

Павлова

ПАВЛОВА Ольга Николаевна

**МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА
ОСАДОЧНЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ
В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ**

1.5.11. – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в лаборатории микробиологии углеводов в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологическом институте Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск.

Научный консультант:

Земская Тамара Ивановна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии углеводов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Котова Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Вайнштейн Михаил Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Немировская Инна Абрамовна, доктор геолого-минералогических наук, главный научный сотрудник Аналитической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Защита состоится « 09 » октября 2025 года в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке ИНМИ РАН по адресу 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_pavlovoy-o-n.html

Автореферат разослан « _____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Морские и пресноводные осадки – крупнейший резервуар органического углерода, населенный разнообразными микробными сообществами (Hedges, Keil, 1995; Parkes et al., 2000; Zinger et al., 2011). Бактерии и археи играют ключевую роль в реминерализации органического вещества, круговороте питательных веществ и передаче энергии в осадочной толще (Mason et al., 2009). Их метаболическая активность оказывает значительное влияние на биогеохимические циклы углерода, азота и серы в глобальном масштабе (Bernier, 1982; Nealson, 1997; Orcutt et al., 2011; Zhang et al., 2021). Деятельность микроорганизмов определяет практически все процессы, протекающие в донных осадках в диагенезе и раннем катагенезе. По мере накопления отложений в течение геологического времени микробная жизнь сохраняется, но темпы ее роста снижаются из-за истощения акцепторов электронов и уменьшения реакционной способности субстратов с увеличением глубины, что приводит к формированию глубинной биосферы (D'Hondt et al., 2004, 2019; Jorgensen, Marshall, 2016; Zhang et al., 2021).

Проницаемые зоны тектонических нарушений, углеводородные сипы и гидротермальные выходы, связанные со срединно-океаническими хребтами, рассматриваются как «окна» между верхней частью литосферы и биосферой Земли (Orcutt et al., 2011; Edwards et al., 2012). Совместно с потоками глубинных флюидов, насыщенных углеводородами и другими соединениями, которые образуются в осадочной толще в результате термогенной активации и разложения керогена, в верхние слои осадка могут поступать представители глубинных микробных сообществ (Horsfield et al., 2006; Parkes et al., 2007; Chakraborty et al., 2020; Gittins et al., 2022).

Озеро Байкал, расположенное в зоне активного рифта, характеризуется разгрузкой минерализованных газосодержащих флюидов, естественными выходами нефти и залежами газовых гидратов (Конторович и др., 2007; Khlystov et al., 2022). Выходы углеводородов приурочены к разрывным нарушениям, имеющим глубокие корни, активность которых во многом связана с сейсмической активностью Байкальской впадины (Khlystov et al., 2013). Такие районы характеризуются повышенными тепловыми потоками, связанными с восходящими по разломам гидротермальными флюидами (Голубев, 1979; Дучков и др., 1999; Van Rensbergen et al., 2002). Биомаркерные показатели катагенеза в разгружающейся нефти, изотопный состав газа, присутствие мантийного гелия, тяжелого кислорода, дейтерия в газовых гидратах свидетельствуют о том, что в отдельных районах озера поступление нефти и газов к поверхности дна, где температура близка к 4°C, происходит с глубин не менее 2–3 км, характеризующихся термобарическими условиями (Конторович и др., 2007; Poort et al., 2012; Khlystov et al., 2013; Крылов и др., 2023). Очевидно, что в районах озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, могут действовать те же механизмы, что и в океане, обеспечивающие поступление микроорганизмов, в том числе и термофильных, из зоны миграции углеводородов в поверхностные осадки.

Вместе с тем термофильные микробные сообщества глубинных слоев осадков в районах разгрузки углеводородов остаются «темной материей». Прокариоты могут обладать метаболизмом, нехарактерным для типовых видов, осуществлять преобразование органического вещества в термобарических условиях, вносить значительный вклад в процессы анаэробного окисления нефти и образования углеводородов в донных осадках оз. Байкал. Изучение этих процессов представляется важным и актуальным. В случае оз. Байкал, мирового хранилища пресной воды, особое

значение имеет характеристика процессов, происходящих с нефтью на дне, в водной толще и на его поверхности, а также отклика микробных сообществ на происходящие изменения.

Состояние вопроса. Самые ранние свидетельства существования глубинных экосистем появились в 1920-х годах в результате исследований нефтяных резервуаров, проводившихся российскими и американскими исследователями (Беляев и др., 2004). Полученные данные стали доказательством существования активных микроорганизмов в глубоких недрах за много лет до того, как были начаты исследования, сосредоточенные на их изучении (Roadifer, 1987; Head et al., 2010). В настоящее время знания, полученные при исследовании глубинной биосферы, сводятся к следующему: глубинная биосфера представляет собой мир, который можно рассматривать как своего рода «подземный Галапагос», и включает в себя представителей всех трех доменов жизни: бактерий, архей и эукариот; при этом два домена – бактерии и археи – в ней доминируют. Среди них множество различных групп организмов, большинство из которых еще предстоит обнаружить и/или охарактеризовать. Изучение этой так называемой микробной «темной материи» может значительно расширить наше представление о древе жизни (The Deep Carbon Observatory, 2018).

Знания о микроорганизмах, населяющих глубинные экосистемы, основываются на данных, полученных в разных районах Мирового океана (Oremland et al., 1982; Gold, 1992; Pedersen et al., 2000; Fry et al., 2008; Chivian et al., 2008; Orcutt et al., 2011; Edwards et al., 2012; Bell, Heuer, 2012; D'Hondt et al., 2014; Inagaki et al., 2015; Kieft, 2016; Schippers, 2016; Fang et al., 2017; Momper et al., 2017; Govil et al., 2019; Sar et al., 2019; Boll et al., 2020; Heuer et al., 2020; Gittins et al., 2022, 2023; Escudero, Amils, 2023).

В России исследования микроорганизмов глубинных экосистем проводятся специалистами ФИЦ Биотехнологии РАН, Национального исследовательского Томского государственного университета и другими (Miroshnichenko et al., 2002, 2010; Bonch-Osmolovskaya, 2003, 2012; Slobodkina et al., 2009a, б, 2012, 2013, 2017; Merkel et al., 2013; Slobodkin et al., 2013; Podosokorskaya et al., 2013, 2014; Слободкин, Слободкина, 2014; Frank et al., 2016; Mardanov et al., 2016, 2020; Gavrillov et al., 2017; Kadnikov et al., 2017, 2018, 2019, 2020a, б; Karnachuk et al., 2019, 2021, 2023, 2024; Лукина и др., 2020; Кадников и др., 2021; Nazina et al., 2023).

В статье Биддл Дж. с соавторами «Prospects for the study of evolution in the deep biosphere» (Front. Microbiol., 2012) отмечено, что одними из перспективных мест изучения глубинной биосферы являются рифтовые озера, в частности озеро Байкал. В оз. Байкал глубинная биосфера «соприкасается» с поверхностной через выходы нефти- и газонасыщенных флюидов и грязевые вулканы. Учитывая геологические особенности озера, академиком М.А. Грачевым и д.б.н. Т.И. Земской была высказана гипотеза о том, что в оз. Байкал могут действовать схожие механизмы поступления прокариот из зоны генерации углеводородов в поверхностные осадки вместе с газонасыщенными флюидами, как это было выявлено для холодноводных морских осадков. Тем самым было положено начало изучению микробных сообществ осадочной толщи оз. Байкал в районах разгрузки углеводородов.

Ранее было установлено, что развитие определенных физиологических групп микроорганизмов в донных отложениях и филогенетический состав микробных сообществ определяется доступностью субстратов, окисленными или восстановленными условиями на определенных глубинах осадочной толщи (Намсараев и др., 1994; Намсараев, Земская, 2000; Земская и др., 2001, 2008; Клеркс и др., 2003;

Шубенкова и др., 2005; Черницына и др., 2007, 2016; Zemskaya et al., 2010, 2012; Пименов и др., 2014). Изучение филогенетического состава микробных сообществ донных осадков оз. Байкал в районе Академического хребта в 100-метровом керне глубоководного бурения ВДР-96 показало, что последовательности байкальских микроорганизмов образовывали кластеры с неклассифицируемыми бактериями (Ханаева и др., 2010). Особое внимание было уделено исследованию районов естественных нефтепроявлений, где с использованием методов высокопроизводительного секвенирования был изучен состав микробных сообществ донных осадков и битумных построек (Ломакина и др., 2009; 2014; Kadnikov et al., 2013; Likhoshvay et al., 2013; 2014; Zemskaya et al., 2015).

Исследования районов озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, были проведены с привлечением современных методов. Вместе с тем отсутствовали культуры термофильных микроорганизмов как прямое доказательство существования жизнеспособных термофильных прокариот в донных отложениях оз. Байкал. Если термофильные микроорганизмы будут выявлены в низкотемпературных осадках озера, то каков их источник – гидротермы на побережье озера или глубинные флюиды? Процессы преобразования органического вещества микробными сообществами донных отложений оз. Байкал в термобарических условиях ранее не изучались. К постоянным компонентам экосистемы восточного побережья центральной котловины озера относится нефть. Оставался открытым вопрос о разнообразии, ключевых участниках и потенциальной функциональной роли микробных сообществ осадочной толщи в процессах анаэробного окисления нефти, сопровождаемого образованием углеводородных газов. Несмотря на то, что предметом диссертации являются микробные сообщества осадочных отложений озера Байкал, важно учитывать аэробные процессы биodeградации углеводородов, которые взаимосвязаны в экосистеме оз. Байкал. Таким образом, очевидна необходимость проведения комплексных исследований осадочной толщи в районах разгрузки углеводородов в рифтовом озере Байкал.

Цель работы – изучить разнообразие, метаболизм и роль микроорганизмов осадочных отложений оз. Байкал в районах разгрузки нефте- и газонасыщенных флюидов в процессах образования и окисления углеводородов.

В связи с поставленной целью сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести поиск термофильных прокариот в донных осадках и установить источник их поступления, оценить таксономическое разнообразие; изучить метаболизм чистых культур термофильных микроорганизмов.
2. В экспериментальных условиях, характерных для тектонически активной зоны озера Байкал (80°C, 5 МПа), оценить способность микробных сообществ донных осадков осуществлять трансформацию органического вещества с образованием компонентов нефти.
3. На основе экспериментальных и геномных данных определить функциональную роль микробных сообществ в анаэробных процессах биodeградации нефти (в психрофильных и термофильных условиях).
4. Оценить углеводородоксиляющую активность микробных сообществ в аэробных условиях, в том числе наличие генов аэробного окисления *n*-алканов и способность к синтезу поверхностно-активных веществ, с выявлением штаммов, перспективных для биотехнологических целей.

5. Оценить разнообразие микробных сообществ донных осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводородов.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые подтверждено присутствие жизнеспособных термофильных микроорганизмов в низкотемпературных (+4°C) осадках оз. Байкал в районах разгрузки углеводородов. Выделены и охарактеризованы чистые культуры термофильных факультативно-анаэробных бактерий рода *Thermaerobacter* sp. PB12/4term (VKM B-3151) и рода *Thermicanus* sp. (PB15/Grf7geo). Штамм *Thermaerobacter* sp. обладает нехарактерным для типовых видов метаболизмом, изолят *Thermicanus* sp. может быть отнесен к новому виду этого рода. Поступление термофильных микроорганизмов осуществляется с потоками флюидов из глубинной осадочной толщи.

Впервые, при воспроизведении условий, характерных для зоны генерации углеводородов (80°C, 5 МПа), в серии экспериментов с донными осадками озера Байкал установлена способность микробных сообществ осуществлять преобразование органического вещества (биомассы диатомовых водорослей) с образованием дибензотиофенов, три- и моноароматических стероидов, ретена и гаммацереана. Участие микроорганизмов в образовании ретена предполагалось и ранее, но экспериментально подтверждено впервые.

Впервые оценена функциональная активность микробных сообществ в процессах анаэробного окисления нефти в психрофильных и термофильных условиях. Экспериментально показано образование углеводородных газов (метана и этана) в процессе анаэробной деградации нефти. Установлено, что степень биodeградации углеводородов нефти достигает 65% в психрофильных условиях и 89% в термофильных. Выявлены основные участники окисления нефти в донных осадках оз. Байкал. Впервые показано, что реконструированные геномы бактерий и архей содержат функциональные гены активации углеводородов путем анаэробного гидроксирования, присоединения фумарата и деароматизации, а также гены, катализирующие метаболизм промежуточных ароматических соединений и отвечающие за синтрофные превращения углеводородов.

Проведены многолетние исследования в районах естественных нефтепроявлений в оз. Байкал. В чистую культуру получено более 100 деструкторов нефти, обладающих генами аэробного окисления *n*-алканов и образующих поверхностно-активные вещества. Впервые с использованием штамма *Rhodococcus erythropolis* предложено применение биостимуляторов роста углеводородоокисляющих бактерий. При использовании протатранов в микроконцентрациях скорость роста *Rhodococcus erythropolis* увеличивалась в 2–16 раз при низкой положительной температуре (+10°C), характерной для почв северных регионов, а также вод арктических морей и озера Байкал.

Полученные в работе данные дают новые знания о разнообразии, метаболизме и функциональной роли микроорганизмов осадочной толщи в районах разгрузки углеводородов в процессах их окисления и образования.

Практическая значимость работы. Выделенная и описанная в работе чистая культура, отнесенная к роду *Thermaerobacter* sp. PB12/4term, депонирована во Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM B-3151) и доступна для научной общественности как объект для дальнейших исследований. Непосредственное биотехнологическое применение могут найти протатраны в качестве биостимуляторов роста углеводородоокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis*. Изобретение может

быть использовано при разработке ускоренных и экологически безопасных методов очистки и восстановления объектов окружающей среды, загрязненных нефтью или нефтепродуктами в микроконцентрациях и при низких положительных температурах, характерных для почв северных регионов, а также вод арктических морей и озера Байкал (Патент на изобретение № 2694593, 2019). Полученные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов, образующие биосурфактанты, могут быть использованы для создания биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненных объектов. Полученные знания об образовании биомаркеров нефти в донных осадках, в частности ретена, используемых при описании палеоклимата, позволят более корректно интерпретировать процессы, происходившие в далеком прошлом.

Защищаемые положения:

1. В низкотемпературных осадках озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, выявлены жизнеспособные термофильные микроорганизмы. Полученные факультативно-анаэробные термофильные изоляты либо обладают нехарактерным для типовых видов метаболизмом, либо могут быть отнесены к новым видам.

2. Поступление термофильных микроорганизмов осуществляется с потоками газо- и нефтенасыщенных флюидов из зоны генерации углеводородов. Как и в Мировом океане, в оз. Байкал действует механизм геологической микробной петли жизнеспособных прокариот, циркулирующих из глубинной биосферы и обратно в нее. Поступающие флюиды влияют на структуру микробных сообществ и обуславливают значительную долю представителей «редкой биосферы» в осадочной толще.

3. В условиях, характерных для зоны генерации углеводородов (80°C, 5 МПа), микробные сообщества донных осадков осуществляют преобразование органического вещества (биомассы диатомовых водорослей) с образованием биомаркеров нефти (ретена и гаммацерена), дибензотиофенов, три- и моноароматических стероидов.

4. Постоянство площади нефтяного высачивания в двух районах нефтепроявлений оз. Байкал обусловлено деятельностью микроорганизмов, в геномах которых присутствуют функциональные гены, вовлеченные в аэробный и анаэробный катаболизм углеводородов, и обладающих способностью к синтезу биосурфактантов.

Апробация работы. Основные результаты исследования доложены на 4-ой, 5-ой, 6-ой Верецагинской Байкальской конференции, Иркутск, 2005; 2010; 2015; 3-м, 4-м, 5-м, 6-м Байкальском микробиологическом симпозиуме, Иркутск, 2011; 2015; 2020; 2024; III International Conference «Biosphere Origin and Evolution», Rethymno, Greece, 2011; VII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2013; 10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, 2014; 13th International Conference on «Gas in marine sediments», Tromsø, Norway, 2016; 13th International Conference on Salt Lake Research, Ulan-Ude, 2017; 12th International Congress of Extremophiles, Ischia, Italy, 2018; Международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы», Иркутск, 2018; Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания», Иркутск, 2019; I-ом, II-ом, III-ем, IV-ом Российском микробиологическом конгрессе, Пушкино, 2017; Саранск, 2019; Псков, 2021; Томск, 2023; X Международной научно-практической конференции «Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа», Томск, 2023.

Публикации. Материалы диссертации содержатся в 65 печатных работах, включающих 29 экспериментальных статей, 1 главу в монографии, 1 патент и 34 тезиса.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, основной части, включающей 7 глав, заключения и выводов, изложенных на 284 страницах, включая 88 рисунков, 13 таблиц, списка цитируемой литературы, содержащего 871 наименование, из них 144 на русском и 727 английском языках.

Личный вклад соискателя состоял в постановке проблемы, выборе методов исследования, личном участии в лабораторных экспериментах и научном руководстве студентами и аспирантами, выполнявшими работы по защищаемой теме, а также в обобщении и интерпретации результатов. Автор принимал непосредственное участие во всех экспедициях, результаты которых вошли в диссертацию. В работах, выполненных в соавторстве, вклад соискателя заключался в постановке научных задач, непосредственном участии в получении материалов и участии во всех этапах исследований, а также в их обсуждении и подготовке публикаций.

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории микробиологии углеводородов ЛИИ СО РАН.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному консультанту и наставнику д.б.н. Т.И. Земской за плодотворные дискуссии, всестороннюю помощь в проведении исследований и поддержку.

Автор выражает искреннюю благодарность академику РАН, д.х.н. М.А. Грачеву[†] за ценные практические советы и обсуждение полученных результатов, О.М. Хлыстову и А.В. Хабуеву за помощь в отборе проб донных осадков и интерпретацию геологических данных, к.г.н. В.Г. Иванову, к.г.-м.н. Г.В. Калмычкову[†] за проведение газовой хроматографического анализа, д.х.н. А.Ю. Манакову за совместное проведение термобарических экспериментов, д.г.-м.н. В.И. Москвину и к.г.-м.н. Е.А. Костыревой за проведение анализа состава и содержания органического вещества донных отложений, к.х.н. А.Г. Горшкову, О.Н. Изосимовой, к.х.н. А.А. Никоновой, к.х.н. Г.А. Федоровой за проведение анализа убыли нефтяных углеводородов в условиях эксперимента, определение состава жирных кислот, масс-спектрометрическое исследование фракций биоПАВ, к.г.-м.н. Т.В. Погодаевой за предоставление данных химического состава поровых вод, к.б.н. М.Р. Кабилову за проведение совместного исследования генома термофильного микроорганизма, к.х.н. С.Н. Адамовичу за предоставление синтезированных стимуляторов роста, сотрудникам ЦКП «Электронная микроскопия» ЛИИ СО РАН за содействие в проведении электронной микроскопии, а также всем сотрудникам лаборатории микробиологии углеводородов за практическую помощь и ценные советы на всех этапах работы.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность исследований, сформулированы цель и задачи, отражена научная новизна и значимость полученных результатов, приведены защищаемые положения и сведения об апробации работы.

Глава 1. Обзор литературы

В главе изложены данные литературы об осадочной толще как среде обитания микроорганизмов, ее объемах, факторах, влияющих на жизнь в глубинных слоях донных отложений, источниках энергии и метаболизме, разнообразии прокариот. Приведена информация о распространении и таксономическом разнообразии термофильных микроорганизмов в холодноводных экосистемах. Изложены сведения о роли прокариот глубинных экосистем в процессах образования и окисления углеводородов, а также об озере Байкал как об объекте исследований осадочной толщи,

ассоциированной с разгрузкой углеводородов. В заключении приводятся обобщающие сведения о результатах, полученных в рамках данного исследования.

Глава 2. Объекты и методы исследования

В главе изложены материалы и методы, использованные в процессе выполнения экспериментальных работ. Отбор проб донных осадков (ДО) проводили с помощью бентосной трубки, гравитационной трубы с пластиковым вкладышем с борта НИС «Г.Ю. Верещагин» в период с 2006 по 2022 гг. Пробы воды отбирали системой батометров SBE 32 Carousel Water Sampler (таблица).

Таблица. Сведения о районах отбора проб и проведенных исследованиях

Исследование / условия инкубации /	Район отбора проб / сокращение / / температура в источнике
Поиск термофильных микроорганизмов /60°C	Метановый сип Посольская Банка / м/с ПБ
	Грязевой вулкан Кукуй / г/в К-2
	Нефте-метановый сип Горевой Утес / н-м/с ГУ
	Фоновый район, Академический хребет / АХ
Термобарическое преобразование органического вещества / 80°C, 5 МПа	Метановый сип Голоустное / м/с Гол
	Метановый сип Посольская Банка / м/с ПБ
	Грязевой вулкан Хобой (Академический хребет) / г/в Х
Образование углеводородных газов /10°C	Метановый сип Посольская Банка / м/с ПБ
Анаэробное окисление нефти /10°C /60°C	Нефте-метановый сип Горевой Утес / н-м/с ГУ
	Нефте-метановый сип Зеленсип / н-м/с ЗС
	Нефте-метановый сип Зеленсип / н-м/с ЗС
Реконструирование MAGs	Нефте-метановый сип Зеленсип / н-м/с ЗС
Метабаркодинговые исследования	Нефте-метановый сип Горевой Утес / н-м/с ГУ
	Нефте-метановый сип Зеленсип / н-м/с ЗС
	Грязевой вулкан Кедр / г/в КР
	Грязевой вулкан Кукуй / г/в К
	Грязевой вулкан Маленький / г/в М
	Фоновый район (Южный Байкал) / ЮБ
	Фоновый район (Северный Байкал) / СБ
	Горячий ист. Котельниковский (82°C, 59°C, 32°C) / Кот
	Горячий ист. Хакусский (44.8°C, 24°C) / Хак
	Горячий ист. Змеиный (42.6°C, 39°C, 18.8°C) / Зм
	Горячий ист. Давшинский / (37.5°C, 6°C) / Д
Аэробные углеводородокисляющие микроорганизмы	Нефте-метановый сип Горевой Утес / ГУ
	Нефтепроявление (устье р. Б. Зеленовская) / БЗ

Для получения анаэробных термофильных накопительных культур и чистой культуры штамма *Thermaerobacter* sp. PB12/4term образцы ДО асептически отбирали из центральной части керна и сразу помещали во флаконы, содержащие бескислородную минеральную среду (БМС) следующего состава (г/л): NaCl – 0.3; NH₄Cl – 0.33; KH₂PO₄ – 0.33; MgCl₂ x 6H₂O – 0.33; CaCl₂ x 2H₂O – 0.33; NaHCO₃ – 1; резазурин – 0.001; Na₂S · 9H₂O – 0.3; дрожжевой экстракт – 1; 1 мл раствора витаминов, 1 мл раствора микроэлементов (Практикум..., 2005) и газовую смесь H₂:CO₂ (80:20). Культивирование проводили при 60°C.

После получения чистой культуры *Thermaerobacter* sp. PB12/4term и определения ее таксономической принадлежности культивирование проводили на аэробной модифицированной среде 514 DSMZ (АМС) с пониженным содержанием солей, содержащей пептон (1.25 г/л) и дрожжевой экстракт (0.25 г/л). Способность изолята PB12/4term использовать различные органические соединения в качестве источника углерода и энергии в аэробных условиях тестировали на среде АМС, не содержащей пептон и дрожжевой экстракт. В минеральную среду вместо этих компонентов вносили органические кислоты, сахара или пептиды в концентрации 3 г/л и спирты – 5 мл/л.

Для определения субстратов, используемых в анаэробных хемолитотрофных условиях, и влияния концентрации CO₂ на рост штамма PB12/4term, изолят культивировали на среде БМС, не содержащей дрожжевой экстракт. Тестировали молекулярный водород в качестве донора электронов, S⁰ (5 г/л), Na₂S₂O₃ x 5H₂O, Na₂SO₄, NaNO₃, NaNO₂ (1 г/л каждого), O₂ (1–20% о/о) в качестве акцепторов электронов и CO₂ как источник углерода. Для изучения влияния концентрации CO₂ на рост штамма PB12/4term в БМС добавляли Na₂S₂O₃ x 5H₂O (1 г/л) в качестве акцептора электронов. Газовую фазу заменяли необходимыми количествами H₂:CO₂ (60:40, 80:20, 95:5, 98:2 или 99:1) (Steffens et al., 2021). Культивирование проводили при 60°C.

