

УДК 574.58:579.266+579.8

МИКРООРГАНИЗМЫ ЦИКЛА МЕТАНА В ВЕСЛОНОГИХ РАЧКАХ ИЗ ВЫСОКОГОРНОГО ОЗЕРА¹

© 2025 г. А. Ю. Каллистова^а, *, В. В. Кадников^а, А. В. Белецкий^а, Н. В. Пименов^а

^аФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312, Россия

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Поступила в редакцию 26.08.2024 г.

После доработки 23.09.2024 г.

Принята к публикации 26.09.2024 г.

С помощью 16S рРНК профилирования исследован микробиом веслоногих рачков рода *Diaptomus*, обитающих в высокогорном озере Западного Кавказа. Основу микробиома составляли аэробные и анаэробные органотрофные микроорганизмы, метаногенные археи и аэробные метаноокисляющие бактерии (МОБ). Выявлены симбионты и бактерии, входящие в рацион питания рачков. Анаэробные органотрофные микроорганизмы, обитающие в рачках, обеспечивают субстратами метаногенов — вторую по относительной численности физиологическую группу прокариот в составе микробиома. В микробиоме доминировали ацетокластические метаногены рода *Methanothrix* и гидрогенотрофные метаногены родов *Methanobacterium* и *Methanoregula*. Цикл метана внутри рачков замкнут, поскольку их микробиом содержал разнообразную популяцию аэробных МОБ, среди которых доминировали МОБ класса *Gammaproteobacteria* родов *Methylobacter* и *Methyloparacoccus*. Предположительно, обмен метаном между метаногенами и метанотрофами происходит в кишечнике рачка в анаэробных условиях при непосредственном контакте целевых микроорганизмов.

Ключевые слова: *Copepoda*, микробиом, органотрофные микроорганизмы, метаногенные археи, метанотрофные бактерии, высокогорные озера

DOI: 10.31857/S0026365625010078

Свободноживущие веслоногие ракообразные (*Copepoda*) являются важнейшим звеном пищевой цепи и вносят значимый вклад в общую продуктивность и функционирование водных экосистем, включая высокогорные озера. Высокогорные озера характеризуются высокой прозрачностью воды, высоким уровнем УФ-излучения и отсутствием рыбы. В этих условиях именно УФ-излучение является движущим фактором дневной миграции веслоногих рачков в нижние водные слои (Fischer et al., 2015). Ночью веслоногие рачки мигрируют к поверхностным водам, чтобы получить с пищей незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты, а также каротиноиды — предшественники синтеза природного антиоксиданта астаксантина. Накопление астаксантина приводит к снижению уровня свободных радикалов, образующихся под воздействием УФ-излучения, что улучшает метаболизм и повышает антиоксидантный потенциал (Cui et al., 2023). Диета копепод состоит из фототрофных

и гетеротрофных планктонных микроорганизмов (Vakati et al., 2023), и УФ-излучение стимулирует синтез каротиноидов в их клетках (Cui et al., 2023). Во время питания и выделения веслоногие рачки высвобождают растворенное и взвешенное органическое вещество, обеспечивая им сопутствующие микроорганизмы и регулируя численность свободноживущих микробных популяций. Микробиом копепод участвует в регуляции общего энергетического баланса зоопланктона и в обеспечении гомеостаза, а также влияет на круговорот органического вещества в водных экосистемах. Кишечная микробиота рачков помогает разрушать токсины, образующиеся во время цветения цианобактерий, и осуществляет трансформацию биогенных элементов, в том числе в анаэробных реакциях (Feng et al., 2023).

Целью работы являлось изучение микробиома веслоногих ракообразных рода *Diaptomus* (рис. 1), обитающих в водной толще высокогорного озера Западного Кавказа.

