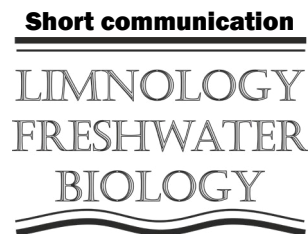


Genetic, physiological and biochemical features of the methanogenic strain *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 isolated from oil-saturated bottom sediments of Lake Baikal



Bukin S.V.^{1*}, Rechkina V.I.², Ivanov V.G.¹, Pogodaeva T.V.¹, Pavlova O.N.¹, Shcherbakova V.A.², Zemskaya T.I.¹

¹Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033, Russia

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, prospect Nauki, 5, Pushchino, 142290, Russia

ABSTRACT. A culture of irregular cocci with a diameter of 0.7-1.5 μm , capable of producing methane when growing on a mixture of H_2/CO_2 gases, methanol, mono-, di- and trimethylamines, was isolated from the bottom sediments of the Bolshaya Zelenovskaya oil-methane seep. On the basis of physiological-biochemical, phenotypic and genetic characteristics, it was found that the microorganism obtained in pure culture is a new strain of *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1, which has differences from the type strain in a number of parameters, including the ability to produce methane from acetate

Keywords: methanogenesis, Lake Baikal, *Methanosarcina*, strain, bottom sediments

For citation: Bukin S.V., Rechkina V.I., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Pavlova O.N., Shcherbakova V.A., Zemskaya T.I. Genetic, physiological and biochemical features of the methanogenic strain *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 isolated from oil-saturated bottom sediments of Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 821-828. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-821

1. Introduction

Lake Baikal is located in a tectonically active zone, which determines the presence of methane and oil seeps, as well as gas hydrate deposits in its sedimentary strata. The microbial communities of oil saturated bottom sediments of Baikal are characterized by the highest relative abundance of methanogenic archaea in comparison with sediments of deep-water background areas and mud volcanoes (Zemskaya et al., 2024 in press). This provides an opportunity to isolate from them microorganisms that constitute a minor part of the methanogenic component of the communities tending to higher concentrations of organic matter. One of such microorganisms are mixotrophic archaea of the genus *Methanosarcina*, new strains of which were previously isolated from Baikal bottom sediments sampled in the area of the Gorevoy Utyos oil-methane seep (Zhilina et al., 2017). Members of the genus *Methanosarcina* are widely distributed in a variety of ecotopes including anaerobic digesters, bottom sediments of freshwater and marine ecosystems, active layers of permafrost soils, and underground oil reser-

voirs (Liu and Whitman, 2008; De Vrieze et al., 2012; Oshurkova et al., 2020). Due to their ability to utilize different types of substrates as carbon and energy sources, they are often tolerant to specific inhibitors of certain methanogenesis pathways (fluoroacetate and methyl fluoride), and have a high tolerance to stress factors typical of ecotopes with high organic matter content, including ammonium toxicity, high concentrations of volatile fatty acids, elevated salinity and pH stress (De Vrieze et al., 2012). All this makes them a promising object for biotechnological application, and together with the significantly increased need to fill the All-Russian Collection of Microorganisms with biotechnologically important strains, determines the relevance of their search and production in pure culture.

In this paper we present an initial description of the genetic and physiological-biochemical characteristics of a new methanogenic strain LB-BZ-1, isolated from the bottom sediments of the oil-methane seep Bolshaya Zelenovskaya (Middle Baikal) and assigned to the genus *Methanosarcina*.

*Corresponding author.

E-mail address: sergeibukin@lin.irk.ru (S.V. Bukin)

Received: August 05, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2. Materials and methods

Strain LB-BZ-1 was isolated from the surface layer of bottom sediments (10 cm) of the deep-water (420 m) oil-methane seep Bolshaya Zelenovskaya (52.64668 N, 107.330563 E) sampled in July 2021 from the R/V “G.Y. Vereshchagin”.

