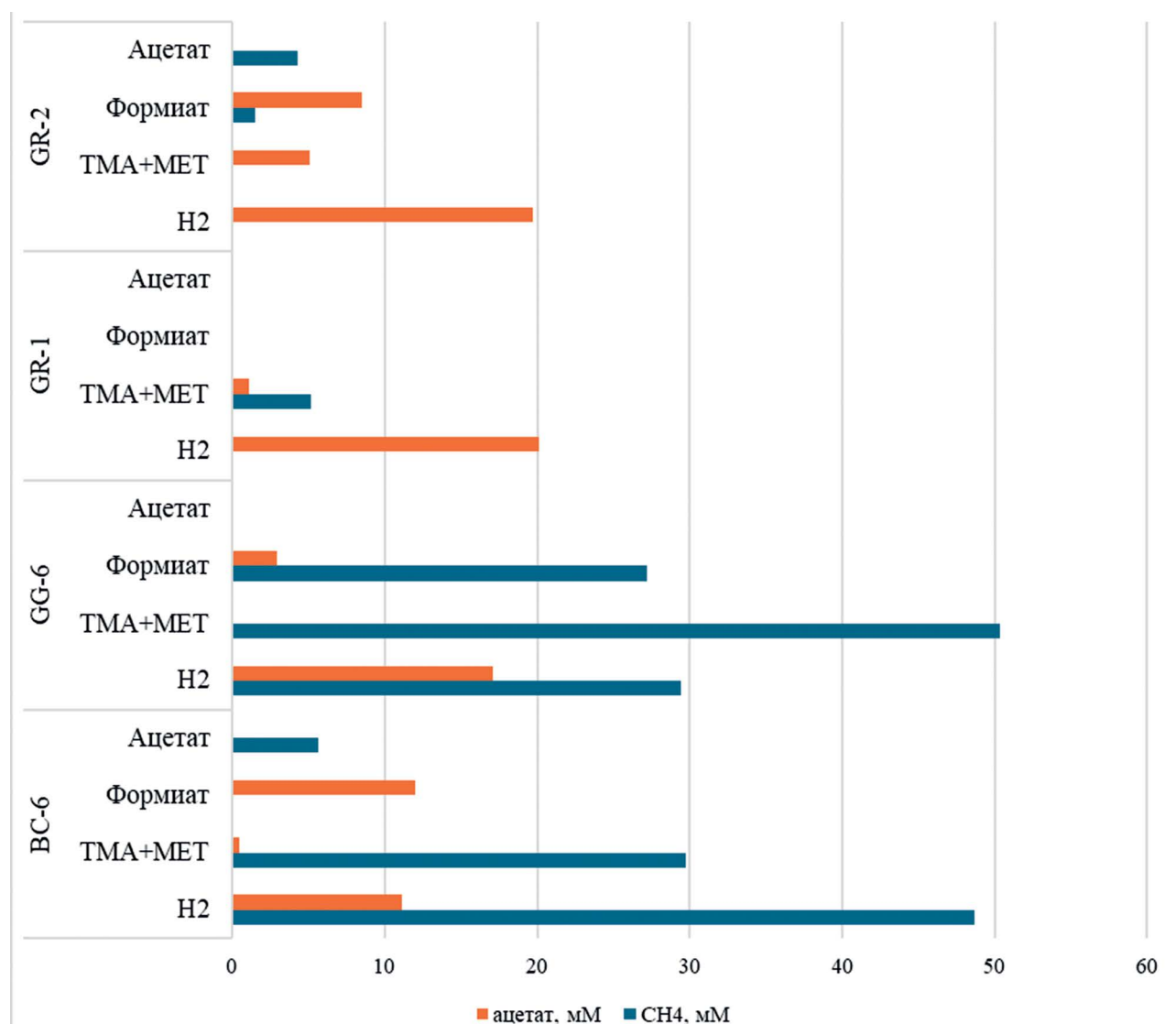


Рис. 1. Сравнение процессов метаногенеза (синие столбцы) и ацетогенеза (желтые столбцы) на разных субстратах метаногенеза в пробах озера Байкал над газогидратами (GR-1, GR-2) и зоны нефтепроявления (BC-6, GG-6).

Морфология. Клетки штамма Z-7115^T кокковидные, неподвижные, размером 0.2–3.0 мкм, объединены в сарциноподобные пакеты и их небольшие агрегаты-конгломераты размером 6–9 мкм, описанные ранее для метаносарцин (Жилина, 1976) как морфотип 2 (рис. 2а).

Варьирование в размере клеток определяется характерным способом деления метаносарцин – неравномерным и не всегда синхронным, с образованием клеточных сферических сегментов, видимых на срезах (Жилина, 1971) (рис. 2б). Они объединены капсулярным, не плотным для электронов слоем полисахаридной природы (рис. 2б). Цитоплазма содержит множество рибосом и нитей ДНК. В ней присутствуют скопления мелких хаотически ориентированных (иногда в виде цепочек)

гетерогенных электронно-плотных включений, подобных наблюдаемым ранее у *M. vacuolata* и определенных как гликоген (Жилина, 1971).