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365625010078>

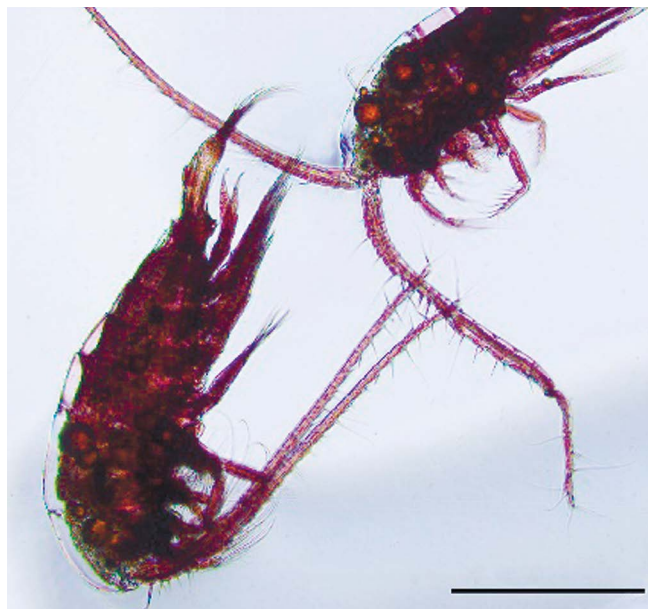


Рис. 1. Внешний вид веслоногих рачков рода *Diaptomus*, обитающих в водной толще оз. Шобайдак-Кель. Масштабная метка соответствует 500 мкм.

Оз. Шобайдак-Кель (43.4462 N, 41.6287 E) расположено на высоте 2936 м над уровнем моря на территории Тебердинского национального парка. Отбор копепоид, воды и донных осадков проводили в августе 2023 года в глубоководной зоне озера в точке с глубиной 8.5 м и в прибрежной зоне (литорали) на глубине 0.2 м. Подробные результаты гидрохимических и биогеохимических исследований водной толщи и донных осадков оз. Шобайдак-Кель будут приведены в нашей связанной публикации (готовится к печати).

Для 16S рРНК профилирования использовали интегральные пробы воды (5 образцов) с глубин 0, 3, 6, 8.5 м (глубоководная зона) и 0.2 м (зона литорали), а также осадков (6 образцов) с глубин 0–2, 2–7, 7–13, 13–30 и 30–35 см (глубоководная зона) и 0–5 см (зона литорали). Для этого 3 образца (биологические повторности) воды с конкретной глубины и 3 колонки осадков отбирали на площади 1 м² и объединяли по горизонтам в одной склянке. Колонку осадков предварительно делили на сектора. Биомассу живых рачков отбирали из всех проб воды по профилю в одну интегральную пробу, отмывали в этаноле и гомогенизировали с жидким азотом перед процедурой выделения ДНК. После отбора копепоид, образцы воды фильтровали через мембранные фильтры (диаметр пор 0.2 мкм).

Выделение ДНК из клеток, сконцентрированных на фильтрах, образцов донных осадков и биомассы копепоид, амплификацию переменного региона V3–V4 гена 16S рРНК, секвенирование, анализ фрагментов гена 16S рРНК, кластеризацию

последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) с помощью программы USEARCH, удаление химерных последовательностей и таксономическую идентификацию ОТЕ по базе SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH syntax проводили по методикам, описанным ранее (Каллистова и соавт., 2023). В результате было получено суммарно для образцов воды и осадков 412587 чтений последовательностей гена 16S рРНК и 16355 чтений для образца биомассы рачков. Индексы альфа-разнообразия рассчитывали с использованием команды “alpha_div” в USEARCH. Расчет расстояния Жаккара был выполнен с применением команды “beta_div” в USEARCH. Немеетрическое многомерное шкалирование (NMDS) было выполнено на языке программирования R с использованием библиотек vegan (Oksanen et al., 2022) и ggplot2 (Wickham, 2016). В качестве входной матрицы использовались расстояния Жаккара. Нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных Sequence Read Archive NCBI в BioProject PRJNA1148430. Микроскопию рачков проводили с использованием CELENA X High Content Imaging System (“Logos Biosystems”, Южная Корея).

Значения индексов Чао и Шеннона указывают на более высокое разнообразие микробного сообщества в слое осадков 0–30 см (703–972.5 и 4.9–5.7 соответственно) по сравнению с водой (125.1–225.3 и 2.7–3.1) и микробиомом рачков (567 и 4.4). Низкие значения индекса Симпсона (0.01–0.12) указывают на то, что при общем довольно высоком разнообразии, филоциты в микробных сообществах всех образцов были распределены равномерно без ярко выраженного доминирования индивидуальных представителей (табл. S1). NMDS анализ выявил сходство в составе микробных сообществ воды. Разные горизонты осадков и микробиом рачков, напротив, отличались по составу, как от воды, так и друг от друга (рис. S1). Общее количество филоцитов, выявленных в воде, варьировало от 180 до 410 с максимальным значением в придонном горизонте. В осадках глубоководной зоны общее количество филоцитов составляло 688–1765 с максимальными и минимальными значениями на горизонтах 7–13 и 30–35 см соответственно. В осадках литорали выявлено 872 филоцита, а в микробиоме рачков – 566.