The isolation of the strain into pure culture and the study of its physiological and biochemical properties were carried out on medium of the following composition: (g/L): NaCl: 0.5, KH_2PO_4 : 0.33, NH_4Cl : 0.33, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 0.33, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 0.33, NaHCO_3 : 0.15, Na_2S : 0.25, L-Cysteine-HCl: 0.25, vitamin solution (Wolin et al., 1963): 10 ml, micronutrient solution (Kevbrin and Zavarzin, 1992): 1 ml, resazurin (0.1%): 0.5 ml. The strain was isolated by sequential culturing on medium supplemented with different antibiotic drugs (vancomycin hydrochloride (125 mg/L), kanamycin sulfate (200 mg/L), ampicillin (500 mg/L)) and methanol (5 g/L) as carbon and energy source. The purity of the culture was confirmed by light microscopy, denaturing gradient gel electrophoresis (D-Code System, Bio-Rad), and no growth on Schedler's medium (g/L): trypticasein-soy broth: 10, dextrose: 5, Tris(hydroxymethyl)aminomethane: 3, L-cystine: 0.4, peptone mixture: 5, yeast extract: 5, hemin: 0.01 and glucose-peptone agar (g/L): glucose: 4, yeast extract: 2, peptone: 2.

During the determination of physiological and biochemical parameters of the strain, growth was evaluated by measuring CH_4 concentrations in the gas phase by gas chromatography. When evaluating the utilization of different carbon sources, cultivation was performed at 29°C for 21 days (90 days at 4°C). All tests were performed in three replications.

To obtain data on the genome structure of strain LB-BZ-1, total DNA was isolated from the culture by a modified enzymatic lysis method followed by phenol-chloroform extraction. Library preparation and sequencing on the MGISEQ DNBSEQ-G400RS platform

in 2×150 bp format were performed at the Institute of Genomic Technologies LLC (Moscow, Russia). Contig assembly and subsequent annotation of genomic data using SPAdes v.3.15.5 genomic assembler (Prjibelski et al., 2020) and SqueezeMeta v.1.6.3 software package (Tamames and Puente-Sanchez, 2019) were performed according to the algorithm described in (Chernitsyna et al., 2024). The taxonomic classification of the strain was determined using the GTDB v.09-RS220 complete genome database based on sequence comparisons of 53 marker genes. The genome assembly obtained in this study was deposited in the NCBI database under project number PRJNA875570.

3. Results and discussion

The LB-BZ-1 strain was represented by immobile coccoid cells with a diameter of 0.7-1.5 μm , often combined into sarcine-like packages and their conglomerates (Fig. A). The cells were Gram-negative stained.

When growing on a medium with methanol (5 g/l), the isolate showed no signs of psychrophilicity - the optimal growth temperature was 29 °C (estimated range 4, 20, 22, 25, 27, 29, 32, 37° C), however, it was able to grow over a wide temperature range, including 4°C, which corresponds to the native temperature of the bottom sediments from which it was isolated (3.8 °C). According to preliminary data, the optimum salinity was in the range of 0-0.01M NaCl (estimated range 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M NaCl), optimum pH 7.5-8.0 (estimated range of initial pH of the medium 5.0-9.0), which is also close to the parameters of bottom sediments of the oil-methane seep.

The strain was able to utilize H_2/CO_2 (80:20 v/v, 110 kPa), methanol (5 g/L), monomethylamine (1 g/L), dimethylamine (1 g/L) and trimethylamine (1 g/L) as carbon and energy sources. Formate (1 g/L), acetate (0.1, 0.5, 1 g/L) and dimethyl sulfide (0.186 g/L) not used.

