

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ЛИН СО РАН)

*На правах рукописи*

**ПАВЛОВА Ольга Николаевна**

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

1.5.11. – Микробиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант  
доктор биологических наук  
Земская Тамара Ивановна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Глубинные морские осадки как среда обитания микроорганизмов.....	11
1.1.2. Объем глубинной осадочной толщи.....	16
1.1.3. Факторы, влияющие на жизнь в глубинной осадочной толще. Источники энергии и метаболизм в глубинной биосфере.....	17
1.1.4. Таксономическое разнообразие микроорганизмов глубинных осадочных отложений.....	31
1.2. Термофильные микроорганизмы в холодноводных экосистемах.....	35
1.3. Роль микроорганизмов в процессах образования и окисления углеводов... ..	41
1.3.1. Окисление углеводов.....	41
1.3.2. Образование углеводов микроорганизмами в глубинных осадочных отложениях.....	55
1.4. Озеро Байкал как объект исследования осадочной толщи, ассоциированной с разгрузкой углеводов.....	63
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	75
2.1. Объекты исследования.....	75
2.2. Методы исследования.....	81
2.2.1. Отбор проб воды и донных осадков.....	81
2.2.2. Физико-химические методы исследования.....	82
2.2.3. Микроскопия.....	85
2.2.4. Методы исследования термофильных микроорганизмов в донных осадках оз. Байкал.....	86
2.2.5. Методы исследования процессов образования углеводов в осадочной толще оз. Байкал.....	88
2.2.5.1. Преобразование органического вещества в термобарических условиях.....	88
2.2.5.2. Образование углеводородных газов.....	90
2.2.6. Методы исследования анаэробных процессов окисления нефти.....	90
2.2.7. Методы исследования аэробных процессов окисления нефти.....	91
2.2.8. Молекулярные методы.....	96
2.2.9. Методы биоинформатического анализа.....	98
ГЛАВА 3. ТЕРМОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ В НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ДОННЫХ ОСАДКАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ.....	102
3.1. Описание и геномный анализ первой факультативно-литотрофной, термофильной бактерии <i>Thermaerobacter</i> sp. PB12/4term (=VKM B-3151).....	105
3.2. Описание термофильного изолята PB15/Grf7geo.....	119
3.3. Источник термофильных бактерий в низкотемпературных осадках озера Байкал – гидротермы на побережье озера или глубинные флюиды?.....	122

ГЛАВА 4. РОЛЬ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ОСАДОЧНОЙ ТОЛЩИ ОЗ. БАЙКАЛ В ПРОЦЕССАХ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА С ОБРАЗОВАНИЕМ УГЛЕВОДОРОДНЫХ МАРКЕРОВ НЕФТИ В УСЛОВИЯХ ПРОТОКАТАГЕНЕЗА.....	131
4.1. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков метанового сипа Голоустное.....	132
4.2. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков метанового сипа Посольская Банка.....	137
4.3. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков грязевого вулкана Хобой (Академический хребет).....	142
ГЛАВА 5. АНАЭРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ДОННЫХ ОСАДКОВ РАЙОНОВ ЕСТЕСТВЕННЫХ НЕФТЕПРОЯВЛЕНИЙ.....	153
5.1. Анаэробное окисление нефти микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у м. Горевой Утес.....	153
5.2. Анаэробное окисление нефти микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская.....	166
5.2.1. Анаэробное окисление нефти микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская в психрофильных условиях.....	166
5.2.2. Анаэробное окисление нефти микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская в термофильных условиях.....	178
5.3. Функциональные гены анаэробной деградации углеводородов в метагеномах из донных осадков района нефтепроявления Б. Зеленовская.....	184
ГЛАВА 6. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОСАДОЧНОЙ ТОЛЩИ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ.....	200
ГЛАВА 7. УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДНОЙ ТОЛЩИ И ДОННЫХ ОСАДКОВ ОЗ. БАЙКАЛ В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ.....	205
7.1. Разнообразие культивируемых углеводородоокисляющих микроорганизмов, наличие генов аэробного окисления <i>n</i> -алканов и способность к синтезу поверхностно-активных веществ.....	212
7.2. Влияние стимуляторов роста (протатранов) на штаммы микроорганизмов, изолированные из оз. Байкал, обладающие способностью к синтезу биоПАВ и углеводородоокисляющей активностью.....	217
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	224
ВЫВОДЫ.....	228
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	230

## ВВЕДЕНИЕ

**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 погребенная 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; Gavrilov 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 нефте- 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 углеводов 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 углеводов.

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 углеводов, 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 углеводородокисляющую 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 гаммацереина. 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 В-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 углеводородоокисляющих 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 Верещагинской 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; 10<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, 2014; 13<sup>th</sup> International Conference on «Gas in marine sediments», Tromsø, Norway, 2016; 13<sup>th</sup> International Conference on Salt Lake Research, Ulan-Ude, 2017; 12<sup>th</sup> 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 углеводов ЛИН 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<sup>†</sup> 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<sup>†</sup> 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 углеводов 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» ЛИН СО РАН за содействие в проведении электронной микроскопии, а также всем сотрудникам лаборатории микробиологии углеводов за практическую помощь и ценные советы на всех этапах работы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

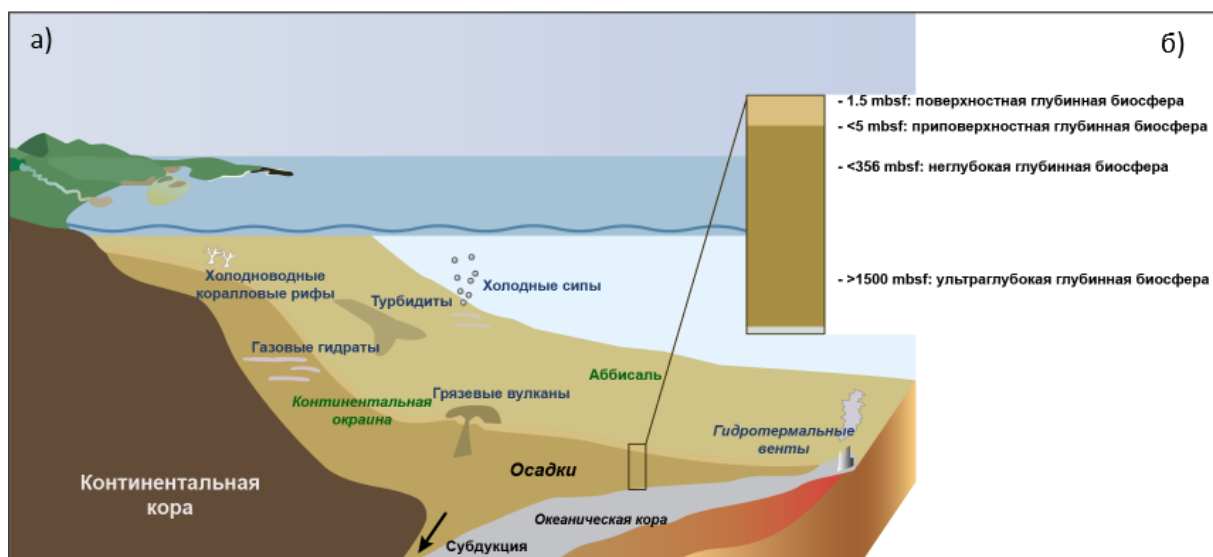
### 1.1. Глубинные морские осадки как среда обитания микроорганизмов

Морские и пресноводные осадки являются крупнейшим резервуаром органического углерода и населены разнообразными микробными сообществами (Hedges, Keil, 1995; Parkes et al., 2000; Zinger et al., 2011). Бактерии и археи в отложениях играют ключевую роль в реминерализации органического вещества, круговороте питательных веществ и передаче энергии (Mason et al., 2010). 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 осадочных отложениях в диагенезе и раннем катагенезе. По мере накопления отложений в течение геологического времени погребенная микробная жизнь сохраняется, но темпы ее роста снижаются из-за истощения дыхательных акцепторов электронов и меньшей реакционной способности субстратов с увеличением глубины (D'Hondt et al., 2004, 2019; Jorgensen, Marshall, 2016), что приводит к формированию глубинной биосферы. Было высказано предположение, что микробные сообщества в глубинной биосфере являются потомками поверхностных сообществ, которые были погребены в прошлом (Inagaki et al., 2015; Lever et al., 2015; Walsh et al., 2016; Starnawski et al., 2017). Таким образом, отбор считается преобладающей силой, определяющей вертикальную сукцессию сообществ в толще осадочных пород, в то время как другие процессы, в том числе диверсификация, расселение и дрейф, могут вызывать незначительные изменения в основном в поверхностной среде (Nemergut et al., 2013; Petro et al., 2017).