Гетеротрофный рост в анаэробных условиях определяли в БМС без добавления NaHCO₃ в атмосфере азота. В качестве акцепторов электронов использовали NaNO₃ (10 мМ), NaNO₂ (2,5 мМ), Na₂SO₄ (14 мМ), S⁰ и Na₂S₂O₃ x 5H₂O (15 мМ); глюкозу, фруктозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, арабинозу, маннозу, маннит, крахмал, пептон, триптон, дрожжевой экстракт (0.2% каждого), ацетат (10 мМ), глицерин (20 мМ) и этанол (20 мМ) в качестве доноров электронов. В качестве контроля тестировали рост на средах без внесения субстрата. Рост клеток оценивали с помощью микроскопии. Субстрат считали используемым, если концентрация клеток, по меньшей мере, в три раза превышала рост в контроле. Все эксперименты проводили в трех повторностях (Pavlova et al., 2023).

Выделение штамма PB15/Grf7geo проводили на модифицированной среде Видделя для пресноводных форм (Kojima, Fukui, 2010), содержащей полный набор витаминов, дрожжевой экстракт (0.5 г/л), ацетат натрия (1 г/л), лактат натрия (14 мМ). Модификация заключалась в пониженном содержании солей, исключении сульфата и включении Na₂S₂O₃ x 5H₂O (10 мМ) и KNO₃ (20 мМ). В качестве восстановителя использовали сульфид натрия (2.5 мМ). В дальнейшем культуры поддерживали на модифицированной среде Лурия-Бертани (г/л): KNO₃ – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; триптон или пептон – 1.0; агар – 10; гельрит – 4 (Gelrite, Duchefa Biochemie). Культивирование проводили при 60°C.

Для изучения функциональной роли микробных сообществ ДО в анаэробных процессах окисления нефти использовали БМС без дрожжевого экстракта, содержащую различные акцепторы электронов: H₂:CO₂; Na₂SO₄; NaNO₃ и аморфный оксид Fe(III). В качестве источника углерода использовали 50 мкл нефти/50 мл среды (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024). В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду с нефтью без добавления проб осадков.

Убыль *n*-алканов и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) оценивали во всем объеме экспериментальной среды (осадок и культуральная жидкость). Перед анализом пробы центрифугировали, водную фракцию отделяли от осадка. Определение *n*-алканов и ПАУ проводили отдельно в водной фазе и осадке путем экстракции аналитов и последующего анализа экстрактов методом газовой

хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС, Agilent, GC 6890, MSD 5973, США). Количественное определение *n*-алканов и ПАУ проводили методом внутреннего стандарта. Результаты определения аналитов в водной и твердой фазах суммировали и представляли в виде суммарного содержания в образцах, отобранных в ходе модельного эксперимента. Средние показатели извлечения *n*-алканов и ПАУ составили 85%. Погрешность определения не превышала 15% (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024).

Инкубирование образцов ДО проводили в термобарических условиях в камерах высокого давления (КВД), разработанных в Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН (Manakov, Pavlova et al., 2019).

Способность микроорганизмов к синтезу биоПАВ оценивали по снижению уровня поверхностного натяжения на границе жидкая среда – воздух и по проявлению эмульгирующей активности супернатантов культуральной жидкости (внеклеточные биоПАВ) и водной эмульсии липидного экстракта биомассы бактерий (клеточно-связанные биоПАВ) (Назина, 2003). Определение химического состава клеточно-связанных биоПАВ проводили методом ГХ-МС. Влияние протатранов (1–3) на рост микроорганизмов, отнесенных к *Rhodococcus erythropolis* (штамм любезно предоставлен к.б.н. Лихошвай А.В.) и *Pseudomonas fluorescens* проводили согласно (Pavlova et al., 2019). Убыль *n*-алканов и ПАУ определяли по указанной выше методике (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024).

Молекулярные методы. Суммарную ДНК из образцов донных отложений, накопительных и чистых культур выделяли модифицированным методом ферментативного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией (Sambrook et al., 1989). Выделенная ДНК являлась матрицей в полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными праймерами на участки гена 16S рПНК бактерий 27f (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3'), 1350r (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3') и архей 20f (5'-TCCCGGTTGATCCYGCCRG-3'), 958r (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3') (DeLong, 1992; Suzuki, Giovannoni, 1996; Massana et al., 1997). Для амплификации варибельной области V2–V3 гена 16S рПНК бактерий использовали универсальные праймеры 16S_BV2f (5'-AGTGGCGGA CGGGTGAGTAA-3'), 16S_BV3r (5'-CCGCGGCTGCTGGCAC-3') (Sahm et al., 2013), а также праймеры для участка V5–V6 гена 16S рПНК архей Arch-0787f (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3'), Arch-1059r (5'-GCCATGCACWCCTCT-3') (Yu et al., 2005) согласно опубликованным ранее методикам (Bukin et al., 2016; Lomakina et al., 2023).

Детекцию генов окисления *n*-алканов (*alkB*) у чистых культур аэробных углеводородоокисляющих микроорганизмов проводили посредством ПЦР-амплификации с тремя группами специфичных праймеров (Sei et al., 2003).

Секвенирование проводили на платформах GS FLX 454 Roche (454 Life science, США), Illumina MiSeq (Illumina, Inc., США), нанопоровом секвенаторе MinION на базе центров коллективного пользования «Геномика», Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск), «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИСХМ (г. Пушкин). Подготовку библиотек и «shotgun» секвенирование проводили с использованием платформы GeneMind GenoLab M в формате 2×150 п.н. на базе ООО «СЕСАНА» (г. Москва).

Обработку метагеномных данных осуществляли с использованием программного конвейера, включающего сборку контигов с применением сборщика SPAdes 3.15.5 в режиме meta, поиск в собранных контигах генов рПНК (Barnap (Seeman, 2014)) и тПНК

(Aragorn (Laslett, Canback, 2004), определение открытых рамок считывания (Prodigal (Hyatt et al., 2010)), таксономическую и функциональную аннотацию обнаруженных генов с применением баз данных NCBI-nr, KEGG, Pfam, eggNOG и алгоритмов BLAST и HMM, картирование чтений (Bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012)) и сборку MAGs (Metabat2 (Kang et al., 2019), MaxBin2 (Wu et al., 2016), CONCOCT (Alneberg et al., 2014), COMEBin (Wang et al., 2024)) с их последующим объединением (DAS Tool (Sieber et al., 2018)), таксономической идентификацией (GTDBtk (Chaumeil et al., 2022)) и оценкой качества (CheckM2 (Chklovski et al., 2023)). Визуализацию и аннотирование филогенетических деревьев проводили с использованием <https://itol.embl.de/> (Letunic, Bork, 2024).

Для первичной фильтрации ошибок в полученных массивах парно-концевых чтений использовали алгоритмы PyroNoise (Quince et al., 2011) и Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Дальнейшую обработку, включая кластеризацию последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на основе 97% сходства с их последующей таксономической идентификацией до отдельных бактериальных филотипов, проводили с использованием базы данных SILVA (<http://www.arb-silva.de>), пакета Mothur (Schloss et al., 2009) и UCHIME алгоритма (Edgar et al., 2011) в соответствии с 454 SOP (Shloss et al., 2011) и MiSeq SOP (Kozich et al., 2013) рекомендациями. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, полученных из накопительных и чистых культур, с известными последовательностями из GenBank проводили с использованием программного пакета BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) и EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (Yoon et al., 2017). Филогенетический анализ и построение филогенетических деревьев выполняли с использованием пакета программ MEGA (Tamura et al., 2013).

Для сравнения разнообразия сообществ нативных ДО и накопительных культур на уровне филума и рода строили диаграммы для таксономических единиц с относительной численностью $\geq 1\%$ с использованием программных пакетов *ggplot2* и *reshape2* для языка R (R Core Team, 2022) в среде Rstudio (<https://www.R-project.org/>). Предсказание метаболического потенциала сообществ на основании относительной представленности генов, относимых к различным функциональным категориям из базы данных KEGG (Kanehis, Goto, 2000), выполнено с помощью PICRUSt2 алгоритма (Douglas et al., 2020) путем поиска ближайшего гомологичного аннотированного референсного генома для каждой ОТЕ_{0.03}. Визуализация полученных результатов в виде тепловой карты выполнена с использованием программных пакетов *cluster*, *vegan* и *pheatmap* в R.

Все данные, полученные с помощью молекулярно-биологических методов, депонированы в NCBI GenBank. Все ресурсоемкие операции выполнены с использованием высокопроизводительного кластера «Академик В.М. Матросов» центра коллективного пользования «Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН».

Физико-химические, молекулярно-биологические, микроскопические методы исследования, а также номера последовательностей, приведены в полном тексте диссертации, соответствующих публикациях и проведены на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИИ СО РАН.

Глава 3. Термофильные бактерии в низкотемпературных донных осадках озера Байкал в районах разгрузки углеводов

Появление термофильных прокариот в низкотемпературных осадках озера Байкал может быть объяснено двумя способами. Первый – поступление микроорганизмов с

минерализованными газонасыщенными флюидами из зоны генерации углеводородов, аналогично морским осадкам; второй – поступление из термальных источников, расположенных на побережье оз. Байкал, с последующим их распределением посредством системы градиентно-конвективных течений в водной толще и захоронением в поверхностных донных отложениях.

Для подтверждения первого способа был проведен поиск термофильных микроорганизмов в газонасыщенных осадках оз. Байкал в сравнении с фоновым районом (таблица). В результате инкубирования образцов при 60°C анаэробные накопительные культуры термофильных бактерий были получены только для осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводородов. При инкубировании осадков АХ получить термофильные накопительные культуры не удалось (Павлова и др., 2019).

В клональной библиотеке генов 16S рРНК культуры н-м/с ГУ выявлены последовательности термофильных бактерий рода *Thermaerobacter*, имеющие 97–99% сходства с таковыми бактерий *T. litoralis*, *T. nagasakiensis*, *T. subterraneus*, а также последовательности некультивируемых бактерий, имеющих отдаленное сходство (84.6%) с единственным культивируемым представителем рода *Kallotenue* (сем. *Kallotenuaceae*, класс *Chloroflexia*). Бактерии рода *Kallotenue papyrolyticum* изолированы из горячего источника и характеризуются как термофильные, целлюлолитические хемоорганогетеротрофы (Cole et al., 2013) (рис. 1).

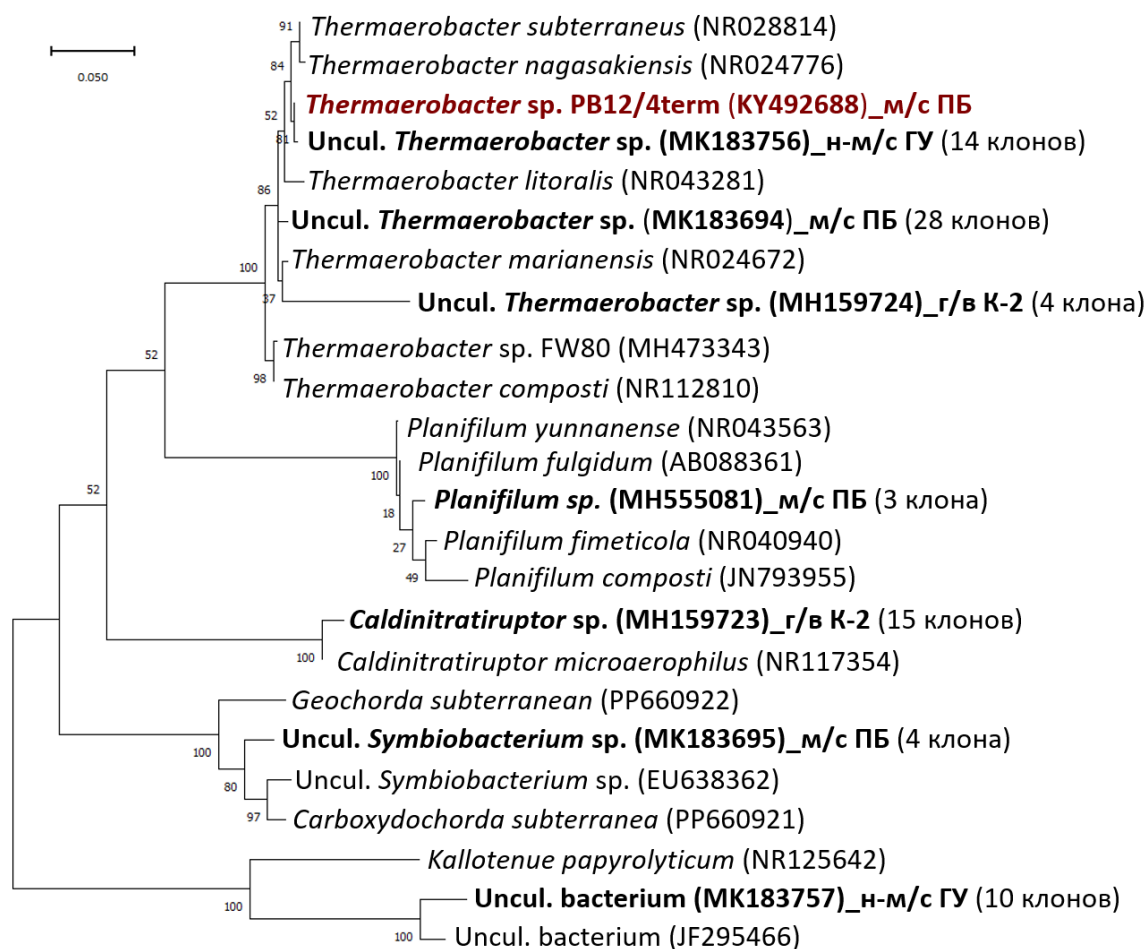


Рисунок 1. Филогенетическое дерево на основе последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение термофильных бактерий из осадков оз. Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов. Полученные последовательности выделены жирным шрифтом; красным цветом – последовательность культивируемого штамма *Thermaerobacter* sp. PB12/4term.

Библиотека м/с ПБ включала последовательности на 97–99% гомологичные гену 16S рРНК бактерий рода *Thermaerobacter*. Минорные последовательности принадлежали

термофильным актиномицетам, представителям рода *Planifilum* (97–99% сходства) семейства *Thermoactinomycetaceae*. Остальные последовательности были наиболее близки *Symbiobacterium*, *Geochorda subterranea* и *Carboxydochorda subterranea*. Ветвь *Symbiobacterium* включает только два термофильных вида, оптимальный рост которых наблюдается при совместном культивировании с термофильной бактерией *Geobacillus* sp. (Fardeau et al., 2010). Чистые культуры термофильных *Geochorda subterranea* и *Carboxydochorda subterranea*, отнесенные к *Geochordaceae* fam. nov., класса *Limnochordia*, филума *Bacillota*, выделены из глубинного водоносного горизонта в Западной Сибири и способны к анаэробному и аэробному дыханию с использованием фумарата и O₂ соответственно (Karnachuk et al., 2024).

В библиотеке накопительной культуры К-2 преобладали последовательности *Caldinitratiruptor microaerophilus* (97–99% сходства). Представитель рода *Caldinitratiruptor* (семейство *Symbiobacteriaceae*, филум *Bacillota*), выделенный из термального источника, является нитрат-редуцирующим микроаэрофильным термофилом. Остальные 4 последовательности формировали отдельную ветвь внутри кластера последовательностей, отнесенных к роду *Thermaerobacter*. Таким образом, библиотеки генов 16S рНК накопительных культур характеризовались небольшим разнообразием. Последовательности актиномицетов, факультативно-анаэробных бактерий и нитратредуцирующих микроаэрофильных термофилов обнаружены в незначительных количествах. Во всех библиотеках наиболее представленными были последовательности рода *Thermaerobacter* (Павлова и др., 2019).

Впоследствии, из поверхностных низкотемпературных отложений м/с ПБ была получена чистая культура *Thermaerobacter* sp., обозначенная как штамм PB12/4term. Типовой вид рода – *Thermaerobacter marianensis* выделен из донных осадков Марианской впадины – «Challenger Deep» с глубины 10897 м (Takai et al., 1999). Все известные изоляты характеризуются как строгие аэробы, хемоорганогетеротрофы, термофилы с оптимумом роста от 70 до 77°C (Spanevello, Patel, 2015; Nam et al., 2019). Обнаружение и доминирование в анаэробных накопительных культурах представителей аэробного рода *Thermaerobacter* позволило предположить, что микроорганизмы, выявленные в донных осадках оз. Байкал, обладают фенотипическими свойствами, отличными от таковых у ранее описанных представителей рода.

3.1. Описание и геномный анализ первой факультативно-литотрофной, термофильной бактерии *Thermaerobacter* sp. PB12/4term

Клетки штамма PB12/4term представляют собой грамотрицательные, прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными концами (0.3–0.4 x 2–15 мкм в аэробных условиях; 0.3–0.5 x 1.8–3 мкм – в анаэробных). Споры круглые 0.58–0.6 мкм в диаметре, локализованы терминально на одном конце клетки (рис. 2).

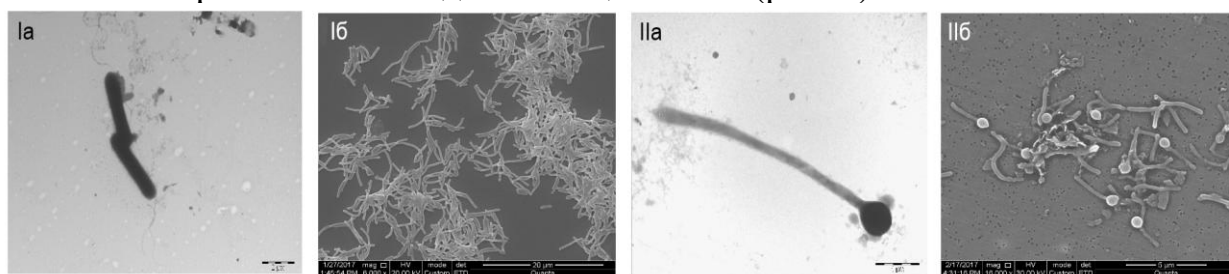


Рисунок 2. Морфология клеток штамма PB12/4term в аэробных (I) и анаэробных (II) условиях в электронном (а) и сканирующем микроскопе (б). Масштаб соответствует 2 мкм (I а), 20 мкм (I б), 1 мкм (II а), 5 мкм (II б). Цитировано по Pavlova et al., 2023.

Микроорганизм подвижен за счет полярного жгутика. Оптимальный рост наблюдался при 60°C, тогда как при 45°C или 85°C роста не происходило. Штамм PB12/4term является нейтрофилом с областью роста pH 5.0–8.0 и оптимумом pH 7.0. При pH ниже 4.5 и выше 8.5 рост отсутствовал. Изолят хорошо рос при концентрации NaCl до 5 г/л с оптимумом 1 г/л. Аэробный рост наблюдался только на жидких средах; на плотных средах штамм PB12/4term колонии не образовывал (Pavlova et al., 2023).

В литоавтотрофных условиях штамм PB12/4term использовал H₂ в качестве донора электронов, CO₂ в качестве источника углерода, элементную серу, тиосульфат и O₂ в качестве акцепторов электронов. При росте на средах, содержащих эти компоненты, наблюдалось минимум 3-х кратное увеличение количества клеток в сравнении с контролем. Наилучший рост выявлен в облигатно-анаэробных условиях на среде H₂:CO₂ (80:20) и в факультативно-анаэробных условиях при культивировании на среде с H₂:CO₂:O₂, с содержанием кислорода 1 и 2%. При анаэробном росте с серой выявлено образование сероводорода в следовых количествах (0.15 мг/л). Исследование влияния концентрации CO₂ на рост PB12/4term показало, что культура хорошо росла при 5% CO₂ в газовой смеси и умеренно при 20% и 40% CO₂. При 1% или 2% CO₂ в газовой фазе роста не наблюдалось. Изолят PB12/4term не способен к анаэробному хемоорганогетеротрофному росту.

В профиле клеточных жирных кислот преобладали iso-C_{15:0} (53%), iso-C_{17:0} (20.1%), iso-C_{16:0} (13.7%), iso-C_{14:0} (3.8%), anteiso-C_{15:0} (3.7%) и C_{16:0} (2.4%). Всего было идентифицировано 13 жирных кислот. Общее содержание жирных кислот составляло 23.1±1.6 мг/г сухого веса.

Сравнение последовательности гена 16S рРНК (1484 п.н.) штамма PB12/4term с имеющимися в GenBank показало принадлежность изолята к филуму *Bacillota*. На основе филогенетического анализа установлено, что штамм PB12/4term близок с *T. nagasakiensis* Ts1a (99%), *T. subterraneus* C21^T (99%), *T. composti* (98%) и *T. marianensis* 7p75a^T (98%). Геном штамма PB12/4term состоит из одной хромосомы общей длиной 2820915 п.н. и содержанием Г+Ц 72.2% (Baturina, Pavlova et al., 2018). Геном содержит 2229 белок-кодирующих последовательностей и 57 генов РНК, в том числе 6 рРНК, 47 тРНК и 4 нкРНК (некодирующие РНК). Идентифицировано 98 псевдогенов и 5 кластеров регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (CRISPR). Для большинства генов, кодирующих белки (84.7%), определена предполагаемая функция, остальные аннотированы как гипотетические белки.

Значение ANI (average nucleotide identity) между геномами штамма PB12/4term и его ближайшего родственного организма *T. subterraneus* DSM 13965 составило 95.08%. Значение ANI для штамма *T. marianensis* DSM 12885 было ниже и составило 84.98%. Значения AF (alignment fractions) для штамма PB12/4term, а также *T. marianensis* и *T. subterraneus* составили 0.77–0.91 соответственно. Значения dDDH между штаммом PB12/4term и *T. subterraneus*, *T. marianensis* – 80.8 и 32.3% соответственно.

Выравнивание геномов *Thermaerobacter* sp. PB12/4term, *T. subterraneus* и *T. marianensis* показало одинаковый порядок для большинства синтетных блоков; однако в геноме *T. subterraneus* присутствовала делеция фрагмента размером 388 Кб. В свою очередь, в геноме PB12/4term отсутствовали 242 гена, которые присутствовали в *T. subterraneus*. Выявленные при филогеномном анализе значения ANI, AF и dDDH между геномами штамма PB12/4term и *T. marianensis*, *T. subterraneus* были выше значений, используемых для разграничения видов прокариот (Konstantinidis et al., 2017).

Полученные геномные данные свидетельствуют о том, что штамм PB12/4term не является новым видом рода.

Подобно представителям рода *Thermaerobacter*, новый штамм имеет респираторный тип метаболизма с использованием кислорода и способен к органогетеротрофному росту с сахарами, пептидами и белками. В отличие от других видов рода *Thermaerobacter*, являющихся экстремальными термофилами, новый изолят – умеренный термофил с более низкими температурным оптимумом и температурными границами роста. Изолят PB12/4term образует споры, что для *T. marianensis*, *T. nagasakiensis* и *T. litoralis* показано не было. Его клетки подвижны за счет полярного жгутика, что роднит его с типовыми штаммами *T. nagasakiensis* и *T. litoralis*.

Отличительной особенностью штамма PB12/4term от других представителей рода *Thermaerobacter* является его способность к факультативно-литоавтотрофному росту (рис. 3). Новый изолят рос на анаэробной среде с молекулярным водородом в качестве донора электронов, элементарной серой и тиосульфатом в качестве акцепторов электронов и CO₂ в качестве источника углерода.