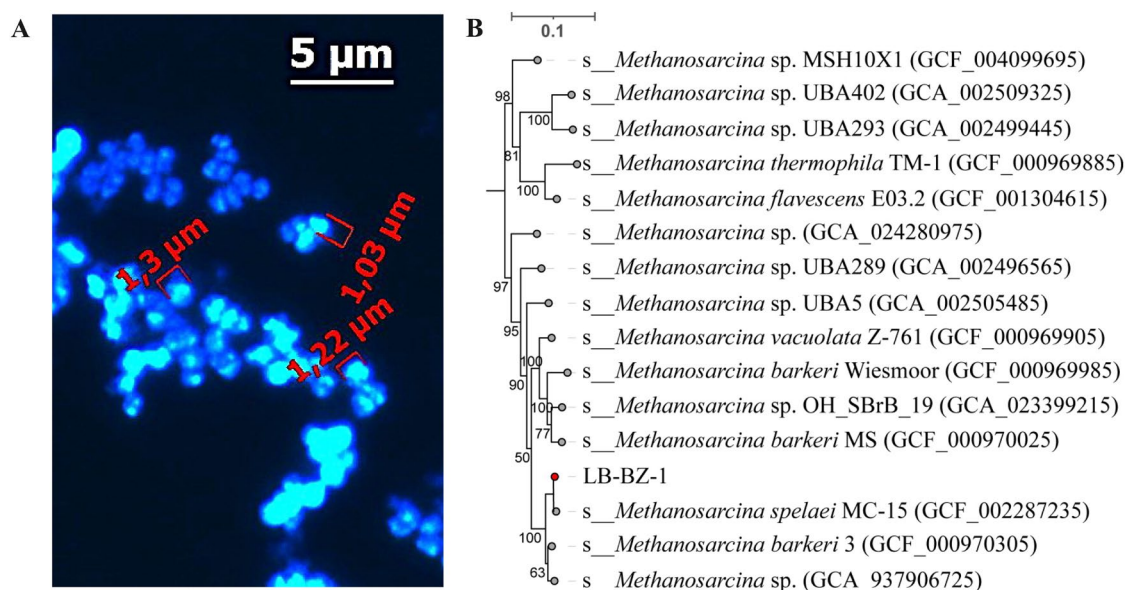


Fig. Cell morphology of strain LB-BZ-1 in the light epifluorescence microscopy image (A) and its position on the phylogenetic tree of representatives of the genus *Methanosarcina* (B).

Table. Physiological, biochemical and genetic characteristics of strains

Characterization	<i>M. spelaei</i> MC-15 ^T (Ganzert et al., 2014)	LB-BZ-1
Source of isolation	Floating biofilm, cave lake.	Surface layer of bottom sediments, Lake Baikal
Cell dimension (µm)	2.0-4.0	0.7-1.5
Gram stain	-	-
Temperature range for growth (°C)	0-54	4-37 (requires clarification)
Temperature optimum (°C)	33	29
pH range for growth	4.1->9.9	5.0-8.5 (requires clarification)
Optimum pH	6.6	7.5-8.0
Tolerance of NaCl (M)	0.02->0.6	0-0.3 (requires clarification)
Optimum NaCl (M)	0.02	0-0.01
Substrates used		
H ₂ /CO ₂	+	+
Methanol	+	+
Acetate	+	-
Formate	-	-
Dimethyl sulfide	-	-
Monomethylamine	+	+
Dimethylamine	+	+
Trimethylamine	+	+
Characteristics of genome assemblies		
Size (bp)	5088600	4553458
N50	25064	179504
Completeness according to CheckM2 (%)	99.90	99.98
Contamination according to CheckM2 (%)	1.62	1.51
GC content (%)	38.75	39.04
Coding density (%)	71.27	71.90
Number of genes according to PGAP	4374	3819
Number of protein-coding genes	4310	3757
Number of rRNA genes (5S;16S;23S)	1;1;1	1;1;1
Number of tRNA genes	59	56

The results of sequencing data processing for the strain yielded a genome assembly with a total length of 4553458 bp, an estimated completeness of 99.97% and a contamination of 1.5% according to CheckM2 (Chklovski et al., 2023). Taxonomic analysis showed that the obtained isolate has the highest similarity to the strain *Methanosarcina spelaei* MC-15^T (Ganzert et al., 2014) and forms a single clade with it on the phylogenomic tree (Fig. B). In terms of average nucleotide identity (ANI), the similarity between strains was within the accepted limits of intraspecific variability (95%) and amounted to 97.13%. The average amino acid identity (AAI) and DNA-DNA *in silico* hybridization were 97.42% and 71.70%, respectively, which also

indicated that the strains belonged to the same species.