Рост и метаболические свойства. Штамм Z-7115^T – строгий анаэроб, развивающийся только в присутствии восстановителей, таких как сульфид или тиогликолат натрия. Штамм Z-7115^T использовал в качестве источника энергии только метанол, моно- ди-, триметиламины и ацетат. На ацетате рост слабый, медленный и не всегда воспроизводимый, хотя в случаях позитивного роста было установлено его потребление, сопровождающееся образованием метана. Рост и метаногенез отсутствовали на смеси H₂/CO₂ и формиате. Водород не потреблялся и в сочетании с метанолом, но и не угнетал рост и метаногенез на этом субстрате. Пируват,

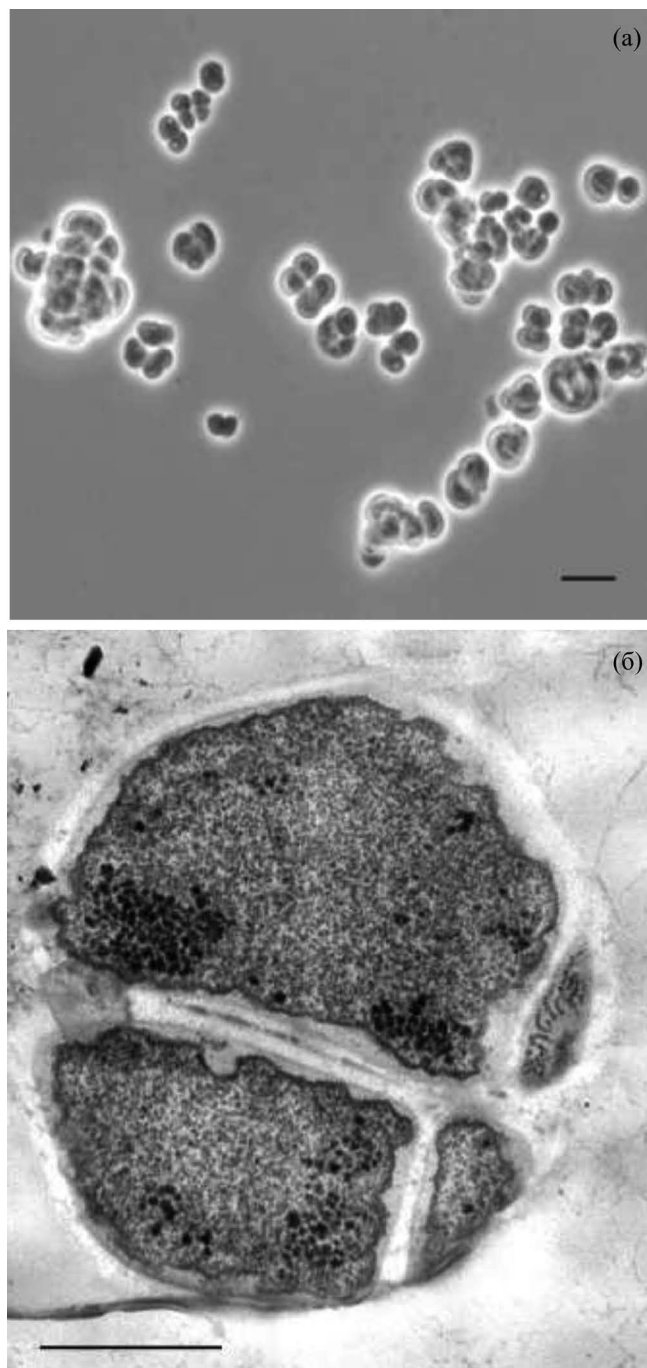


Рис. 2. Морфология клеток штамма Z-7115^T: а — световой микроскоп, фазовый контраст, масштабная метка — 5 мкм; б — электронный микроскоп, масштабная метка — 1 мкм.

н-пропанол, изопропанол, н-бутанол не использовались для роста и метаногенеза. Штамм Z-7115^T не нуждался в органических добавках. Небольшое количество дрожжевого экстракта в среде (50 мг/л) могло быть заменено раствором витаминов или

ацетатом натрия (2 мМ). Штамм Z-7115^T не нуждался в NaCl и был толерантен к его присутствию в среде без ухудшения роста до концентрации 0.05 М NaCl. Падение урожая клеток и метаногенеза в два раза наблюдалось при концентрации NaCl 0.1 М, в три раза — при 0.2 М NaCl по сравнению с контролем, где NaCl отсутствовал, и полным ингибированием при NaCl 0.3 М и выше. Штамм Z-7115^T — нейтрофил с областью роста при значениях pH 6.3–7.5 и оптимумом при pH 7.3 (дополнительные материалы, рис. S1a). Выше pH 7.7 и ниже pH 6.0 рост отсутствовал. По отношению к температуре культуру можно характеризовать как мезофильную, с областью развития при температуре 15–35°C и оптимумом роста при 25°C (рис. S1б).

Филогенетическое положение. Филогенетический анализ полной последовательности гена 16S рРНК штамма Z-7115^T показал, что изолят представляет собой хорошо обособленную отдельную ветвь внутри рода *Methanosarcina* (рис. 3а), а его ближайшим валидно описанным родственником является штамм *M. sicilae* T4/M^T (Ni et al., 1994) с уровнем сходства по гену 16S рРНК 98.51%.