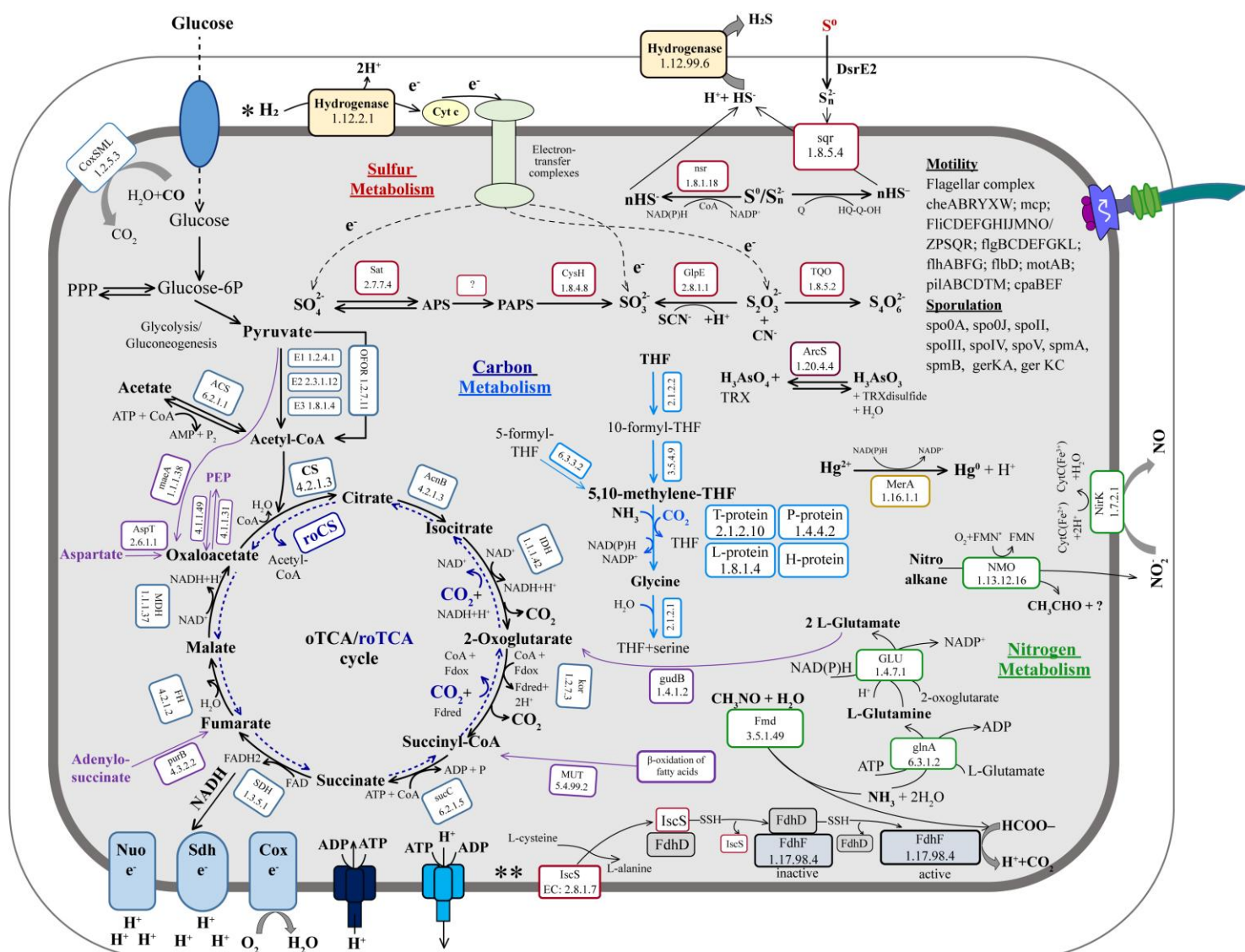


Рисунок 3. Схема метаболизма *Thermaerobacter* sp. PB12/4term, реконструированная на основе геномных данных. Цитировано по Pavlova et al., 2023.

В связи с этим был проведен поиск генов, обеспечивающих функционирование основных циклов автотрофной фиксации CO₂. Три основных фермента (рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (RuBisCO), фосфорибулокиназа A (*prkA*))

и седогептулозо-1,7-бисфосфатаза), необходимые для фиксации CO₂ через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама, отсутствовали, как и ферменты, необходимые для реализации восстановительного пути ацетил-КоА (путь Вуда-Люнгдаля). Геном PB12/4term содержит большинство генов, кодирующих восстановительный цитратный цикл (цикл Арнона-Бьюкенена). Поскольку в геноме отсутствуют гены, кодирующие ключевые ферменты этого цикла – цитратлиазу АТФ/цитрил-КоА синтетазу и цитрил-КоА лиазу, восстановительный цитратный цикл не может осуществляться в этом организме. В геноме исследуемого штамма выявлены все ферменты обратного окислительного цикла трикарбоновых кислот (roTCA) (Mall et al., 2018; Nunoura et al., 2018), а также пути восстановления глицина (rGlyP) (Berg et al., 2010; Sánchez-Andrea et al., 2020).

Факультативно-литотрофный рост штамма PB12/4term может обеспечиваться наличием в геноме генов, кодирующих гидрогеназы, формиадегидрогеназу, формамидазу, цистеиновые десульфуразы, тиосульфат сульфуртрансферазу/роданазу, тиосульфатдегидрогеназу (хинон), сульфид:хинон-оксидоредуктазу, дегидрогеназу монооксида углерода, а также, вероятно, генов обратного окислительного цикла трикарбоновых кислот или пути восстановления глицина (rGlyP), ответственных за автотрофную фиксацию CO₂ (рис. 3).

Основное различие между геномами *Thermaerobacter* sp. PB12/4term и *T. marianensis* DSM 12885, *T. subterraneus* DSM 13965, *Thermaerobacter* sp. FW80 заключается в отсутствии генов, кодирующих гидрогеназы, и генов посттрансляционной экспрессии/образования/созревания гидрогеназ, которые образуют кластер размером 12 Кб. Однако эти гены присутствуют у *Thermaerobacter* sp003242195 (геном, собранный из метагенома зоокомпоста) (рис. 4), который находится в одном кластере с культивируемыми бактериями рода *Thermaerobacter*.

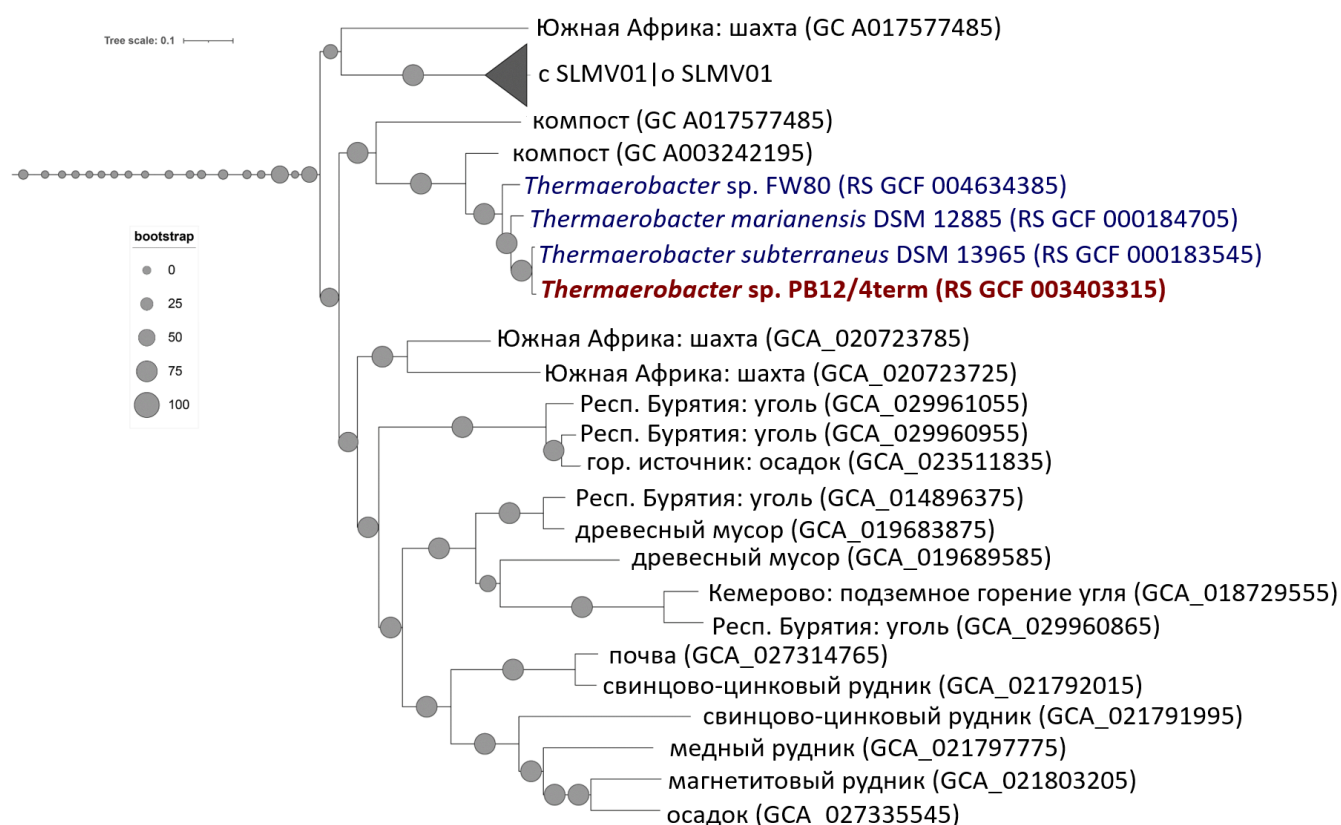


Рисунок 4. Филогеномное дерево представителей подфилума *Bacillota*_E. Красным цветом выделена последовательность генома *Thermaerobacter* sp. PB12/4term, синим – культивируемых бактерий рода *Thermaerobacter*, черным – MAGs (аннотированные геномы из метагеномных массивов данных).

На этом основании можно предположить, что гидрогеназный кластер изначально присутствовал у предка рода *Thermaerobacter* и был утерян большинством представителей рода. С другой стороны, обнаруженная делеция 388 Кб в геноме *T. subterraneus* в совокупности с филогеномными данными позволяет предположить, что вначале произошло эволюционное расхождение предков *T. marianensis* и PB12/4term, а затем делеция большой геномной области, что привело к дивергенции PB12/4term и *T. subterraneus*. Ранее, из-за отсутствия последовательностей *Thermaerobacter* в базах данных, было высказано предположение о достаточно редкой идентификации этих бактерий в природных биоценозах (Han et al., 2010). В настоящее время MAGs, идентифицированные до класса *Thermaerobacteria* (<https://lpsn.dsmz.de/class/-thermaerobacteria>; Chuvochina et al., 2023; Oren, Göker, 2024), выявлены в разнообразных экосистемах, включая шахты, рудники, угольные пласты (Kadnikov et al., 2023) и районы подземного горения угля в Кемеровской области (Кадников и др., 2021).

3.2. Описание термофильного изолята PB15/Grf7geo

Изолят PB15/Grf7geo был выделен из донных осадков м/с ПБ и на основании филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК отнесен к роду *Thermicanus*. Клетки штамма PB15/Grf7geo представляют собой грамположительные, одиночные, длинные, прямые или слегка изогнутые палочки (0.37–0.52 x 4.5–6 мкм) (рис. 5). Деление с образованием перетяжек (бинарное деление). На твердой среде образует споры. Споры овальные, локализованы терминально. Культура терморезистентна. Споры выдерживают нагрев при 100°C в течение 5 мин. Колонии штамма лишены пигмента, имеют округлую форму, плоские, непрозрачные, края неровные, консистенция плотная.

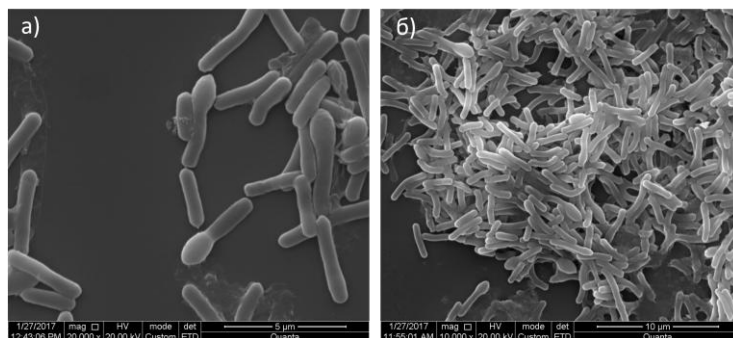


Рисунок 5. Морфология клеток изолята PB15/Grf7geo на плотной питательной среде. Сканирующая микроскопия. Масштаб: а – 5 мкм, б – 10 мкм.

Штамм термофильный, оптимум роста – 55–60°C. Верхняя граница роста – 80°C, нижняя – 46°C. Нейтрофил. При pH 5.0 и 8.6 рост отсутствовал. Область pH для роста 6.8–8.2, с оптимумом 7.0–7.2. Неподвижен. Аэроб, факультативный анаэроб. Каталазоположительный. Оксидазоотрицательный. В качестве источника углерода и энергии использует глюкозу, фруктозу, рамнозу, маннозу, мальтозу, сахарозу. Гидролизует крахмал и эскулин. При росте штамм нуждается в нитрате (10 мМ), в восстановителе (сульфид натрия, 2.5 мМ), витаминах и не нуждается в хлориде натрия. В профиле клеточных жирных кислот преобладали изо-С_{15:0} – 33%; изо-С_{16:0} – 13.6%; изо-С_{17:0} – 32.3%; изо-С_{17:1} n-11 – 7.3%. Остальные жирные кислоты содержатся в минорных количествах.

Содержание Г+Ц пар в ДНК PB15/Grf7geo составляет 53.0 мол.%. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК PB15/Grf7geo показал, что она обнаруживает 96.3%–96.4% сходства с последовательностью типового штамма *Thermicanus aegyrius* ET-5b^T и последовательностью некультивируемой бактерии,

отнесенной к р. *Thermicanus* (JN998833), выявленной в составе микробного сообщества из образца биodeградированной нефти (Dellagnezze et al., 2016). Также последовательность на 97.3% гомологична последовательности клона SHBZ1616, выявленной в микробном сообществе топливных элементов, катализирующих преобразование органического вещества (ацетата) в электрическую энергию (Wrighton et al., 2008) (рис. 6).

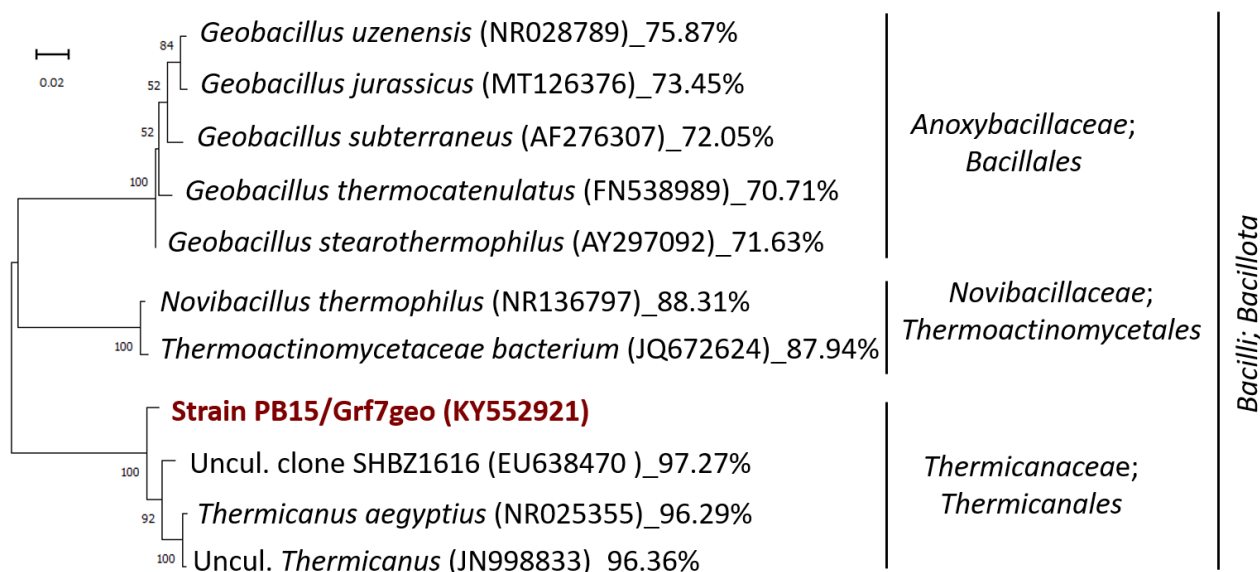


Рисунок 6. Филогенетическое дерево на основе последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма PB15/Grf7geo среди других представителей класса *Bacilli*, филума *Bacillota*.

Род *Thermicanus* состоит из единственного валидно описанного вида – *Thermicanus aegyptius* ET-5b^T (DSMZ 12793), выделенного совместно с термофильным ацетогеном *Moorella thermoacetica* из почвы (Египет). Штамм подвижный, термофильный (оптимальная температура роста 55–60°C), факультативный анаэроб. Высокий уровень O₂ замедляет рост; наилучший рост установлен в бескислородных или микроаэрофильных условиях. Споры не обнаружены. Утилизирует олиго- и моносахариды (Göbner et al., 1999). Содержание Г+Ц пар у *Thermicanus aegyptius* ET-5b^T составляет 50.3 мол.% согласно (Göbner et al., 1999) и 48.21 мол.% согласно геномным данным (https://gtdb.ecogenomic.org/genome?gid=GCF_000510645.1). В соответствии с таксономической идентификацией LPSN и GTDB, род *Thermicanus* относится к семейству *Thermicanaceae*, порядку *Thermicanales*, классу *Bacilli*, филуму *Bacillota*.

Несмотря на то, что термофильный, факультативно-анаэробный изолят PB15/Grf7geo выделен из низкотемпературного биотопа, его физиолого-биохимические свойства не отличаются от свойств типового штамма этого рода, выделенного из почвы Египта, где температура может составлять 28–40°C. Подобно *Thermicanus aegyptius* ET-5b^T, новый изолят PB15/Grf7geo – умеренный термофил, аэроб, факультативный анаэроб. В отличие от *Thermicanus aegyptius* ET-5b^T, PB15/Grf7geo образует споры и неподвижен. Анализ структуры гена 16S рРНК штамма PB15/Grf7geo свидетельствует о его неполной идентичности типовому культивируемому штамму (96.3%) и обособленном филогенетическом положении внутри кластера последовательностей семейства *Thermicanaceae*. Данные результаты, возможно, являются основанием для отнесения полученного штамма к новому виду. Очевидно, что для валидации его в качестве нового вида рода *Thermicanus* необходимо уточнение фенотипических признаков и анализ его генома.

3.3. Источник термофильных бактерий в низкотемпературных осадках озера Байкал – гидротермы на побережье озера или глубинные флюиды?

Для проверки гипотезы о том, что гидротермы на побережье озера Байкал могут являться источником термофильных бактерий в низкотемпературных осадках озера, проведен сравнительный анализ таксономической принадлежности термофильных микроорганизмов в наземных горячих источниках, расположенных на побережье оз. Байкал, и донных осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводородов (таблица).

Последовательности бактерий, способных к росту при температуре $\geq 50^\circ\text{C}$, родов *Hydrogenobacter*, *Caldimicrobium*, *Fervidobacterium*, *Truepera*, *Thermotalea*, *Thermobrachium*, *Meiothermus*, были обнаружены только в горячих источниках (ГИ). Доля *Hydrogenobacter* составляла 0.008–53.1%, *Thermobrachium* – 3.2–3.6%. Доля последовательностей остальных бактерий не превышала 1% (Павлова и др., 2024).

Бактерии родов *Thermus*, *Caldisericum*, *Thermomonas*, *Geothermomicrobium*, *Caloramator*, а также некультивируемые представители *Atribacterota*, *Ca. Acetothermota*, *Ca. Aminicenantales* и *Thermodesulfovibrionia* обнаружены в сообществах как гидротерм, так и донных осадков (рис. 7).

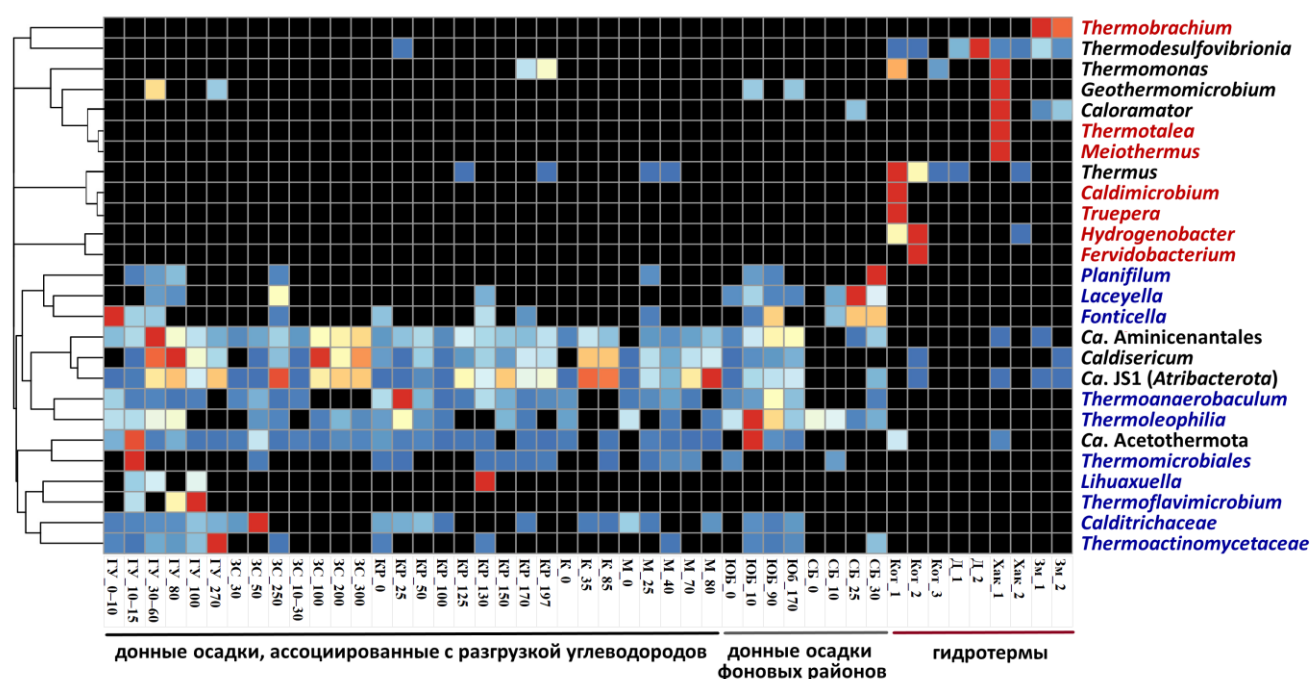


Рисунок 7. Тепловая карта распределения последовательностей термофильных бактерий в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК микробных сообществ воды горячих источников и донных осадков оз. Байкал. Последовательности, обнаруженные только в горячих источниках, выделены красным цветом; только в донных осадках – синим; и в донных осадках, и в горячих источниках – черным. Цитировано по Павлова и др., 2024.

В сообществах ДО выявлено большее разнообразие микроорганизмов, способных к росту в термофильных условиях, чем в ГИ. Кроме таксонов, перечисленных выше, только в микробном сообществе донных отложений обнаружены бактерии родов *Thermoanaerobaculum*, *Thermoleophilia*, *Laceyella*, *Lihua Xuella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*, *Fonticella* и некультивируемые представители *Calditrachaceae*, *Thermoactinomycetaceae* и *Thermomicrobiales*.

В числе доминирующих выявлены ОТЕ, принадлежащие *Ca. Aminicenantales*, классу-кандидату JS1 (*Atribacterota*) и роду *Caldisericum*. Представители JS1 составляли от 0.03 до 1% в подповерхностных донных осадках и до 46% в глубинных, во всех исследуемых образцах, ассоциированных с разгрузкой углеводородов. Доля последовательностей,

отнесенных к *Ca. Aminicenantales (Acidobacteriota)*, варьировала от 0 до 5% в подповерхностных осадках, и до 15% – в глубинных. Наибольшее число ОТЕ этого порядка-кандидата выявлено в осадках н-м/с ГУ и БЗ. Последовательности *Atribacterota* и *Acidobacteriota* наиболее часто выявляются в биотопах, обогащенных углеводородами – в геотермальных системах, нефтяных резервуарах, анаэробных морских отложениях и метановых сипах (Kadnikov et al., 2019; Liu et al., 2019). Представители этих филумов доминировали в микробиоме осадков Мексиканского залива, ассоциированных с непрерывным адвективным переносом термогенных газов (Chakraborty et al., 2020).

Бактерии рода *Caldisericum*, обнаруживаемые чаще всего в горячих источниках, водоносных горизонтах, загрязненных углеводородами, содовых озерах и биореакторах (Mori, 2018), в основном были выявлены в глубинных осадках н-м/с ГУ и БЗ, а также в г/в Кукуй. Последовательности бактерий, выявленные только в сообществе донных осадков и отнесенные к филуму *Bacillota* (неклассифицированные представители семейства *Thermoactinomycetaceae*, родов *Laceyella*, *Lihuaxuella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*, *Fonticella*), преобладали в глубинных слоях осадков г/в Кедр и г/в Маленький.