Основу микробиома копепоид составляли прокариоты трех физиологических групп: органотрофные микроорганизмы, метаногенные археи и аэробные метаноокисляющие бактерии (МОБ) (рис. 2).

Органотрофная составляющая микробиома была многочисленна, разнообразна и включала аэробных и анаэробных представителей бактерий и архей. Среди них доминировали 3 филоцита (17.3, 10.7 и 0.9% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК соответственно) эндемиков: *Acidovorax temperans* (98.71% сходства последовательностей

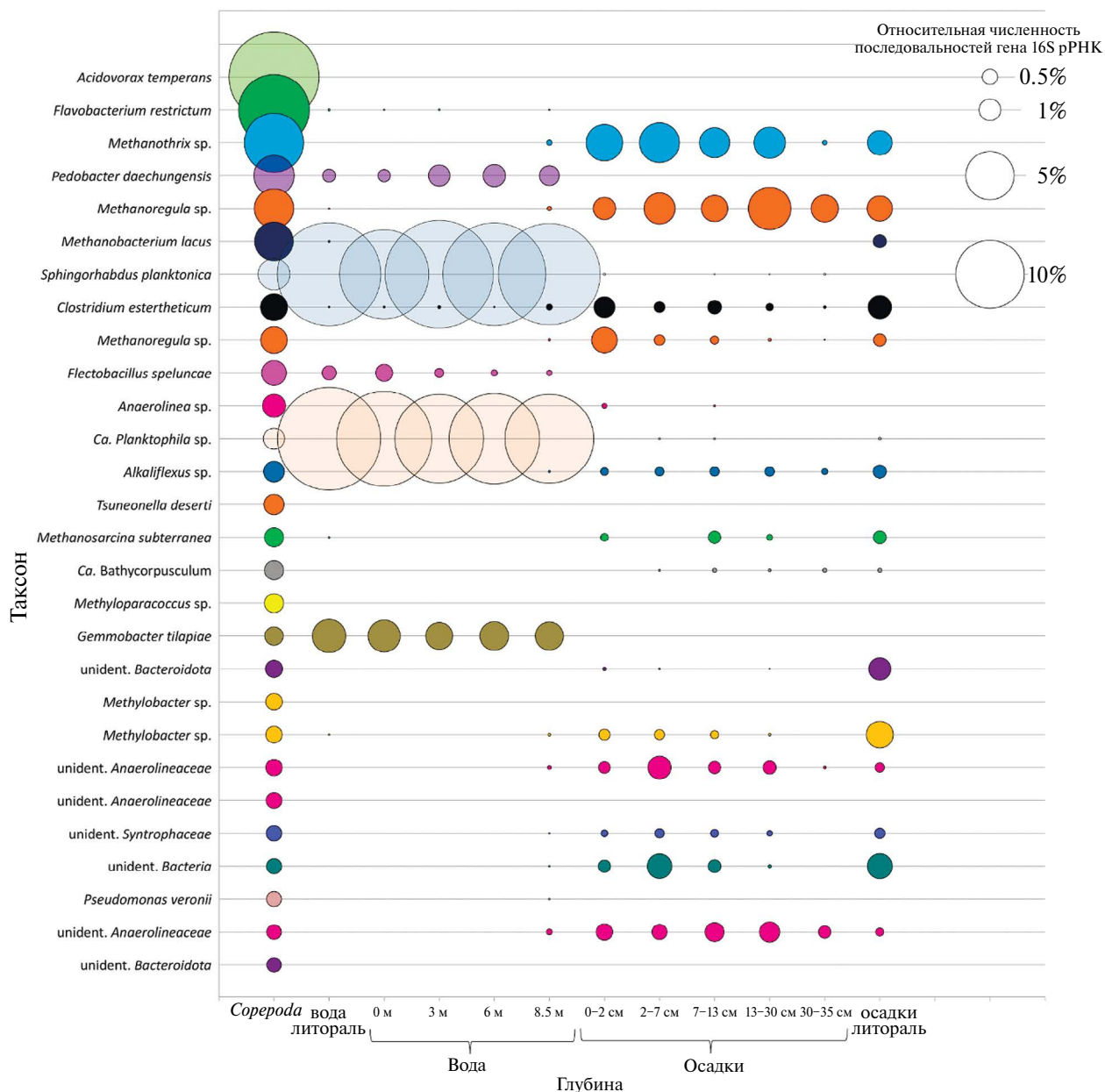


Рис. 2. Относительная численность прокариот (% от общего количества последовательностей гена 16S рРНК), доминирующих в микробиоме веслоногих рачков.