Despite the fact that both strains were isolated from ecotopes located at the boundary between oxidized and reduced environmental conditions, comparison of their physiological, biochemical, and genetic characteristics revealed a number of differences (Table). Thus, the Baikal isolate is characterized by smaller cell sizes, lower temperature optimum for growth, and a shorter genome with fewer protein coding genes. However, the main difference is that LB-BZ-1 lacks the ability to grow on medium with acetate as the only source of carbon and energy. It should be noted that this feature is not a consequence of global genetic changes - all key genes of the acetoclastic pathway of methanogenesis were

found in the genome of LB-BZ-1 strain. In this regard, the suppression of the ability to produce methane from acetate probably occurs at the level of transcription regulation and is a consequence of living in conditions of low concentrations of acetate ion (below the detection threshold of 0.01 mg/l) and high competition for this substrate from other microorganisms, including acetoclastic methanogens of the genus *Methanotrix*, which have a large relative abundance in the community of bottom sediments of oil methane seep (Zemskaya et al., 2024 in press).

4. Conclusions

A mixotrophic methanogenic strain LB-BZ-1 has been isolated from the oil-saturated bottom sediments of Lake Baikal, capable of growing in a wide range of temperatures, salinity and pH. Taxonomic analysis confirmed its belonging to the species *M. spelaei*. The assessment of physiological, biochemical and genetic characteristics showed the presence of moderate evolutionary adaptations of LB-BZ-1 to the conditions of existence in the sediments of a cold-water oligotrophic reservoir in comparison with the typical strain of MC-15^T isolated from a mesophilic, sulfide ecosystem. The lack of the ability to produce methane via the acetoclastic pathway and the level of DNA-DNA hybridization suggest that the Baikal strain is a representative of the new subspecies *Methanosarcina spelaei subsp. baikalica*.

Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation project No. 22-14-00084.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V. et al. 2024. Genomic and morphological characterization of a new *Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). *Antonie van Leeuwenhoek* 117: 23. DOI: [10.1007/s10482-023-01918-w](https://doi.org/10.1007/s10482-023-01918-w)

Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20(8):1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)

De Vrieze J., Hennebel T., Boon N. et al. 2012. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* 112: 1–9. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.02.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079)

Ganzert L., Schirmack J., Alawi M. et al. 2014. *Methanosarcina spelaei* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a floating biofilm of a subsurface sulphurous lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3478–3484. DOI: [10.1099/ijs.0.064956-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.064956-0)

Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. 1992. Effect of sulfur compounds on the growth of the halophilic homoacetogenic bacterium *Acetohalobium arabaticum*. *Microbiologiya* 61(5): 812–817. (in Russian)

Liu Y., Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *Archaea*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125(1): 171–189. DOI: [10.1196/annals.1419.019](https://doi.org/10.1196/annals.1419.019)

Oshurkova V., Troshina O., Trubitsyn V. et al. 2020. Characterization of *Methanosarcina mazei* JL01 isolated from Holocene arctic permafrost and study of the archaeon cooperation with bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2^T. *Proceedings* 66(1): 4. DOI: [10.3390/proceedings2020066004](https://doi.org/10.3390/proceedings2020066004)

Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70(1): e102. DOI: [10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)

Tamames J., Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Frontiers in Microbiology* 9: 3349. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349)

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *Journal of Biological Chemistry* 238(8): 2882–2886. DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)67912-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67912-8)

Zhilina T.N., Gruzdev D.S., Kolganova T.V. et al. 2017. Methanogens and acetogens in anaerobic silts over gas hydrates and in oil spill zones of Lake Baikal. In: Reshetilova T.A. (Ed.), *Proceedings 1st Russian microbiological congress*. Moscow: ID “Voda: chimiya i ekologiya”, pp. 44-45. (in Russian)

Генетические и физиолого-биохимические особенности метаногенного штамма *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 выделенного из нефтенасыщенных донных отложений оз. Байкал