Самые ранние свидетельства существования глубинной биосферы появились в 1920-х годах, в результате исследований нефтяных резервуаров одновременно российскими и американскими исследователями (Беляев и др., 2004). В России, первые микробиологические исследования пластовых вод нефтяных месторождений Апшерона проведены Т.Л. Гинзбург-Карагичевой (Гинзбург-Карагичева, 1926; 1932). В это же время, из нефтяных резервуаров в бассейне Иллинойса, Бастин Е.С. изолировал сульфатредуцирующие бактерии и установил наличие биоразлагаемой нефти в нефтяных коллекторах. Полученные данные стали доказательством существования активных микроорганизмов в глубоких недрах за много лет до того, как исследования были сосредоточены на изучении глубинной биосферы (Roadifer, 1987; Head et al., 2010). Вскоре после этого, в 1930-х годах, микробиологические исследования морских отложений продемонстрировали существование жизни в океанических недрах (ZoBell, Anderson, 1936; ZoBell, 1938; Escudero et al., 2018). Однако достижения в этой области в последующие годы были ограничены из-за отсутствия доверия со стороны научного сообщества (Lipman, 1931). Возможность обнаружения активной жизни в глубоких недрах

была поставлена под сомнение, так как считалось, что комбинированное воздействие низких температур и высокого давления подавляет рост микроорганизмов в глубинах океана (Jannasch et al., 1971). Концепция жизни на больших глубинах радикально изменилась в 1979 году, когда Корлисс Дж. Б. и его коллеги обнаружили животных, обитающих вокруг глубоководных гидротермальных источников на дне Мирового океана, в основе пищевой цепи которых лежат хемолитоавтотрофные микроорганизмы, окисляющие серу (Corliss et al., 1979; Escudero et al., 2018). Благодаря этому открытию изучение глубинной биосферы в океанических недрах получило развитие, и было включено в международные программы бурения (Oremland et al., 1982; Whelan et al., 1983; D'Hondt et al., 2002). Одним из первых, кто высказал предположение о существовании экосистемы в континентальных недрах, независимой от фотосинтеза, был Томас Голд (Gold, 1992). Голд Т. рассматривал недра не только как возможную среду обитания микроорганизмов, но и возможность того, что жизнь может быть найдена на других планетах (Escudero et al., 2018).

Термин «глубинная биосфера» появился намного позже, когда были получены данные о профилях микробной активности, общей численности микроорганизмов и разнообразии культивируемых форм в глубинных слоях морских осадочных отложений. Эти данные подтвердили, что глубинные осадки являются крупнейшей средой обитания микроорганизмов на Земле (Cragg et al., 1990; Gold, 1992; Parkes et al., 1994; Whitman et al., 1998). В настоящее время универсального определения «глубинная биосфера» не существует. В целом, наземные среды, осадочные породы в морях и океанах, а также подземные среды обитания (магматические породы, шахты и системы глубоких водоносных горизонтов в континентальной области) подпадают под это определение (Wehrmann, Riedinger, 2016; Schippers, 2016). Наиболее спорным аспектом является определение понятие «глубинная биосфера» для донных отложений в морях и океанах. Уитмен У.Б. с соавторами (Whitman et al., 1998) полагали, что верхние 10 см осадочного слоя в открытом океане должны быть включены в океаническую среду обитания. Д'Хондт С. с коллегами (2002, 2009) определили «подповерхностные отложения» как отложения, находящиеся ниже 1.5 м границы раздела вода – осадок. Йоргенсен Б.Б., Боэтиус А. и Эдвардс К.Дж. определили «глубинную биосферу» как отложения и горные породы, находящиеся на глубине ниже одного метра от морского дна (1 m.b.sf. – meters below seafloor) (Jorgensen, Boetius, 2007; Edwards et al., 2012). Из-за большого диапазона глубин глубинная биосфера в морских отложениях была дополнительно разделена на «поверхностную» – до 1.5 m.b.sf, «приповерхностную» – от 5 m.b.sf, «неглубокую» от 356 m.b.sf и «(сверх)глубокую» морскую биосферу (Valentine, 2011; Inagaki et al, 2015; Wehrmann, Riedinger, 2016) (рис. 1).



**Рисунок 1.** Схематическое изображение вертикального разреза структуры морского дна (а) и морского дна с указанием диапазона глубин подводных биосферных местообитаний (б); m.b.sf: метры ниже морского дна. Цитировано по Jorgensen, Voetius, 2007; Parkes et al., 2014; Wehrmann, Riedinger, 2016.

Изучение глубинных осадочных отложений началось в 1968 г. с Проекта глубоководного бурения в океанах (DSDP – Deep Sea drilling Project), направленного на совершенствование фундаментальных знаний о физических, химических и биологических процессах, определяющих геологическую историю, строение и эволюцию океанической литосферы (осадков и коры) через исследование глубинного строения Земли под океанами с помощью бурового судна «Гломар Челленджер», оборудованного системой динамического удержания на месте. На основе изучения скоростей реакций в поровых водах кернов, полученных в рамках выполнения DSDP, было выдвинуто предположение, что в толще донных отложений обитают активные живые бактерии, которые используют окислительно-восстановительные реакции для получения энергии, необходимой для их жизнедеятельности.

Для осуществления этих исследований был создан консорциум, получивший название «Объединение океанографических институтов по глубинному опробованию Земли» (JOIDES), который вначале объединял несколько океанографических институтов США. В настоящее время консорциум включает научные организации из двух десятков стран. С 1985 года проект реализуется в рамках программы океанического бурения (Ocean Drilling Program) с помощью более совершенного бурового судна “JOIDES Resolution”. В 2003 году, после присоединения Японии, берет свое начало «Международная комплексная программа глубоководного бурения в океане» (IODP, “The Integrated Ocean Drilling Program”), по заказу которой построен специальный исследовательский корабль «Земля» (“Chikyu”). С 2013 года, объединив четыре предыдущих проекта, возникает новый «Международная программа открытия океана (International Ocean Discovery Program (IODP)).

В настоящее время самой глубокой океанской скважиной является скважина, пробуренная у берегов Японии в Тихом океане, неподалеку от эпицентра землетрясения Тохоку 2011 года. Отверстие находится на 8023 метров ниже уровня моря. Извлечен керн длиной 37.75 метра (<https://www.vice.com/>). Ранее самая глубокая скважина находилась в Марианской впадине – 7033 метра ниже уровня моря. Ее пробурил экипаж судна «Гломар Челленджер» в 1978 году.

Глубокие земные недра более труднодоступны для изучения. Образцы из них могут быть получены через буровые скважины в породе, пещерные ручьи, скважины в шахтах и пещерах и заводняемые их воды (Sohlberg et al., 2015; Brannen-Donnelly, Engel, 2015; Miettinen et al., 2015; Rajala et al., 2015; Bonis, Gralnick, 2015; Kutvonen et al., 2015; Wu et al., 2015), а также путем сбора каменного материала и соскобов из пещер (Govil et al., 2019). Количество сверхглубоких скважин ограничивается техническими проблемами бурения, возрастающими с глубиной и стоимостью бурения скважины. На суше, самой глубокой в настоящее время остается скважина Кольская сверхглубокая, «СГ-3», пробуренная в 1970-е годы советскими учеными на Кольском полуострове. Глубина скважины – 12261 м. Геологи предполагали, что до глубины 5 км залегает гранитная толща, за которой следуют более прочные и более древние базальтовые породы. Об этом говорили данные сейсмического зондирования. Но оказалось, что на глубине более 7 км залегают менее плотные и менее прочные породы – архейские гнейсы. На глубинах 9–12 км обнаружены высокопористые породы, насыщенные сильно минерализованными водами и органическим веществом, а также 14 видов окаменевших микроорганизмов. Возраст глубинных слоев превышал 2.8 миллиарда лет. По результатам данных исследований получается, что жизнь на планете Земля возникла на 1.5 миллиарда лет раньше, чем предполагалось. Также не соответствовал расчетным прогнозам градиент температуры. Температура увеличивалась с большей скоростью и достигла 180°C на забое скважины, что резко отличалось от ожидаемой температуры в 100°C. Значительно глубже слоев осадочных пород был обнаружен метан, который не может иметь биогенное происхождение (Орлов, Лаверов, 1998; Pedersen, 2000; Жамалетдинов, 2020). Впоследствии, при получении Кольским научным центром образцов лунного грунта, установлено, что по химическому составу он практически идентичен породам, извлеченным из скважины с глубины около 3 км. Теория «земного» происхождения Луны обрела еще одно подтверждение.

В сверхглубокой скважине, проходящей через кратер Сильян Ринг в Швеции, в трещиноватых породах обнаружены сульфид и вторичные карбонатные минералы, датированные  $80 \pm 5$ – $22 \pm 3$  миллионами лет, образованные в результате процессов метанагенеза и анаэробного окисления метана, сопряженного с восстановлением сульфатов. Сильян – кратерное озеро, образованное в результате удара метеорита, который произошел 380 млн. лет

назад. Углеводороды (нефть), мобилизованные из зрелых сланцевых исходных пород, утилизировались подземными микроорганизмами, что привело к накоплению микробного метана, смешанного с незначительной абиотической газовой фракцией под осадочной породой на краю кратера (Drake et al., 2019).

Уникальной системой одного вида считается золоторудная шахта в Южной Африке, глубиной 2.8 км, где бактерия, *Candidatus Desulforudis audaxviator* составляет >99.9% микроорганизмов, населяющих жидкую фазу данного разлома. Геномные данные показали, что *Ca. Desulforudis audaxviator* (CDA) является хемолитоавтотрофом, растущим за счет гидрогенотрофного сульфатного дыхания (Chivian et al., 2008). Все попытки культивировать CDA оказались безуспешными. Последовательности CDA были обнаружены в нескольких континентальных подповерхностных экосистемах Южной Африки, Северной Америке, Европе и подземном термальном водоносном горизонте в Западной Сибири (Karnachuk et al., 2019). Водоносный горизонт, в Западной Сибири, залегающий в раннемеловых отложениях (150–100 млн. лет), был вскрыт нефтеразведочной скважиной 1-Р глубиной 2.56 км (Banks et al., 2014). Артезианская вода скважины с температурой 40–45°C поступает с глубины 2 км, а ее состав определяется присутствием древней морской воды, разбавляемой современными метеорными водами (Kadnikov et al., 2020a). Все попытки культивирования организма на протяжении более 10 лет оставались безуспешными, что породило гипотезу об исключительно медленных скоростях роста и делении один раз в тысячу лет (Labonté et al., 2015). Полученный впервые д.б.н. Карначук О.В. с соавторами культивируемый штамм «*Desulforudis audaxviator*» ВУФ использовал для своего роста не только H<sub>2</sub>, но также различные органические доноры электронов для сульфатного дыхания и имел скорость удвоения 28.5 ч (Karnachuk et al., 2019).