Необходимо отметить обнаружение последовательностей термофильных бактерий в донных осадках «фоновых» районов. В образцах выявлены последовательности, отнесенные к *Ca. Aminicenantales*, классу-кандидату JS1, роду *Thermoleophilia*, *Thermoanaerobaculum*, *Laceyella*, *Fonticella* и некультивируемым представителям *Calditrichaceae*, *Thermoactinomycetaceae* и *Thermomicrobiales*. Ранее анализ MAGs, реконструированных из образцов воды придонной зоны фонового района в Южном Байкале, показал, что геномы, принадлежащие микроорганизмам различных таксономических групп, содержат гены разложения ароматических соединений и алкан/метансульфонатмонооксигеназы (Cabello-Yeves et al., 2020). Донные осадки этого района напрямую не сопряжены с разгрузкой углеводородов. Предполагается влияние газосодержащих флюидов из донных отложений во время землетрясений, что может быть связано со значительным количеством близкорасположенных гидратоносных структур в донных осадках озера Байкал (Cabello-Yeves et al., 2020) и обуславливает обнаружение последовательностей термофильных микроорганизмов.

Проведенные исследования показали, что как в горячих источниках, так и в донных осадках обнаруживаются последовательности термофильных прокариот, имеющих одинаковую таксономическую принадлежность. Вместе с тем большинство таксонов микроорганизмов встречались либо только в образцах из ГИ, либо только в образцах из ДО, что позволяет предположить разные источники их поступления. Структура последовательностей в библиотеках генов 16S рРНК из гидротерм не идентична таковой из библиотек этого гена из донных осадков, водной толщи Байкала и горячих источников, расположенных на территории Байкальской рифтовой зоны (Алла, Кучигер, Умхей, Гарга), что выражается в формировании отдельных ветвей на филогенетическом дереве (приведено в тексте диссертации).

Сравнение бета-разнообразия исследуемых сообществ на основе матрицы дистанций Брея-Кертиса показало, что они достоверно различаются в соответствии с районом отбора проб (PERMANOVA $R^2 = 0.149$, $p < 0.001$). Расположение образцов на графике NMDS указывает на объединение в отдельные кластеры термофильных микробных популяций донных отложений и горячих источников (рис. 8).

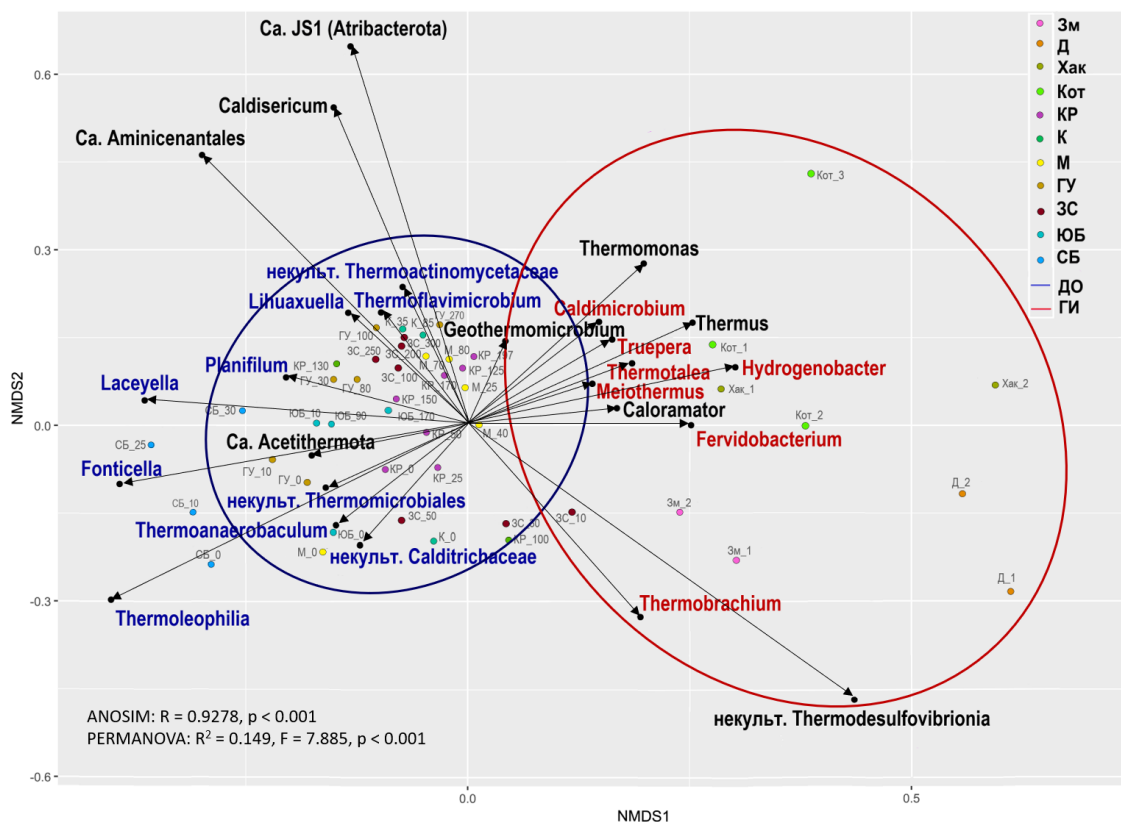


Рисунок 8. График непараметрического многомерного шкалирования на основе матрицы дистанций Брея-Кертиса, отражающий сходства и различия в составе термофильной компоненты микробных сообществ донных отложений и горячих источников на уровне рода. Эллипсы представляют собой 95%-ные доверительные интервалы для кластерных центроидов.

Не исключено, что термофильные микроорганизмы, обнаруживаемые в гидротермах, расположенных на побережье оз. Байкал, могут попадать с их стоками в водную толщу и распространяться по акватории озера на длительные расстояния с помощью градиентно-конвективных течений (Верболов, 1996). Очевидно, что низкая температура *in situ* воды и ДО озера Байкал не может обеспечить рост и развитие термофильных прокариот. Как показали исследования, в ГИ в основном выявлены аспорогенные микроорганизмы, которые погибают, попадая в воду оз. Байкал, что подтверждается их отсутствием в местах впадения источников в озеро (Павлова и др., 2024).

Наличие в низкотемпературных осадках термофильных микроорганизмов, филогенетически отличающихся от обитателей гидротерм, делает вероятным существование в оз. Байкал механизма, описанного для Мирового океана, в процессе которого микроорганизмы из глубинной осадочной толщи выносятся на поверхность вместе с потоками газонасыщенных флюидов, пассивно разносятся течениями, оседают в донных отложениях, где сохраняются в течение многих лет и постепенно захораниваются (Chakraborty et al., 2020). При благоприятных температурных условиях, формирующихся в глубоких донных отложениях, микроорганизмы прорастают на подходящих субстратах, завершая геологическую микробную петлю жизнеспособных клеток, циркулирующих из глубинной биосферы и обратно в нее (Gittins et al., 2022).

Глава 4. Роль микробных сообществ осадочной толщи оз. Байкал в процессах преобразования органического вещества с образованием углеводородных маркеров нефти в условиях протокатагенеза

Происхождение нефти является фундаментальной проблемой естествознания. Озеро Байкал характеризуется длительной историей осадконакопления (Grachev et al., 1998).

Преобразование органического вещества (ОВ) в осадках Байкала по мере изменения термобарических условий в недрах кайнозойской толщи способствовало процессам генерации углеводородов, возникновению их скоплений различного типа – нефтяных, газовых и газогидратных (Кузьмин и др., 2001; Конторович и др., 2007). Основными факторами, обуславливающими возникновение и развитие процесса преобразования ОВ в осадочной толще в углеводороды нефтяного ряда, являются деятельность бактерий, каталитические свойства горных пород, температура, давление и геологическое время (Баженова, 2004).

Ранний диагенез ОВ в донных отложениях Байкала является предметом многих исследований (Мизандронцев, 1978; Гранина, 2008; Och et al., 2012). Однако процессы преобразования органического вещества в условиях протокатагенеза с участием микробных сообществ осадочной толщи оз. Байкал ранее не изучались. Для проведения таких исследований в Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН были разработаны и собраны камеры высокого давления (КВД) с автоматическим регулированием температуры (Manakov, Pavlova et al., 2019). КВД позволяют воспроизвести условия (температура 80°C, давление 50 атм), которые, с одной стороны, характерны для глубинных слоев донных отложений оз. Байкал (Хатчинсон и др., 1993) и приближаются к пороговым для живых организмов, с другой – являются нижней границей значений, характерных для метокатагенеза, и обеспечивают отсутствие влияния физических факторов на процесс преобразования органического вещества. В качестве источника дополнительного органического вещества в КВД вносили биомассу диатомовой водоросли *Ulnaria acus*, которая входит в число доминирующих видов фитопланктона оз. Байкал и вносит существенный вклад в пищевые сети и круговорот кремния (Grachev et al., 1998). Ее аксеничная культура любезно предоставлена отделом Ультразвуковой структуры клетки ЛИН СО РАН.

4.1. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков метанового сипа Голоустное

В районе м/с Голоустное происходит пузырьковая разгрузка метана (Granin et al., 2010), выявлены приповерхностные залегающие газовых гидратов. Керны, отобранные в местах разгрузки газа, состояли из плейстоценовых глин, в которых преобладали ископаемые виды диатомей *Stephanodiscus grandis* и *Cyclotella bradburyi* (Khlystov et al., 2013).

Экспериментальную инкубацию проводили в КВД в течение 11 месяцев (Pavlova et al., 2016). В природном байкальском осадке до эксперимента отмечалось присутствие гопенов C_{27} , C_{30} , а также гопанов C_{27} , C_{31} и C_{33} с «биологической» стереохимической конфигурацией $\beta\beta$. После экспозиции среди «геогопанов» (конфигурация $\alpha\beta$ и $\beta\alpha$) идентифицированы лишь «био-гопаны» C_{27} , C_{31} , а также углеводород, структуру которого расшифровать не удалось. В образце до и после эксперимента среди высокомолекулярных углеводородов преобладали нечетные углеводороды. Индекс нечетности (carbon preference index, CPI), рассчитанный по формуле:
$$CPI = \frac{(C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31})}{(C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32})}$$
, свидетельствует о более высокой степени преобразования ОВ в образце после эксперимента (3.5) в сравнении с образцом до эксперимента (4.24). Степень превращения органического вещества (ОВ) по индексам нечетности высокомолекулярных углеводородов составила 17.4% (Pavlova et al., 2016). Наиболее существенные различия состояли в появлении в образце осадка после эксперимента ароматического углеводорода – ретена (1-метил, 7-изопропил-фенантрен, $C_{18}H_{18}$) – продукта деградации смоляных (дитерпеновых) кислот (рис. 9).

Ретен, как правило, рассматривается как биомаркер хвойных растений (van Aarssen et al., 2000; Meyers, 2009). Тем не менее, показано, что ретен не всегда присутствует в нефтях, имеющих наземное происхождение, и часто обнаруживается в осадках и битумах, обогащенных органическим веществом водорослей (Wang, 1990; Zhang et al., 1999; Romero-Sarmiento et al., 2010).

Участие анаэробных микроорганизмов в образовании ретена предполагалось и ранее (Martin et al., 1999), но экспериментально не было подтверждено. Впервые полученные собственные экспериментальные данные в более мягких условиях, чем пиролиз, показывают, что ретен является продуктом деструкции биомассы диатомовых водорослей, осуществляемой микробным сообществом (Pavlova et al., 2016).

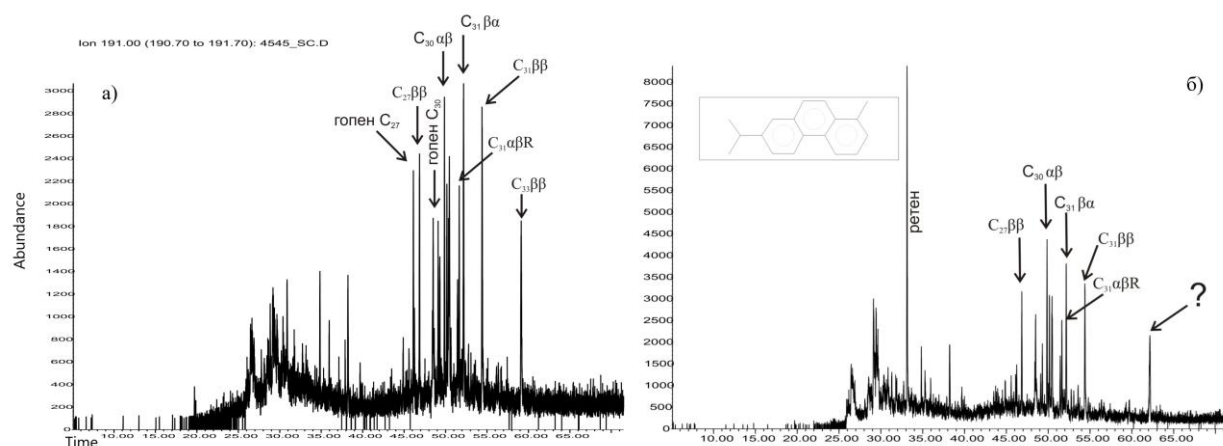


Рисунок 9. Масс-хроматограмма терпановых углеводородов по фрагментному иону m/z 191 – до эксперимента (а) и после (б). Цитировано по Pavlova et al., 2016.

4.2. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков метанового сипа Посольская Банка

Район Посольская Банка является газогидратным районом и представляет собой выраженную подводную возвышенность (Bezrukova et al., 2005). Данные геологических исследований, а также анализ изотопного состава углерода разгружающегося газа свидетельствуют о том, что часть потоков газонасыщенных флюидов в данном районе поступает из глубинных слоев донных отложений, расположенных ниже зоны стабильности газовых гидратов (Калмычков и др., 2006; Klerkx et al., 2006; Naudts et al., 2012). Ранее было показано влияние флюидной микробной петли на распределение и разнообразие микроорганизмов, которая привносит микроорганизмы из глубинных осадков в поверхностные (Черницына и др., 2016).

Экспериментальную инкубацию проводили в КВД в течение 17 месяцев. Анализ библиотек генов 16S рРНК в образце до эксперимента показал, что среди *Bacteria* наиболее многочисленны последовательности представителей филумов *Chloroflexota* (18.5%), *Pseudomonadota* (17.6%), *Acidobacteriota* (16.8%), *Atribacterota* (11%) и *Deinococcota* (5.1%). Последовательности *Actinomycetota*, *Ca. Patescibacteria*, *Ca. Latescibacterota*, *Ca. WS4* составляли 2.3–3.6%. Менее 2% составляли последовательности, принадлежащие представителям филумов *Nitrospinota*, *Bacillota*, *Margulisbacteria* и *Bacteroidota* (рис. 10а). Филум *Chloroflexota* представлен семействами *Anaerolineaceae*, *Dehalococcoidaceae*, KD4-96 и неклассифицируемыми *Chloroflexota* (Bukin, Pavlova et al., 2016). Представители семейств *Anaerolineaceae* и *Dehalococcoidaceae* обнаружены в широком диапазоне анаэробных сред обитания, включая донные отложения, горячие источники, анаэробные реакторы, экотопы, загрязненные углеводородами, где они способны осуществлять синтрофное окисление

углеводородов (*Anaerolineaceae*) с образованием метана при участии метаногенных архей или восстановительное дехлорирование хлорированных углеводородов и галогенорганическое дыхание (*Dehalococcoidaceae*) (Liang et al., 2015; Löffler et al., 2015). Филум *Pseudomonadota* представлен семействами *Sphingomonadaceae* (класс *Alphaproteobacteria*, 33.4%), *Burkholderiaceae* и *Moraxellaceae* (класс *Gammaproteobacteria*, 5.2%).

Филум *Acidobacteriota* включал анаэробные, хемоорганогетеротрофные бактерии порядка *Ca. Aminicenantes* (10.1%). ОТЕ филума *Atribacterota* принадлежали классу-кандидату JS1. Потенциальные функциональные возможности показывают важную экологическую роль *Atribacterota* в глобальном цикле углерода, особенно в средах, обогащенных углеводородами, таких как нефтяные пласты, гидраты метана и естественные выходы углеводородов, где представители этого филума обнаруживаются наиболее часто (Head et al., 2003; Vigneron et al., 2017).

Филум *Deinococcota* представлен полиэкстремофильными бактериями рода *Deinococcus*. Последовательности, отнесенные к филумам *Actinomycetota* и *Bacillota*, принадлежали бактериям рода *Kocuria* и рода *Staphylococcus*. Для бактерий этих родов, выделенных из углеводородокисляющих накопительных культур, показана способность к биodeградации ПАУ (Ahmed et al., 2015; Hentati et al., 2021; Sahu, Shrivastava, 2022).

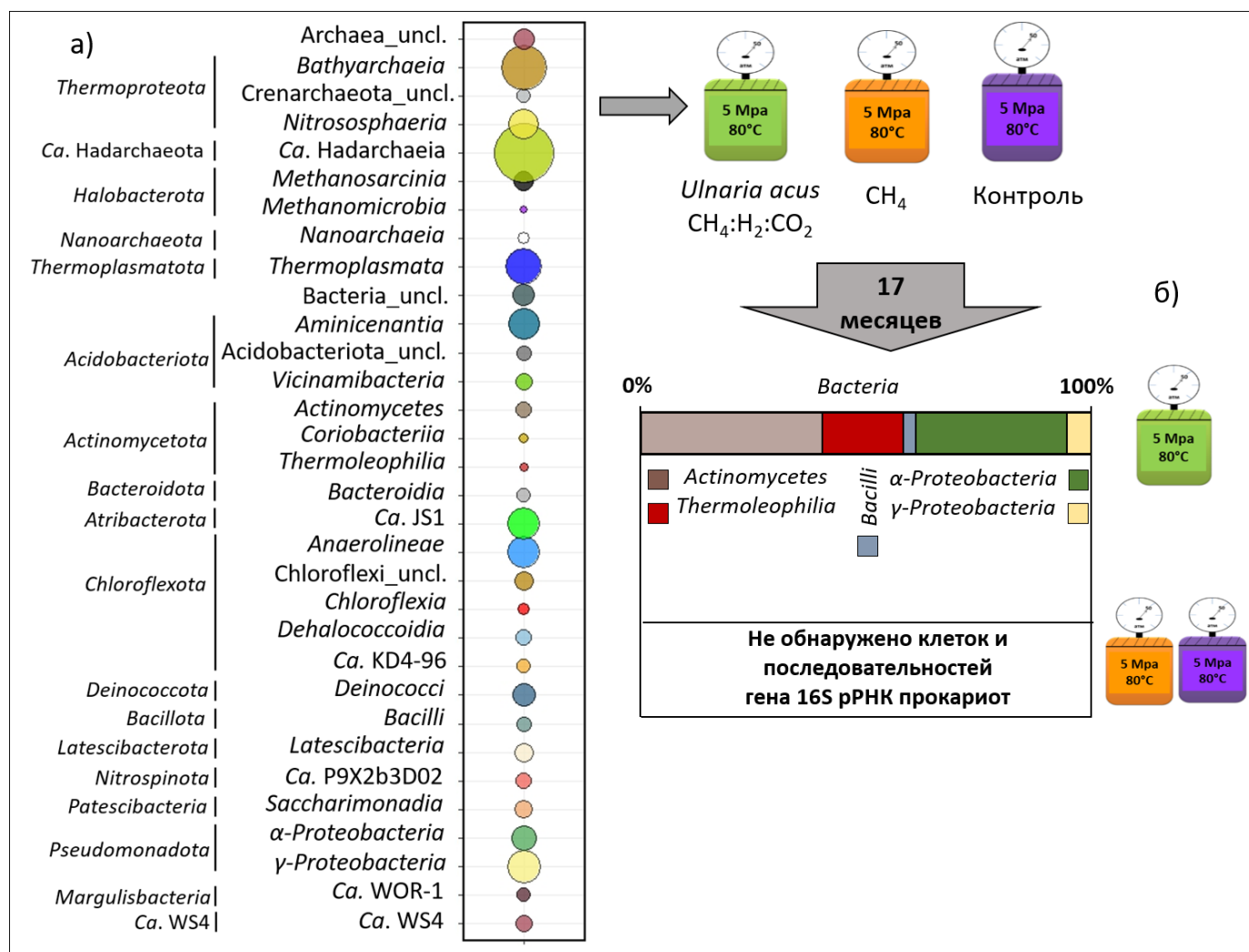


Рисунок 10. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria* и *Archaea*, представленных на уровне филума и класса в библиотеках из образца донного осадка метанового сипа Посольская Банка до (а) и после термобарического инкубирования (б). Цитировано по Bukin, Pavlova et al., 2016.

Архейная компонента представлена филумами *Ca. Hadarchaeota* (41.6%), *Thermoproteota* (33.6%), *Thermoplasmatota* (14.4%), *Halobacterota* (4.1%) и *Nanoarchaeota* (в н.в. *Nanobdellota*) (1%) от всех выявленных *Archaea*. Доминирующие в микробном сообществе археи *Ca. Hadarchaeota*, согласно данным реконструкций геномов, обладают генами, связанными с путем фиксации углерода через путь Вуда-Льюнгаля, метаногенезом и метаболизмом алканов, и считаются посредниками в ключевых геохимических процессах, специализированными для выживания в глубинной биосфере (Baker et al., 2016).

Филум *Thermoproteota* представлен классами *Bathyarchaeia*, *Nitrososphaeria* и неклассифицированными представителями класса *Thermoprotei*. Филум *Thermoplasmatota* состоял, в основном, из представителей Marine Benthic Group D (в н.в. *Ca. Thermoprofundales*) – архей со специфическим миксотрофным метаболизмом, синтрофно окисляющих органическое вещество и способных расщеплять ароматические соединения по пути фенилуксусной кислоты (Zhou et al., 2019; Liu et al., 2019). Среди ОТЕ, отнесенных к филуму *Halobacterota*, выявлены последовательности, принадлежащие роду *Ca. Methanoperedens* – археям, осуществляющих анаэробное окисление метана (АОМ) в сочетании с восстановлением нитратов, железа и марганца (Haroony et al., 2013; Cai et al., 2018; Leu et al., 2020; Lomakina et al., 2020, 2023).

ПЦР-продукты после эксперимента получены только для ДНК из КВД №1 (с добавлением биомассы диатомовой водоросли *Ulnaria acus*, в атмосфере $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$) (Bukin, Pavlova et al., 2016). В библиотеках гена 16S рРНК не выявлены последовательности представителей домена *Archaea*. Среди *Bacteria* 58% составляли последовательности филума *Actinomyces*, в частности рода *Arthrobacter* (39.6%, класс *Actinomycetes*) и рода *Solirubrobacter* (18%, класс *Thermoleophilia*). Около 33.4% – последовательности рода *Sphingomonas* (класс *Alphaproteobacteria*), 2–2.9% – рода *Ralstonia* и *Enhydrobacter* (класс *Gammaproteobacteria*) и около 3% класса *Bacilli* (филум *Bacillota*) (рис. 10б). Ближайшие филогенетические родственники обнаружены в почве, воде и донных отложениях пресноводных и морских водоемов, а также в подземных водах и экосистемах, загрязненных углеводородами (Mnif et al., 2009; Reyes-Sosa et al., 2018; Neifar et al., 2019; Nazina et al., 2023).

Доминирование представителей домена *Bacteria* в КВД № 1 и отсутствие представителей домена *Archaea* может быть связано с инкубацией в атмосфере $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$. Стимулирование развития бактерий, а не архей, при добавлении H_2 и CO_2 и давлении 40 МПа показано в работе (Ohtomo et al., 2013). Авторами установлено, что добавление высоких концентраций CO_2 в природные пласты каменного угля с использованием реакторной системы высокого давления преимущественно стимулирует гомоацетогенез, осуществляемый бактериями, а не метаногенез, несмотря на присутствие в исследуемых образцах представителей гидрогенотрофных и метилотрофных метаногенов (Ohtomo et al., 2013).

О том, что под воздействием микробного сообщества в термобарических условиях эксперимента происходят процессы преобразования органического вещества, свидетельствуют результаты хромато-масс-спектрометрического анализа донных осадков до и после эксперимента. Так, значимые изменения в составе органического вещества наблюдались лишь в образце из КВД №1. Содержание $\text{C}_{\text{орг}}$ в осадке снизилось с 0.77 до 0.66% в течение эксперимента. Доля асфальтово-смолистых компонентов в битумоиде составляла 80.4% до эксперимента. После эксперимента содержание последних увеличилось до 91.2%. Значение коэффициента CPI уменьшилось с 5.1 до 3

в процессе культивирования, что указывает на то, что превращение углеводородной составляющей органического вещества достигло 41%. Среди терпанов в осадке после эксперимента доминировали гопаны C_{27} – C_{35} – 53.0%. В этой же фракции после эксперимента зафиксировано увеличение содержания биомаркеров нефти – гаммацереина и ретена (Bukin, Pavlova et al., 2016). Согласно (Vaz dos Santos Neto et al., 1998), $\delta^{13}C$ гаммацереина указывает на его происхождение из биомассы простейших, цианобактерий и других микроорганизмов, обитающих в различных палеоусловиях. Гаммацереин является важным биомаркером во многих озерных нефтях и битумах, включая нефтяное месторождение «Green River» в Китае, где органическое вещество состоит преимущественно из детрита водорослей и бактерий (Peters et al., 2005).