Виртуальная оценка гибридизации геномов этих двух штаммов составила 23.3%, а вероятность того, что гибридизация даст значение больше 70%, составила 0%. Филогенетический анализ на основе 53 консервативных однокопийных маркерных генов (Chaumeil et al., 2022) показал результат, схожий с результатом анализа гена 16S рРНК, но с более высокой статистической достоверностью (рис. 3б). ANI между геномами штамма Z-7115^T и типовыми штаммами видов рода *Methanosarcina* составило 83.2–85.7% (рис. 4).

Общие характеристики генома. Полученный геном штамма Z-7115^T состоял из 157 контигов с общей длиной 3742969 п.о., N50 = 48212. Полнота сборки составила 99.84%; уровень вероятной контаминации сборки — 0.327%. Содержание Г + Ц геномной ДНК составило 40.76%. Геном содержал 3302 генов, из которых 3151 кодирующий белок ген и 63 кодирующих РНК генов, 59 из которых кодируют тРНК. В геноме содержатся по одной копии генов 16S и 23S рРНК.

Гены, связанные с метаногенезом. В геноме штамма Z-7115^T присутствовали все основные гены белков гидрогенотрофного/метилотрофного метаногенного пути (формилметанофуран дегидрогеназа, *fwd*; формилметанофуран-тетрагидрометанооптерин N-формилтрансфераза, *flr*; метенилтетрагидрометанооптерин циклогидролаза, *mch*; метилентетрагидрометанооптерин дегидрогеназа, *mtd*; 5,10-метилентетрагидрометанооптерин редуктаза, *mer*; коэнзим F420-гидрогеназа, *frh*; тетрагидрометанооптерин S-метилтрансфераза, *mtr*; метил-коэнзим M редуктаза, *mcr*; гетеродисульфид редуктаза, *hdr*(ABCDE)).

В геноме отсутствуют гены F₄₂₀-восстанавливающей формилатдегидрогеназы *fdh*, что не позволяет штамму использовать в качестве субстрата

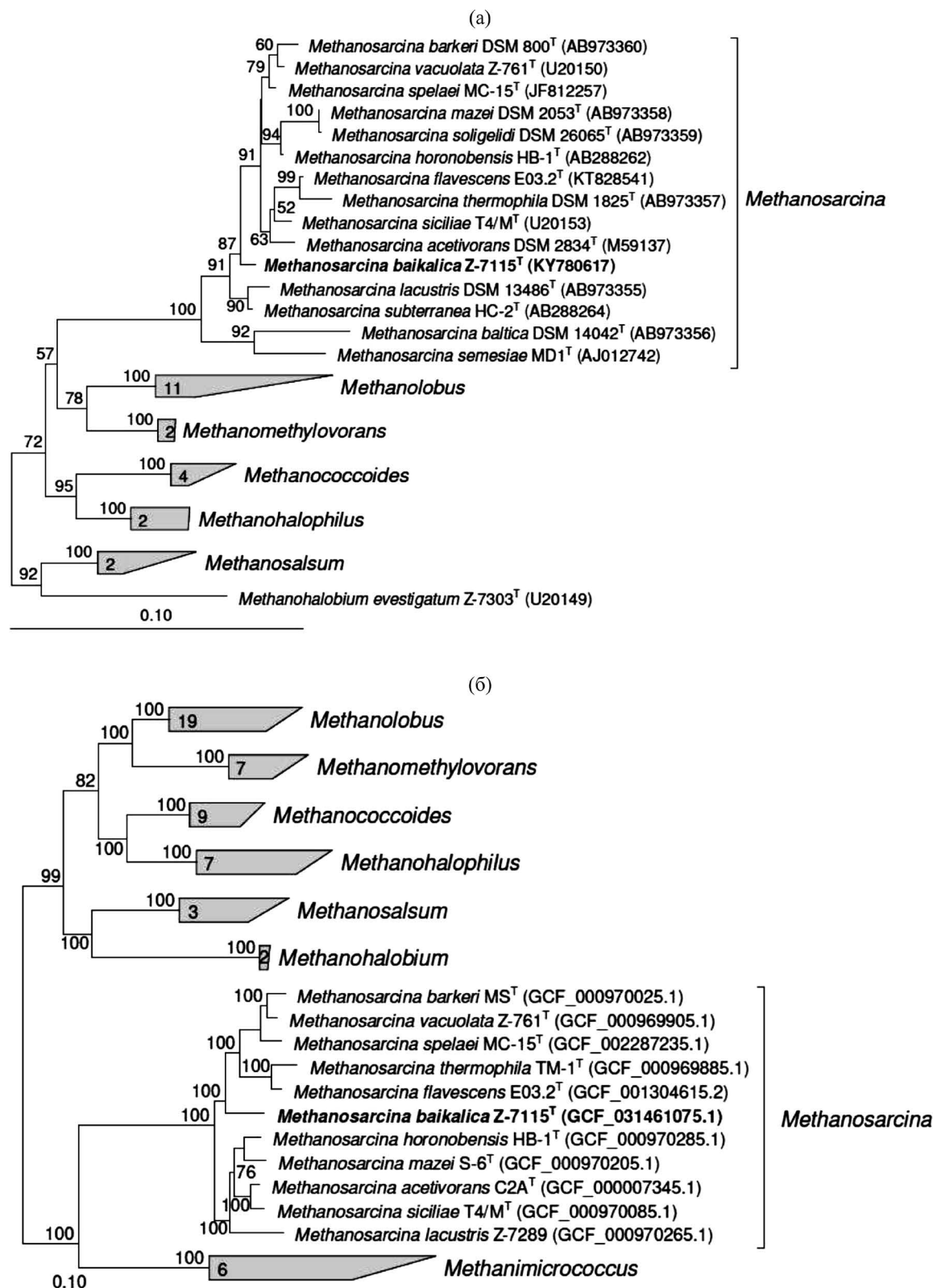


Рис. 3. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рРНК (а) и на 53 консервативных однокопийных маркерных генах (б) (Chaumeil et al., 2022). Дерево было реконструировано методом maximum-likelihood с помощью ПО IQ-TREE 2.2.0.3 (Minh et al., 2020). Значения бутстрепа выше показаны в узлах. Масштабная метка — 0.1 замен на нуклеотидное положение.