Тем самым авторы показали, что в условиях, богатых питательными веществами, подземный организм может адаптироваться к относительно быстрому росту, несмотря на то что глубокие подземные среды считаются экосистемами, в которых обитают медленнорастущие прокариоты из-за крайнего ограничения энергии. Дальнейший подбор условий культивирования показал, что в лабораторных условиях, штамм «*Desulforudis audaxviator*» ВУФ может иметь скорость роста, сопоставимую со скоростями роста традиционных анаэробов (Лукина, Карначук, 2021). Установлено, что бактерия имеет сложную внутриклеточную организацию, включающую газовые пузырьки, внутренние мембраны и электронно-плотные структуры, обогащенные фосфором, железом и кальцием. Несмотря на значительное пространственно-временное разделение двух географических мест (Южная Африка и Западная Сибирь) ANI (average nucleotide identity) двух геномов составило 99.95% (Karnachuk et al., 2019).

### 1.1.2. Объем глубинной осадочной толщи

Первые исследования по определению объема глубинной осадочной толщи были проведены Паркес Р. с соавторами методом прямого подсчета клеток микроорганизмов в донных осадках с использованием флуоресцентного окрашивания образцов акридиновым оранжевым (Parkes, 1994, 2000). Таким образом было задокументировано существование глубокой биосферы в нескольких сотнях метров глубоко погребенных отложений (Parkes et al., 1994). Общее количество прокариот (бактерий и архей) в отложениях уменьшалось с увеличением глубины осадка в соответствии с содержанием органического углерода (Parkes et al., 2000; D'Hondt et al., 2004; Roussel et al., 2008). Полученные данные были экстраполированы для расчета глобальной биомассы глубинной биосферы.

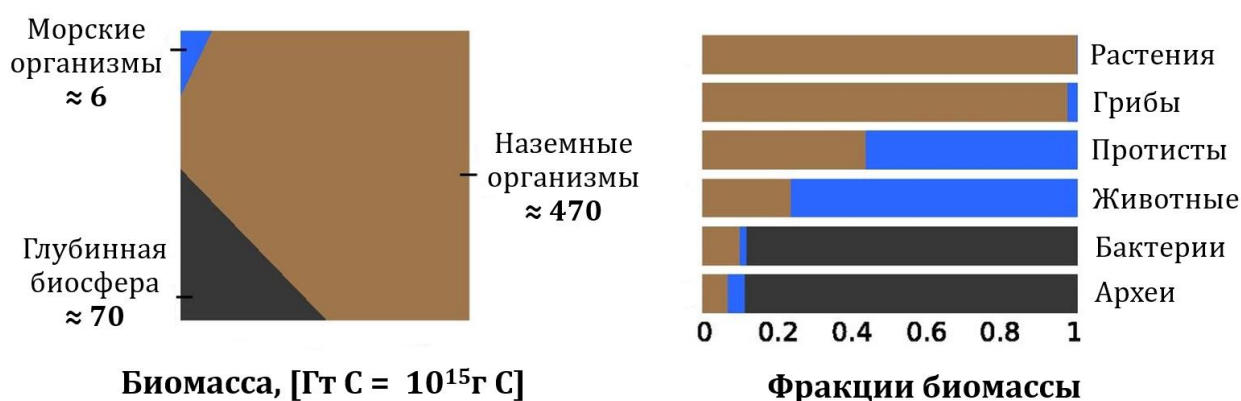
В 1998 году Уитмен У.Б. с соавторами (Whitman et al., 1998) было подсчитано, что численность микроорганизмов в морских осадках достигает  $35.5 \times 10^{29}$  клеток, что составляет 55–86% биомассы прокариот Земли и 27–33% живой биомассы Земли. Для своих оценок авторы использовали среднее отношение концентрации клеток к глубине в шести участках Тихого океана, чтобы охарактеризовать концентрацию микроорганизмов в осадках по всему Мировому океану. Однако эти оценки были в основном получены для богатых органическим углеродом мезо- и эвтрофных отложений континентальных окраин и / или районов апвеллинга. В этих регионах растворенный кислород глубоко проникает в отложения, и микробная активность обычно носит аэробный характер (Roy et al., 2012; D'Hondt et al., 2015). При изучении олиготрофных отложений Тихого океана, обедненных органическим углеродом, установлено, что количество клеток варьирует в зависимости от океанических участков на пять порядков величины и коррелирует со средней скоростью седиментации и расстоянием от суши (Kallmeyer et al., 2012). Основываясь на этих корреляциях, авторы оценили глобальную численность микроорганизмов в морских осадках, которая составляет  $2.9 \times 10^{29}$  клетки, что соответствует 4.1 петаграмм (Pg C) ( $4.1 \times 10^{12}$  кг) и ~0,6% всей живой биомассы Земли, что превышает численность прокариот в морской воде ( $1.2 \times 10^{29}$ ) и почве ( $2.6 \times 10^{29}$ ) (Kallmeyer et al., 2012).

Оценка объема континентальной подповерхностной биомассы имеет более широкий диапазон значений. Голд Т. (1992) определил континентальную подповерхностную биомассу в размере  $2.2 \times 10^{14}$  тонн ( $1.1 \times 10^5$  PgC), предположив, что микроорганизмы занимают 1% «обитаемого» объема пор континентальной подповерхности ( $2 \times 10^{22}$  на  $\text{см}^{-3}$ ), что эквивалентно  $\sim 2.5 \times 10^{11}$  клеток на  $\text{см}^{-3}$ . Уитмен У.Б. с соавторами, использовал модель заполнения пористости Голда Т., но полагал, что только 0.016% континентального обитаемого объема пор было занято биомассой, что привело к существенно более низкому значению численности микроорганизмов ( $2.2 \times 10^{30}$ ) клеток в континентальной подповерхностной биосфере. Позднее,



Магнабоско С. с соавторами пересчитали биомассу континентальных недр. Авторы проанализировали опубликованные данные о микробном разнообразии из различных источников подземной биосферы и определили, что континентальная подповерхностная биосфера содержит от  $2 \times 10^{29}$  до  $6 \times 10^{29}$  клетки (от 23 до 31 PgC биомассы), состав сообщества которых коррелирует с литологией образца (Magnabosco et al., 2018). Глобальное разнообразие морских прокариот (архей и бактерий) в приповерхностном океане (от 0 до 1000 m.b.sf.) составило  $3.75 \times 10^4$  операционных таксономических единиц (ОТЕ) (Sunagawa et al., 2015; Hoshino et al., 2019).

Подсчет всей биомассы на Земле, проведенный Барн-Он И. с соавторами (Barn-On et al., 2018), показал, что она составляет 550 гигатонн углерода (Гт С) (рис. 2).



**Рисунок 2.** Распределение биомассы в различных средах и трофических уровнях. Абсолютная биомасса представлена диаграммой Вороного, где площадь каждой ячейки пропорциональна глобальной биомассе в каждой среде. Глубинная биосфера определена как морские донные отложения и океаническая кора, а также наземный субстрат глубиной более 8 м, исключая почву. Доля биомассы каждого царства, сосредоточенная в земной, морской или глубинной среде. Цитировано по Bar-On et al., 2018.

На долю растений приходится ≈470 Гт С (≈450 Гт С на наземные растения), на долю животных ≈2 Гт С. Глобальная биомасса бактерий составляет ≈70 Гт С, в которой ≈60 Гт С занимает доля наземных глубинных бактерий. Масса архей оценена на уровне ≈7 Гт С, при этом ≈4 Гт С и ≈3 Гт С составляют наземные и морские глубинные археи соответственно (Bar-On et al., 2018).