16S рРНК), *Flavobacterium restrictum* (99.13%) и *Tsuneonella deserti* (98.18%). Последовательности этих микроорганизмов не были выявлены ни в воде, ни в осадках озера. Аэробных, способных к гетеротрофной денитрификации хемоорганотрофных бактерий вида *A. temperans*, обычно выделяют из различных клинических и связанных с ними образцов (Willems et al., 1990), что свидетельствует об их паразитической природе. Возможно, эти бактерии передаются от взрослой особи рачка потомству через яйцевые мешки. Другая, доминировавшая

в микробиоме аэробная бактерия вида *F. restrictum*, напротив, является свободноживущим психротолерантным хемоорганотрофом, способным к нитратредукции (Zhang et al., 2020). Ее клетки характеризуются наличием пигментов желтого цвета, возможно, каротиноидов. Аналогичные пигменты известны и для свободноживущего аэробного органотрофа вида *T. deserti* (Yan et al., 2017; Zhang et al., 2020), последовательности которого также присутствовали в микробиоме рачка, но не во внешней среде. Поскольку каротиноиды необходимы

высокогорным копеподам для синтеза астаксантина (Cui et al., 2023), вероятно, у рачка-хозяина устанавливались симбиотические отношения с данными бактериями: рачки обеспечивали бактерий органическим веществом, а бактерии снабжали рачков каротиноидами.

Наряду с эндемиками, в микробиоме рачка присутствовали аэробные органотрофы из водной толщи озера (рис. 2). К ним относились представители двух филотипов, близкородственных (>99% сходства) представителям вида *Sphingorhabdus planktonica* (2.2% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК) и рода *Candidatus Planktophila* (1%). Доля этих филотипов в воде достигала 25% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК. Также в микробиоме доминировали 3 филотипа, близкородственные (>98.6% сходства) представителям видов *Pedobacter daechungensis* (3.5% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК), *Flectobacillus speluncae* (1.3%) и *Gemmobacter tilapiae* (0.7%), доля которых в воде была ниже 2.5%. Клетки всех бактерий, за исключением *G. tilapiae*, имеют желтую, розовую или красновато-оранжевую окраску; большинство предпочитает слабощелочные условия, характерные для водной толщи оз. Шобайдак-Кель (An et al., 2009; Jezbera et al., 2009; Jogler et al., 2013; Sheu et al., 2013). Данные бактерии, вероятно, составляли рацион питания рачков. Таким образом, рачки получают необходимые для синтеза астаксантина каротиноиды, не только поедая образующие их микроорганизмы, но и за счет симбиоза.

В микробиоме копепод обнаружена также довольно разнообразная популяция анаэробных органотрофных прокариот, последовательности которых детектированы в осадках озера (рис. 2). К ним относились некультивируемые представители семейств *Anaerolineaceae* (2.7% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК), *Syntrophaceae* (0.5%) и филума *Bacteroidota* (1.1%). В осадках их относительная численность по профилю составляла 0.3–1.6, 0–0.2 и 0–1.1% соответственно. Из культивируемых представителей в микробиоме доминировало 2 филотипа, один из которых имел 98.7% сходства с последовательностями алкалофильного, содержащего каротиноиды сахаролитика рода *Alkaliflexus*, основными продуктами брожения которого являются пропионат, ацетат и сукцинат (Zhilina et al., 2004). Его доля в микробиоме достигала 0.9%. Второй филотип имел 99.32% сходства с последовательностями нейтрофильного и психрофильного сахаролитика вида *Clostridium estertheticum*, который образует большие количества H_2 и CO_2 , бутанола, сложный спектр эфиров и летучих серосодержащих соединений (Collins et al., 1992). Его доля в микробиоме достигала 1.6% (рис. 2).

Наряду с бактериями в микробиоме копепод обнаружены последовательности архей филума *Ca.*

Bathyarchaeota (0.8% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК), ближайшими родственниками которых (96.45% сходства последовательностей гена 16S рРНК) являлись *Ca. Bathycorpusculum tergae* (OQ724660.1) — обитатели кишечника термитов (Protasov et al., 2023). Для первого представителя батиархей, выделенного в чистую культуру, *Ca. Bathyarchaeum tardum*, показана способность к трансформации метоксилированных ароматических соединений, которые являются важными компонентами лигнина. Центральный углеродный метаболизм в процессе метоксидотрофного роста включает окисление метильных групп 3,4-диметоксибензоата или ванилата, восстановление CO_2 и образование ацетата. Изолят метаболизирует белковые субстраты; диметилсульфоксид и нитрат стимулируют рост. Батиархеи, возможно, вступают в мутуалистические отношения с метаногенами, снабжая их субстратами (Khomyakova et al., 2023). Процент сходства последовательностей гена 16S рРНК *Ca. Bathyarchaeum tardum* (CP122380.1) и батиархей, обнаруженных в микробиоме копепод, составлял 86.18%. Вероятно, анаэробные прокариоты попали в организм рачка при взмучивании верхнего слоя осадка и прижились в анаэробном кишечнике.