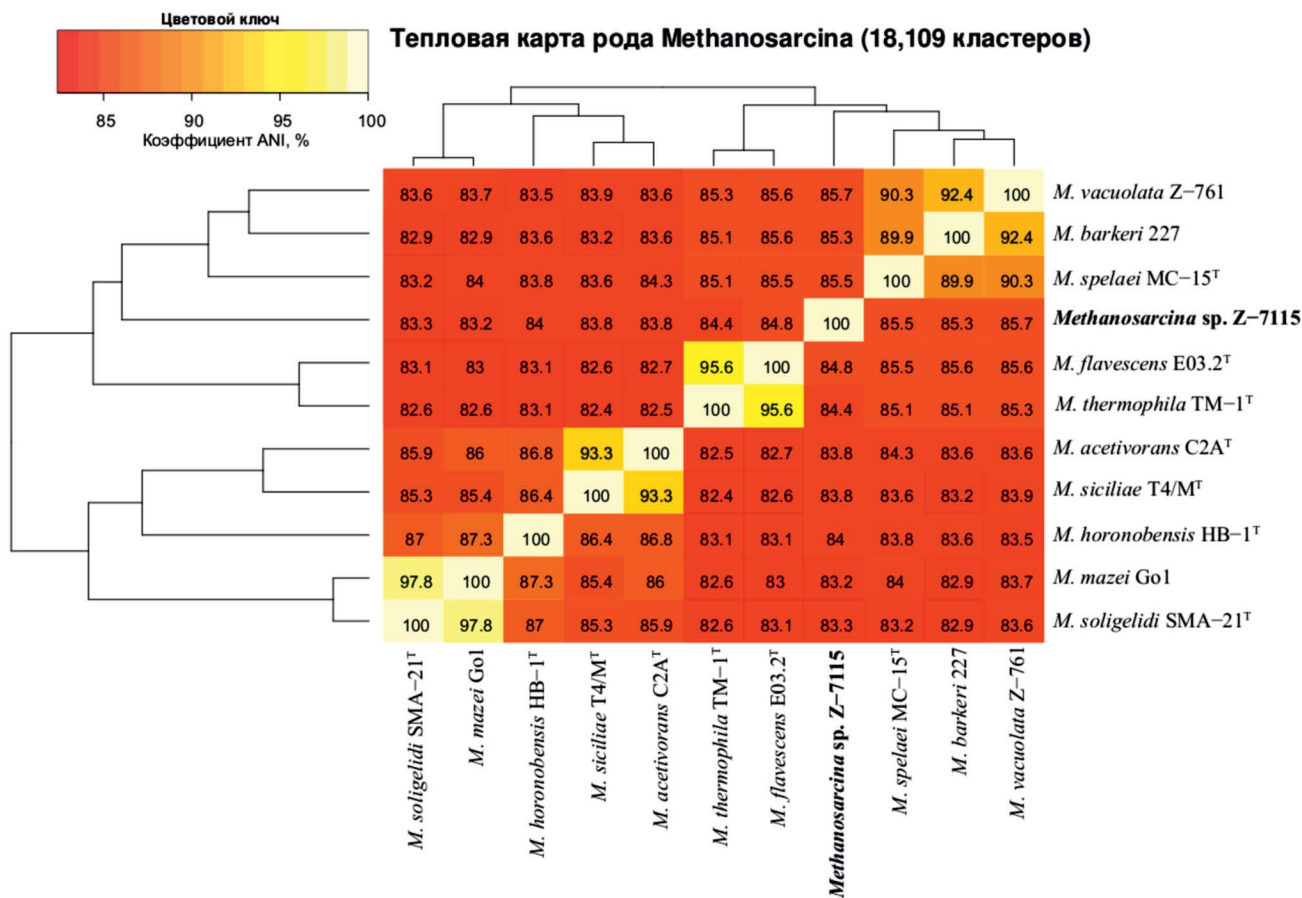


Рис. 4. Упорядоченная тепловая карта, построенная по матрице распределения коэффициентов ANI между геномами рода *Methanosarcina*.