### 1.1.3. Факторы, влияющие на жизнь в глубинной осадочной толще. Источники энергии и метаболизм в глубинной биосфере

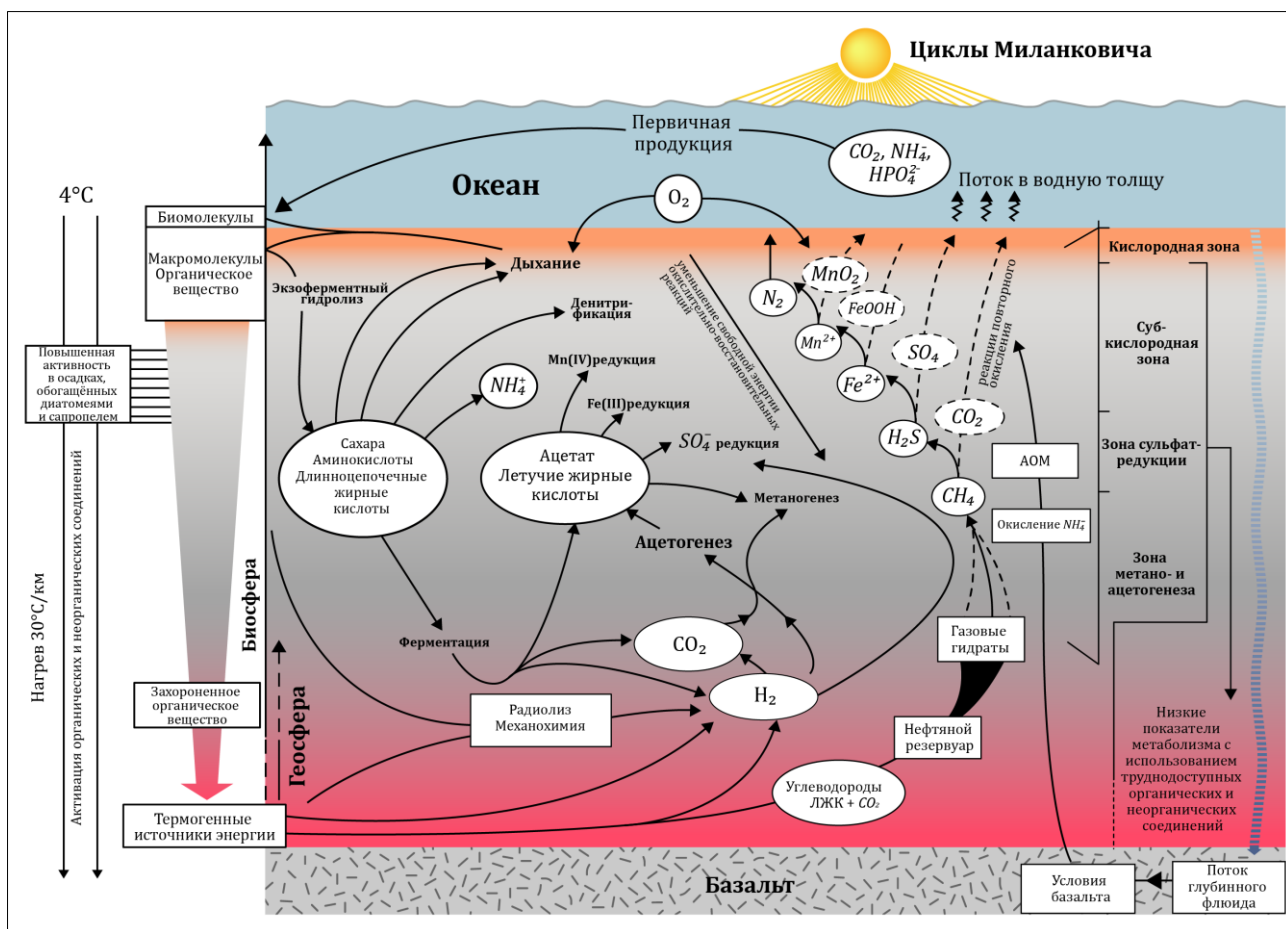
По мере обнаружения микроорганизмов в глубинной биосфере открытым оставался вопрос о природе источников углерода и энергии, стимулирующих их активность. Обитаемость подземной биосферы на Земле определяется наличием трех основных параметров: доступностью энергии, воды и умеренной температуры (Hoehler, 2004; Escudero et al., 2018). Профили подсчета клеток и химического состава поровых вод показывают, что

микробная активность в донных отложениях обычно чрезвычайно низка, средняя скорость дыхания составляет от  $2.8 \times 10^{-18}$  до  $1.1 \times 10^{-14}$  моль электронов на клетку в год, в зависимости от наличия доноров и акцепторов электронов (D'Hondt et al., 2002, 2015; Hoehler, Jorgensen, 2013). Инкубация со стабильным изотопным зондированием и нанометровая вторичная ионная масс-спектрометрия показали, что большинство микроорганизмов в образцах донных отложений могут ассимилировать широкий спектр соединений углерода и азота в клеточную биомассу даже из анаэробных миоценовых отложений глубиной 2 км и окисленных отложений возрастом 101.5 Ma (Morono et al., 2013, 2020; Inagaki et al., 2015; Trenbath-Reichert et al., 2017). Основным источником энергии в глубинной биосфере является органический углерод, образованный в результате первичной продукции в океане. Большая часть органического углерода разлагается в первом метре (1 m.b.sf), содержание органического углерода в глубоких недрах составляет примерно 0.1–1% от сухого веса осадка (Jorgensen, Voetius, 2007). Глубинная биосфера часто лишена органического углерода. Нехватка  $C_{org}$  в подземной среде не всегда определяет преобладание хемолитоавтотрофного образа жизни (Sag et al., 2019). Промежуточные продукты метаболизма или продукты хемолитоавтотрофного метаболизма могут подпитывать гетеротрофов в недрах. О гетеротрофных микроорганизмах из глубинной биосферы сообщается в работах (Hallbeck, Pedersen, 2008; Nyssonen et al., 2014; Purkamo et al., 2015). Гетеротрофные микробные сообщества также могут использовать абиогенные углеводороды, генерируемые по реакции Фишера-Тропша (Purkamo et al., 2016).

Микроорганизмы подповерхностной глубинной биосферы получают энергию в результате широкого спектра окислительно-восстановительных реакций (например, реакций диспропорционирования, ферментации и реакций дыхания). В приповерхностных прибрежных отложениях кислород обычно быстро удаляется в результате аэробного дыхания, что способствует анаэробному дыханию с использованием акцепторов электронов, с уменьшением выхода свободной энергии последовательного ряда  $NO_3^- > Mn^{4+} > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > CO_2$  и образованием характерных зон с увеличением глубины, содержащих  $NH_4^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $S^{2-}$  и  $CH_4$  (рис. 3) (Parkes et al., 2014).

Химия поровых вод мелководных морских осадков обычно демонстрирует предсказуемую зональность, с пиковыми концентрациями растворенных продуктов различных окислительно-восстановительных процессов [ $Mn(II)$ ,  $Fe(II)$ ,  $\Sigma H_2S$  и  $CH_4$ ], увеличивающейся по глубине осадка (Froelich et al., 1979; Nealson, 1997; Jørgensen, 2000; Schulz, 2000). Такая последовательность окислительно-восстановительных зон объясняется конкуренцией между метаболическими путями; предполагается, что реакции с участием электронов, которые дают последовательно меньший выход свободной энергии, преобладают на последовательно большей глубине, поскольку акцепторы электронов с более высоким

выходом свободной энергии истощаются раньше на меньшей глубине (Froelich et al., 1979; Nealson, 1997; Jørgensen, 2000; D'Hond et al., 2004). Таким образом, также происходит последовательная смена групп прокариот (рис. 3).



**Рисунок 3.** Схематическое изображение процессов в глубинной биосфере. Цитировано по Parkes et al., 2014.

Подобные изменения происходят во многих глубоких морских отложениях. Например, часто существующая зона сульфатно-метанового перехода (SMTZ<sup>1</sup>) находится на разных глубинах в донных осадках в зависимости от глубины водной толщи. Так, при глубине воды 151 м зона SMTZ находится ~35 m.b.sf и содержит 2–8% органического углерода. На мелководных участках с высоким содержанием органического вещества, например, пролив Скагеррак (соединяющий Северное море с Балтийским морем, Дания) – на глубине ~0.7 m.b.sf.

<sup>1</sup> Зона перехода сульфат-метан (SMTZ) является зоной в океанах, озерах и реках, находящихся ниже поверхности отложений, в которых одновременно находятся сульфатион и метан. Формирование SMTZ обусловлено диффузией сульфатиона вниз по осадочной толще и диффузией метана вверх по отложениям. В SMTZ их диффузионные профили встречаются, что позволяет существовать в SMTZ микробному сообществу, основной формой метаболизма которого является анаэробное окисление метана (АОМ). Присутствие АОМ указывает на переход от диссимиляционного восстановления сульфата к метаногенезу в качестве основного метаболизма, используемого организмами (Hinrichs et al., 1999; Boetius et al., 2000).

В более глубоководных местах (бассейн Вудларк в Тихом океане) с низким содержанием органического углерода (глубина водной толщи 1150–2303 м, ~0.4% органического углерода) восстановление сульфатов происходит гораздо медленнее, а SMTZ находится от 107 до 199 m.b.sf на различных участках (Parkes et al., 2014).

Сульфатредукция, метаногенез, анаэробное окисление метана (АОМ) и ферментация являются основными метаболическими процессами в глубинных морских отложениях (>1.5 m.b.sf.) по трем причинам: 1) на границе раздела осадок-вода концентрация растворенного  $\text{SO}_4^{2-}$  более чем в 50 раз превышает концентрации всех вместе взятых акцепторов электронов с более высокой свободной энергией (Froelich et al., 1979; Pilson, 1998); 2) акцепторы электронов, дающие больше энергии, чем  $\text{SO}_4^{2-}$ , расходуется в пределах первых нескольких сантиметров до десятков метров по глубине отложений (Froelich et al., 1979); 3) при снижении концентрации сульфатов, метаногенез, ферментация и АОМ являются основными путями метаболической активности (D'Hondt et al., 2002).

Процесс диссимиляционной сульфатредукции в глубинных морских отложениях, в основном, осуществляется представителями класса *Deltaproteobacteria* (в н.в. филум *Desulfobacterota* согласно Genome Taxonomy Database, GTDB) (р. *Desulfovibrio*, *Desulfomonile*, *Desulfopila* и др.) и филума *Firmicutes* (в н.в. *Bacillota*) (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Desulforudis* и др.). В водородных экосистемах сульфатредукторы используют либо геогенный водород, либо водород, образуемый в процессе анаэробного окисления метана.

