

## МИКРООРГАНИЗМЫ ЦИКЛА МЕТАНА В ЕСТЕСТВЕННЫХ ТОРФЯНЫХ ПОЧВАХ И ГИДРОЛОГИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТАХ ОСУШЕННЫХ ТОРФЯНИКОВ

© 2011 А.К. Кизилова<sup>1</sup>, А.А. Сирин<sup>2</sup>, И.К. Кравченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Институт лесоведения РАН, г. Москва

Поступила в редакцию 20.05.2011

Почвы болот и заболоченных земель – важный источник и сток углеродсодержащих парниковых газов, поток которых существенно меняется в зависимости, в том числе и от их трансформации при хозяйственном использовании. Антропогенное воздействие на торфяные болота нарушает баланс процессов поглощения и эмиссии парниковых газов, что может быть причиной аномально высокого выделения метана из гидрологических элементов искусственной дренажной сети. Для идентификации механизмов регуляции этих процессов проведена оценка разнообразия метанотрофных бактерий и метаногенных архей в торфяной почве естественного болота и дренажных канавах методами молекулярной экологии (ПЦР, ДГГЭ рибосомальных и функциональных генов). Установлено, что в почве естественного болота и минеральной почве ближайшего леса доминируют метанотрофы II типа (*Alphaproteobacteria*), в то время как в дренажной канаве обнаружены исключительно метанотрофы I типа (*Gammaproteobacteria*). В верхнем биогеохимически активном слое естественного болота метаногены обнаружены не были, а в дренажной канаве выявлены разнообразные представители *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* и *Methanobacteriales*. Полученные данные свидетельствуют о кардинальных изменениях микробных сообществ цикла метана в гидрологических элементах осушенных торфяниках и могут быть использованы в мониторинговых исследованиях антропогенного воздействия на болотные экосистемы.

Ключевые слова: осушенные торфяники, цикл метана, метанотрофы, метаногены

Торфяные почвы болот играют значительную роль в формировании глобального потепления как потенциальные источники метана, важнейшего парникового газа. В торфяниках законсервировано большое количество органического вещества, которое при вмешательстве человека и осушении болот для их последующего сельскохозяйственного использования разлагается с выделением диоксида углерода и метана [1]. Вклад метана в парниковый эффект на нашей планете составляет 30% от вклада диоксида углерода, при этом метан примерно в 20 раз более активен [2]. В России болотами занято более 10% территории, включающих в себя около 5 млн. га мелиорированных для сельского хозяйства избыточно увлажненных земель, большей частью представленных торфяными почвами [3], поэтому изучение микробных сообществ, отвечающих за образование и поглощение метана чрезвычайно важно. До настоящего времени сведения о разнообразии микроорганизмов, участвующих в биологическом цикле метана в естественных торфяниках и созданных человеком гидрологических элементах болот крайне ограничены.

**Цель исследования:** оценка изменений в составе сообществ метанотрофных бактерий и метаногенных архей при антропогенном воздействии

Кизилова Анна Константиновна, кандидат биологических наук, научный сотрудник. E-mail: alegrria@gmail.com

Сирин Андрей Артурович, доктор биологических наук, директор. E-mail: sirin@proc.ru

Кравченко Ирина Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: irinakravchenko@inbox.ru

на торфяные почвы за счет проведения осушительной мелиорации.

### Материалы и методы.

**Образцы почв.** Образцы торфяных почв для исследования были отобраны в октябре 2010 г. в Дубненском болотном массиве Талдомского района Московской области (56°42' с.ш. 37°50' в.д.), который был частично осушен в 1979 г. для добычи торфа и сельскохозяйственного использования. Исследования разнообразия метанооксиляющих и метаногенных микроорганизмов проводили в горизонтах 0-10 см торфяной почвы естественного болота и в минеральной почве соседнего леса, а также в донных отложениях и воде дренажной канавы.

**Выделение ДНК.** Выделение ДНК из исследуемых торфяных почв проводили с помощью коммерческого набора реактивов PowerSoil DNA Kit (MO BIO, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Аmplификация генов *ptoA* бактерий.** Препараты ДНК, выделенные из торфяных почв, были использованы в качестве матрицы для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации с помощью системы вырожденных праймеров A189F –A682R [4] фрагмента гена *ptoA*. Этот ген кодирует синтез β-субъединицы метанмонооксигеназы (ММО), ключевого фермента метанокисления. Амплификацию проводили на приборе MyCycler (BioRad, США). Для эффективного последующего разделения смеси полученных продуктов с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) мы использовали так называемую «вложенную» (nested) ПЦР, при которой в качестве матрицы использовали ПЦР-

продукт, полученный при первичной амплификации. Второй раунд ПЦР проводили с праймерами mb661R и A189F-GC, к последнему был прикреплен GC-кламп для обеспечения разделения смеси ампликонов в полиакриламидном геле [5].