Анаэробные органотрофы *C. estertheticum*, *Alkaliflexus* sp., *Ca. Bathycorpusculum*, а также синтрофные бактерии семейства *Syntrophaceae* могут обеспечивать субстратами метаногенов — вторую по относительной численности физиологическую группу прокариот в микробиоме рачка. В микробиоме детектированы представители, осуществляющие все известные пути метаногенеза. Доминировали ацетокластические (7.5% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК) метаногены рода *Methanotherix* (1 филотип) и гидрогенотрофные (8.7%) метаногены родов *Methanobacterium* (3 филотипа) и *Methanoregula* (4 филотипа) (рис. 2, 3).

Помимо доминирующих представителей в микробиоме рачка обнаружены последовательности метаногенов родов *Methanosarcina*, *Methanolinea*, *Methanospirillum*, некультивируемых представителей семейства *Methanomicrobiaceae* и порядка *Methanomassiliicoccales* (рис. 3). При этом из 20 филотипов метаногенов, детектированных в микробиоме, лишь половина, включая доминирующие филотипы, выявлена в осадках озера. Минорные последовательности метаногенов являлись уникальным компонентом микробиома рачка. В сумме относительная численность метаногенов в микробиоме рачка достигала 17.6%.

Метаногены являются обычным компонентом кишечной микробиоты беспозвоночных животных (Protasov et al., 2023), включая веслоногих рачков (Sadaïappan et al., 2021), где они образуют метан, выделяемый в атмосферу. Метаногенез в кишечнике зоопланктона до недавнего времени считался одной из основных гипотез, объясняющих “метановый парадокс” — повышение концентрации

Таксон		Вода	Глубоководная часть озера (глубина)										Осадки	
Метаногены	Соперода	литораль	0 м	3 м	6 м	8.5 м	0-2 см	2-7 см	7-13 см	13-30 см	30-35 см	литораль	№ОТЕ	
Methanolinea sp.	0,05	0	0	0	0	0,01	0,08	0,12	0,05	0,01	0,01	0,22	1249	
Methanolinea sp.	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2719	
Methanospirillum sp.	0,05	0	0	0	0	0,01	0,01	0	0	0	0	0,01	2599	
Methanospirillaceae	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5608	
Methanomicrobiaceae	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6602	
Methanobacterium lacus	3,19	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,37	449	
Methanobacterium sp.	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0,01	0	0	1255	
Methanobacterium sp.	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1469	
Methanoregula sp.	3,34	0	0	0	0	0,04	1,08	2,09	1,51	3,88	1,59	1,38	13	
Methanoregula sp.	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6286	
Methanoregula sp.	1,52	0	0	0	0	0,01	1,42	0,25	0,15	0,02	0	0,34	136	
Methanoregula sp.	0,22	0	0	0	0	0,01	0,05	0,95	0,30	0,24	0,04	0,01	86	
Methanomicrobia	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4135	
Σ Гидрогенотрофных МГ	8,67	0,01	0	0	0	0,08	2,64	3,40	2,03	4,16	1,64	2,35		
Methanotherix sp.	7,49	0	0	0	0	0,06	2,85	3,41	1,95	2,11	0,04	1,30	24	
Σ Ацетокластических МГ	7,49	0	0	0	0	0,06	2,85	3,41	1,95	2,11	0,04	1,30		
Methanosarcinales	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	6098	
Methanosarcina sp.	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	5603	
Methanosarcina subterranea	0,78	0	0	0	0	0	0,13	0	0,33	0,07	0	0,36	434	
Σ Миксотрофных МГ	0,91	0	0	0	0	0	0,13	0,00	0,33	0,07	0	0,36		
Methanomassiliicoccales	0,34	0	0	0	0	0,02	0,23	0,64	0,72	0,58	0,14	0,34	31	
Methanomassiliicoccales	0,20	0	0	0	0	0,01	0,03	0,04	0,02	0,01	0	0	4201	
Methanomassiliicoccales	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1416	
Σ Метилредуцирующих МГ	0,58	0	0	0	0	0,03	0,26	0,68	0,74	0,60	0,14	0,34		
Σ всех метаногенов	17,64	0,02	0	0	0	0,16	5,89	7,48	5,05	6,93	1,82	4,34		
МОБ														
Methyloparacoccus sp.	0,78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2662	
Methylobacter sp.	0,60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5269	
Methylobacter sp.	0,58	0,005	0	0	0	0,015	0,26	0,22	0,14	0,013	0	1,54	63	
Methylobacter sp.	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1387	
Methylobacter sp.	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0	0	0	4112	
Methylococcaceae	0,09	0	0	0	0	0	0	0,008	0	0	0	0,03	1377	
Methylicorpusculum sp.	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1440	
Methylolobus sp.	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4132	
Methylococcus sp.	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5175	
Methylomonas sp.	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6164	
Methylobacter sp.	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0,003	0	0,06	523	
Methylobacter sp.	0,02	0	0	0	0	0	0,01	0,01	0,236	0,55	0,003	0,01	229	
Σ Gamma-МОБ	2,59	0,005	0	0	0	0,02	0,27	0,23	0,38	0,57	0	1,64		
Methylocystaceae	0,05	0,005	0	0	0	0	0	0	0,007	0	0	0,03	2454	
Σ Alpha-МОБ	0,05	0,005	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0,03		
Σ всех МОБ	2,65	0,010	0	0	0	0,02	0,27	0,23	0,39	0,57	0,00	1,67		