Метан является одним из самых распространенных углеводородов, образующихся в глубинных осадках. Метилкоэнзим М редуктаза (*mcr*) является ключевым ферментом анаэробного метаболизма метана (Laso-Pérez et al., 2016; Evans et al., 2019; Chen et al., 2019; Wang et al., 2021). Большинство культивируемых метаногенов восстанавливают углекислый газ с помощью водорода. Микроорганизмы содержат ферменты пути Вуда-Льонгдаля, для восстановления углекислого газа до метильных групп, связанных с тетрагидрометаноптерином (Thauer et al., 2008). Минералы, катализирующие абиотическое восстановление  $\text{CO}_2$ , часто содержат большое количество Fe и Ni, что привело к гипотезе о том, что появление биологических катализаторов (например, CO-дегидрогеназы, *mcr* и [NiFe]- и [FeFe]-гидрогеназ), участвующих в восстановлении  $\text{CO}_2$  через  $\text{H}_2$ , произошло в подповерхностной глубинной биосфере, где эти минералы находились в изобилии (Russell, Martin, 2004; Boyd et al., 2014). Другие метаногены осуществляют ацетокластическую реакцию или диспропорционирование метилированных субстратов в метан и двуокись углерода (Thauer et al., 2008). Ферментом, соединяющим путь Вуда-Льонгдаля с *mcr*, является тетрагидрометаноптерин S-метилтрансфераза (*mtr*), которая переносит метильные группы между кофакторами тетрагидрометаноптерин и кофермент М (Gottschalk, Thauer, 2001; Thauer

et al., 2008). Однако были культивированы водородозависимые метилотрофные археи порядка *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmata*), у которых отсутствует как путь Вуда-Льонгдаля, так и ген *mtr*, и, следовательно, требуются метилированные соединения и водород в качестве акцептора и донора электронов соответственно (Borrel et al., 2013, 2016; Wang et al., 2021).

В последние годы геномика выявила множество ранее неизвестных линий потенциальных метаногенов по всему древу архей (Evans et al., 2015; Vanwonterghem et al., 2016; Nobu et al., 2016; Berghuis et al., 2019; Borrel et al., 2019; Wang et al., 2019; Hua et al., 2019; Wang et al., 2021). Данные филогеномного и сравнительного геномного анализа разнообразия архей подтвердил гипотезу о том, что общим предком *Euryarchaeota* (в н.в. *Halobacterota*) и ТАСК (суперфилум архей, включающий *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Geoarchaeota* и *Bathyarchaeota*<sup>2</sup>), был метаноген (Berghuis et al., 2019; Borrel et al., 2019; Wang et al., 2019; Hua et al., 2019; Wang et al., 2021).

Считается, что метаногены могут представлять одну из самых ранних форм жизни (Ueno et al., 2006; Martin, Sousa, 2016; Wolfe, Fournier, 2018; Wang et al., 2021) и первыми метаногенами были либо гидрогенотрофные метаногены, использующие путь Вуда-Льонгдаля (Berghuis et al., 2019), либо водородозависимый метилотроф (Borrel et al., 2019; Wang et al., 2021). На основе анализа аннотированных геномов из метагеномных массивов данных (MAGs) 56 *mcr/acr*-содержащих организмов, высказано предположение, что метаногенез развился вскоре после дивергенции бактерий и архей в позднем хадейском периоде<sup>3</sup> (Wang et al., 2021). Жизнь, вероятно, возникла в гидротермальных источниках или местах серпентинизации, которые обеспечивали идеальные условия для таких прокариот (Russell et al., 2010; Martin, Sousa, 2016; Westall et al., 2018). Температуры были повышены по сравнению с другими, возможно, холодными планетами из-за низкой освещенности молодым Солнцем, а большое количество молекулярного водорода и простых органических соединений, таких как метанол и ацетат, обеспечивали отдельные источники углерода и энергии (Goldblatt, Zahnle, 2011). Между тем, микроорганизмы, возможно, разработали путь Вуда-Льонгдаля либо для фиксации углерода, либо для сохранения энергии при метаболизме ацетата. Более поздняя эволюция *mtr* могла обеспечить метаногенез через восстановление углекислого газа, что сильно увеличило образование метана на Земле. В бескислородной архейской атмосфере метан оставался ~1000 раз дольше, чем сегодня (Kasting, Siefert, 2002), и, следовательно, метаногенез, возможно, оказал решающее влияние на климат ранней Земли. Накапливающийся метан усиливал ранний парниковый эффект и сохранял излучение

---

<sup>2</sup> в н.в. суперфилум ТАСК – объединен в филум *Thermoproteota* (Rinke et al., 2021)

<sup>3</sup> Hades – «ад» или «невидимый». Хадейский эон относится к самой ранней геологической эпохе в истории Земли, от образования планеты около 4.5 миллиардов лет назад до начала архейского периода, 3,8 миллиарда лет назад.

молодого Солнца, что повышало температуру поверхности Земли, обеспечивая подходящие места обитания для развития другой жизни.

Анаэробные окислители метана в подземной среде окисляют абиогенный метан и метан, образуемый прокариотами. АОМ осуществляется, в основном, представителями домена *Archaea* и большинство его членов тесно связаны с классом *Methanomicrobia* (в н.в. р\_ *Halobacterota*; с\_ *Methanosarcinia*) (ANME-1, ANME-2 и ANME-3) (Sar et al., 2019). Хотя сульфатзависимое АОМ является наиболее частым процессом для морских экосистем, в качестве акцепторов электронов могут выступать другие соединения. В качестве акцепторов электронов в процессе АОМ используются также  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mn}^{4+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  (Cui et al., 2015; Cai et al., 2018; Leu et al., 2020) (раздел 1.3.1).

Сверхглубинная биосфера считается экстремальной средой, характеризующейся темнотой и анаэробиезом, где температура и давление повышаются с глубиной (Kieft, 2016). В этих средах доступность питательных веществ и воды, следовательно, численность и активность микроорганизмов контролируются геохимическими и геогидрологическими параметрами. С одной стороны, из-за нехватки органического вещества, минералы являются практически основным источником субстратов, так как обновляются в результате абиотических процессов, либо находятся в биодоступном растворенном состоянии. Таким образом, доступные доноры и акцепторы электронов определяются геологическим составом глубинного местоположения (Jones, Bennett, 2017; Rempfert et al., 2017). Кроме того, в глубоких недрах преобладают анаэробные процессы метаболизма с низким выходом получаемой энергии по сравнению с аэробными процессами (Hoehler, 2004). С другой стороны, пористость горных пород и наличие трещин или разломов в системе влияют на рост микроорганизмов. В тех системах, где пористость высока, поток воды и питательных веществ будет выше, что в свою очередь способствует колонизации микроорганизмами большей площади и формированию гетерогенных микро niches, которые позволяют сосуществовать в недрах микроорганизмам с конкурентным (антагонистическим) метаболизмом, таким как сульфатное восстановление и метаногенез (Fredrickson et al., 1997; Pedersen, 2000; Jakobsen, 2007; Escudero et al., 2018).

Одной из наиболее спорных тем при изучении подповерхностных сред является вопрос о том, являются ли доступные источники метаболической энергии эндогенными или, наоборот, частично зависят от продуктов фотосинтеза, образующихся на поверхности (Escudero et al., 2018). Некоторые авторы считают, что только те микробные сообщества, которые способны развиваться в отсутствие солнечного света, могут считаться частью глубинной биосферы (Orcutt et al., 2011; Momper et al., 2017). Экосистемы, которые функционируют без фотосинтеза, называются «Подземные литоавтотрофные микробные

экосистемы» (SLiMEs – Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems) (Stevens, McKinley, 1995). Абиотические процессы, такие как серпентинизация, радиолиз воды, окисление минералов, растворение минералов и дегазация магматических пород способствуют образованию газов –  $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$  и  $H_2S$ .

Нилсон К. с соавторами считают, что настоящая подземная литоавтотрофная микробная экосистема должна питаться от геосферы, и как доноры, так и акцепторы электронов должны постоянно обновляться в результате геологических процессов, и, следовательно, микроорганизмы, составляющие основу экосистемы, должны быть хемолитоавтотрофами (Nealson et al., 2005). Вместе с тем, чтобы поддерживать жизнь в подземных средах, минеральная матрица должна накапливать достаточное количество энергии, а также обладать потенциалом для ее передачи в биологически доступной форме (Hoehler, 2004; Escudero et al., 2018). Исследования показали способность микроорганизмов использовать минералы в качестве электронных доноров или акцепторов (El-Naggar et al., 2010) или растворять минералы, такие как биотит (Shelobolina et al., 2012), пирит (Vera et al., 2013), халькопирит (Edwards et al., 2000), полевошпат (Rogers et al., 1998), образуя соединения, которые могут использоваться в качестве субстратов при образовании биомассы. Вместе с тем, микроорганизмам необходимо производить внеклеточные соединения для растворения минералов, что предполагает увеличение энергии, необходимой для выживания в среде, которая считается олиготрофной (Escudero et al., 2018).

Одним из наиболее распространенных газов в недрах является водород, который может быть получен абиотическим путем многими различными способами (Apps, 1993). Водород является одной из наиболее часто используемых молекул хемолитоавтотрофными микроорганизмами и в настоящее время считается основным источником первичной энергии в литоавтотрофных экосистемах (Escudero et al., 2018). Способность метаболизировать  $H_2$  широко распространена в микробном мире, причем ~30% таксонов с доступными геномами кодируют основные ферменты, участвующие в метаболизме  $H_2$ : [FeFe]-, [NiFe]-гидрогеназы или [Fe]-гидрогеназы (Peters et al., 2015). Количество гомологов [FeFe]- и [NiFe]-гидрогеназ в геномах сообществ из подповерхностных сред почти на порядок выше по сравнению с поверхностными средами, что соответствует центральной роли  $H_2$  в энергетическом метаболизме подповерхностной жизни. Высокие концентрации  $H_2$  могут также стимулировать абиотическое гидрирование  $CO_2$  в процессе, который называют синтезом Фишера-Тропша (Studier et al., 1968). При высоких температурах гидратация оливина и образующийся при этом  $H_2$ , катализируют абиотическое восстановление водного  $CO_2$  до формиата ( $HCOO^-$ ), который затем может уравниваться до монооксида углерода (CO) (McCollom, Seewald, 2001). Интересно, что геномы подповерхностных микробных сообществ также обогащены генами,

позволяющими использовать СО в анаэробных условиях, формиатдегидрогеназой и никель-зависимой СО-дегидрогеназой по сравнению с геномами поверхностных сообществ. В отличие от этого молибден-зависимая СО-дегидрогеназа не была обнаружена в геномах микроорганизмов из подповерхностных осадков по сравнению с поверхностными сообществами, что может быть связано с ограниченной доступностью Мо в анаэробных и, возможно, сульфидных условиях, присутствующих во многих подповерхностных слоях глубинной биосферы (Helz et al., 1996).