**Амплификация генов *mcrA* и 16S рРНК архей.** Для изучения состава архейных сообществ была выбрана система праймеров 344F-915R, разработанная в 2000 г. [6], которая позволяет амплифицировать фрагмент гена 16S РНК архей длиной около 570 пар нуклеотидов. Для оценки разнообразия метаногенных архей был применен анализ фрагмента гена *mcrA*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу метил-коэнзим М редуктазы, предложенной в качестве маркера на метаногенов [7]. Этот фермент катализирует восстановление метильной группы, связанной с коферментом М, с высвобождением метана. Для постановки ПЦР на *mcrA* использовали праймеры и протокол, описанные в работе [7].

**Денатурирующий градиентный гель-электрофорез и секвенирование.** Разделение ампликонов *pmoA* бактерий, *mcrA* и 16S рРНК архей проводили с помощью системы DCode для DGGE (BioRad, США) в 0,5 TAE буфере, нагретом до 60°C в течение 6 часов при 200 V. Использовали полиакриламидный гель с 8% содержанием акриламида и градиентом денатуранта 50-80%, 30-70% и 40-60% соответственно. Окрасивание проводили бромистым этидием, после чего гель отмывали дистиллированной водой и фотографировали с помощью системы Gel Doc (BioRad, США). Выбранные полосы вырезали стерильным скальпелем и элюировали ДНК в стерильной деионизованной воде в течение 24 часов. Воду с ДНК использовали как

матрицу для постановки реамплификации, после чего ПЦР-продукт очищали через агарозный гель и секвенировали в сервисной лаборатории с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3 sequencing kit (Applied Biosystems Inc., United States). Полученные последовательности были проанализированы с помощью программного пакета BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Депонирование последовательностей.** Все нуклеотидные последовательности метаногенных и метанотрофных организмов, полученные в данной работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами JF965494-JF965498 (метаногены) и JF965499-JF965504 (метанотрофы).

### Результаты и обсуждение.

**Состав метанотрофных сообществ.** В торфяной почве естественного болота (peat T5) и минеральной почве леса Дубненского болотного массива (soil T6) преобладали метанотрофы II типа, относящиеся к *Alphaproteobacteria* (рис. 1). Однако полученные последовательности значительно отличались от культивируемых организмов этой группы. Ближе всего к метанооксилюющим бактериям естественного болота оказались некультивируемые организмы, обнаруженные в заболоченном участке финского озера Кеватон [8] и кислых болотах Северной Англии [9]. Также относительно высокую степень сходства к фрагментам последовательностей гена *pmoA* из исследованных образцов продемонстрировал некультивируемый клон *Methylocystis sp.* GSC357, обнаруженный в лесной почве с помощью метагеномного анализа [10].



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, построенное на основе аминокислотных последовательностей фрагментов *pmoA*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Номера базы данных GenBank использованных последовательностей фрагментов генов указаны в скобках. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на 100 аминокислотных остатков. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 100 альтернативных деревьев (значимыми являются значения более 50).

Таким образом, впервые было установлено, что при осушительной мелиорации торфяников кардинально изменяется состав метанотрофных сообществ. В гидрологических элементах (осушительные каналы) происходит вытеснение метанотрофов II типа метанотрофами I типа. Аналогичные

изменения были выявлены нами ранее при анализе лесных и сельскохозяйственных минеральных почв [13], поэтому выявленные закономерности можно рассматривать как индикатор антропогенных нарушений природных экосистем.

**Метаногенные сообщества торфяников.** Метаногенные археи не были обнаружены в верхнем биогеохимически активном слое торфяной почве естественного болота и лесной почвы ни с праймерами, специфичными для 16s RNA архей, ни с праймерами на функциональный ген метаногенов. Возможно, это связано с тем, что в этих почвах