4.3. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков грязевого вулкана Хобой (Академический хребет)

Органическое вещество ДО Академического хребта представляет собой смесь органического углерода и биогенного кремнезема, образуемого преимущественно диатомовыми водорослями (Гранина и др., 1993; Грачев и др., 1997). В настоящее время в районе Академического хребта выявлена грязевулканическая гидратоносная область, где признаки грязевых вулканов или газовых гидратов прежде не регистрировались (Хлыстов и др., 2017).

Экспериментальную инкубацию проводили в КВД в течение 7 месяцев. Анализ библиотек генов 16S рРНК природного образца до эксперимента показал, что домен *Bacteria* в основном, представлен филумами *Pseudomonadota* (47.5%), *Chloroflexota* (22.7%), *Actinomycetota* (13.4%), *Deinococcota* (5%) (рис. 11а). Менее 3% составляли последовательности *Atribacterota*, *Acidobacteriota*, *Bacillota* и неклассифицированных *Bacteria*. В библиотеке генов 16S рРНК архей выявлены последовательности класса *Bathyarchaeia* (96.5%, *Thermoproteota*) и порядка *Methanomassiliicoccales* (2.7%, *Thermoplasmata*) (рис. 11а; Павлова и др., 2019).

В библиотеках генов 16S рРНК микробного сообщества отмечено высокое содержание представителей классов *Gamma*- и *Alphaproteobacteria* (33.6–13.8% соответственно). Класс *Gammaproteobacteria* представлен семействами *Halomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Shewanellaceae* и *Pseudomonadaceae*. Для многих видов этих семейств показана способность к окислению продуктов переработки нефти и компонентов нефти с образованием гликолипидных биосурфактантов (Mnif et al., 2009; Reyes-Sosa et al., 2018; Neifar et al., 2019; Nazina et al., 2023). Последовательности *Chloroflexota* достигали 23% от общего числа выявленных последовательностей в библиотеке генов 16S рРНК *Bacteria*. Филум в основном состоял из последовательностей некультивируемой группы MSB-5B2, класса *Dehalococcoidia* и семейства *Anaerolineaceae*. Филум *Deinococcota* представлен родом *Thermus* – хемоорганогетеротрофными, экстремально термофильными бактериями, обитающими в гидротермах, глубоководных морских источниках и гейзерах Йеллоустонского национального парка (Huber, Stetter, 2004). Через 7 месяцев термобарического культивирования в КВД № 1 в библиотеках генов 16S рРНК не выявлены последовательности представителей домена *Archaea* и филумов *Acidobacteriota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota* (домена *Bacteria*). Процент последовательностей филумов *Actinomycetota*, *Deinococcota*, *Bacillota* остался на том же уровне. Увеличилась доля *Bacteroidota* и *Pseudomonadota* (в 1.7 раза) (рис. 11б).

По истечении эксперимента в контрольном образце из КВД № 2 геохимических изменений в составе ОВ не установлено. В составе ОВ донных осадков, обогащенных

биомассой *Ulnaria acus* (КВД № 1), выявлены процессы его преобразования. Количество углеводов и асфальто-смолистых компонентов в битумоиде из образца до эксперимента составило 22.8% и 77.2% соответственно. После эксперимента концентрация углеводов возросла до 29.3%, концентрация асфальто-смолистых компонентов уменьшилась до 70.7%.

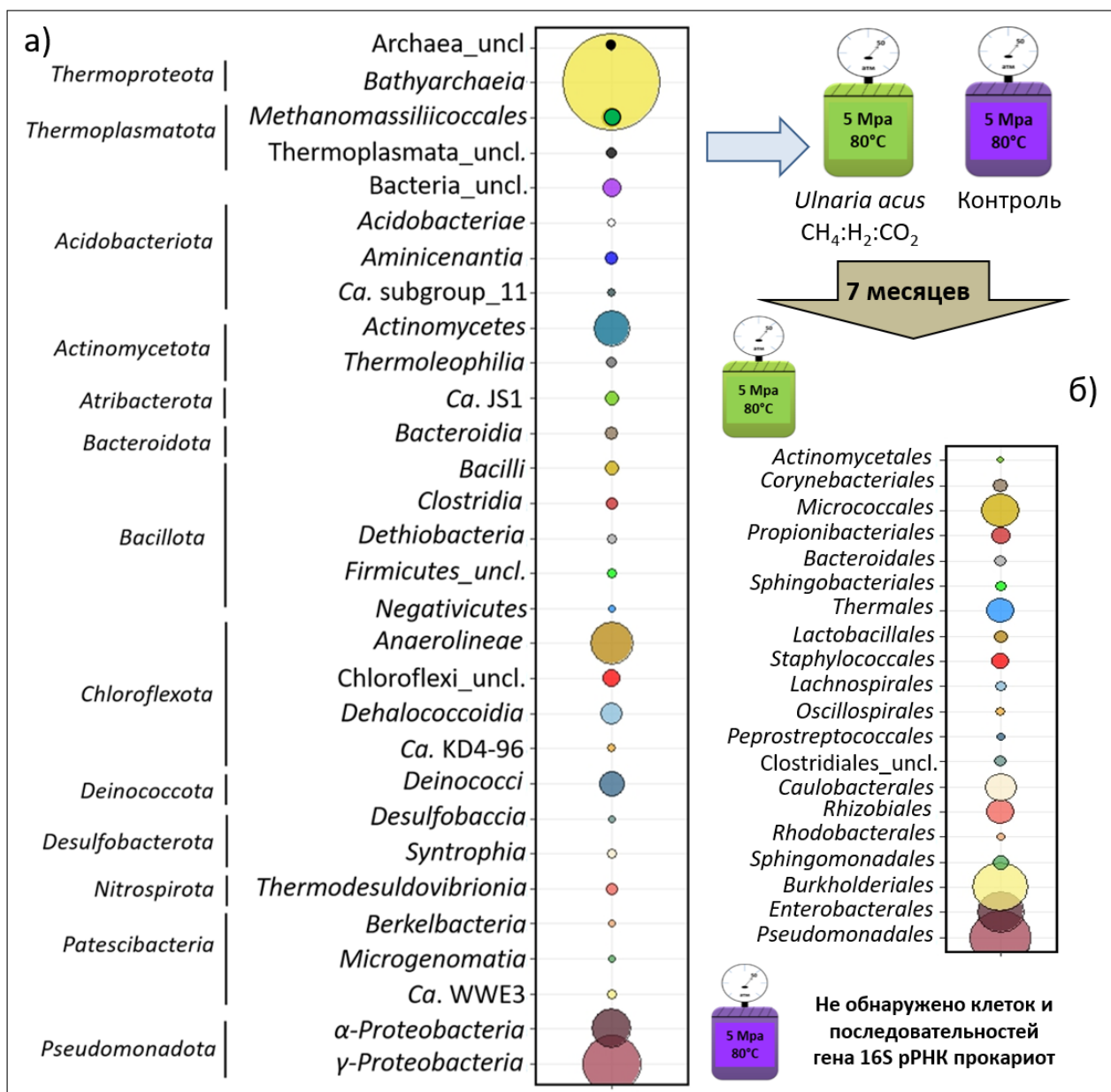


Рисунок 11. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria* и *Archaea*, представленных на уровне филума и класса в библиотеках из образца донного осадка г/в Хобой до (а) и после термобарического инкубирования (б). Цитировано по Павлова и др., 2019.

Степень преобразованности органического вещества составила 16%. В составе углеводородной фракции зафиксировано увеличение концентрации полиароматического углеводорода – перилена (стабильного конечного продукта превращений органического вещества в донных отложениях). Регистрируемые изменения в составе ОВ донных осадков г/в Хобой не столь значительны (16%) в сравнении с данными, полученными в эксперименте с донными осадками м/с Посольская Банка, где данный показатель был равен 41% (Bukin, Pavlova et al., 2016). При достаточно небольшом времени инкубации осадка (7 мес.) из г/в Хобой зафиксировано снижение концентрации фенантронов относительно его метилзамещенных гомологов, включая ретен, и увеличение серосодержащих

соединений (дибензотиофенов и их метилзамещенных гомологов) относительно нормальных алканов, а также образование моноароматических стероидов, включая 4 диастереомера 17-дисметил-, 23-метилмоноароматических стероидов C₂₇ и триароматических стероидов. Доминирование S над R-изомерами в гомогипанах, наличие биогипанов в следовых количествах также свидетельствует о бóльшей преобразованности ОБ в образце после эксперимента.

Снижение концентрации фенантронов может быть обусловлено деятельностью представителей филумов *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* и *Bacillota*, последовательности которых выявлены в значительном количестве в составе микробного сообщества в образцах осадка как до, так и после эксперимента. Для представителей данных таксонов способность к деградации полициклических ароматических углеводородов является общепризнанной. Ранее для бактерий рода *Pseudomonas* и рода *Bacillus*, выделенных из оз. Байкал, показана селективная биodeградация флуорантена, фенантрена и пирена. В условиях модельного эксперимента в течение 30 суток степень конверсии полициклических ароматических углеводородов составила 18–30% (Павлова и др., 2005). Увеличение концентрации три- и моноароматических стероидов в образце осадка после эксперимента может быть следствием биодеструкции биомассы байкальской диатомеи *Ulnaria acus*. В частности, для байкальской диатомеи *Stephanodiscus meyerii* Genkal and Popovskaya показано наличие в ее составе двух основных стеролов – холестерина и 24-метиленхолестерина, а также фитола (Ponomarenko et al., 2004).

Таким образом, при воспроизведении условий, характерных для зоны генерации углеводородов, в серии экспериментов установлена способность микробных сообществ осуществлять преобразование органического вещества (биомассы диатомовых водорослей) с образованием дибензотиофенов, три- и моноароматических стероидов, а также биомаркеров нефти (ретенена и гаммацерена). Различающиеся геохимические условия донных отложений оказывают влияние на состав микробных сообществ и, как следствие, на степень преобразованности органического вещества и спектр соединений, образуемых в результате его деструкции в термобарических условиях. После эксперимента в донных осадках грязевого вулкана, вмещающих грязевулканическую брекчию, преобладали представители термофильных таксонов (*Deinococcus-Thermus*, *Bacillota* и др.), которые могли поступить в подповерхностные осадки в составе газонасыщенного материала с глубин в несколько километров.

Глава 5. Анаэробные процессы биodeградации нефти микробными сообществами донных осадков районов естественных нефтепроявлений

Оз. Байкал – одно из трех пресноводных озер, которое характеризуется природными выходами нефти. В оз. Байкал установлены два района естественных нефтепроявлений, один расположен в устье р. Б. Зеленовская (БЗ) и известен с XVIII века (Рябухин, 1934); второй – у м. Горевого Утес (ГУ) (открыт в 2005 г.; Хлыстов и др., 2007). При длительном нахождении нефти в осадочной толще в ней могут происходить анаэробные процессы биodeградации углеводородов, которые обуславливают появление глубоко биodeградированной нефти на водной поверхности (как это наблюдается в районе БЗ). Эти процессы могут различаться в двух районах нефтепроявлений в оз. Байкал, так как районы отличаются временем функционирования, термобарическими условиями, геологическим строением и составом нефти на современном этапе.

5.1. Анаэробное окисление углеводородов нефти микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у м. Горевой Утес

Культивирование микробных сообществ в анаэробных накопительных культурах, обогащенных гидрокарбонат- и сульфат-ионами, в течение одного года выявило различную степень конверсии *n*-алканов и ПАУ. В накопительных культурах с подповерхностным осадком (GUI) наибольшая убыль *n*-алканов (28%) была установлена при культивировании микробного сообщества в сульфатредуцирующих условиях, где содержание $\Sigma_{\text{алк}}$ в образце снизилось до 5 мг во всем объеме экспериментальной среды в сравнении с контрольными накопительными культурами (7 мг) (рис. 12а; Pavlova et al., 2022). В культурах, содержащих $\text{H}_2:\text{CO}_2$ в газовой фазе, уменьшение количества алкановой фракции нефти было незначительным (6.6 мг) и составило 6%. Содержание $\Sigma_{\text{ПАУ}}$ в присутствии сульфат- и гидрокарбонат-ионов в накопительных культурах GUI- SO_4 и GUI- HCO_3 снизилось на 20–37% соответственно (рис. 12в). Конверсия нефтяных углеводородов в GUI- HCO_3 сопровождалась образованием метана (Pavlova et al., 2022). Осадок изначально был газонасыщен, концентрация метана в газовой фазе накопительных культур в начале эксперимента составляла 208 мг/л. Через три месяца культивирования концентрация метана увеличилась до 432 мг/л. Наибольшая его концентрация (512 мг/л) зафиксирована через 6 месяцев культивирования в накопительных культурах, содержащих подповерхностный образец осадка. Данный уровень концентрации метана сохранялся до завершения эксперимента (496 мг/л).

В накопительных культурах с глубинным осадком (GUII), обогащенных гидрокарбонат-ионом, конверсия *n*-алканов составила 20%, сульфат-ионом – не более 1.5% (рис. 12б). Степень конверсии ПАУ составила 45–46% вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов (рис. 12г). В накопительных культурах GUII концентрация метана в течение всего эксперимента оставалась практически неизменной (48–60.8 мг/л), так как значения были сопоставимы со значениями, определенными в начале эксперимента (51.2 мг/л). Убыль сульфат-иона в накопительных культурах, содержащих как подповерхностные, так и глубинные образцы, составила 25% от начальной концентрации.

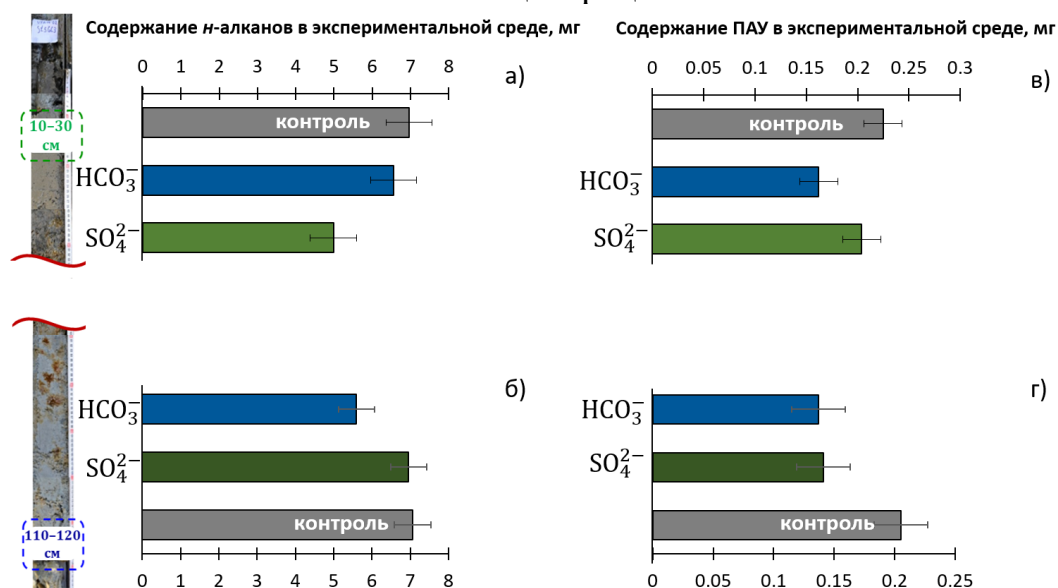


Рисунок 12. Убыль *n*-алканов (а, б) и ПАУ (в, г) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные гидрокарбонат- и сульфат-ионами в течение одного года инкубации. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Анализ клональных библиотек гена 16S рРНК бактериального сообщества в накопительных культурах GUI и GUII выявил представителей 15 филумов домена *Bacteria* и 3 филумов домена *Archaea* (*Halobacterota*, *Thermoplasmata*, *Thermoproteota*, класс *Bathyarchaeia*). Общими для двух образцов были последовательности бактерий, отнесенных к *Acidobacteriota*, *Atribacterota*, *Armatimonadota*, *Bacillota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota* и *Caldiseriicota*. Представители филумов *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, *Planctomycetota*, *Ca. Latescibacterota* обнаружены только в накопительных культурах подповерхностного образца; *Pseudomonadota* (класс *Alphaproteobacteria*), *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1), *Ca. Microgenomatus* (OP11), *Ca. Patescibacteria* (*Parcubacteria*, OD1) – только глубинного.

Инкубирование подповерхностного осадка с $H_2:CO_2$ в газовой фазе привело к доминированию в накопительных культурах представителей филума *Bacillota*, ближайшие филогенетические родственники которых являются некультивируемыми бактериями из донных осадков пресноводных водоемов с неустановленным метаболизмом, возможно, не связанным с анаэробным окислением углеводов. Убыль *n*-алканов в накопительной культуре GUI_ HCO_3 может обеспечиваться представителями филумов *Chloroflexota* и *Acidobacteriota*. Также в анаэробном окислении нефти могут принимать участие археи, представители филумов *Thermoproteota* и *Thermoplasmata*, составляющие 33 и 43% соответственно от библиотеки генов архей образца GUI_ HCO_3 .

В культуре GUII_ HCO_3 основная роль в деградации *n*-алканов может принадлежать бактериям филума *Chloroflexota* (доля в библиотеке генов – 33%) и *Bacillota* (17%), представленным семейством *Peptococcaceae*. *Peptococcaceae* наиболее часто выявляются в аноксигенных биотопах, ассоциированных с анаэробной деградацией ароматических углеводов (Rabus et al., 2016) и в накопительных анаэробных алканедеградирующих культурах совместно с метаногенными *Archaea* (*Methanotrichaceae* и *Methanomicrobiaceae*) (Tan et al., 2015). В культуре GUII_ HCO_3 основная доля последовательностей *Archaea* принадлежала представителям класса *Methanomicrobia*. Тем не менее, присутствие синтрофных бактерий и метаногенных архей не привело к значительной генерации метана в глубинном образце. Отсутствие процесса метангенерации в глубинных слоях осадка в ряде случаев было установлено ранее, как в нативных природных отложениях, так и в условиях эксперимента (Намсараев, Земская, 2000; Букин и др., 2018), несмотря на присутствие метаногенных архей в составе микробных сообществ.

Добавление сульфат-иона в экспериментальные флаконы, содержащие подповерхностный осадок, привело к формированию более разнообразного бактериального сообщества и большей убыли *n*-алканов в сравнении с метаногенными условиями. Доминирующее положение в нем занимали представители семейств *Caldiseriicaceae* (*Caldiseriicota*); *Anaerolineaceae*, *Dehalococcoidaceae* (*Chloroflexota*); *Thermoactinomycetaceae*, *Gracilibacteraceae* (*Bacillota*) и *Syntrophaceae* (*Desulfobacterota*). Несмотря на различные условия культивирования, в библиотеках генов 16S рРНК бактерий GUI_ HCO_3 и GUI_ SO_4 выявлены одни и те же ближайшие гомологи, отнесенные к *Desulfobacterota*, *Chloroflexota* и *Methanomicrobia*. В условиях присутствия смешанных акцепторов электронов, в зависимости от концентрации сульфата в среде, показана конкуренция и сосуществование сульфатредуцирующих и метаногенных популяций во время анаэробных процессов разложения гексадекана (Ma et al., 2017). Конкуренция, возможно, имеет место и в осадках оз. Байкал, где в процессе

деградации углеводородов принимают участие одни и те же микроорганизмы вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов.

Присутствующие в накопительных культурах микроорганизмы могут быть участниками процессов деградации не только *n*-алканов, но и ПАУ. В настоящее время на основе метаболической реконструкции геномов *Acidobacteriota*, *Atribacterota*, *Desulfobacterota*, *Ca. TA06* и классов *Dehalococcoidia*, *Anaerolineae* (*Chloroflexota*), *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) показано, что микроорганизмы в анаэробных условиях могут окислять короткоцепочечные *n*-алканы и ароматические соединения до жирных кислот, которые затем потребляются вторичными деструкторами (Dong et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Снижение концентрации ПАУ в донных осадках района нефтепроявления у м. Горевой Утес наблюдается с момента открытия естественного выхода нефти в 2005 г. Так, в 2006 г. $\Sigma_{\text{ПАУ}}$ (24 соединения) в донных осадках варьировала от 0.9 до 70 нг/г., в 2016 году – от 1.6 до 16 нг/г (Павлова и др., 2020; Gorshkov, Pavlova et al., 2020). Проведенный эксперимент показал, что снижение концентрации ПАУ обусловлено воздействием микробных сообществ как подповерхностных, так и глубинных донных осадков в анаэробных условиях вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. В глубинных отложениях в первую очередь подвергаются окислению полициклические ароматические углеводороды, а *n*-алканы в основном окисляются в водной толще в аэробных условиях или в подповерхностных осадках в случае обогащения их сульфатами.

5.2.1. Анаэробное окисление углеводородов микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская в психрофильных условиях

В культурах, содержащих подповерхностный осадок (K1), наибольшая убыль *n*-алканов (32–36%) отмечена в среде с нитратом и $\text{H}_2\text{:CO}_2$ в газовой фазе. В этих культурах содержание $\Sigma_{\text{алк}}$ в экспериментальной среде снизилось до 3.3–3.5 мг в сравнении с контролем (5.2 мг). В сульфатредуцирующей (K1_ SO_4) и железоредуцирующей культуре (K1_Fe) содержание алкановой фракции уменьшилось на 17–20% (рис. 13а; Павлова и др., 2024). В культурах из глубинного осадка (K2) максимальная конверсия *n*-алканов (48%) установлена в среде с Fe^{3+} . В присутствии других акцепторов электронов (HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) биodeградация *n*-алканов составляла 27–29% (рис. 13б).

Деградация ПАУ (55–65%) была сопоставима в накопительных культурах K1 и K2 (рис. 13в, г). Наибольшая конверсия полициклических ароматических углеводородов (64–65%) зафиксирована в культурах K1_ NO_3 и K2_ HCO_3 , где выявлено снижение $\Sigma_{\text{ПАУ}}$ с 0.4 мг в контроле до 0.14–0.15 мг в эксперименте. Среди индивидуальных полициклических углеводородов, наибольшая степень конверсии (55–79%) отмечена для нафталина, 1-метилнафталина, 2-метилнафталина, флуорена, антрацена, бензо[а]антрацена, бензо[б]флуорена, бензо[к]флуорена, бензо[а]пирена и бензо[ghi]перилена в культурах K1 и K2, вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. Наименьшей деградации (1–14%) подверглись 1-метилфенантрен, 9-метилфенантрен, пирен и бензо[е]пирен в накопительных культурах K1. Добавление нитрат-иона увеличивало степень конверсии этих соединений до 25%. В культурах K2 деградация 1-метилфенантрена, 9-метилфенантрена, пирена и бензо[е]пирена составила 12–29%.