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYБукин С.В.^{1*}, Речкина В.И.², Иванов В.Г.¹, Погодаева Т.В.¹, Павлова О.Н.¹, Щербакова В.А.², Земская Т.И.¹¹ ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН, проспект Науки, 5, Пуццоно, 142290, Россия

АННОТАЦИЯ. Из донных отложений нефте-метанового сипа Большая Зеленовская выделена культура сарцино-подобных кокков диаметром 0.7-1.5 мкм, способных образовывать метан как автотрофно, при росте на смеси газов H_2/CO_2 , так и при использовании метанола, моно-, ди- и триметиламинов. На основе физиолого-биохимических, фенотипических и генетических характеристик, установлено, что полученный в чистой культуре микроорганизм представляет собой новый штамм *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1, имеющий отличия от типового штамма по ряду параметров, включая способность образовывать метан из ацетата.

Ключевые слова: метаногенез, озеро Байкал, *Methanosarcina*, штамм, донные отложения

Для цитирования: Букин С.В., Речкина В.И., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Павлова О.Н., Щербакова В.А., Земская Т.И. Генетические и физиолого-биохимические особенности метаногенного штамма *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 выделенного из нефтенасыщенных донных отложений оз. Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 821-828. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-821](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-821)

1. Введение

Озеро Байкал расположено в тектонически активной зоне, что обуславливает наличие метановых и нефтяных сипов, а также залежей газовых гидратов в его осадочной толще. Микробные сообщества нефтенасыщенных донных отложений Байкала характеризуются наибольшей относительной численностью метаногенных архей в сравнении с осадками глубоководных фоновых районов и грязевых вулканов (Zemskaya et al., 2024 в печати). Это предоставляет возможность выделения из них микроорганизмов, составляющих минорную часть метаногенной компоненты сообществ, тяготеющую к повышенным концентрациям органического вещества. Одними из таких микроорганизмов являются миксотрофные архей рода *Methanosarcina*, новые штаммы которых ранее уже выделялись из байкальских донных отложений, отобранных в районе нефте-метанового сипа Горевой Утёс (Жилина и др., 2017). Представители рода *Methanosarcina* широко

распространены в различных экотопах включая метантенки, донные отложения пресноводных и морских экосистем, активные слои вечномёрзлых почв, а также подземные нефтяные резервуары (Liu and Whitman, 2008; De Vrieze et al., 2012; Oshurkova et al., 2020). Благодаря способности использовать в качестве источников углерода и энергии различные типы субстратов они зачастую толерантны к специфичным ингибиторам отдельных путей метаногенеза (фторацетат и метилфторид), а также обладают большей устойчивостью к стрессовым факторам, характерным для экотопов с высоким содержанием органического вещества, включая аммонийную токсичность, высокие концентрации летучих жирных кислот, повышенную солёность и pH-стресс (De Vrieze et al., 2012). Все это делает их перспективным объектом для биотехнологического применения, а в совокупности со значительно возросшей потребностью по наполнению Всероссийской коллекции микроорганизмов биотехнологически-значимыми

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: sergeibukin@lin.irk.ru (С.В. Букин)

Поступила: 05 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



штаммами, обуславливает актуальность их поиска и получения в чистой культуре.

В данной работе мы приводим первичное описание генетических и физиолого-биохимических характеристик нового метаногенного штамма LB-BZ-1, выделенного из донных отложений нефте-метанового сипа Большая Зеленовская (Средний Байкал), и, отнесённого к роду *Methanosarcina*.

2. Материалы и методы

Штамм LB-BZ-1 был выделен из поверхностного слоя донных отложений (10 см) глубоководного (420 м) нефте-метанового сипа Большая Зеленовская (52.64668 N, 107.330563 E), отобранных в июле 2021 г. с борта НИС “Г.Ю. Верещагин”.