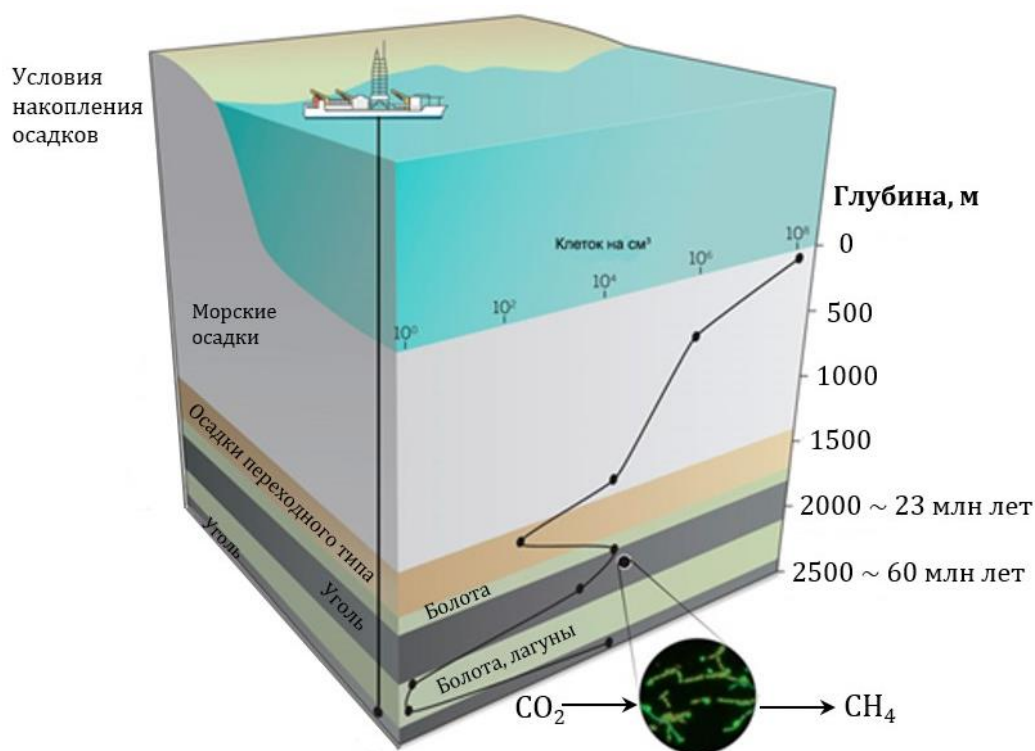
Хемолитотрофы могут быть облигатными или факультативными по своей природе, филогенетически разнообразны и играют важную роль в различных биогеохимических циклах в глубинной биосфере. Некоторые из известных хемолитотрофов – это представители родов *Nitrospira*, *Nitrobacter* и *Nitrosomonas* (окисляющие аммиак); *Gallionella*, *Thiobacillus ferrooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans* (окисляющие железо); *Hydrogenobacter thermophilus*, *Aquifex aeolicus* и *Hydrogenovibrio marinus* (окисляющие водород); *Acidithiobacillus*, *Thiomonas* и *Thiobacillus* и др. (окисляющие серу).

Источником углерода для хемолитоавтотрофов зачастую выступает СО<sub>2</sub>. В настоящее время известны семь путей автотрофной фиксации СО<sub>2</sub>: цикл Кальвина-Бенсона-Бассама (Calvin Cycle), обратный цикл Кребса (rTCA), восстановительный ацетил-КоА (путь Вуд-Льюндаля), 3-гидроксипропионатный (3-HP) цикл, цикл 3-гидропропионата/4-гидроксипропионата (3-HP/4-HP), цикл дикарбоксилата/4-гидроксипропионата (DC/4-HP), восстановительный глициновый путь (rGlyP) (Berg et al., 2010; Purkamo et al., 2015; Sánchez-Andrea et al., 2020). Также фиксация СО<sub>2</sub> может происходить через обратный окислительный цикл трикарбоновых кислот (roTCA) (Mall et al., 2018; Nunoura et al., 2018). Абиогенные источники углекислого газа и бикарбонатов в глубинной биосфере образуются, в основном, в результате дегазации магматической системы и растворения минералов кальцита соответственно (Sar et al., 2019).

Факторы, которые могут ограничивать глубинную осадочную биосферу, не ограничиваются дефицитом питательных веществ и дефицитом доноров электронов. Лимитирующие факторы могут также включать температуру, давление, рН, соленость, доступность воды, пористость осадка или проницаемость. Например, без переноса жидкости в осадке рассеивание подповерхностных микробных клеток может быть ограничено диффузионным переносом, поскольку маловероятно, что управляемая протонным насосом подвижность жгутиков может происходить при таком низком потоке энергии (Berg, 2003). В этом случае перенос может достигать только 6 м за 1 млн. лет, даже в очень пористых слоях (Fenchel, 2008; Hoehler, Jorgensen, 2013; Jorgensen, Marshall, 2016). Недавние исследования композиционных связей сообществ между мелкими отложениями и морской водой показали,



что глубинные донные отложения заселены потомками сообществ морских отложений, которые становятся преобладающими благодаря преимущественному выживанию, поскольку сообщества погребены в течение от тысяч до сотен тысяч лет (Walsh et al., 2016; Kirpatrick et al., 2019). Так, в ходе глубокого бурения северо-западного шельфа Тихого океана у берегов Японии были получены доказательства существования активных микробных сообществ (обнаружено от  $10^0$  до  $10^4$  клеток на  $\text{см}^{-3}$ ) в океанических осадках на глубинах от 1.5 до 2.5 км при температуре от  $40^\circ$  до  $60^\circ\text{C}$  (рис. 4; Inagaki et al., 2015). По своему составу микробное сообщество оказалось ближе к комплексу лесных почв, чем морских осадков. Это говорит о том, что терригенные осадки сохранили изначальное почвенное сообщество после десятков миллионов лет после захоронения. Количественные максимумы были приурочены к углесодержащим прослоям. Микробиота глубоких угленосных прослоев активна и существует за счет гидрогенотрофного метаногенеза (Inagaki et al., 2015).



**Рисунок 4.** Жизнь в толще морских осадков. Цитировано по Inagaki et al., 2015.

Некоторые глубоко погребенные клетки могут позже быть вынесены в океан через транспорт флюидов (поток через разломы, грязевой вулканизм и естественные выходы углеводородов), будучи рассеянными как «семена глубинной биосферы» (Hoshino et al., 2017; Ijiri et al., 2018; Chakraborty et al., 2020). Исходя из математических моделей энергообеспеченности и микробных процессов, энергия, необходимая для простого выживания, а не для роста, составляет существенную долю общей мощности, потребляемой

подземно-осадочными сообществами (D'Hondt et al., 2014; LaRowe, Amend, 2015; Bradley et al., 2019).

Одним из факторов, определяющих предел физиологического и филогенетического разнообразия и биогеохимической функции организмов в глубинных морских отложениях, является температура (Teske et al., 2014). С увеличением глубины количество растворенных твердых веществ в грунтовых водах имеет тенденцию к увеличению, как и температура, но градиенты этого увеличения меняются в зависимости от геологической формации. Температура в океанической коре увеличивается примерно на 15°C на 1 км глубины, что дает температурный максимум пригодный для жизни на глубине около 7 км. В континентальной коре порода нагревается значительно быстрее, примерно 25°C на км, в результате чего максимальная глубина составляет примерно 4 км (Fredrickson, Onstott, 1996). Температурные пределы жизни были рассчитаны исходя из температурного максимума для живых организмов – 113°C, на момент открытия в 1997 г. археи, отнесенные к *Pyrolobus fumarii* (Blochl et al., 1997). Диапазон роста находится от 90 до 113°C (оптимум 106°C). Штамм изолирован из гидротермального источника черного курильщика на Срединно-Атлантическом хребте (глубина 3650 м). Было показано, что при температуре выше 110°C аминокислоты и метаболиты, становятся крайне нестабильными, и гидрофобные взаимодействия значительно ослабевают (Jaenicke, 1998).

Однако повышенное гидростатическое давление увеличивает температурный максимум для возможной пролиферации клеток со 116°C при 0.4 МПа до 122°C при 20 МПа, обеспечивая потенциал для роста даже при 122°C при высоком давлении в условиях *in situ*, как это было показано для штамма *Methanopyrus kandleri* (Kurt et al., 1991; Takai et al., 2008). Анализ полной нуклеотидной последовательности *Methanopyrus kandleri* показал, что геном содержит необычно большое количество отрицательно заряженных аминокислот, что может быть адаптацией к высокой внутриклеточной солености, малое количество белков, участвующих в передаче сигналов и регуляции экспрессии генов, а также содержит меньше генов, полученных в результате горизонтального переноса, чем другие археи. Филогеномный анализ показал, что *Methanopyrus kandleri* относится к очень глубокой ветви, близкой к корню древа архей (Slesarev et al., 2002).