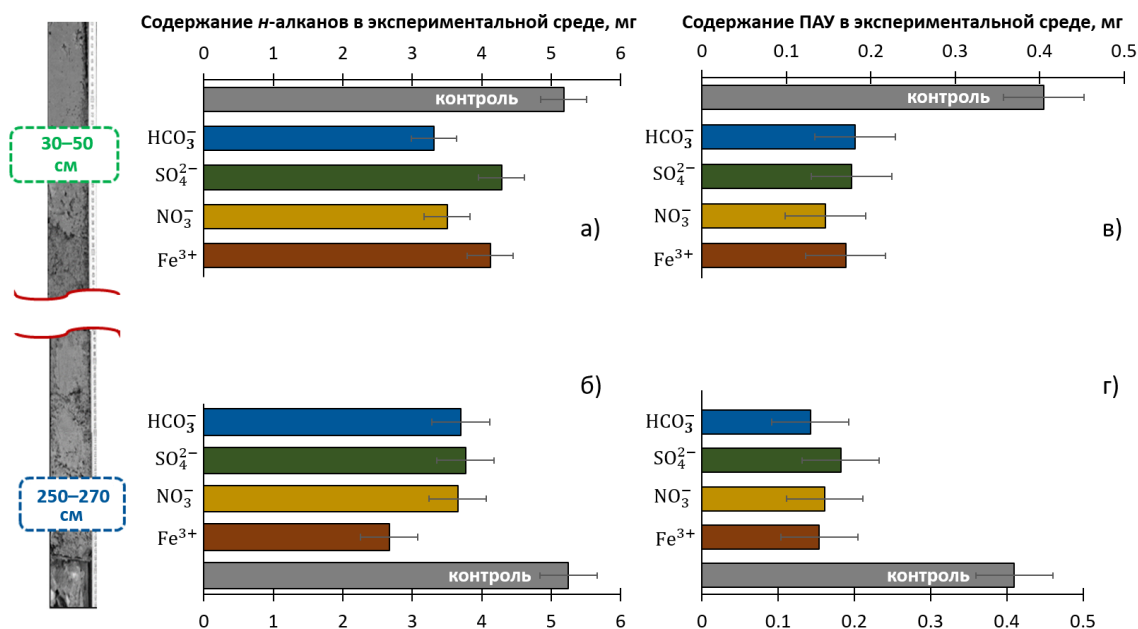


Рисунок 13. Убыль *n*-алканов (а, б) и ПАУ (в, г) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные гидрокарбонат-, сульфат, нитрат-ионами и Fe(III) в течение одного года инкубации. Цитировано по Павлова и др., 2024.

В накопительной культуре K1_НСО₃ выявлено образование метана. Концентрация метана в начале эксперимента составляла 0.04 мг/л осадка. Через двенадцать месяцев культивирования содержание метана увеличилось до 37.9 мг/л в сравнении с контролем. К концу эксперимента концентрация СН₄ составляла 27.2 мг/л. В накопительных культурах K2_НСО₃ концентрация метана в течение всего эксперимента оставалась практически неизменной (0.02–0.05 мг/л осадка), что свидетельствует об отсутствии метаногенеза. Образование этана было выявлено в накопительных культурах как с подповерхностным, так и с глубинным осадком, в сравнении с контролем. В культуре K1_НСО₃ через 6 месяцев культивирования концентрация С₂Н₆ увеличилась в 7 раз в сравнении с исходной (0.002 мг/л осадка) и составила 0.014 мг/л осадка. К концу эксперимента содержание этана снизилось до 0.003 мг/л. В культуре K2_НСО₃ концентрация этана увеличилась в 2 раза. Максимальное его содержание (0.02 мг/л осадка) зафиксировано по истечении 6 месяцев с начала эксперимента. К концу эксперимента концентрация этана в накопительных культурах K1_НСО₃ и K2_НСО₃ составляла 0.003–0.01 мг/л осадка соответственно.

В сообществе подповерхностного осадка доминирующее положение занимали микроорганизмы, способные хемогетеротрофно использовать различные соединения посредством аэробного и анаэробного дыхания (*Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*, *Ca. Sva0485*, *Ca. MBNT15*), анаэробно окислять метан (*Methylomonadaceae*, *Methanoperedenaceae*), а также синтрофно окислять углеводороды нефти (бактерии филумов *Bacillota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota*, археи *Halobacterota* и *Methanobacteriota*). Инкубация подповерхностного осадка в различных условиях приводила к увеличению доли бактерий некоторых таксонов, в частности *Bacillota*, *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* в составе накопительных культур.

Исследуемый керн имел повышенную минерализацию за счет гидрокарбонат-, сульфат-, нитрат-ионов и ионов хлора. Компонентный состав поровых вод исследуемого керна, вероятно, нивелировал действие добавленных акцепторов электронов в накопительные культуры, что привело к доминированию

микроорганизмов, сочетающих окисление соединений серы с денитрификацией (*Thiobacillus denitrificans*) в культурах, содержащих нитрат-ион, или доминированию восстанавливающих соединения азота микроорганизмов в культурах, содержащих сульфат-ион или железо. Об этом свидетельствует обнаружение архей рода *Ca. Methanoperedens*, первоначально описанных как анаэробно окисляющие метан в сочетании с восстановлением нитрата (Haroony et al., 2013). В настоящее время показано, что в геномах *Ca. Methanoperedens* присутствуют гены, кодирующие путь «обратного метаногенеза», мультигемовые цитохромы C-типа, которые, как предполагается, способствуют диссимиляционному восстановлению Fe(III), а также гены для окисления водорода и восстановления сульфата при синтрофном взаимодействии с *Desulfobacterota* (Cai et al., 2018; Bell et al., 2022).

Значимое влияние на биodeградацию *n*-алканов оказывало только добавление Fe^{3+} . В накопительных культурах, содержащих $\text{H}_2:\text{CO}_2$, SO_4^{2-} и NO_3^- , степень конверсии *n*-алканов была одинаковой, так же как и состав микробных сообществ, отличающийся незначительным варьированием вклада микроорганизмов различных систематических групп. В глубинном осадке конверсия углеводородов может проходить при участии представителей филумов *Bacillota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota* и класса *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*). В библиотеках генов 16S рРНК из глубинного образца в значимых количествах (1.8–4.3%) выявлены последовательности представителей филумов *Caldisericota*, *Elusimicrobiota* и *Ca. Nadarchaeota*. На основании реконструкции геномов этих прокариот показано, что бактерии обладают ферментативным метаболизмом, магнитотаксисом и участвуют в круговороте железа и серы, в то время как археи являются автотрофами, способными осуществлять фиксацию углерода через восстановительный ацетил-KoA путь, метаногенез и метаболизм алканов (Hua et al., 2019; Wang et al., 2019; Uzun et al., 2023).

5.2.2. Анаэробное окисление углеводородов микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская в термофильных условиях

Исследование образцов нефти, собранных с поверхности озера в районе Б. Зеленовская, показало, что это биodeградирующая ароматико-нафтенная нефть. Значения биомаркерных показателей катагенеза соответствуют градации МК2 и глубине погружения нефтепроизводящих отложений не менее 3 км (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2022). В районе нефтепроявления Б. Зеленовская нефть состоит преимущественно из высокомолекулярной битумной фракции. Скопления углеводородов длительное время находятся в донных отложениях и не поступают на поверхность водной толщи (Хлыстов и др., 2022). Высокая степень биodeградации нефти может быть обусловлена углеводородоокисляющей активностью микробных сообществ в анаэробных условиях в глубинных донных осадках, где расчетная температура составляет ~60–70°C (Хатчинсон и др., 1993), то есть в зоне функционирования термофильных микроорганизмов.

Для подтверждения этой гипотезы были проведены эксперименты по деградации нефти в анаэробных условиях при температуре 60°C. В результате по истечении 2.5 месяцев культивирования установлены сопоставимые значения убыли *n*-алканов и ПАУ в накопительных культурах, содержащих подповерхностный (Т1) и глубинный осадок (Т2), обогащенных $\text{H}_2:\text{CO}_2$, SO_4^{2-} . Содержание $\Sigma_{\text{алк}}$ в накопительных культурах Т1_НCO₃ и Т1_СО₄ снизилось до 1.5–1.6 мг/объем экспериментальной среды в сравнении с контрольными накопительными культурами (6.6 мг), в культурах Т2_НCO₃

и T2_SO₄ – до 1.5 мг. Концентрация ΣПАУ в присутствии сульфат- и гидрокарбонат-ионов в накопительных культурах, содержащих подповерхностный образец, по истечении эксперимента составила 0.03–0.035 мг, в глубинных – 0.04–0.045 мг, в сравнении с контрольными накопительными культурами (0.26 мг).

Метагеномный анализ библиотек гена 16S рРНК термофильных накопительных культур показал преобладание в них последовательностей представителей филума *Bacillota* (97%) (рис. 14). В числе доминирующих ОТЕ выявлены последовательности бактерий родов *Thermosediminibacter* (до 96% от общего числа выявленных последовательностей в библиотеке генов 16S рРНК *Bacteria* в культуре T2_HCO₃) и *Desulfofundulus* (до 22% в культуре T1_SO₄). Последовательность, отнесенная к роду *Desulfofundulus*, имела 97.9% сходства с термофильной бактерией *Desulfofundulus kuznetsovii* DSM 6115 (NR075068). *Desulfofundulus* spp. выявлены в подземных термальных минеральных водах, пластовых водах нефтяных резервуаров, горячих источниках, метаногенных реакторах, а также в горящих угольных пластах (Назина и др., 1988; Karnachuk et al., 2023; Nazina et al., 2024).

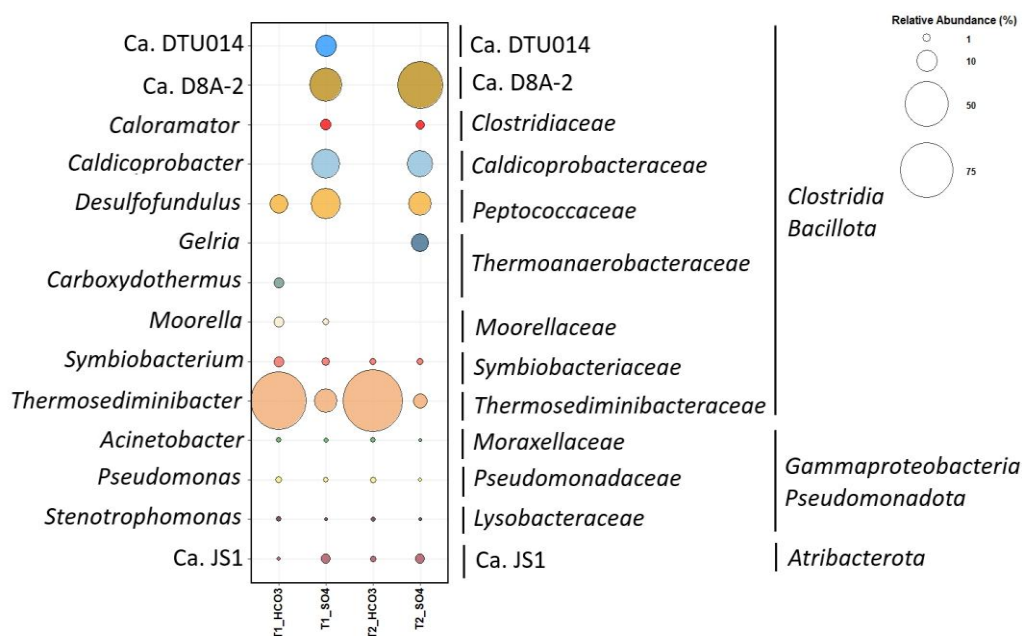


Рисунок 14.

Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне рода в библиотеках из термофильных накопительных культур. Таксономия приведена по LPSN.

Последовательность, отнесенная к *Thermosediminibacter*, имела 96% сходства с таковой у *Thermosediminibacter oceani*, изолированной из термофильных (52–76°C) накопительных культур, содержащих отложения, полученные во время Международной комплексной программы глубоководного бурения в океане (Lee et al., 2005). *Thermosediminibacter oceani* – анаэробный, барофильный, хемоорганотрофный термофил, способный использовать тиосульфат, элементную серу и MnO₂ как акцепторы электронов для роста.

Инкубация подповерхностного и глубинного осадков в присутствии сульфат-иона приводила к увеличению доли неклассифицируемых бактерий, последовательности которых были гомологичны представителям семейств-кандидатов DTU014 и D8A-2, выявленных в термофильных, анаэробных метаногенных реакторах. В культурах T1_HCO₃ и T2_HCO₃ определены последовательности бактерий родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* (*Pseudomonadota*); в культурах T1_SO₄ и T2_SO₄ – последовательности класса-кандидата JS1 (*Atribacterota*).

Таким образом, результаты экспериментов, проведенных с использованием донных осадков из двух районов нефтепроявлений при разных температурах, коррелируют с

геохимическими данными по составу органического вещества и отдельных биомаркерных соединений в донных отложениях. Осадки ГУ обогащены органическим веществом, биodeградированным в разной степени в зависимости от глубины залегания, в сравнении с БЗ. Групповой состав битумоидов и повышенный индекс продуктивности свидетельствуют о постоянном нефтенасыщении осадков ГУ. Присутствие нафтенового горба, высокий уровень зрелости *n*-алканов ($\text{CPI} \leq 2$), снижение концентрации ПАУ и *n*-C₃₅–*n*-C₃₉ с глубиной в образцах ГУ указывают на процессы биodeградации (Morgunova, Pavlova et al., 2022). В результате фракционирования нефти в верхних слоях донных отложений и образования битумных построек на дне озера в районе ГУ, в водную толщу поступает фракция, обогащенная *n*-алканами (Khlystov et al., 2009; Gorshkov, Pavlova et al., 2020), которая эффективно окисляется микроорганизмами в аэробных условиях в водной толще. Частичная потеря низкомолекулярных алканов и сохранение высокомолекулярных, а также высокие значения концентрации полициклических углеводородов в донных осадках способствуют развитию микробного сообщества, нацеленного на биodeградацию ароматических соединений в анаэробных условиях, о чем свидетельствует снижение их концентрации в течение 20 лет с момента открытия нефтепроявления (Gorshkov, Pavlova et al., 2020).

В осадках БЗ концентрация органического вещества значительно ниже, отсутствуют *n*-алканы и изопреноиды, в составе битумоидов доминируют асфальтово-смолистые компоненты (до 94%) (Хлыстов и др., 2022; Костырева, Павлова и др., 2022; Morgunova, Pavlova et al., 2022). В более длительно существующем районе БЗ (нефтепроявление известно с XVIII века) нефть имеет продолжительный путь прохождения от источника генерации и длительно накапливается в донных отложениях, где происходит активная анаэробная биodeградация как *n*-алканов, так и ПАУ, вероятнее всего, в термофильных условиях. О длительном пути нефти от источника и о ее накоплении свидетельствует содержание перилена в битуме, которое на два порядка величины выше, чем в нефти из района нефтепроявления Горевой Утес (Хлыстов и др., 2022).

Биodeградация нефти накопительными культурами сопровождалась образованием метана. В эксперименте с осадками БЗ и ГУ максимальная концентрация образовавшегося метана, за вычетом контрольных проб, составила 54 мл/л и 728 мл/л соответственно. В среднем диапазон концентрации метана в донных осадках оз. Байкал составляет от нескольких мкл/л до 10 мл/л. В районах, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, эти значения могут быть в 7–20 раз выше (Земская и др., 2008; Rogodaeva et al., 2017). Таким образом, значения концентрации образуемого метана при биodeградации нефти в условиях эксперимента являются весьма значимыми, особенно в случае с образцами из нефтепроявления ГУ. Генерация этана, напротив, была более характерна при культивировании сообществ из отложений БЗ, где концентрация C₂H₆ после года культивирования увеличилась в 2.3–7 раз в сравнении с началом эксперимента.

Образование метана при биodeградации нефти показано во многих нефтяных резервуарах (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Назина и др., 2006; Jones et al., 2008). Схожие процессы образования углеводородных газов происходят и в донных осадках озера Байкал, где установлено более 60 участков, содержащих газогидраты и расположенных в южной и центральной котловине озера (Khlystov et al., 2022). Генерация метана и этана при биodeградации нефти в экспериментальных условиях может объяснить нахождение газа из районов нефтепроявлений оз. Байкал за пределами

термогенной зоны на эмпирической диаграмме по изотопным данным углерода и водорода (Nashikubo et al., 2023) за счет добавления вторичного микробного газа к термогенному. Образование углеводородных газов в экспериментальных условиях установлено не только для осадков из районов нефтепроявлений (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024). В накопительных культурах, содержащих микробное сообщество донных осадков метанового сипа Посольская Банка, доля этана в образующихся углеводородных газах составляла от 1.5 до 26.8% (Павлова и др., 2014).

5.3. Функциональные гены анаэробной деградации углеводов в метагеномах из донных осадков района нефтепроявления Б. Зеленовская

Состав нефти в донных осадках района нефтепроявлений указывает на ее трансформацию в результате деятельности микробных сообществ. Об этом свидетельствуют углеводородоокисляющая активность микроорганизмов и молекулярный анализ филогенетического разнообразия микробных сообществ. Для определения функциональной роли прокариот в процессах биodeградации нефти проведена аннотация геномов из метагеномных массивов данных (MAG) трех образцов донных осадков района нефтепроявления БЗ.

Анализ геномных данных, полученных из образца ДО, соответствующего глубине керна 10 см (БЗ_10), позволил реконструировать 31 MAG, из образцов кернов с глубины 100 см (БЗ_100) – 156 MAG и 180 см (БЗ_180) – 80 MAG. Реконструированные геномы из всех образцов представляли доминирующие таксоны, что согласуется с данными анализа фрагментов гена 16S рРНК. Аннотированные геномы отражали метаболизм, характерный для микроорганизмов отложений оз. Байкал, включая круговорот серы, азота и метана, разложение углеводов и фиксацию углерода (Zemskaya, Pavlova et al., 2025).

Средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) варьировали от 74.52% до 99.77%. Ближайшими гомологами MAGs байкальских бактерий и архей были последовательности геномов из экотопов, загрязненных углеводородами, метаногенных биореакторов, холодных сипов, гидротермальных морских вентов, образцов гидротермально нагретых слоев осадочных пород в бассейне Гуаймас (Калифорнийский залив, Мексика), а также водной толщи и донных осадков пресноводных озер, включая озеро Танганьика.

Филогеномный анализ MAGs показал, что некоторые последовательности из образца БЗ_10 на уровне класса относились к таксонам, неидентифицированным в образцах БЗ_100 и БЗ_180 (рис. 15). Так, только в подповерхностном осадке выявлены MAGs, отнесенные к порядку *Limnocyndrales* (*Chloroflexota*) – зеленых несернистых бактерий, выявленных в пресноводных экосистемах, в том числе глубоководных (Mehrshad et al., 2018), или *Desulfomonilia* (*Desulfobacterota*) – классу диссимиляционных сульфатредуцирующих прокариот с дыхательным, иногда ферментативным типом метаболизма, использующих метоксигруппы ароматических соединений. Также только в подповерхностном образце реконструированы MAGs, отнесенные к классам *Thermodesulfovibrionia* (*Nitrospirota*) и *Verrucomicrobiae* (*Verrucomicrobiota*), а также филумам-кандидатам (WTBG01, RBG-13-43-22) (филогеномные деревья приведены в тексте диссертации).

Реконструированные в настоящем исследовании MAGs, имеющие гомологов из осадков бассейна Гуаймас, были идентифицированы как представители *Ca. Pacearchaeota*, *Ca. Woesearchaeota* и GIF9 (*Dehalococcoidia*, *Chloroflexota*). Бактерии

GIF9 выявляются в недрах и гидротермальных источниках (Mara et al., 2023). К группе GIF9 было отнесено 17 геномов из БЗ_100, БЗ_180 и 1 из БЗ_10.

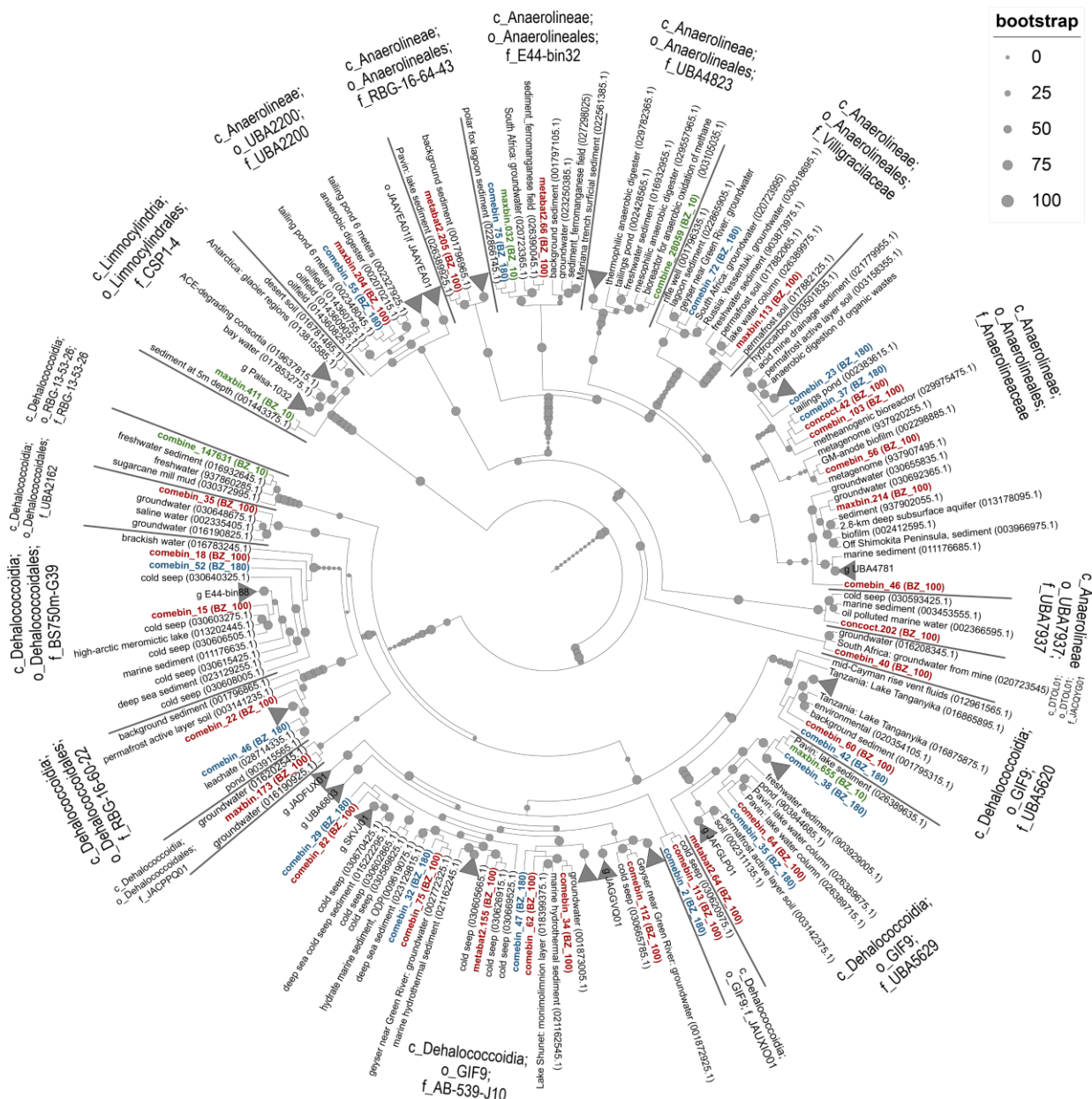


Рисунок 15. Филогеномное дерево реконструированных геномов бактерий, отнесенных к филуму *Chloroflexota* из образцов БЗ_10 (выделено зеленым), БЗ_100 (выделено бордовым) и БЗ_180 (выделено синим). Таксономия приведена по GTDB.

В микробиоме из осадка БЗ_100 аннотирован геном сопсост.81, идентифицированный как *Ca. Electryoneota*, класс AABM5-125-24. MAG сопсост.81 был гомологичен таковому из бассейна Гуаймас и образцов воды озера А (Арктика), одного из самых северных озер (Vigneron et al., 2023). Бактерии *Ca. Electryoneota* доминировали в придонном слое бескислородной сульфидной морской воды озера А, изолированного от Северного Ледовитого океана около 3000 лет назад, и, таким образом, могут быть либо реликтом древних океанических условий, либо эндемиком высокоарктической системы на высоком таксономическом уровне. Анализ генома указывает на строго анаэробный образ жизни с возможностью восстановления сульфатов и серы и разнообразным метаболизмом углерода (Vigneron et al., 2023).

MAGs, гомологичные выявленным в осадках бассейна Гуаймас и Б. Зеленовской, обнаружены в водной толще озера Танганьика (ОТ) (Tran et al., 2021). Озеро является

одним из трех пресноводных озер, в которых зарегистрированы естественные нефтепроявления и содержит более 23 Тг метана под оксиклином (Simoneit et al., 2000; Tran et al., 2021). Кроме MAGs, отнесенных к GIF9 (*Dehalococcoidia*) в микробиомах из ОТ и БЗ, выявлены представители порядков: *Methanomethylicaes* (p_Thermoproteota; c_Methanomethylicia), TCS64 (p_Thermoproteota; c_Bathyarchaeia), *Syntrophales* (p_Desulfobacterota; c_Syntrophia), *Ca.* SM23-61 (p_Desulfobacterota), *Ca.* UBA2258, *Ca.* SM23-42 (p_WOR-3) и *Ca.* UBA2199 (p_Acidobacteriota; c_Aminicenantia).