Выделение штамма в чистую культуру и изучение его физиолого-биохимических свойств проводили на среде следующего состава: (г/л): NaCl: 0.5, K_2HPO_4 : 0.33, NH_4Cl : 0.33, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.33, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.33, NaHCO_3 : 0.15, Na_2S : 0.25, L-Цистеин-HCl: 0.25, раствор витаминов (Wolin et al., 1963): 10 мл, раствор микроэлементов (Кевбрин и Заварзин, 1992): 1 мл, резазурин (0.1%): 0.5 мл. Штамм был изолирован методом последовательного культивирования на среде с добавлением различных антибиотических препаратов (ванкомицина гидрохлорид (125 мг/л), канамицина сульфат (200 мг/л), ампициллин (500 мг/л) и метанолом (5 г/л) в качестве источника углерода и энергии. Чистота культуры была подтверждена методами световой микроскопии, денатурирующего градиентного гель-электрофореза (D-Code System, Bio-Rad), а также отсутствием роста на среде Шедлера (г/л): триптиказеино-соевый бульон: 10, декстроза: 5, трис (гидроксиметил аминометан): 3, L-цистин: 0.4, пептоновая смесь: 5, дрожжевой экстракт: 5, гемин: 0.01 и глюкозопептонном агаре (г/л): глюкоза: 4, дрожжевой экстракт: 2, пептон: 2.

В ходе определения физиолого-биохимических параметров штамма рост оценивали путём измерения концентраций CH_4 в газовой фазе мето-

дом газовой хроматографии. При оценке использования различных источников углерода культивирование проводили при 29°C в течении 21 суток (90 суток при 4°C). Все тесты проводились в трёх повторностях.

Для получения данных о структуре генома штамма LB-BZ-1 суммарную ДНК из культуры выделяли модифицированным методом ферментативного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией. Подготовку библиотеки и секвенирование на платформе MGISEQ DNBSEQ-G400RS в формате 2×150 пн проводили на базе ООО Институт геномных технологий (Москва, Россия). Сборку контигов и последующую аннотацию геномных данных с использованием геномного сборщика SPAdes v.3.15.5 (Prjibelski et al., 2020) и программного пакета SqueezeMeta v.1.6.3 (Tamames and Puente-Sanchez, 2019) осуществляли по алгоритму, описанному в работе (Chernitsyna et al., 2024). Таксономическую классификацию штамма определяли с использованием базы данных полных геномов GTDB v.09-RS220 на основе сравнения последовательностей 53-х маркерных генов. Геномная сборка, полученная в данной работе депонирована в базе данных NCBI под номером проекта PRJNA875570.

3. Результаты и обсуждение

Штамм LB-BZ-1 был представлен неподвижными, кокковидными клетками диаметром 0.7-1.5 мкм, часто объединёнными в сарциноподобные пакеты и их конгломераты (Рис. А). Клетки окрашивались по Граму отрицательно.

При культивировании на среде с метанолом (5 г/л) изолят не проявил признаков психрофильности - оптимальная температура роста составила 29°C (оценённый диапазон 4, 20, 22, 25, 27, 29, 32, 37°C), однако он был способен развиваться в широком диапазоне температур, включая 4°C что соответствует нативной температуре донных отложений, из которых он был выделен (3.8°C). По предваритель-