формат. Присутствуют все гены для использования в качестве субстрата метанола (mtaABC), но часть генов для роста на моно-, ди- и триметиламинe либо имеет нарушенную рамку считывания (mttB, mtbB), либо отсутствует (mtmB). У штамма Z-7115^T обнаружены все гены комплекса ACDS (cdhA₁A₂A₃B₁B₂C₁C₂E₁E₂) для восстановительного пути Вуда–Льюнгдала и гены ферментов активации ацетата, универсальные для рода *Methanosarcina*: ацетаткиназы (ackA) и фосфоацетилтрансферазы (pta). Отсутствуют гены ацетил-КоА синтетазы (АДФ-зависимой, EC 6.2.1.1.3) acdA и acdB, что в целом необычно, поскольку этот фермент присутствует у большей части исследованных типовых штаммов рода, как использующих ацетат в качестве катаболического субстрата (*M. acetivorans* C2A^T (GCA_000007345.1), *M. horonobensis* HB-1^T (GCA_000970285.1), *M. thermophila* TM-1^T (GCA_000969885.1), *M. vacuolata* Z-761^T (GCA_000969905.1), *M. soligelidi* SMA-21^T (GCA_000744315.1), *M. flavescens* E03.2^T (GCA_001304615.2)), так и неспособных его использовать (*M. siciliae* T4/M^T (GCA_000970085.1)).

Ген acdA отсутствовал также у штамма *M. spelaei* MC-15^T (GCA_002287235.1), который мог использовать ацетат для роста. У штамма Z-7115^T обнаружены основные дегидрогеназы, связанные с генерацией трансмембранного потенциала и использованием молекулярного водорода у цитохром-содержащих метаногенов: frhABDГ, vhtACDГ, fpoABCDEFGHIJK, hdrDE, а также echABCDEF, которую в некоторых работах связывают со способностью метаносарцин к потреблению ацетата как единственного субстрата (Kulkarni et al., 2018). Дегидрогеназы rnfABCDEFГ и ионный транспортер mtrABCDEFGHIГ, необходимые для роста на ацетате, в частности, *M. acetivorans* C2A^T (Ferry, 2020), у исследуемого штамма не обнаружены.

ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм Z-7115^T по типу обмена является строго анаэробным хемоорганотрофом. Диапазон предпочтительно используемых им субстратов

характеризует его, прежде всего, как метилотрофного метаногена. Лучшим из метилированных субстратов для роста является метанол, и все гены, необходимые для его использования, у организма присутствуют. Несмотря на то, что часть генов для роста на моно-, ди- и триметиламинах имеет нарушенную рамку считывания (*mttB*, *mtbB*), либо отсутствует (*mtmB*), штамм Z-7115^T стабильно растет на всех трех метиламинах с предпочтением ТМА.

Организм не способен к использованию формата, и в геноме отсутствуют соответствующие этой возможности гены. В геноме обнаружены основные дегидрогеназы, связанные с генерацией трансмембранного потенциала и использованием молекулярного водорода. Таким образом, штамм теоретически способен использовать водород как донор электронов, однако есть неопределенные причины, мешающие ему реализовать эту возможность, и с CO₂, как акцептором, и при метилредуцирующем метаногенезе на метаноле. Несмотря на имеющиеся гены белков восстановительного пути Вуда–Льюнгдала и гены ферментов активации ацетата, универсальные для рода *Methanosarcina*, ацетат используется штаммом Z-7115^T крайне слабо, и рост на нем нестабилен. Потенциально имеющиеся в геноме возможности для осуществления в анаэробном сообществе метаногенеза тремя известными путями, по сути, ограничены для исследуемого штамма метилотрофным путем.

Наиболее вероятным для него субстратом в анаэробном сообществе донных отложений оз. Байкал может быть метанол, образуемый в пресноводных водоемах при разложении пектина и лигноцеллюлозы клеточных стенок водорослей. Метиламины — специфичные субстраты метаногенеза для гиперсоленых мест обитания. Их появление обусловлено деградацией осмопротектора бетаина, и специализированные на использовании исключительно метиламинов экстремально галофильные метаногены были открыты вместе с ацетогеном, способным разлагать бетаин с образованием метиламинов (Zhilina, Zavarzin, 1990). В оз. Байкал детектированное присутствие метиламинов в верхних слоях осадков зон разгрузок, откуда был выделен штамм, объясняется их миграцией из глубинных осадков, что согласуется с изотопным составом растворенного биогенного метана, характерным для его образования преимущественно восстановлением метильных групп (Земская и соавт., 2021). Помимо способных к использованию метилированных соединений представителей семейства *Methanosarcinaceae* в оз. Байкал выявлены метил-редуцирующие археи порядка *Methanomassiliicoccales*, семейств *Methanomethyliaceae* и *Methanofastidiosaceae*, что дополнительно подтверждает возможность образования биогенного метана в донных осадках путем использования метилированных соединений, в том

числе метиламинов (Земская и соавт., 2021). Выделение нами чистой культуры метаногенной археи, использующей метанол и метиламины для метаногенеза, микробиологически обосновывает сделанные ранее предположения.

По своим физиологическим характеристикам (зависимости роста от pH, температуры, минерализации среды) штамм Z-7115^T соответствует занимаемой им экологической нише (таблица). Воды оз. Байкал классифицируются как гидрокарбонатные и отличаются низкой минерализацией. Общая минерализация поровых вод донных отложений выше водной толщи и достигает 120–400 мг/л (Намсараев, Земская, 2000). Штамм Z-7115^T может развиваться при такой низкой минерализации, поскольку способен расти на среде Пфеннига, разведенной в 2–3 раза, с общей минерализацией 500 мг/л. Не нуждаясь в хлориде натрия, новый изолят толерантен лишь к его крайне низким концентрациям <0.1 М, с полным ингибированием роста и метаногенеза уже при 0.3 М NaCl. Диапазон pH для роста штамма лежит в границах, установленных для донных отложений оз. Байкал (pH 6.7–8.0) (Намсараев, Земская, 2000). Температурный оптимум роста выделенного штамма (25°C) значительно ниже характерного для большинства мезофильных штаммов и сопоставим с таковым у психротолерантного вида *Methanosarcina lacustris* (Simankova et al., 2001). В тоже время новый изолят не рос при 10°C и ниже, и его нельзя отнести к психротолерантным видам.