Рис. 3. Относительная численность метаногенных архей (МГ) и аэробных метаноокисляющих бактерий (МОБ) в микробиоме веслоногих рачков и в фоновых образцах воды и осадков оз. Шобайдак-Кель (% от общего количества последовательностей гена 16S рРНК).

метана в аэробных водах (Bižić et al., 2020). Однако в копеподах из оз. Шобайдак-Кель цикл метана замкнут, поскольку в их микробиоме присутствовала разнообразная популяция аэробных МОБ. Относительная численность МОБ в микробиоме рачков составляла 2.65%. Подавляющее большинство (2.59%) последовательностей принадлежало МОБ типа I класса *Gammaproteobacteria* (Gamma-МОБ), ближайшими родственниками которых являлись некультивируемые представители родов *Methylobacter*, *Methyloparacoccus*, *Methylicorpusculum*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas* (рис. 3). В микробиоме доминировали (1.5%) представители рода *Methylobacter* (6 филогенов). На втором месте по относительной численности стояли представители рода *Methyloparacoccus* (0.78%, 1 филоген). Все

последовательности МОБ типа II класса *Alphaproteobacteria* (Alpha-МОБ) принадлежали некультивируемым представителям семейства *Methylocystaceae*. Из 13 филогенов МОБ, детектированных в микробиоме рачка, 7 присутствовали в воде и осадках озера (рис. 3).

Метанотрофные эндосимбионты, обитающие в жаберных тканях беспозвоночных животных, хорошо известны (Distel et al., 1995; Пименов и соавт., 2002). Последовательности МОБ и метилотрофов также ранее детектировали в микробиомах копепод (Samad et al., 2020; Sadaipappan et al., 2021). Мы предполагаем, что обмен метаном между метаногенами и метанотрофами происходит в кишечнике рачка в анаэробных условиях при близком контакте целевых микроорганизмов.

В микробиоме рачка доминировали представители родов МОБ, которых в последние годы все чаще детектируют в бескислородных зонах различных водоемов. Вопрос о том, как аэробные МОБ выживают и окисляют метан в анаэробных условиях, в настоящее время крайне актуален и привлекает внимание многих ведущих мировых специалистов (Reis et al., 2024). Согласно нашей гипотезе, отдельные представители аэробных МОБ осуществляют окисление метана в анаэробных условиях за счет процесса NO-дисмутации, побочным продуктом которого является O_2 (Kallistova et al., 2024). Окись азота может образовываться внутри рачка, благодаря активности как самих МОБ (из нитрата и нитрита), так и органотрофных микроорганизмов микробиома, способных к денитрификации (*A. temperans*) и нитратредукции (*F. restrictum*).