Анализ суммарной нормализованной доли чтений, картируемых на функциональные гены (ТПМ, *tpm transcript per million*), имеющих идентификационный номер в базе данных KEGG (KO/pfam), выявил в метагеномах подповерхностного и глубинных образцов гены активации углеводов путем анаэробного гидроксирования, присоединения фумарата и деароматизации (рис. 16а), гены, ответственные за метаболизм промежуточных ароматических продуктов, гены метаногенеза и синтрофных взаимодействий (рис. 16б) (Sierra-Garcia et al., 2020). В метагеномах не обнаружены гены анаэробного карбоксилирования и ген нафтил-2-метилсукцинатсинтазы (NMS), ответственного за присоединение фумарата к нафталину и другим ПАУ. С наибольшей частотой искомые функциональные гены выявлены в метагеноме БЗ_10, который характеризовался присутствием генов, кодирующих пути катаболизма углеводов как в анаэробных, так и аэробных условиях. К ним относятся гены, кодирующие: 1) этилбензолдегидрогеназу (*EBDH*, K10700), участвующую в активации ароматических соединений посредством кислороднезависимого гидроксирования; 2) кластер генов (K15760–K15765, K00055, K00141), катализирующий гидроксирование метильной группы толуола с образованием бензилового спирта, бензальдегида и бензоата; 3) бензоат-КоА-лигазу (*badA*, K04110), ответственную за превращение бензоата в бензоил-КоА; 4) бензоил-КоА-редуктазу II класса (*oah/bamA*, K07539), осуществляющую АТФ-независимый путь анаэробной деароматизации углеводов, и 5) гены аэробного окисления *n*-алканов и ПАУ, которые либо не встречались в метагеномах глубинных образцов, либо встречались с минимальной частотой.

В метагеномах из глубинных осадков наиболее часто встречались гены, кодирующие бензилсукцинатсинтазу (*bssA*, K07540) – глицил-радикальный фермент, присоединяющий фумарат к ароматическому соединению. Гены, кодирующие различные субъединицы гетеротетрамernого фермента бензоил-КоА-редуктазы I класса (*bcrABCD*, K04112–K04115), установлены со схожей частотой в метагеномах всех исследуемых образцов. Ранее этот ген был обнаружен в собранных геномах различных таксономических групп байкальских бактерий и архей, обитающих в донных осадках грязевого вулкана Кедр (Zemskaya, Pavlova et al., 2025). Гены, ответственные за синтрофные взаимодействия при превращении углеводов и входящие в различные COG (кластеры ортологичных генов), выявлены в метагеноме подповерхностного образца с незначительным снижением в образцах по глубине осадка (рис. 16б). В то же время гены, ответственные за осуществление ацетокластического и гидрогенотрофного метаногенеза (суммарно), с наибольшей частотой были выявлены в образце, соответствующем глубине керна 100 см (рис. 16б).

Наибольшее количество генов анаэробного окисления углеводов выявлено в MAGs, классифицированных как *Desulfobacterota* (*Syntrophia*, *Deferrimicrobia*, *Syntrophorhabdia*), *Chloroflexota* (*Dehalococcoidia*, *Anaerolineae*), *Bacteroidota*

(*Bacteroidia*, сем. *VadinHA17*) и *Actinomycetota* (*Thermoleophilia*, *Geothermincolia*) *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*).

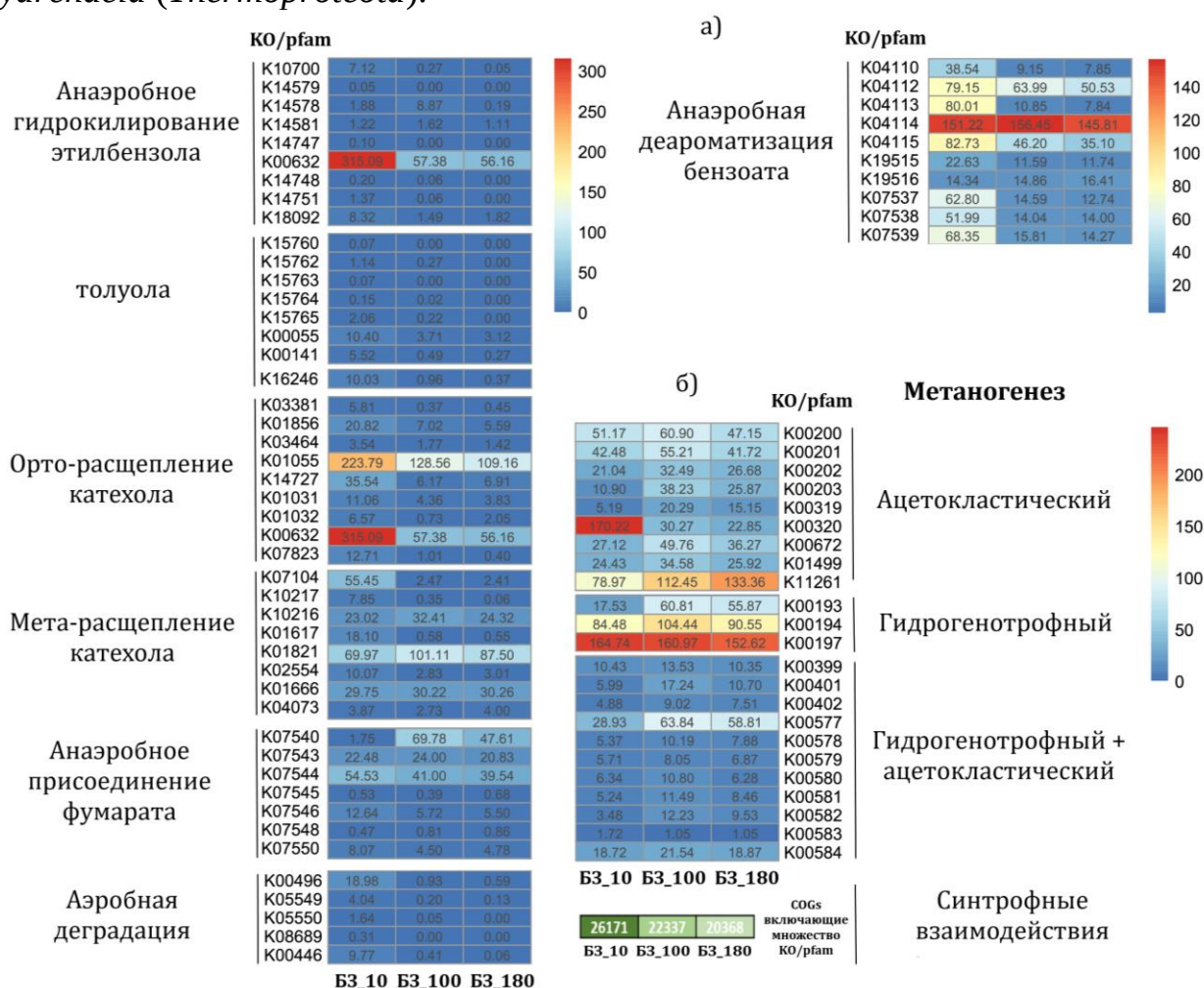


Рисунок 16. Тепловая карта распределения нормализованной доли чтений, картируемых на функциональные гены (ТПМ, *tpm transcript per million*, имеющих идентификационный номер в базе данных KEGG (KO/pfam), отвечающих за активацию углеводов (а), гены метаногенеза и синтрофных взаимодействий (б). COGs – кластеры ортологичных генов цитированы по Sierra-Garcia et al., 2020.

Гены деградации бензоата и нитротолуола обнаружены в геномах представителей порядков *Pluralincolimonadales* (*Ca. Omnitrophota*), *Sedimentisphaerales* (*Planctomycetota*), *Methylomirabilales* (*Methylomirabilota*), *Desulfotomaculales* (*Bacillota*), филумов-кандидатов WOR-3 и *Electryoneota*. В MAGs, принадлежащих домену *Archaea* и аннотированных из метагеномов B3_100 и B3_180, наибольшее количество генов, связанных с путями деградации промежуточных продуктов окисления углеводов, было выявлено в реконструированных геномах *Bathyarchaeia*.

Таким образом, метагеномный анализ микробных сообществ донных осадков, отобранных на разной глубине в районе естественного нефтепроявления, показал наличие генов, ответственных за деградацию углеводов в анаэробных условиях, а также генов, участвующих в синтрофных превращениях углеводов и метаногенезе. С наибольшей частотой функциональные гены деградации углеводов выявлены в метагеноме из подповерхностного осадка, который характеризовался присутствием путей катаболизма углеводов как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Гены аэробного окисления *n*-алканов и ПАУ в метагеномах глубинных осадков либо не встречались, либо встречались с минимальной частотой. В метагеноме подповерхностного образца преобладали гены, участвующие в активации

ароматических соединений посредством кислороднезависимого гидроксирования, в глубинных – гены присоединения фумарата к ароматическим соединениям. Гены активации углеводов путем деароматизации установлены со схожей частотой во всех метагеномах.

Глава 6. Микробные сообщества осадочной толщи в районах разгрузки углеводов

Метабаркодинговые исследования таксономического разнообразия микробных сообществ, обитающих в донных осадках грязевых вулканов, метановых и нефте-метановых сипов, показали, что в осадочной толще озера Байкал присутствует значительное количество представителей «редкой биосферы», которые обычно составляют менее 1% в составе микробных сообществ (Pascoal et al., 2021). В восстановленных осадках метанового сипа Посольская Банка доля термофильных *Ca. Nadarchaeota* составляла до 42%, в осадках грязевых вулканов Кедр, Кукуй, Маленький – до 6%, в донных отложениях из районов нефтепроявлений (Б. Зеленовская, Горевой Утес) – до 3.8%. Доля *Ca. Zixibacteria* и *Elusimicrobiota* достигала 4.6% в глубинных осадках грязевых вулканов и районов нефтепроявлений, в сравнении с подповерхностными отложениями (0.06–2%). В целом состав микробных сообществ донных осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводов, является схожим на уровне филумов, но различается на уровне семейств (Zemskaya, Pavlova et al., 2025). Так, в поверхностных осадках нефте-метановых сипов бактерии, осуществляющие синтрофное окисление углеводов с образованием метана при участии метаногенных архей, представлены семействами *Anaerolineaceae* (*Chloroflexota*) и *Syntrophaceae* (*Desulfobacterota*). В глубинных – семействами *Dehalococcoidaceae* и *Smithellaceae*, что, вероятно, обусловлено различным компонентным составом углеводов по глубине осадочной толщи.

Основное различие в таксономическом составе микробных сообществ наблюдалось между подповерхностными и глубинными осадками. Микробные сообщества подповерхностных осадков характеризуются большим бактериальным разнообразием, чем глубинных. В них преобладали типичные для пресноводных озер органотрофные бактерии *Chloroflexota*, *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Ca. MBNT15*, *Nitrospirota*, *Pseudomonadota*, *Bacteroidota* и *Desulfobacterota* (Земская и др., 2018; Kadnikov et al., 2012; Zemskaya et al., 2015; Zakharova et al., 2018). С глубиной осадка снижается представленность хемоорганогетеротрофных бактерий и возрастает доля *Caldiseriicota* (до 12%) и *Atribacterota* (до 42%).

Структура архейной компоненты сообществ также варьировала между подповерхностными и глубинными слоями осадочной толщи. Одно из основных различий относилось к составу филума *Thermoproteota*, доля которого варьировала от 8 до 85% от выявленных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК архей в различных типах геологических структур. В поверхностных илах *Thermoproteota* в большей степени представлены аэробными *Nitrososphaerales* (до 11% суммарно в осадках районов разгрузки углеводов), среди которых наибольшую численность имели аммоний-окисляющие археи рода *Ca. Nitrosopumilus*, семейства *Nitrosopumilaceae* (12–31% – в осадках грязевых вулканов). Представители семейства *Nitrosopumilaceae* могут составлять до 40% от всей архейной компоненты в морских экосистемах и до 19% от общего числа прокариотических клеток в олиготрофных озерах (Klotz et al., 2022 и ссылки в статье). В работе (Cabello-Yeves et al., 2020) показано, что, несмотря на существенные различия, глубоководные зоны океана и озеро

Байкал демонстрируют определенное сходство по составу микробиомов. Это проявляется в присутствии общих таксонов микроорганизмов, таких как *Nitrosopumilaceae*, *Ca. Pelagibacteraceae* (*Pseudomonadota*) и *Ca. SAR202* (*Chloroflexota*).

В глубинных осадках районов разгрузки суммарная доля представителей порядка *Nitrososphaerales* не превышала 1%. В них доминировали представители класса *Bathyarchaeia*, чья доля составляла до 60% (в нефте-метановых сипах) и до 51% суммарно во всех образцах. С глубиной осадка возрастает до 8% доля неклассифицируемых *Crenarchaeota* (*Thermoproteota*). Также с глубиной осадка суммарно увеличивается численность *Ca. Nadarchaeia* (до 7%) в сравнении с подповерхностными осадками (1%), и снижается доля представителей *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* (*Halobacterota*), *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmata*) и *Ca. Woesearchaeota*. Анализ геномов *Ca. Woesearchaeota* показал, что эти археи могут участвовать в анаэробном круговороте углерода, азота и серы. Высокая совместная встречаемость с метаногенными археями предполагает возможность синтрофных отношений между этими организмами (Liu et al., 2021).

В целом анализ микробных сообществ 75 образцов донных отложений озера Байкал, отобранных как в фоновых районах, так и в зонах разгрузок газо- и нефтенасыщенных флюидов, показал, что возрастание доли метаногенных микроорганизмов происходит в ряду от фоновых осадков к осадкам нефте-метановых сипов. В сообществах окисленных осадков фоновых районов относительная численность метаногенных архей в среднем составляла чуть более 1% от всех выявленных *Archaea*. При этом метаногенная компонента была почти полностью представлена микроорганизмами порядка *Methanomassiliicoccales* (Букин, Павлова и др., 2023). В донных отложениях грязевых вулканов максимальная доля метаногенных архей варьировала от 12 до 39% от всех архей. Как и в фоновых осадочных толщах, в поверхностных слоях доминировали представители *Methanomassiliicoccales*, с увеличением глубины возрастал вклад метаногенов за счет представителей гидрогенотрофных и ацетокластических архей семейств *Methanoregulaceae* (*Methanospirillaceae*) и *Methanotrichaceae*. Отличительной особенностью сообществ донных отложений грязевых вулканов являлось присутствие в большинстве из них небольшого процента метилотрофных микроорганизмов порядка *Methanomethyloales* (*Methanomethyloales*), редко обнаруживающихся в других районах. Наибольшая относительная численность метаногенных архей выявлена в богатых органическим веществом донных отложениях нефте-метановых сипов Горевой Утес и Б. Зеленовская, где их доля превышала 20% даже в поверхностных слоях. При этом состав сообществ сходен с таковым в фоновых районах и грязевых вулканах (Zemskaya, Pavlova et al., 2025).

Микробное сообщество глубинных донных осадков в большей части представлено последовательностями микроорганизмов, выявляемых в объектах, географически весьма отдаленных от оз. Байкал. В Мировом океане обнаружение одних и тех же филогенетических бактерий в отдаленных друг от друга районах объясняется их распространением океаническими течениями, которые играют ключевую роль в пассивном распространении микроорганизмов из места их происхождения (Chakraborty et al., 2020; Gittins et al., 2022). Озеро Байкал, расположенное в центральной части Байкальской рифтовой зоны, не связано океаническими течениями с Мировым океаном. Выявление последовательностей микроорганизмов, имеющих ближайших гомологов из географически весьма отдаленных от оз. Байкал районов, может быть результатом их вертикальной миграции совместно с глубинными флюидами из зоны

генерации углеводородов либо из гидротерм, расположенных на глубине ~4–6 км, формирование которых проходило в начале неогенового периода (Ломоносов, 1974). В этот же период, на рубеже миоцена и плиоцена, сформировалась современная система срединно-океанических хребтов в Мировом океане.

Глава 7. Углеводородокисляющая активность микробных сообществ водной толщи и донных осадков в аэробных условиях

Открытие в 2005 г. нового района естественного выхода углеводородов у мыса Горевой Утес позволило в режиме реального времени изучать качественные и количественные изменения в составе нефти и численности микроорганизмов. В первые годы исследований отмечалось увеличение количества культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов (УВОМ) как в водной толще, так и в донных отложениях. В зоне нефтяных slickов, образующихся на поверхности водной толщи, количество культивируемых УВОМ в 12 раз превышало значения в воде фоновых районов. В донных осадках увеличение численности отмечено в первые два года (2005–2007 гг.) (до 250 ± 27 тыс. КОЕ/г) и последующее уменьшение к 2017–2019 гг. до 90 ± 1 тыс. КОЕ/г. В настоящее время значения численности УВОМ сопоставимы с таковыми, зафиксированными в 2017–2019 гг. (Павлова и др., 2020; Земская, Павлова и др., 2021).

7.1. Разнообразие культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов, наличие генов аэробного окисления *n*-алканов и способность к синтезу поверхностно-активных веществ

В чистую культуру выделено 108 штаммов аэробных углеводородокисляющих микроорганизмов. На основе анализа последовательности гена 16S рРНК исследуемые организмы отнесены к бактериям родов: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Bosea*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Novosphingobium*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium*, *Acidovorax* (Ломакина, Павлова и др., 2009; Lomakina et al., 2009).

Детекция генов окисления *n*-алканов (*alkB*) у чистых культур аэробных углеводородокисляющих микроорганизмов посредством ПЦР-амплификации с тремя группами специфичных праймеров показала, что большая часть исследованных штаммов (76%) содержала *alk* гены III группы, ответственные за деградацию широкого спектра *n*-алканов. У 10% штаммов выявлены *alk*-гены I группы. *Alk*-гены II группы выявлены у представителей рода *Acinetobacter* sp. (Павлова и др., 2010).

Способность к синтезу клеточно-связанных ПАВ изучали у шести штаммов, отобранных на основании результатов экспериментов по деградации нефти в лабораторных условиях. Штамм № 5–05, отнесенный к *Pseudomonas fluorescens*, был выделен из водной толщи района ГУ. За 36 суток эксперимента в присутствии данного штамма, показавшего положительную ПЦР-реакцию на III группу *alk*-генов, окислилось 35% *n*-алканов нефти с длиной цепи C_{10} – C_{24} (Павлова и др., 2011). Пять штаммов, отнесенные к роду *Rhodococcus*, были выделены из битумной постройки, полученной с помощью ГОА «МИР» со дна оз. Байкал (Likhoshvay et al., 2013). Все штаммы осуществляли биодеструкцию *n*-алканов. Для всех штаммов, кроме штамма №2, было характерно потребление длинноцепочечных *n*-алканов (от C_{21} и далее), концентрации которых уменьшились на 46–100%, при увеличении в 2–3 раза содержания короткоцепочечных алканов (C_{12} – C_{20}) (Лихошвай и др., 2010). В водных эмульсиях экстрактов биомассы бактерий было обнаружено снижение поверхностного натяжения до уровня 35.93–44.71 мН/м и проявление эмульгирующей активности,

равной 23.7–32.4%, при исходных показателях 73 мН/м и 0%, соответственно.

Наиболее активным оказался штамм *Rhodococcus erythropolis* (№ 4–08), снижающий поверхностное натяжение на 27 мН/м. Анализ состава потенциальных биосурфактантов, извлеченных из флоккул, показал, что в составе липидов присутствует трегалолипид, содержащий 2 остатка жирных кислот, каждая из которых имеет одну двойную связь. А также штамм *Pseudomonas fluorescens* (№ 5–05), обладающий не только поверхностно-активными, но и эмульгирующими свойствами. Перспективным для дальнейших исследований является штамм *Rhodococcus globerulus* (№ 2–08), обладающий слабой поверхностной активностью (снижает поверхностное натяжение на 7.26 мН/м) и выраженной эмульгирующей активностью.

7.2. Влияние стимуляторов роста (протатранов) на штаммы микроорганизмов, изолированные из оз. Байкал, обладающие способностью к синтезу биоПАВ и углеводородокисляющей активностью

Существует большое количество методов, позволяющих снизить загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами (Rosa, Triguís, 2007; Couto et al., 2014). Биологические методы считаются наиболее перспективными и основаны не только на использовании биопрепаратов, содержащих углеводородокисляющие микроорганизмы, но и на активизации микробного сообщества загрязненного объекта (Boronin et al., 2002; Belyaev et al., 2003; Filatov et al., 2017; Nazina et al., 2017; Varjani, Urasani, 2017). В естественных условиях процессы биodeградации протекают в течение длительного времени, особенно в регионах с пониженной температурой. Для активизации процессов жизнедеятельности углеводородокисляющих микроорганизмов при низких температурах возможно применение биологически активных соединений в качестве стимуляторов роста, в частности арилхалькогенил-ацетатов трис-(2-гидрокси-этил)аммония, названных протатранами (Mirskova et al., 2015; Adamovich et al., 2017).

В качестве тест-объектов были использованы штаммы *R. erythropolis* (№ 4–08) и *P. fluorescens* (№ 5–05), описание углеводородокисляющих свойств которых приведено выше. В результате проведенных исследований выявлены различия в степени влияния протатранов 1–3 (различающихся формулой) на рост двух штаммов микроорганизмов, отличающихся по физиолого-биохимическим свойствам (Pavlova et al., 2019). В отношении *R. erythropolis* (№ 4–08) все три тестируемых соединения оказывали влияние на скорость роста микроорганизма. Добавление в культуральную среду соединений 1–3 при низкой температуре (10°C) в микроконцентрациях (10^{-4} – 10^{-8} мас. %) многократно (в 2–16 раз, в зависимости от продолжительности культивирования, концентрации и типа аниона) увеличивало скорость генерации бактерий рода *R. erythropolis*. Влияние соединений 1–3 на рост *P. fluorescens* проявлялось слабее. Полученные результаты показали перспективность исследований протатранов ряда А в качестве эффективных биостимуляторов роста, развития и активности бактерий-нефтедеструкторов. Преимуществом синтетических биостимуляторов 1–3 является их низкая стоимость, растворимость в воде, устойчивость при хранении, нетоксичность и эффективность в низких (1×10^{-4} – 1×10^{-8} мас. %) концентрациях (Павлова О.Н., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Земская Т.И. Патент на изобретение № 2694593, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе экспериментально подтверждено поступление микроорганизмов из зоны генерации углеводов в подповерхностные осадки вместе с газо- и нефтенасыщенными флюидами. Из поверхностных осадков выделены и

охарактеризованы чистые культуры термофильных факультативно-анаэробных микроорганизмов рода *Thermicanus* sp. (PB15/Grf7geo) и рода *Thermaerobacter* sp. PB12/4term (VKM В–3151). Оптимальная температура роста изолированных штаммов составляет 60°C. Метаболизм, нехарактерный для типовых видов бактерий рода *Thermaerobacter*, закреплен в геноме *Thermaerobacter* sp. PB12/4term и может обеспечивать жизнедеятельность на основе хемолитотрофии в глубинных донных осадках с использованием неорганических доноров и акцепторов электронов.

В оз. Байкал, как и в Мировом океане, действует механизм геологической микробной петли жизнеспособных прокариот, циркулирующих из глубинной осадочной толщи и обратно в нее. Поступающие флюиды влияют на структуру микробных сообществ и обуславливают значительную долю представителей «редкой биосферы» (*Ca. Nadarchaeota*, *Ca. Zixibacteria* и *Elusimicrobiota*) в осадочной толще.

При воспроизведении условий, характерных для зоны генерации углеводородов, установлено, что выявляемые в донных отложениях дибензотиофены, три- и моноароматические стероиды, ретен и гаммацерен образуются в результате преобразования биомассы диатомовых водорослей микробными сообществами осадочной толщи. Участие микроорганизмов в образовании ретена предполагалось и ранее, но экспериментально подтверждено впервые. Учитывая, что ретен используется в качестве биомаркера хвойных растений при реконструкции палеоклимата, полученные данные позволят более корректно интерпретировать происходившие в далеком прошлом процессы.

Проведенные исследования показали, что в районе нефтепроявлений обитает микробное сообщество с повышенной численностью углеводородокисляющих микроорганизмов в зонах, содержащих углеводороды. Получены углеводородокисляющие штаммы родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, синтезирующие гликолипидные биосурфактанты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами. Большинство штаммов обладает *alk* генами III группы, ответственными за деградацию широкого спектра *n*-алканов, идентичными в большинстве случаев *alkB*-генам, обнаруженным у *Rhodococcus erythropolis*. На основе экспериментов предложено применение арилхалькогенилацетатов трис(2-гидроксиэтил)аммония – протатранов в качестве биостимуляторов роста углеводородокисляющих бактерий. Обнаруженный эффект положительного влияния протатрановых соединений на увеличение скорости роста *Rhodococcus erythropolis* при низких положительных температурах может быть использован при разработке экологически безопасных методов восстановления объектов окружающей среды в случае загрязнения их нефтью.