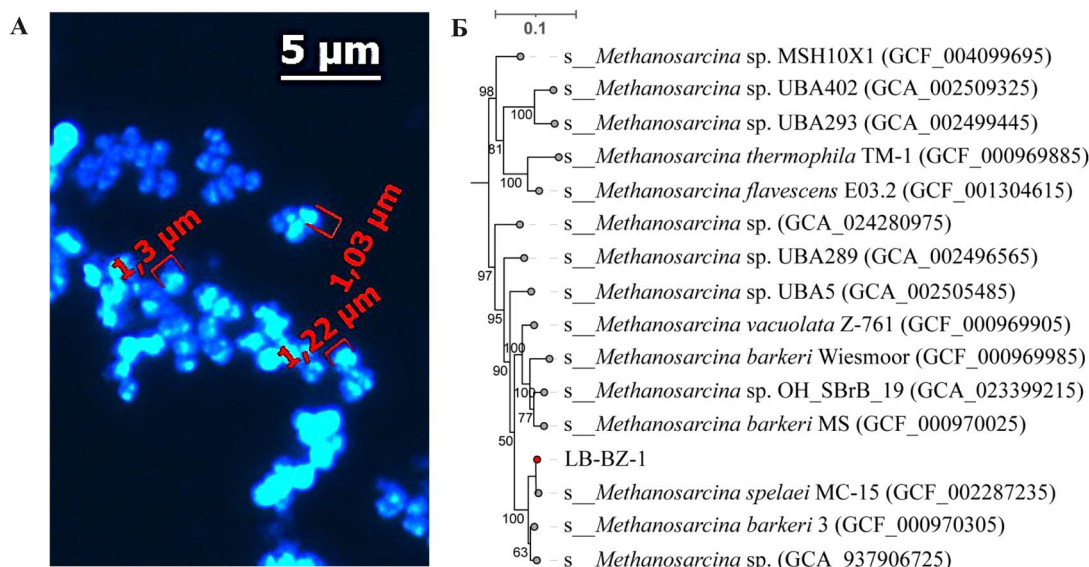


Рис. Морфология клеток штамма LB-BZ-1 на снимке световой эпифлуоресцентной микроскопии (А) и его положение на филогеномном древе представителей рода *Methanosarcina* (Б).

Таблица. Физиолого-биохимический и генетические характеристики штаммов

Характеристика	<i>M. spelaei</i> MC-15 ^T (Ganzert et al., 2014)	Штамм LB-BZ-1
Источник выделения	Плавающая биоплёнка, пещерное озеро	Поверхностный слой донных отложений, озеро Байкал
Размер клеток (мкм)	2.0-4.0	0.7-1.5
Окраска по Граму	-	-
Температурный диапазон роста (°C)	0-54	4-37 (требуется уточнения)
Температурный оптимум (°C)	33	29
Диапазон pH	4.1->9.9	5.0-8.5 (требуется уточнения)
Оптимум pH	6.6	7.5-8.0
Диапазон NaCl (M)	0.02->0.6	0-0.3 (требуется уточнения)
Оптимум NaCl (M)	0.02	0-0.01
Используемые субстраты		
H ₂ /CO ₂	+	+
Метанол	+	+
Ацетат	+	-
Формиат	-	-
Диметилсульфид	-	-
Монометиламин	+	+
Диметиламин	+	+
Триметиламин	+	+
Характеристики геномных сборок		
Размер (п.н.)	5088600	4553458
N50	25064	179504
Полнота согласно CheckM2 (%)	99.90	99.98
Контаминация согласно CheckM2 (%)	1.62	1.51
GC (%)	38.75	39.04
Плотность кодирования (%)	71.27	71.90
Количество генов согласно PGAP	4374	3819
Количество белок-кодирующих генов	4310	3757
Количество генов рРНК (5S;16S;23S)	1;1;1	1;1;1
Количество генов тРНК	59	56

ным данным, оптимум солёности находился в пределах 0-0.01M NaCl (оценённый диапазон 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M NaCl), оптимум pH 7.5-8.0 (оценённый диапазон начального pH среды 5.0-9.0), что также близко к параметрам донных отложений нефте-метанового сипа.

В качестве источников углерода и энергии штамм был способен использовать H₂/CO₂ (80:20 v/v, 110 кПа), метанол (5 г/л), монометиламин (1 г/л), диметиламин (1 г/л), триметиламин (1 г/л). Формиат (1 г/л), ацетат (0.1, 0.5, 1 г/л) и диметилсульфид (0.186 г/л) не использовал.

По результатам обработки данных секвенирования для штамма получена геномная сборка общей длиной 4553458 пар нуклеотидов, оценочной полнотой 99.97% и контаминационным показателем 1.5% согласно CheckM2 (Chklovski et al., 2023). Таксономический анализ показал, что полученный изолят имеет наибольшее сходство со

штаммом *Methanosarcina spelaei* MC-15^T (Ganzert et al., 2014) и образует с ним единую кладу на филогеномном древе (Рис. Б). По показателю средней идентичности нуклеотидов (ANI) сходство между штаммами не выходило за принятые рамки внутривидовой вариабельности (95%) и составило 97.13%. Показатели средней аминокислотной идентичности (AAI) и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* составили 97.42% и 71.70% соответственно, что также указывает на принадлежность штаммов к одному виду.