Вместе с тем в исследовании Хойер В.Б. с соавторами (Heuer et al., 2020) показано, что жизнь в глубинных морских отложениях не ограничена верхним пределом температуры ниже 120°C и определяется, в том числе геологическими процессами, которые оказывают значительное влияние на микробную жизнь в глубоких горячих отложениях. Группа исследователей (Heuer et al., 2020) анализировала керны донных осадков длиной до 1.2 км, полученные в зоне субдукции Нанкайского прогиба у побережья Японии. Авторы установили,

что численность микробных популяций в основном контролируется температурно-зависимыми физиологическими факторами вплоть до 600 m.b.sf. С увеличением глубины и температуры количество вегетативных клеток бактерий уменьшалось, достигая минимума на 500 метрах, где температура повышалась до 60°C. При ~300–400 m.b.sf (<0.4 млн лет) концентрация вегетативных клеток резко падала на два порядка и приближалась к минимальному пределу количественного определения (ПКО) (16 кл/см<sup>-3</sup>) по мере повышении температуры с 40° до 50°C (рис. 5а). Одновременно с этим возрастала концентрация эндоспор (до 2×10<sup>5</sup>/см<sup>-3</sup>), образуемых представителями филума *Firmicutes* (*Bacillota*). Тем не менее, небольшая микробная популяция сохранялась при температуре >50°C в форме вегетативных клеток и эндоспор. В отличие от случайного распределения вегетативных клеток в отложениях с температурой >50°C, распределение эндоспор имело четкую зональность (рис. 5б). Количество эндоспор заметно возрастало в интервале ~200 m.b.sf (температура 75–90°C) и достигало максимума 1.2×10<sup>6</sup> эндоспор см<sup>-3</sup> при температуре 85°C.

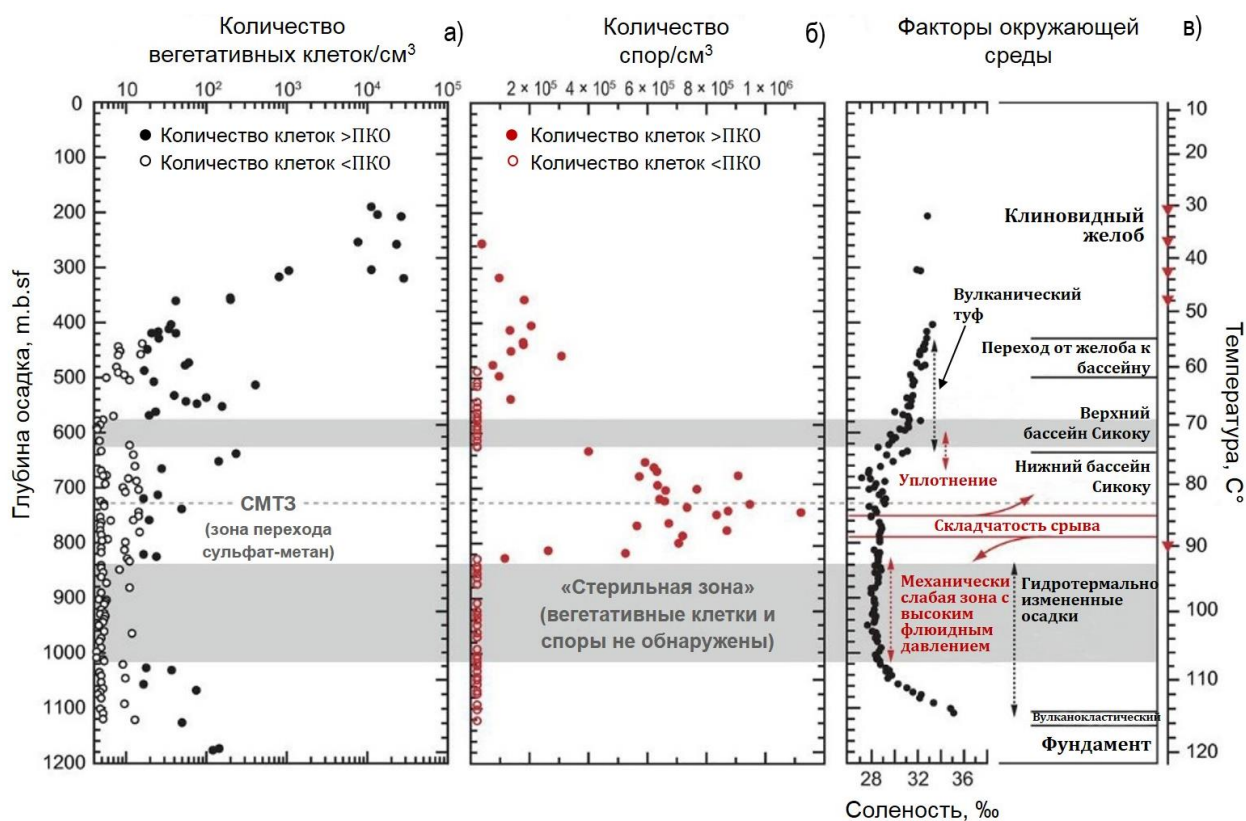
Среднее соотношение эндоспор к вегетативным клеткам превышало 6000 в отложениях ниже 350 m.b.sf и было на два-три порядка выше, чем в холодных донных отложениях (Worner et al., 2019). Вероятно, накопление эндоспор в отложениях, которые почти лишены вегетативных клеток, связаны с повышением температуры до ~50°C и наступлением определенных условий<sup>4</sup>, что привело к временному росту термофильной популяции, образующей эндоспоры, с последующим спорообразованием.

В двух горизонтах, от 570 до 633 m.b.sf и от 829 до 1021 m.b.sf выявлена зона стерильности, где не обнаружены ни вегетативные клетки, ни эндоспоры. Авторы предположили, что отсутствие жизни связано не с дефицитом субстратов для роста (ацетат выявлен в составе поровых вод), а со свойствами вмещающих пород (рис. 5в). Профили поровой воды донных осадков свидетельствуют о микробной активности вплоть до глубины осадка возрастом ~16 млн лет. Высокие концентрации метана со средним изотопным составом углерода ( $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ ) от  $-61.3 \pm 3.0$  ‰ указывают на биогенный метаногенез, по крайней мере, до зоны перехода сульфат-метан (SMTZ) при температуре от 80° до 85°C, соответствующих ~730 m.b.sf. Положительное отклонение в  $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$  в зоне перехода сульфат-метан (SMTZ) указывает на биогенное окисление метана и согласуется с результатами предыдущих исследований, в которых показана активность культивируемых термофильных (80–85°C) анаэробных метаноокисляющих сообществ (Holler et al., 2011; Kallmeyer et al., 2012). Ниже

---

<sup>4</sup> гемипелагические аргиллиты и туфы возрастом ~ 16 миллионов лет и мощностью ~ 600 м в результате деколлемента (тектоническая складчатость срыва) образовали желоб, но были быстро погребены за последние ~ 0,4 миллиона лет слоем отложений, богатых органическим веществом такой же мощности (Horsfield et al., 2006; Tsang et al., 2020)

SMTZ метан присутствует только в микромолярных концентрациях, изотопный анализ газа и уменьшающееся соотношение метан/этан указывали на увеличение содержания термогенных углеводородов. Диффузионные профили компонентов поровой воды донных осадков не позволяют провести различие между текущими и недавними биогеохимическими процессами *in situ*.



**Рисунок 5.** Профили распределения вегетативных клеток и эндоспор в зависимости от факторов окружающей среды. (а) Количество вегетативных клеток, определенное подсчетом клеток, флуоресцентно окрашенных SYBR Green I. ПКО – предел количественного обнаружения; (б) Количество бактериальных эндоспор, определенное на основе концентрации дипиколиновой кислоты (DPA), аналитическая чувствительность соответствует пределу обнаружения  $2,2 \times 10^4$  эндоспор  $\text{см}^{-3}$ . (в) Схематическое описание факторов окружающей среды: температуры, тектонических единиц и солености, показывающее геохимическое влияние изменений с глубиной; красные символы на оси температуры обозначают глубинные горизонты, в которых были проведены измерения температуры *in situ*. Серая штриховка указывает на зоны, в которых вегетативные клетки и эндоспоры не обнаружены во всех образцах; серая пунктирная линия указывает на местоположение зоны перехода сульфат-метан (SMTZ) (SMTZ). Цитировано по Neuer et al., 2020.

Эксперименты с радиотрейсером показали современную метаногенную активность в 65% исследованных образцов. Потенциальные скорости гидрогенотрофного метаногенеза, в отложениях ниже 300 m.b.sf., были ниже  $4 \text{ пмоль/см}^{-3}/\text{сут}^{-1}$  и находились в пределах диапазона скорости метаногенеза, установленных в предыдущих исследованиях глубинной биосферы (Parkes et al., 2000). Скорость метаногенеза снижалась до  $0.6 \text{ пмоль/см}^{-3}/\text{сут}^{-1}$  ниже SMTZ и до не обнаруживаемого уровня в 63% образцов из «стерильной зоны» без вегетативных клеток и

эндоспор. Потенциальные скорости метаногенеза снова возрастали в трех глубинных образцах, до значений, наблюдаемых в метановой зоне, что подтверждает существование активных метаногенных сообществ в горячих отложениях от 110° до 120°C. Ацетат является ключевым субстратом для микроорганизмов, и было высказано предположение, что его образование из осадочного органического вещества при нагревании питает микробную жизнь в глубоко погребенных отложениях (Wellsbury et al., 1997). По всей глубине исследуемого керна, использование ацетата в процессах сульфатредукции и метаногенеза являются эксергическими<sup>5</sup>, при этом выходы свободной энергии Гиббса становятся все более отрицательными с глубиной. В нагретой до 60°C верхней части 600 m.b.sf. низкие концентрации ацетата около  $26 \pm 22$  мкмоль согласуются с устойчивым состоянием, регулируемым тесно связанным образованием и потреблением ацетата микроорганизмами. Колебание  $\delta^{13}\text{C}$ -ацетата вокруг его среднего значения –  $25.5 \pm 3.4\%$  указывает на метаболическую активность прокариот (Neuer et al., 2009). Использование ацетата было минимально при температуре от 60° до 100°C. При температуре от 60° до 75°C концентрация ацетата резко возросла с одновременным снижением концентрации метана и накоплением эндоспор, что свидетельствует о том, что потребление микроорганизмами больше не уравновешивало высвобождение ацетата из осадочного органического вещества. Ниже SMTZ концентрация ацетата находилась на уровне  $9.2 \pm 2.4$  ммоль с неизменным  $\delta^{13}\text{C}$ -ацетата около  $-18.8 \pm 0.5\%$ . Сочетание высокой концентрации и низкой изотопной изменчивости указывает на наличие ацетатного пула без существенного потребления в зоне с преобладанием эндоспор, а также в лежащей под ними зоне толщиной 200 м, где не было обнаружено ни клеток, ни эндоспор.