Таким образом, внутри копепод происходит круговорот метана, благодаря присутствию органотрофных микроорганизмов, обеспечивающих метаногенных архей субстратами, и метанотрофных бактерий, окисляющих образуемый метан.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность заместителю директора по научной работе Тебердинского национального парка Текееву Д.К. и командиру Домбайского военизированного противолавинного отряда Ткаченко В.И. за помощь в организации экспедиции и полевых работах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00038.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каллистова А.Ю., Косякова А.И., Русанов И.И., Кадников В.В., Белецкий А.В., Коваль Д.Д., Юсупов С.К., Зеккер И., Пименов Н.В. Образование метана в пресном озере умеренного пояса в период интенсивного цветения цианобактерий // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 477–489.
<https://doi.org/10.31857/S0026365623600256>
- Kallistova A.Yu., Kosyakova A.I., Rusanov I.I., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Koval' D.D., Yusupov S.K., Zekker I., Pimenov N.V. Methane production in a temperate freshwater lake during an intense cyanobacterial bloom // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 638–649.
<http://doi.org/10.1134/S0026261723601586>
- Пименов Н.В., Калюжная М.Г., Хмеленина В.М., Митюшина Л.Л., Троценко Ю.А. Потребление метана и углекислоты симбиотрофными бактериями в жабрах митилид (*Bathymodiolus*) гидротермальных полей Рейнбоу и Логачев Срединно-Атлантического хребта // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 681–689.
- Pimenov N.V., Kalyuzhnaya M.G., Khmelennina V.N., Mityushina L.L., Trotsenko Yu.A. Utilization of methane and carbon dioxide by symbiotrophic bacteria in gills of *Mytilidae* (*Bathymodiolus*) from the Rainbow and Logachev Hydrothermal Fields on the Mid-Atlantic Ridge // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 587–594.
<https://doi.org/10.1023/A:1020519105618>
- An D.S., Kim S.G., Ten L.N., Cho C.H. *Pedobacter dae-chungensis* sp. nov., from freshwater lake sediment in South Korea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 69–72.
<http://doi.org/10.1099/ijls.0.001529-0>
- Bižić M., Grossart H.-P., Ionescu D. Methane Paradox // eLS / Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2020. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028892>
- Collins M.D., Rodrigues U.M., Dainty R.H., Edwards R.A., Roberts T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 75. P. 235–240.
[http://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90410-p](http://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90410-p)
- Cui S., Ding R., Wang Q., Li Y., Chen F. Upward migration of calanoid copepods is driven by high food quality in surface waters in an alpine lake // Freshwater Biol. 2023. V. 68. P. 2120–2130.
<https://doi.org/10.1111/fwb.14179>
- Distel D.L., Lee H.K.-W., Cavanaugh C.M. Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 9598–9602.
<http://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9598>
- Feng J., Mazzei M., Di Gregorio S., Niccolini L., Vitiello V., Ye Y., Guo B., Yan X., Buttino I. Marine copepods as a microbiome hotspot: revealing their interactions and biotechnological applications // Water. 2023. V. 15. Art. 4203.
<https://doi.org/10.3390/w15244203>
- Fischer J.M., Olson M.H., Theodore N., Williamson C.E., Rose K.C., Hwang J. Diel vertical migration of copepods in mountain lakes: the changing role of ultraviolet