Впервые получены данные о роли анаэробных микробных сообществ в процессах биodeградации нефти в осадочной толще пресноводной и глубоководной экосистемы. В анаэробных психрофильных условиях более активная конверсия *n*-алканов (до 35%) и ПАУ (до 65%) проходила в эксперименте с осадками, отобранными в длительно существующем районе нефтепроявления Б. Зеленовская. В подповерхностных осадках происходит деградация как *n*-алканов, так и ПАУ, в глубинных – биodeградации подвергаются в основном полициклические ароматические углеводороды. Создание термофильных условий (60°C), характерных для верхней границы зоны генерации углеводородов, в накопительных культурах привело к доминированию бактерий семейств *Thermosediminibacteraceae*, *Desulfotomaculaceae*, *Thermoanaerobacteraceae*, *Moorellaceae*, *Symbiobacteriaceae*, *Caloramatoraceae*, обычно занимающих, на основе данных метабаркодирования, минорное положение в составе микробных сообществ

подповерхностных осадков или углеводородоокисляющих анаэробных психрофильных накопительных культур. Проведенные эксперименты показали более высокую скорость трансформации углеводородов нефти микробными сообществами донных осадков в термофильных условиях, чем в психрофильных. За короткий период времени (2.5 месяца) убыль *n*-алканов в термофильных условиях составила до 77%, ПАУ – до 89%.

Как и в других нефтяных экосистемах, деградация нефти сопровождается образованием вторичного микробного газа (метан, этан). Генерация метана и этана при биodeградации нефти в экспериментальных условиях может объяснить нахождение газа в донных осадках районов нефтепроявлений за пределами термогенной зоны на эмпирической диаграмме по изотопным данным углерода и водорода (Nashikubo et al., 2023) за счет добавления вторичного микробного газа к термогенному.

Экспериментальные данные по деградации нефти в анаэробных условиях подтверждены геномными данными. Метагеномный анализ микробных сообществ подповерхностных и глубинных донных осадков района естественного нефтепроявления Б. Зеленовская показал наличие генов, ответственных за деградацию углеводородов в анаэробных условиях, а также генов, участвующих в синтрофных превращениях углеводородов и метаногенезе. На основании геномных и экспериментальных данных, к числу основных участников деградации нефти в донных осадках оз. Байкал могут быть отнесены представители *Chloroflexota* (*Dehalococcoidia*, *Anaerolineae*), *Desulfobacterota* (*Syntrophia*, *Deferrimicrobia*, *Syntrophorhabdia*), *Bacillota* (*Clostridia*), *Pseudomonadota* (*Gammaproteobacteria*), *Actinomycetota* (*Thermoleophila*), *Bacteroidota* (*Bacteroidia*, сем. *VadinHA17*), *Atribacterota* (JS1), *Halobacterota* (*Methanomicrobia*, *Methanosarcinia*) и *Thermoproteota* (*Bathyarchaeia*).

Полученные результаты свидетельствуют о сложных синтрофных взаимодействиях микробных сообществ осадочной толщи в районах разгрузки углеводородов в процессах преобразования органического вещества, включая углеводороды (рис. 17).

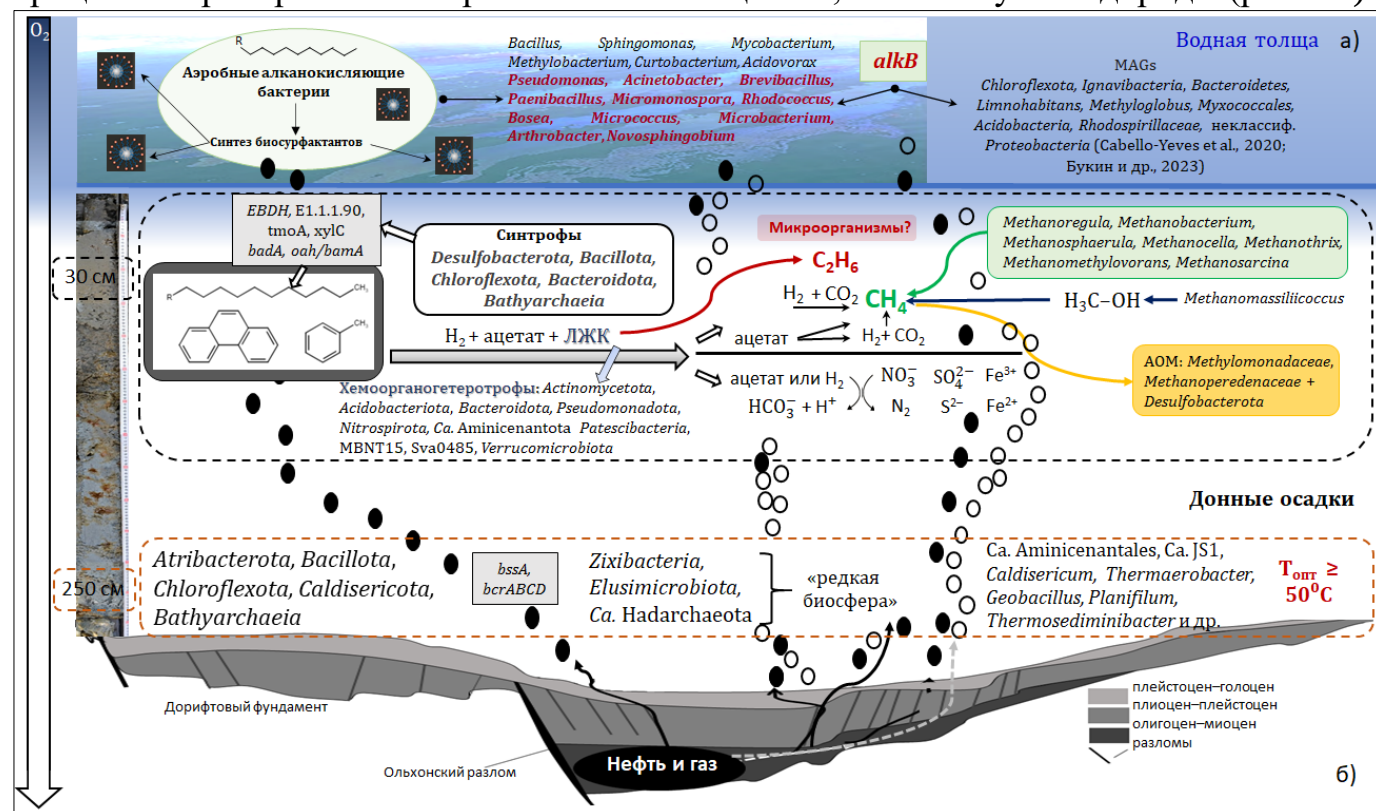


Рисунок 17. а) Схематическое изображение синтрофных взаимодействий микробных сообществ осадочной толщи в районах разгрузки углеводородов; (б) Разрез осадочных чехлов средней котловины и современные разломы цитированы по Хлыстов и др., 2007.

ВЫВОДЫ

1. В низкотемпературных осадках оз. Байкал, ассоциированных с выходами углеводородов, подтверждено присутствие жизнеспособных термофильных микроорганизмов. Поступающие флюиды влияют на структуру микробных сообществ и обуславливают значительную долю представителей «редкой биосферы» (*Ca. Nadarchaeota*, *Ca. Zixibacteria* и *Elusimicrobiota*) в донных осадках.

2. Микробные сообщества нефте-метановых сипов характеризуются наибольшей долей метаногенных микроорганизмов в сравнении с фоновыми осадками, осадками грязевых вулканов и метановых сипов.

3. При воспроизведении условий, характерных для зоны генерации углеводородов (80°C, 5 МПа) впервые показано преобразование органического вещества при участии микробных сообществ. Среди продуктов деструкции биомассы диатомовых водорослей выявлено образование углеводородных компонентов нефти (дибензотиофены, три- и моноароматические стероиды, ретен и гаммацерен).

4. Обнаружение ретена в донных осадках не всегда свидетельствует о его континентальном происхождении, так как он также может быть продуктом деструкции автохтонного органического вещества, осуществляемой микроорганизмами.

5. В районах разгрузки нефти обитает микробное сообщество, осуществляющее эффективную трансформацию углеводородов. Гены алканмонооксигеназ обнаружены у большинства чистых культур аэробных бактерий и в метагеноме из подповерхностного осадка района нефтепроявления.

6. Реконструированные MAGs содержат функциональные гены активации углеводородов путем анаэробного гидроксирования, присоединения фумарата и деароматизации, а также гены, катализирующие метаболизм промежуточных ароматических соединений и участвующие в синтрофных превращениях углеводородов. Гены анаэробного окисления углеводородов выявлены в геномах, отнесенных к *Desulfobacterota* (*Syntrophia*, *Deferrimicrobia*, *Syntrophorhabdia*), *Chloroflexota* (*Dehalococcoidia*, *Anaerolineae*), *Bacteroidota* (*Bacteroidia*, сем. *VadinHA17*), *Actinomycetota* (*Thermoleophilia*, *Geothermincolia*) и *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*).

7. В анаэробных психрофильных условиях степень биodeградации нефти достигает 65% за 12 месяцев культивирования, в термофильных – до 89% за 2.5 месяца. Более высокая степень анаэробной деградации нефти выявлена в эксперименте с осадками из района нефтепроявления Б. Зеленовская, функционирующего в условиях длительного воздействия углеводородов. Деградация нефти сопровождалась образованием углеводородных газов (метан, этан).

8. Выделены и охарактеризованы штаммы бактерий рода *Rhodococcus* и рода *Pseudomonas*, образующие биосурфактанты. Применение арилхалькогенилацетатов трис(2-гидроксиэтил)аммония (протатранов) увеличивает скорость роста углеводородоокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis* в 2–16 раз, что делает их перспективными для биотехнологических целей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в Белом списке, Web of Science или Scopus

1. Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В., Земская Т.И., Гранин Н.Г., Калмычков Г.В., Воробьева С.С., Павлова О.Н., Якуп М.А., Макаров М.М., Москвин В.И., Грачев М.А. Нефть в озере мирового наследия // ДАН. 2007. Т. 414, № 5. С. 656–659.

2. Павлова О.Н., Земская Т.И., Горшков А.Г., Косторнова Т.Я., Хлыстов О.М., Парфенова В.В. Сравнительная характеристика микробных сообществ двух районов естественных нефтепроявлений озера Байкал // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. Т. 3. С. 333–340.
3. Павлова О.Н., Земская Т.И., Горшков А.Г., Парфенова В.В., Сулова М.Ю., Хлыстов О.М. Исследование микробного сообщества озера Байкал в районе естественных нефтепроявлений // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 2, № 3. С. 319–323.
4. Ломакина А.В., Павлова О.Н., Шубенкова О.В., Земская Т.И. Разнообразие культивируемых аэробных микроорганизмов в районах естественных выходов нефти на оз. Байкал // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. № 5. С. 515–522.
5. Павлова О.Н., Ломакина А.В., Горшков А.Г., Сулова М.Ю., Лихошвай А.В., Земская Т.И. Микробные сообщества и их способность окислять n-алканы в районе разгрузки газо-нефтедержащих флюидов в среднем Байкале (мыс Горевого Утес) // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. Т. 5. С. 540–545.
6. 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, № 6. С. 694–702.
7. Мамаева Е.В., Губарев П.С., Горшков А.Г., Павлова О.Н., Сулова М.Ю., Изосимова О.Н., Ходжер Т.В., Земская Т.И. Деградация нефти бактериями, выделенными из донных осадков Карского моря и озера Байкал // Вестник Московского университета. Серия 5. География. 2018. № 6. С. 18–26.
8. Pavlova O.N., Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Shubenkova O.V., Manakov A.Y., Moskvina V.I., Morozov I.V., Bukin S.V., Khlystov O.M. Transformation of organic matter by microbial community in sediments of Lake Baikal under experimental thermobaric conditions of protocatagenesis // Geomicrobiol. J. 2016. V. 33, № 7. P. 599–606.
9. Bukin S.V., Pavlova O.N., Manakov A.Y., Kostreva E.A., Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I. The ability of microbial community of Lake Baikal bottom sediments associated with gas discharge to carry out the transformation of organic matter under thermobaric conditions // Front. Microbiol. 2016. V. 7, № 690. P. 1–18.
10. Букин С.В., Павлова О.Н., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Галачянц 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, № 4. С. 409–420.
11. Baturina O.A., Pavlova O.N., Novikova A.S., Kabilov M.R., Zemskaya T.I. Draft genome sequence of *Thermaerobacter* sp. strain PB12/4term, a thermophilic facultative anaerobic bacterium from bottom sediments of Lake Baikal, Russia // Microbiol. Resour. Announc. 2018. V. 7, № 20:e01178-18.
12. Павлова О.Н., Букин С.В., Костырева Е.А., Москвин В.И., Мананов А.Ю., Морозов И.В., Галачянц Ю.П., Хабуев А.В., Земская Т.И. Преобразование органического вещества природным микробным сообществом из донных осадков Академического хребта (озеро Байкал) в термобарических условиях // Геология и геофизика. 2019. Т. 60. С. 1171–1184.
13. Павлова О.Н., Ломакина А.В., Новикова А.С., Черницына С.М., Ханаева Т.А., Погодаева Т.В., Хабуев А.В., Земская Т.И. Термофильные бактерии в донных осадках озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов // Микробиология. 2019. Т. 88, № 3. С. 358–366.
14. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorshkov A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., Oborina E.N., Mirskova A.N., Zemskaya T.I. Protatrans, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia // Biotechnol. Rep. 2019. V. 24:e00371.
15. Gorshkov A., Pavlova O., Khlystov O., Zemskaya T. Fractioning of petroleum hydrocarbons from seeped oil as a factor of purity preservation of water in Lake Baikal (Russia) // J. Great Lakes Res. 2020. V. 46, № 1. P. 115–122.
16. Zemskaya T.I., Cabello-Yeves P.J., Pavlova O.N., Rodriguez-Valera F. Microorganisms of Lake Baikal – the deepest and most ancient lake on Earth // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 6079–6090.
17. Павлова О.Н., Изосимова О.Н., Горшков А.Г., Новикова А.С., Букин С.В., Иванов В.Г., Хлыстов О.М., Земская Т.И. Современное состояние глубоководного выхода нефти у мыса Горевого Утес (Средний Байкал) // Геология и геофизика. 2020. – Т. 61. С. 1231–1240.
18. 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, № 3. С. 286–303.

19. **Pavlova O.N.**, Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Khabuev A.V., Gorshkov A.G., Zemskaya T.I. Anaerobic oxidation of petroleum hydrocarbons in enrichment cultures from sediments of Gorevoy Utes natural oil seep under methanogenic and sulfate-reducing condition // *Microb. Ecol.* 2022. V. 83, № 4. P. 899–915.

20. Morgunova I., Semenov P., Kursheva A., Litvinenko I., Malyshev S., Bukin Yu.S., Khlystov O.M., **Pavlova O.N.**, Zemskaya T.I., Krylov A.A. Molecular indicators of sources and biodegradation of organic matter in sediments of fluid discharge zones of Lake Baikal // *Geosciences.* 2022. V. 12, № 2. P. 72.

21. **Pavlova O.N.**, Tupikin A.E., Chernitsyna S.M., Bukin Yu.S., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Nikonova A.A., Bukin S.V., Zemskaya T.I., Kabilov M.R. Description and genomic analysis of the first facultatively lithoautotrophic, thermophilic bacteria of the genus *Thermaerobacter* isolated from low-temperature sediments of Lake Baikal // *Microb. Ecol.* 2023. V. 86. P. 1604–1619.

22. **Павлова О.Н.**, Черницына С.М., Букин С.В., Ломакина А.В., Шубенкова О.В., Смирнова Д.К., Земская Т.И. Источник термофильных бактерий в холодных осадках озера Байкал – гидротермы на побережье озера или глубинные флюиды? // *Микробиология.* 2024. Т. 93, № 3. С. 323–329.

23. **Павлова О.Н.**, Букин С.В., Изосимова О.Н., Черницына С.М., Иванов В.Г., Хабуев А.В., Погодаева Т.В., Еловская И.С., Горшков А.Г., Земская Т.И. Анаэробное окисление нефти микробными сообществами донных осадков из района естественного нефтепроявления (Средний Байкал, Большая Зеленовская) // *Микробиология.* 2024. Т. 93, № 5. С. 548–561.

Статьи в рецензируемых изданиях

1. **Павлова О.Н.**, Ломакина А.В., Лихошвай А.В., Федорова Г.А., Шишлянникова Т.А., Корнева Е.С., Букин С.В., Земская Т.И. Микробные сообщества в районах естественных выходов нефти на озере Байкал // *Успехи наук о жизни.* 2010. № 2. С. 169–172.

2. Manakov A.Yu., **Pavlova O.N.**, Bukin S.V., Kostyreva E.A., Moskvina V.I., Morozov I.V., Rodionova T.V., Zemskaya T.I. Experimental equipment for Lake Baikal deep biosphere microorganism's exploration and some results obtained using this equipment // *Limnology and Freshwater Biology.* 2019. № 3. P. 253–259.

3. Gorshkov A.G., Izosimova O.N., **Pavlova O.N.**, Khlystov O.M., Zemskaya T.I. Assessment of water pollution near the deep oil seep in Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology.* 2020. № 2. P. 397–404.

4. **Pavlova O.N.**, Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Gorshkov A.G. Process of anaerobic oxidation of oil in bottom sediments of Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology.* 2020. № 4. P. 1006–1007.

5. Bukin S.V., **Pavlova O.N.**, Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Zemskaya T.I. Methylophilic methanogens in bottom sediments of Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology.* 2020. № 4. P. 973–975.

6. **Павлова О.Н.**, Изосимова О.Н., Иванов В.Г., Черницына С.М., Букин С.В., Хабуев А.В., Погодаева Т.В., Смирнова Д.К., Земская Т.И. Сравнительная характеристика процессов анаэробного окисления нефти микробными сообществами в донных осадках районов естественных нефтепроявлений оз. Байкал (Горевой Утес, Большая Зеленовская) // *Limnology and Freshwater Biology.* 2024. № 4. P. 1035–1049.

Глава в монографии

Zemskaya T.I., Bukin S.V., Chernitsyna S.M., Lomakina A.V., **Pavlova O.N.** Microbial communities in the sediments of rift Lake Baikal and their role in diagenesis processes. In: *Urban Watershed Microbiology - Biodiversity Composition, Ecological Function, and Technological Advances*, edited by S.M. Tiquia-Arashiro, G. Medema, E. Ubomba-Jaswa, H. Urakawa, V. Ella, N. Libardi. – 2025. Chapter 4. – P. 1–74.

Патенты

Павлова О.Н., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Земская Т.И. Стимулятор роста клеток углеводородокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis* (варианты). Патент на изобретение 2694593. Заявка №2018130418. Опубликовано: 16.07.2019. – 2019.

Избранные публикации в материалах конференций

1. **Павлова О.Н.**, Земская Т.И., Волгина Т.В. Результаты микробиологических исследований воды и донных осадков озера Байкал, в районе естественных нефтепроявлений // *Материалы Всероссийской молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии».* 1-3 ноября 2005 г., г. Москва. – М.: МАКС Пресс, 2005. С. 50.

2. Lomakina A.V., **Pavlova O.N.**, Gorshkov A.G., Zemskaya T.I. Hydrocarbon oxidizing microorganisms and their ability to degrade oil and its derivatives et natural oil seepage sites (Central Baikal) // Special Supplement Geochimica et Cosmochimica Acta. – Switzerland, 2009. V. 73. № 13. P. A789.
3. Лихошвай А.В., Ханаева Т.А., Ломакина А.В., Горшков А.Г., **Павлова О.Н.**, Земская Т.И., Грачев М.А., Слепенчук М.В. Бактерии рода *Rhodococcus* из битумных построек на дне озера Байкал, деградирующие нефть // Тезисы докладов 5-ой Верецагинской Байкальской конференции. 4-9 октября 2010 г., г. Иркутск. – Иркутск: Изд-во «Аспринт», 2010. – С. 139–141.
4. **Павлова О.Н.**, Лихошвай А.В., Федорова Г.А., Шишлянникова Т.А., Букин С.В., Ломакина А.В., Земская Т.И. Сравнительная характеристика микроорганизмов р. *Rhodococcus* и р. *Pseudomonas*, образующих биосурфактанты // Материалы 3-го Байкальского Микробиологического симпозиума. 3-8 октября 2011 г., г. Иркутск. – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2011. С. 94–96.
5. Ломакина А.В., **Павлова О.Н.**, Горшков А.Г., Лихошвай А.В., Земская Т.И. Микробные сообщества районов естественных нефтепроявлений оз. Байкал: биоразнообразие, функциональные гены, роль в процессе деградации нефти // Материалы XIX Международной научной конференции «Геология морей и океанов». 14-18 ноября 2011 г., г. Москва. – Москва: ГЕОС. 2011. С. 71–74.
6. **Павлова О.Н.**, Букин С.В., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Хабуев А.В., Погодаева Т.В., Земская Т.И. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков озера Байкал // «Газовые гидраты в экосистеме Земли». 7-10 апреля 2014 г., г. Новосибирск. – Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2014. С. 75.
7. **Pavlova O.**, Bukin S.V., Nikitina A.A., Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Zemskaya T.I. Thermophilic microorganisms in bottom sediments associated with fault areas of Lake Baikal // 10th International Congress on Extremophiles. Saint Petersburg, Russia, September 7–11, 2014. P. 336.
8. **Pavlova O.N.**, Bukin S.V., Kalmychikov G.V., Moskvina V.I., Manakov A.Y., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Khlystov O.M., Zemskaya T.I. Microbial communities in bottom sediments of Lake Baikal and their role in the early hydrocarbon generation // Abstract from 13th International Conference on Gas in Marine Sediments, Tromsø, Norway, September 19–22, 2016. P. 76.
9. **Pavlova O.N.**, Bukin S.V., Kalmychikov G.V., Ivanov V.G., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Chernitsyna S.M., Khlystov O.M., Zemskaya T.I. Influence of geochemical conditions on the structure and activity of methanogenic microbial communities: a case study of the bottom sediments from the methane seep Posolsk Bank // Abstract from 13th International Conference on Salt Lake Research, Ulan-Ude, Russia, August 21-25, 2017. P. 196.
10. **Павлова О.Н.**, Букин С.В., Горшков А.Г., Ханаева Т.А., Земская Т.И. Микроорганизмы озера Байкал: от психрофильных углеводородокисляющих аэробов до термофильных миксотрофов // Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса. 7-18 октября 2017 г., г. Пущино. – Пущино: «ИД «Вода: химия и экология», 2017. С. 68–69.
11. **Pavlova O.**, Novikova A., Khanaeva T., Lomakina A., Chernitsyna S., Zemskaya T. Thermophilic facultative anaerobic bacteria as markers for the supply of gas-saturated fluids to the surface sediments of Lake Baikal from the deep biosphere // Abstract from 12th International Congress of Extremophiles. Ischia, Italy, September 16–20, 2018. P. 7.
12. **Павлова О.Н.**, Новикова А.С., Черницына С.М., Изосимова О.Н., Горшков А.Г. Первые результаты изучения процессов анаэробного окисления нефти в донных осадках озера Байкал // Материалы 2-го Российского микробиологического конгресса. 23-27 сентября 2019 г., г. Саранск. С. 129–130.
13. **Павлова О.Н.**, Черницына С.М., Ломакина А.В., Тупикин А.Е., Земская Т.И., Кабилов М.Р. Термофильные бактерии в психрофильных осадках озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов // Материалы 3-го Российского микробиологического конгресса. 26 сентября–1 октября 2021 г., г. Псков. – Псков: ООО «Конкорд». 2021. С. 57–58.
14. **Павлова О.Н.**, Черницына С.М., Земская Т.И. Источник термофильных бактерий в психрофильных осадках озера Байкал – гидротермы на побережье озера или глубинные флюиды? // Материалы 4-го Российского микробиологического конгресса. 24-29 сентября 2023 г., г. Томск. С. 188–189.
15. **Павлова О.Н.**, Земская Т.И. Естественные нефтепроявления озера Байкал – как источник углеводородокисляющих микроорганизмов, перспективных для биотехнологии // X Международная научно-практическая конференция «Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа». 2-6 октября 2023 г., г. Томск. С. 32–33.