Приведенное в таблице фенотипическое сравнение штамма Z-7115^T с филогенетически близкими видами рода *Methanosarcina* показывает, что толерантность к NaCl можно считать важным отличительным признаком в этой группе метаносарцин. Штамм Z-7115^T наиболее чувствителен к повышению солености и требует низкой минерализации среды, что отличает его от других пресноводных метаносарцин и филогенетически близким с ним морских видов — *M. sicilae* (Ni, Boone, 1991; Ni et al., 1994), *M. subterranea* (Shimizu et al., 2015) и *M. acetivorans* (Sowers et al., 1984; Ni et al., 1994). Близкие к штамму виды различаются также размерами и степенью агрегации клеток, составом клеточных стенок, что определяется действием на них детергентов, границами и оптимумом температуры роста, а также способностью использовать водород и/или ацетат (таблица). Штамм Z-7115^T способен использовать ацетат, имеет, как и другие пресноводные метаносарцины, полисахаридную, а не белковую клеточную стенку, иные границы и оптимум температуры роста, иное место обитания, что отличает его от близкородственного вида *M. sicilae* T4/M^T.

На основании совокупности морфофизиологических свойств и филогенетических данных можно утверждать, что выделенный метаноген представляет новый вид рода *Methanosarcina*, для которого

Таблица. Сравнительные признаки нового изолята с типовыми штаммами ближайших видов рода *Methanosarcina*

Свойства	Z-7115 [†]	<i>M. siciliae</i> T4/M ^{1,2}	<i>M. subterranea</i> HC-2 ³	<i>M. acetivorans</i> C2A ⁴	<i>M. vacuolata</i> Z-761 ^{5,6}	<i>M. lacustris</i> ZS ⁷	<i>M. barkeri</i> MS ^{8,6}
Клетки, мкм	0.2–3	0.5–3.0	0.9–1.4	1.9	1–2	1.5–3.5	1.5–2.0
Рост в жидкой среде	Морфотип 2	Морфотип 3, 2	Морфотип 3, 2	Морфотип 3 и цисты	Морфотип 2	Морфотип 1	Морфотип 2
Окраска по Грамму	Нд	–	–	–	+	+	+
Лизис 0.01% (w/v) SDS	–	+	+	+	–	Нд	–
Температура роста (°C): диапазон оптимум	15–35 25	25–45 40	10–40 35	15–42 35–40	18–45 37–40	1–35 25	20–45 40–42
pH роста: диапазон оптимум	6.5–7.5 7.3	6.0–7.7 6.5–6.8	5.9–7.4 6.6–6.8	5.0–7.0 6.0	6.0–8.0 7.5	4.5–8.5 7.0	5.0–8.0 6.0–7.0
Влияние NaCl (M): диапазон оптимум	0–0.2 0–<0.1	0–>1.7 0.4–0.6	0–0.6 0.1–0.2	0.1–1.0 0.1–0.6	0.1–0.5 0.1–0.125	Нд Нд	0.1–0.8 0.1–0.125
Субстраты: H ₂ /CO ₂ Метанол Триметиламин Диметиламин Монометиламин Диметилсульфид Ацетат	– + + + + – +/-	– + + Нд Нд + –	– + + + + + –	– + + + + + +	– + + Нд + Нд +	– + + + + – –	– + + Нд Нд Нд +
Стимуляция роста дрожжевым экстрактом	–	+	+	–	+	+	+
Г + Ц, мол. %	40.76 (геном)	41.5 (Т _m)	41.5 (геном)	41 ± 1 (Т _m)	51 ± 0.5 (Т _m)	43.4 (Т _m)	38.8–43.5
Источник выделения	Пресные донные осадки оз. Байкал, Россия	Морские осадки	Из глубоких недр в формации диатомовых сланцев Хоронобе, Япония	Морские осадки Scripps Canjon, La Jolla, California	Сброженный ил метантенк	Пресные озерные осадки, Швейцария	Сточные воды

Обозначения: “–” – нет роста; “+/-” – слабый, нестабильный; Нд – нет данных; Т_m – температура плавления. Морфотипы (Жилина, 1976): морфотип 1 – большие не разделяемые агрегаты псевдосарцин – зерна (псевдопаренхима); морфотип 2 – кокковидные клетки по 2–4 в пакетах (псевдосарцина) и небольшие агрегаты их; морфотип 3 – отдельные кокковидные клетки. Ссылки на источники: 1 – Ni & Boone, 1991; 2 – Ni et al., 1994; 3 – Shimizu et al., 2015; 4 – Sowers et al., 1984; 5 – Zhilina & Zavarzin, 1987; 6 – Maestrojuan & Boone, 1991; 7 – Simankova et al., 2001; 8 – Bryant & Boone, 1987.