- radiation across a transparency gradient // *Limnol. Oceanogr.* 2015. V. 60. P. 252–262.
<https://doi.org/10.1002/lno.10019>
- Jezbera J., Sharma A.K., Brandt U., Doolittle W.F., Hahn M.W. “*Candidatus Planktophilum limnetica*”, an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 2864–2869.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.010199-0>
- Jogler M., Chen H., Simon J., Rohde M., Busse H.J., Klenk H.P., Tindall B.J., Overmann J. Description of *Sphingorhabdus planktonica* gen. nov., sp. nov. and reclassification of three related members of the genus *Sphingopyxis* in the genus *Sphingorhabdus* gen. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1342–1349.
<http://doi.org/10.1099/ijs.0.043133-0>
- Kallistova A., Oshkin I., Rusanov I., Kadnikov V., Yusupov S., Zekker I., Pimenov N. Profile distribution of methane oxidation in reduced lake sediments suggests utilization of NO-dismutation pathway by aerobic methanotrophic bacteria // Preprint. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4805437>,
<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4805437>
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Mamiy D.D., Klyukina A.A., Slobodkin A.I. Phenotypic and genomic characterization of *Bathymarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., a cultivated representative of the archaeal class *Bathymarchaeia* // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1214631.
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214631>
- Oksanen J., Simpson G., Blanchet F., Kindt R., Legendre P., Minchin P., O'Hara R., Solymos P., Stevens M., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Carvalho G., Chirico M., De Caceres M., Durand S., Evangelista H., FitzJohn R., Friendly M., Furneaux B., Hannigan G., Hill M., Lahti L., McGlinn D., Ouellette M., Ribeiro Cunha E., Smith T., Stier A., Ter Braak C., Weedon J. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-4, 2022.
<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Protasov E., Nonoh J.O., Kästle Silva J.M., Mies U.S., Hervé V., Dietrich C., Lang K., Mikulski L., Platt K., Poehlein A., Köhler-Ramm T., Miambi E., Boga H.I., Feldewert C., Ngugi D.K., Plarre R., Sillam-Dussès D., Šobotník J., Daniel R., Brune A. Diversity and taxonomic revision of methanogens and other archaea in the intestinal tract of terrestrial arthropods // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1281628.
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1281628>
- Reis P.C.J., Tsuji J.M., Weiblen C., Schiff S.L., Scott M., Stein L.Y., Neufeld J.D. Enigmatic persistence of aerobic methanotrophs in oxygen-limiting freshwater habitats // *ISME J.* V. 18. Art. wrae041.
<http://doi.org/10.1093/ismejo/wrae041>
- Sadaippan B., Prasanna Kumar C., Nambiar V.U., Subramanian M., Gauns M.U. Meta-analysis cum machine learning approaches address the structure and biogeochemical potential of marine copepod associated bacteriobiomes // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 3312.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82482-z>
- Samad M.S., Lee H.J., Cerbin S., Meima-Franke M., Bodelier P.L.E. Niche differentiation of host-associated pelagic microbes and their potential contribution to biogeochemical cycling in artificially warmed lakes // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 582.
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00582>
- Sheu S.Y., Sheu D.S., Sheu F.S., Chen W.M. *Gemmobacter tilapia* sp. nov., a poly-β-hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater pond // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1550–1556.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.044735-0>
- Vakati V., Fuentes-Reines J.M., Wang P., Wang J., Dodsworth S. A summary of *Copepoda*: synthesis, trends, and ecological impacts // *J. Oceanol. Limnol.* 2023. V. 41. P. 1050–1072.
<https://doi.org/10.1007/s00343-022-1309-9>
- Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.
<https://ggplot2.tidyverse.org>
- Willems A., Falsen E., Pot B., Jantzen E., Hoste B., Vandamme P., Gillis M., Kersters K., De Ley J. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990. V. 40. P. 384–398.
<https://doi.org/10.1099/00207713-40-4-384>
- Yan Z.F., Lin P., Won K.H., Yang J.E., Li C.T., Kook M., Yi T.H. *Altererythrobacter deserti* sp. nov., isolated from desert soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 3806–3811.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002197>
- Zhang G.Q., Yang L.L., Liu Q., Liu H.C., Zhou Y.G., Xin Y.H. *Flavobacterium restrictum* sp. nov., *Flavobacterium rhamnosiphilum* sp. nov., and *Flavobacterium zepuense* sp. nov. isolated from glaciers // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 4583–4590.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004317>
- Zhilina T.N., Appel R., Probian C., Brossa E.L., Harder J., Widdel F., Zavarzin G.A. *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake // *Arch. Microbiol.* 2004. V. 182. P. 244–253.
<https://doi.org/10.1007/s00203-004-0722-0>

SHORT COMMUNICATIONS

Microorganisms of the Methane Cycle in Copepods from a High-Altitude Lake

A. Yu. Kallistova^{1, *}, V. V. Kadnikov¹, A. V. Beletsky¹, N. V. Pimenov¹

¹*Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia*

**e-mail: kallistoanna@mail.ru*

Abstract. The microbiome of copepods of the genus *Diaptomus* from a high-altitude lake at Western Caucasus was investigated using 16S rRNA gene profiling. Aerobic and anaerobic organotrophic microorganisms, methanogenic archaea, and aerobic methane-oxidizing bacteria (MOB) constituted the basis of the microbiome. The symbionts and bacteria of the copepod diet were revealed. Anaerobic organotrophic microorganisms inhabiting the copepods provide the substrates for methanogens, the second most abundant physiological group of prokaryotes in the microbiome. Acetoclastic methanogens of the genus *Methanotrix* and hydrogenotrophic methanogens of the genera *Methanobacterium* and *Methanoregula* were predominant. The methane cycle within the copepods was closed, since their microbiome contained a diverse population of aerobic MOB, among which members of the genera *Methylobacter* and *Methyloparacoccus* (class *Gammaproteobacteria*) predominated. Methane exchange between methanogens and methanotrophs occurs probably in the anoxic environment of the copepod intestine under direct contact of the target microorganisms.

Keywords: *Copepoda*, microbiome, organotrophic microorganisms, methanogenic archaea, methanotrophic bacteria, high-altitude lakes