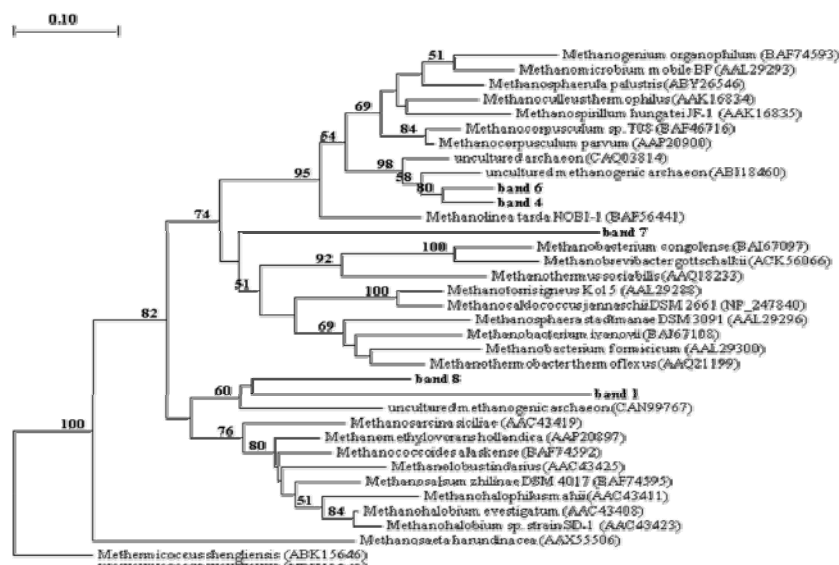
не складываются условия, благоприятные для развития этих организмов, которые являются строгими анаэробами. Другое возможное объяснение – присутствие метаногенов, последовательности 16s RNA и *mcrA* которых не амплифицируются при помощи использованных в данной работе праймеров.

**Таблица 1.** Сиквенс-анализ полос, вырезанных из полиакриламидного геля

Образец	Номер полосы	Ближайший организм, фрагмент 16S RNA	Покрытие / сходство
peat T1	1	Uncultured methanogenic archaeon clone PASLSS0.5m_1 (FJ982666) Uncultured <i>Methanosarcinales</i> archaeon (AB448783)	100/96 100/94
	2	Uncultured <i>Methanosarcinales</i> archaeon (AB448783)	98/88
	3	Uncultured <i>Methanosarcinales</i> archaeon (AB448783)	97/95
	4	Uncultured <i>Methanomicrobia</i> archaeon clone LPBBA93 (FJ902710)	100/91

Напротив, в торфяной почве дренажной канавы было обнаружено значительное разнообразие метаногенных архей. Метаногены были обнаружены как с помощью праймеров, специфически связывающихся 16s RNA архей (табл. 1), так и с  $\alpha$ -субъединицей метил-коэнзим М редуктазы (рис. 2). Метаногенные археи из торфяной почвы дренажной канавы проявили наибольшее сходство с некультивируемыми представителями порядков *Methanosarcinales* и *Methanomicrobiales*, из почвы рисовников Италии [14] и почвы кислого болота.

Данные, полученные после анализа последовательностей 16s RNA, хорошо дополняются анализом функционального гена метаногенов, так как организмы порядка *Methanobacteriales* были обнаружены только при ДПГЭ на *mcrA*. В целом, появление дренажной канавы в естественном болоте привело к развитию широкого спектра метаногенных архей, что, скорее всего, вызвало усиление потока метана из почвы в атмосферу, зафиксированное в полевых исследованиях [15].



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево, построенное на основе аминокислотных последовательностей фрагментов *mcrA*. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в данной работе. В скобках указаны номера GenBank последовательностей, использованных для построения дерева. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на 100 аминокислотных остатков. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 100 альтернативных деревьев (значимыми являются значения более 50)

Антропогенное воздействие на торфяные болота нарушает равновесие процессов, определяющих поглощение и эмиссию метана. Вопрос о причине аномально высокому выделению  $CH_4$  из элементов дренажной сети до настоящего времени остается дискуссионным. Согласно нашей гипотезе основной причиной является изменение в составе метанотрофных и метаногенных сообществ и, как результат, дисбаланс между микробиологическими процессами образования и окисления метана. Проведенные молекулярно-

биологические исследования наглядно продемонстрировали, что в антропогенно нарушенных торфяниках происходят кардинальные перестройки в составе метанотрофных и метаногенных сообществ. Согласно современным представлениям в кислых сфагновых болотах умеренной зоны доминируют метанотрофы II типа (*Methylocystis*, *Methylocella*) и гидрогенотрофные метаногены, относящиеся к семейству *Methanomicrobiales*. Антропогенное воздействие, связанное с изменениями гидрологических условий,