мы предлагаем название *Methanosarcina baikalica* sp. nov. с типовым штаммом Z-7115^T.

Описание *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

Methanosarcina baikalica (bai' ka.li.ca. L.n. baikalicum, the Baikal lake. N.L. fem.adj. по названию озера Байкал, из которого организм был выделен).

Клетки неподвижные, кокковидные, диаметром 0.2–3.0 мкм, в парах, тетрадах или небольших сарциноподобных агрегатах. В жидкой среде растет в виде легко диспергируемого желтоватого осадка. Строгий анаэроб. Субстратами для роста и метаногенеза служат метанол, моно-, ди-, триметиламины и ацетат. Не использует смеси $H_2 + CO_2$, $H_2 +$ метанол, формиат, пируват, н-пропанол, изопропанол, н-бутанол и диметилсульфид. Ацетат (0.2 г/л) требуется для роста в качестве источника углерода. Дрожжевой экстракт не стимулирует рост и может быть заменен раствором витаминов. Мезофил с областью роста при 15–35°C (оптимум 25°C); нейтрофил, растет при значениях pH 6.3–7.5 (оптимум pH 7.3). Развитие возможно в среде с низкой минерализацией (Σ 500 мг/л). Не нуждается в NaCl и толерантен к низким его концентрациям <0.1 М с ингибированием роста и метаногенеза при 0.3 М NaCl. Содержание Г + Ц в геноме типового штамма 40.76 мол. %.

Место обитания – донные осадки пресноводных водоемов. Типовой штамм Z-7115^T (=JCM 39438, =VKM B-3565) выделен из поверхностного слоя донных осадков озера Байкал (Восточная Сибирь, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания № 122041100029-2 ФИЦ Биотехнологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Букин С.В., Павлова О.Н., Калмычков Г.В., Иванов В.Г.,
Погодаева Т.В., Галачьянц Ю.П., Букин Ю.С.,

Хабуев А.В., Земская Т.И. Субстратная специфичность метаногенных сообществ из донных отложений оз. Байкал, ассоциированных с разгрузками углеводородных газов // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 409–420.

Bukin S.V., Pavlova O.N., Kalmychikov G.V., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Galachyants Yu.P., Bukin Yu.S., Khabuyev A.V., Zemskaya T.I. Substrate specificity of methanogenic communities from Lake Baikal bottom sediments associated with hydrocarbon gas discharge // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 549–558.

<https://doi.org/10.1134/S0026261718040045>

Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Козырева Л.П., Земская Т.И., Дулов Л.Е. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал // Микробиология. 2004. Т. 74. С. 248–257.

Dagurova O.P., Namsaraev B.B., Kozyreva L.P., Zemskaya T.I., Dulov L.E. Bacterial processes of the methane cycle in bottom sediments of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 202–210.

<https://doi.org/10.1023/B:MIC1.0000023990.71983.c1>

Жилина Т.Н. Тонкое строение метаносарцины // Микробиология. 1971. Т. 50. С. 674–679.

Жилина Т.Н. Биотипы метаносарцины // Микробиология. 1976. Т. 55. С. 481–489.

Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В., Пименов Н.В. Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал // Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса / Под ред. Решетиловой Т.А. М.: ООО “ИД “Вода: химия и экология”, 2017. С. 44–45.

Земская Т.И., Букин С.В., Ломакина А.В., Павлова О.Н. Микроорганизмы донных отложений Байкала – самого глубокого и древнего озера мира // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 286–303.

Zemskaya T.I., Bukin S.V., Lomakina A.V., Pavlova O.N. Microorganisms of bottom sediments of Lake Baikal – the deepest and oldest lake in the world // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 298–313.

<https://doi.org/10.1134/S002626172103014>

Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Морозов И.В., Земская Т.И. Микробные сообщества зоны разгрузки газонефте содержащих флюидов ультрапресного озера Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 355–365.

Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Zemskaya T.I. Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2014. Vol. 83, No. 3, pp. 355–365.

<https://doi.org/10.1134/S0026261714030126>

Намсараев Б.Б., Земская Т.И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал // Новосибирск: Гео, 2000. 160 с.

Павлова О.Н., Букин С.В., Ломакина А.В., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Морозов И.В., Погодаева Т.В.,