Несмотря на то, что оба штамма выделены из экотопов, располагающихся на границе между окисленными и восстановленными условиями среды, сравнение их физиолого-биохимических и генетических характеристик выявило ряд имеющихся различий (Таблица). Так для байкальского изолята характерны меньшие размеры клеток, более низкий температурный оптимум роста, а также геном мень-

шей длинны с меньшим количеством белок-кодирующих генов. Однако основным отличием является отсутствие у LB-BZ-1 способности к росту на среде с ацетатом, в качестве единственного источника углерода и энергии. Следует отметить, что данная особенность не является следствием глобальных генетических изменений - у байкальского штамма обнаружены все ключевые гены ацетокластического пути метаногенеза. В связи с этим угнетение способности образовывать метан из ацетата, вероятно происходит на уровне регуляции транскрипции и является следствием обитания в условиях низких концентраций ацетат-иона (ниже порога детекции - 0.01 мг/л) и высокой конкуренции за данный субстрат со стороны других микроорганизмов, включая ацетокластических метаногенов рода *Methanotrix*, имеющих большую относительную численность в сообществе донных отложений нефте-метанового сипа (Zemskaya et al., 2024 в печати).

4. Выводы

Из нефтенасыщенных донных отложений озера Байкал выделен миксотрофный метаногенный штамм LB-BZ-1, способный расти в широком диапазоне температур, солёности и pH. Таксономический анализ подтвердил его принадлежность к виду *Methanosarcina spelaei*, а оценка физиолого-биохимических и генетических характеристик показала наличие умеренных эволюционных адаптаций к условиям существования в осадках холодноводного олиготрофного водоёма в сравнении с типовым штаммом MC-15^T, выделенным из мезофильной, сульфидной экосистемы. Анализ полученных результатов и уровень ДНК-ДНК гибридизации позволяют предположить, что новый метаноген является представителем нового подвида *Methanosarcina spelaei subsp. baikalica*.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 22-14-00084.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В. и др. 2017. Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал. В: Решитилова Т.А. (Ред.), I Российский микробиологический конгресс. Москва: ИД Вода: химия и экология, с. 44–45.
- Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. 1992. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацететной бактерии *Acetohalobium arabaticum*. Микробиология 61(5): 812–817.
- Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V. et al. 2024. Genomic and morphological characterization of a new *Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). Antonie van Leeuwenhoek 117: 23. DOI: [10.1007/s10482-023-01918-w](https://doi.org/10.1007/s10482-023-01918-w)
- Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. Nature Methods 20(8):1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)
- De Vrieze J., Hennebel T., Boon N. et al. 2012. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. Bioresource Technology 112: 1–9. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.02.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079)
- Ganzert L., Schirmack J., Alawi M. et al. 2014. *Methanosarcina spelaei* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a floating biofilm of a subsurface sulphurous lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:3478–3484. DOI: [10.1099/ijs.0.064956-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.064956-0)
- Liu Y., Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *Archaea*. Annals of the New York Academy of Sciences 1125(1): 171–189. DOI: [10.1196/annals.1419.019](https://doi.org/10.1196/annals.1419.019)
- Oshurkova V., Troshina O., Trubitsyn V. et al. 2020. Characterization of *Methanosarcina mazei* JL01 isolated from Holocene arctic permafrost and study of the archaeon cooperation with bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2^T. Proceedings 66(1): 4. DOI: [10.3390/proceedings2020066004](https://doi.org/10.3390/proceedings2020066004)
- Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. Current Protocols in Bioinformatics 70(1): e102. DOI: [10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)
- Tamames J., Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. Frontiers in Microbiology 9: 3349. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349)
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. Journal of Biological Chemistry 238(8): 2882–2886. DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)67912-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67912-8)