pH, растительности, содержания доступных минеральных соединений углерода и азота приводит к увеличению разнообразия метаногенов и появлению в составе сообществ ацетокластических метаногенов семейств *Methanosarcinales*, доминирующих, например, в почвах рисовников. Для метанотрофных сообществ наблюдается замена метанотрофов II типа на метанотрофов I типа. Выявленные закономерности могут быть использованы в мониторинге антропогенного воздействия на болотные экосистемы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-05-01113.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бажин, Н.М. Метан в атмосфере // Соросовский образовательный журнал, Химия. 2000. №6 .С. 52-57.
2. Oleszczuk, R. Impacts of agricultural utilization of peat soils on the greenhouse gas balance / R.K. Oleszczuk, L. Szajdak, H. Höper, V. Maryganova // In: Peatlands and climate change. Maria Strack (ed.). 2008. Jyväskylä: International Peat Society. P. 70-97.
3. Торфяные болота России: к анализу отраслевой информации // Под ред. Сирина А.А., Минаевой Т.Ю. – М.: Геос. 2001. 190 с.
4. Holmes, A.J. Evidence that particulate methane monoxygenase and ammonia monoxygenase may be evolutionarily related / A.J. Holmes, A. Costello, M.E. Lidstrom, C.J. Murrell // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 132. P. 203-208.
5. McDonald, I.R. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs / I.R. McDonald, L. Bodrossy, Y. Chen, C.J. Murrell // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 1305-1315.
6. Casamayor, E.O. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis / E.O. Casamayor, H. Schafer, L. Baneras et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. С. 499-508.
7. Luton, P.E. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill / P.E. Luton, J.M. Wayne, R.J. Sharp, P.W. Riley // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3521-3530.
8. Siljanen, H.M. Hydrology is reflected in the functioning and community composition of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal lake / H.M. Siljanen, A. Saari, S. Krause et al. // FEMS Microbiol Ecol. 2011.V. 75(3). P. 430-445.
9. Chen, Y. Diversity of the active methanotrophic community in acidic peatlands as assessed by mRNA and SIP-PLFA analyses / Y. Chen, M.G. Dumont, N.P. McNamara et al. // Environ Microbiol. 2008. V. 10(2). С. 446-459.
10. Dumont, M.G. Identification of a complete methane monoxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis / M.G. Dumont, S.M. Radajewski, C.B. Miguez et al. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8 (7). P. 1240-1250.
11. Wartainen, I. *Methylobacter tundripaludum* sp. nov., a methane-oxidizing bacterium from Arctic wetland soil on the Svalbard islands, Norway (78 degrees N) / I. Wartainen, A.G. Hestnes, I.R. McDonald, M.M. Svenning // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56 (1). P. 109-113.
12. Nercessian, O.G. Bacterial populations active in metabolism of C<sub>1</sub> compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake / O.G. Nercessian, E. Noyes, M.G. Kaluyzhnaya et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V 71 (11). P. 6885-6899.
13. Кравченко, И.К. Физико-химические и биологические факторы, контролирующие окисление атмосферного метана в серых лесных почвах / И.К. Кравченко, В.М. Семенов, Т.В. Кузнецова и др. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 255-260.
14. Conrad, R. Soil type links microbial colonization of rice roots to methane emission / R. Conrad, M. Klose, M. Noll et al. // Glob. Chang. Biol. 2008.V. 14 (3). P. 657-669.
15. Суворов, Г.Г. Влияние растительности и режима увлажнения на эмиссию метана из осушенной торфяной почвы / Г.Г. Суворов, М.В. Чистотин, А.А. Сирин // Агрохимия. 2010. №12. С. 37-45.

## MICROORGANISMS OF METHANE CYCLE IN NATURAL PEAT SOILS AND HYDROLOGICAL ELEMENTS OF DRAINED PEATLANDS

© 2011 A.K. Kizilova<sup>1</sup>, A.A. Sirin<sup>2</sup>, I.K. Kravchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology named after S.N. Vinogradskiy RAS, Moscow

<sup>2</sup> Institute of Forest Science RAS, Moscow

Soils of peatlands and wetlands are important as a source or sink of carbon greenhouse gases, which fluxes can differ significantly depending on soil transformation during land and soil management. Effect of human intervention into peatlands disturbs the balance between production and consumption of greenhouse gases, which can lead to unusually high methane emissions from hydrological elements of man-made drain ditch network. In order to identify mechanisms for regulation of mentioned processes we have used molecular ecology techniques (PCR, denaturing gradient gel electrophoresis of ribosomal and functional genes) for studying diversity of methanotrophs and methanogens in peat soils of natural wetland and hydrological elements – drain ditches. Studies revealed that methanotrophic *Alphaproteobacteria* dominated in peat soil of natural wetland and forest soil from nearby the wetland, while peat soil of drain ditch appeared to be inhabited only by methanotrophic *Gammaproteobacteria*. As for methanogens, no methane-producing archaea were detected in upper biogeochemically active layer of peat soil from natural wetland and in forest soil, meanwhile methanogens of *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* and *Methanobacteriales* were found in peat soil of drain ditch. Our data indicate drastic changes in microbial communities, involved in methane cycle in hydrological elements of drained peatlands, and thus can be used for monitoring effects of human impact on peatland ecosystems.

Key words: *drained peatbogs, methane cycle, methanotrophs, methanogens*

Anna Kizilova, Candidate of Biology, Research Fellow. E-mail: alegrria@gmail.com

Andrey Sirin, Doctor of Biology, Director. E-mail: sirin@proc.ru

Irina Kravchenko, Candidate of Biology, Leading Research Fellow. E-mail: irinakravchenko@inbox.ru