- Пименов Н.В., Земская Т.И. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 694–702.
- Pavlova O.N., Bukin S.V., Lomakina A.V., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Morozov I.V., Pogodaeva T.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I. Production of gaseous hydrocarbons by microbial communities of Lake Baikal bottom sediments // Microbiology (Moscow). 2015. V. 83. P. 694–702.
<https://doi.org/10.1134/S0026261714060137>
- Пименов Н.В., Захарова Е.Е., Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Земская Т.И. Активность и структура сообщества сульфатредуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 180–190.
- Pimenov N.V., Zakharova E.E., Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kuznetsov B.B., Turova T.P., Pogodaeva T.V., Kalmychkov G.V., Zemskaya T.I. Activity and structure of the sulfate-reducing bacterial community in the sediments of the southern part of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 47–55.
<https://doi.org/10.1134/S0026261714020167>
- Черницына С.М., Мамаева Е.В., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Галачянц Ю.П., Букин С.В., Пименов Н.В., Хлыстов О.М., Земская Т.И. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ в донных отложениях Посольской банки, оз. Байкал // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 652–662.
- Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Galachyants Yu.P., Bukin S.V., Pimenov N.V., Khlystov O.M., Zemskaya T.I. Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk Bank bottom sediments, Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 672–680.
<https://doi.org/10.1134/S0026261716060060>
- Шубенкова О.В., Земская Т.И., Черницына С.М., Хлыстов О.М., Трибой Т.И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 370–377.
- Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Chernitsyna S.M., Khlystov O.M., Tribay T.I. The first results of an investigation into the phylogenetic diversity of microorganisms in Southern Baikal sediments in the region of subsurface discharge of methane hydrates // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 314–320.
<https://doi.org/10.1007/s11021-005-0069-9>
- Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. (D1). P. D37–D42.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1070>
- Bryant M.P., Boone D.R. Emended description of strain MST (DSM 800T), the type strain of *Methanosarcina barkeri* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 169–170.
- Bukin S.V., Pavlova O.N., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Zemskaya T.I. Methylophilic methanogens in bottom sediments of lake Baikal // Limnol. Freshwater Biol. 2020. V. 4. С. 973–975.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database // Bioinformatics (Oxford, England). 2022. V. 38. P. 5315–5316.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac672>
- Contreras-Moreira B., Vinuesa P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 7696–7701.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>
- Ferry J.G. *Methanosarcina acetivorans*: a model for mechanistic understanding of acetoclastic and reverse methanogenesis // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1806.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01806>
- Kadnikov V.V., Mardanov A., Beletsky A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.N., Zemskaya T.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 79. P. 348–358.
- Kulkarni G., Mand T.D., Metcalf W.W. Energy conservation via hydrogen cycling in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* // Mbio. 2018. V. 9 (4).
<https://doi.org/10.1128/mbio.01256-18>
- Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Galachyants Y.P. et al. Diversity of *Archaea* in bottom sediments of the discharge areas with oil- and gas-bearing fluids in Lake Baikal // Geomicrobiol. J. 2018. V. 35. P. 50–63.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1315195>
- Maestrojuan G.M., Boone D.R. Characterization of *Methanosarcina barkeri* MS^T and 227, *Methanosarcina mazei* S-6^T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761^T // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 41. P. 267–274.
- Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J., Peinado-Olarte R.L., Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes // Nucleic Acid Res. 2022. V. 50. P. D801–D807.
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. 2020. IQ-TREE2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era // Mol. Biol. Evol. V. 37. P. 1530–1534.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Ni S., Boone D.R. Isolation and characterization of a dimethylsulfide-degrading methanogen, *Methanobacillus siciliae* H1350, from an oil well, characterization of *M. siciliae* T4/MT, endemendation of *M. siciliae* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 41. Art. 410416.
- Ni S., Woese C.R., Aldrich H.C., Boone D.R. Transfer of *Methanobacillus siciliae* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina siciliae*, and emendation of the genus *Methanosarcina* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 357–359.
<https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-357>

- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 1043–1055.
<https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Shimizu S., Ueno A., Naganuma T., Kaneko K. *Methanosarcina subterranea* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface diatomaceous shale formation // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 1167–1171.
- Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V., Zehnder A.J.B., Nozhevnikova A.N. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments // *Syst. Appl. Microbiol.* 2001. V. 24. P. 362–367.
- Sowers K.R., Baron S.F., Ferry J.G. *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 47. P. 971–978.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- 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. Art. e1005595.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. *Methanosarcina vacuolata* sp. nov., a vacuolated methanosarcina // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987. V. 37. P. 281–283.
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 1990. V. 87. P. 315–322.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Methanosarcina baikalica sp. nov., a New Methanogenic Archaea Isolated from Surface Bottom Sediments of Lake Baikal

T. N. Zhilina^{1, *}, A. Yu. Merkel¹, T. V. Kolganova², V. E. Trubitsyn^{3, *},
V. A. Shcherbakova³, N. E. Suzina³, N. V. Pimenov¹

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

²Skryabin Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

³Pushchino Research Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com; Zhilinat@mail.ru

A new methane-forming archaeon strain Z-7115^T was isolated from the bottom sediments of the freshwater Lake Baikal (Eastern Siberia, Russia). Morphologically, the strain is represented by non-motile coccoid cells 0.5–3 µm in size, collected in packets of 2–4 and their small aggregates. The strain uses methanol, mono-, di-, trimethylamine and acetate as energy substrates for methanogenesis. The cells grow at a temperature of 15–35°C (optimum 25°C), pH 6.3–7.5 (optimum pH 7.3) and are tolerant to NaCl concentrations < 0.1 M. The G + C content of genomic DNA is 40.76 mol. %. According to the 16S rRNA gene analysis, the new isolate belongs to the genus *Methanosarcina*, having a similarity level of 98.51% with the closest species of this genus *M. sicilae* T4/M^T. The average nucleotide similarity (ANI) between the genomes of strains Z-7115^T and *M. sicilae* T4/M^T was 83.8%. The virtual assessment of the hybridization of the genomes of these two strains was 23.3%. Based on the data of phylogenetic analysis and morpho-physiological properties, it is proposed to classify the isolated strain Z-7115^T (=JCM 39438, =VKM B-3565) as a new species *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

Keywords: *Methanosarcina baikalica* sp. nov., archaea, methanogens, Baikal, sediments of fresh lakes