Однако, на глубине >1030 m.b.sf. концентрация ацетата снижается, а  $\delta^{13}\text{C}$ -ацетата монотонно увеличивается с глубиной, достигая максимума  $-7.9\%$  в образце поровой воды, взятой с глубины 1101 m.b.sf. Эта тенденция согласуется с деятельностью гипертермофилов, которые преимущественно разлагают ацетат, обедненный  $^{13}\text{C}$ , оставляя остаточный ацетат изотопно обогащенным. Без постоянного потребления ацетата диффузия привела бы к гомогенизации вариаций  $\delta^{13}\text{C}$ -ацетата, наблюдаемой в вышележащих отложениях. Таким образом, профили ацетата предполагают существование небольшого микробного сообщества, использующего ацетат при >100°C. Синтрофное окисление ацетата, связанное с потреблением образующегося  $\text{CO}_2$  и электронов метаногенами, является основным путем метаболизма в глубинных отложениях при повышенных температурах (Dolfing et al., 2008; Beulig et al., 2018).

---

<sup>5</sup> Эксергия – предельное (наибольшее или наименьшее) значение энергии, которое может быть полезным образом использовано (получено или затрачено) в термодинамическом процесс с учетом ограничений, накладываемых законами термодинамики

Этот процесс является экзергоническим в условиях *in situ* и может объяснять повышенные скорости метаногенеза и изотопную характеристику метана в самой глубокой части скважины.

В более глубокой части керна геологические процессы могут оказывать дополнительное влияние. Резкое снижение биогенного метаногенеза и утилизация ацетата при температуре от 70° до 75°C, совпадало с верхним диапазоном роста термофилов. Этот же интервал глубин одновременно охватывает литологическую границу между Верхним и Нижним бассейнами Сикоку. На этой границе туфы (затвердевший вулканический пепел) не обнаруживаются. При изменении туфа образуется смектит, микробное восстановление Fe(III) в смектите способствует превращению смектита в иллит. Этот процесс является энергоемким процессом, что может обуславливать снижение количества микроорганизмов и их активности на уровне от 500 до 600 m.b.sf. Таким образом, возможна модуляция некоторых типов микробной активности за счет микробно-минеральных взаимодействий. Пиковые концентрации эндоспор при 85°C совпадают как с SMTZ, так и с пограничным декольманом<sup>6</sup> пластины. В этой зоне короткие периоды нагревания трением во время дифференциального движения пластины (Fulton et al., 2013), вероятно, определяют дополнительные «жесткие» условия для микроорганизмов. Вместе с тем, образование эндоспор и высокие концентрации ацетата могут обеспечить запас «семян» и энергии для восстановления экосистемы от эпизодических возмущений.

В верхних 200 м области надвига, при температуре от ~ 90° до 100°C выявлена «стерильная зона» зона без обнаруживаемых вегетативных клеток и без геохимических признаков микробной активности. В этой зоне недостаточно уплотненные и механически слабые отложения подвергаются избыточному давлению и кратковременному воздействию горячих флюидов от ~ 145° до 220°C (Hamada et al., 2018; Tsang et al., 2020). Временные периоды нагрева могут обуславливать локально стерилизованный осадок (Tsang et al., 2020), но микробные клетки, потребление ацетата и метаногенная активность снова преобладают в отложениях с температурой >100°C, где механическая прочность и соленость возрастают по направлению к границе осадка и фундамента. Гидравлическая связь между базальтами и вышележащими отложениями подтверждается общими стилями эпигенетической минерализации в виде жил кальцита и железистых оксидов металлов. Массоперенос между базальным осадком и водоносным горизонтом, вмещающим базальт, увеличивает обитаемость базального осадка за счет снижения давления пластового флюида и восполнения обедненных субстратов, таких как восстановленное железо и сульфат (Torres et al., 2015). Таким образом, в результате проведенных исследований авторы (Heuer et al., 2020) показали зависимость

---

<sup>6</sup> Декольман (decollement) – пологий надвиг или внутриформационный срыв

численности и активности микробных сообществ от критических температур от 40° до 50°C и при 70°C. Установлено, что жизнь в глубинной биосфере не ограничена верхним пределом температуры ниже 120°C. Геологические процессы, связанные с субдукцией Нанкайского прогиба, оказывают значительное влияние на микробную жизнь в глубоких горячих отложениях.

Стратификация микробных сообществ в зависимости от температуры нагревания слоев осадочных пород в бассейне Гуаймас (Калифорнийский залив, Мексика) показана в работе (Mara et al., 2023). Авторы установили, что состав и распределение MAGs коррелирует с биогеохимическими параметрами до тех пор, пока температура остается умеренной. В образцах, имеющих температуру 2–20°C, преобладали представители филумов *Chloroflexota*, *Acidobacteriota*, *Desulfobacterota*, *Ca. WOR-3*, *Ca. Aerophobota*, *Ca. Bipolaricaulota*, *Thermoproteota*, *Thermoplasmata* и *Aenigmataarchaeota*. В образцах с повышенной температурой (20–45°C) – в основном представители *Chloroflexota* (группа GIF9), *Acidobacteriota*, *Ca. WOR-3* (группа UBA3073), *Ca. Aerophobota* и *Ca. Bipolaricaulota*, *Thermoproteota*, *Ca. Hadarchaeota* и *Aenigmataarchaeota*. Анализ генома бактерии кандидатного филума *Bipolaricaulota*, ранее известного как OP1 и *Acetothermia*, показал, что бактерия является анаэробным органотрофом, способным сбраживать сахара и белковые субстраты, образуя водород и ацетат (Кадников и др., 2019). Из образцов с высокой температурой (45–60°C) аннотирован 1 геном, отнесенный к *Chloroflexota* (класс *Dehalococcoidia*), 1 геном *Ca. WOR-3* и 2 генома *Ca. Aerophobota* (класс *Aerophobia*), несколько геномов *Thermoproteota* (класс *Bathyarchaeia*) и *Ca. Hadarchaeota* (класс *Hadarchaeia*). В слоях осадка, пронизанных пульсирующими, чрезвычайно горячими (более 80°C) флюидными потоками, микробное сообщество представлено археями *Thermoproteota* и *Ca. Hadarchaeota*. Полученные данные отражают метаболизм, прогнозируемый для глубинной биосферы, включающий круговорот серы, азота и метана, разложение углеводов и фиксацию углерода (Mara et al., 2023).

#### **1.1.4. Таксономическое разнообразие микроорганизмов глубинных осадочных отложений**

Самые ранние комплексные микробиологические исследования донных отложений показали, что разнообразные микробные сообщества, пригодные для культивирования присутствуют на глубине 80 m.b.sf (самые глубокие образцы, Parkes et al., 1990) однако количество культивируемых микроорганизмов составляло ~0.0003% (Parkes et al., 2014). Микроорганизмы, изолируемые из глубин донных отложений, в большинстве случаев относятся к бактериям филумов *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Firmicutes* (*Bacillota*), *Actinobacteria* (*Actinomycetota*), *Bacteroidetes* (*Bacteroidota*) и археям родов *Methanoculleus* (*Halobacterota*) и *Methanococcus* (*Methanobacteriota\_A*) (Barnes et al., 1998; Inagaki et al., 2003;

Toffin et al., 2004; Takai et al., 2004; 2006; Kendall et al., 2006; Batzke et al., 2007; Kobayashi et al., 2008; Parkes et al., 2009). Развитие молекулярных методов идентификации в дальнейшем подтвердило, что микробные сообщества глубинной биосферы в основном представлены некультивируемыми микроорганизмами (Orcutt et al., 2011; Parkes et al., 2014). Для морских экосистем применение метагеномного анализа позволило установить значительное сходство в составе сообществ, населяющих донные отложения с одинаковыми геохимическими характеристиками. Так, в библиотеках генов 16S рРНК микробных сообществ из районов газовых сипов характерно преобладание последовательностей сульфатредукторов из *Deltaproteobacteria* (*Desulfobacterota*) и *Epsilonproteobacteria* (*Campylobacterota*), а также архей групп ANME и *Methanosarcinales* (*Halobacterota*), что напрямую связано с высокой активностью процессов анаэробного окисления метана в этих зонах (Ruff et al., 2015). В донных отложениях морских экосистем, богатых органическим веществом, наиболее часто обнаруживаются некультивируемые представители филумов *Chloroflexi* (*Chloroflexota*) и *Bathyarchaeota* (*Thermoproteota*), тогда как в осадках, ассоциированных с газовыми гидратами, доминируют *Atribacteria* (*Atribacterota*) и археи группы MBG-B (p\_Thermoplasmatota; c\_Thermoplasmatata; o\_Ca. Thermoprofundales) (Inagaki et al., 2006; Webster et al., 2006; Hamdan et al., 2012; Lee et al., 2013). В иловых отложениях олиготрофных районов океана многочисленны *Chloroflexi* (*Chloroflexota*), *Gamma*proteobacteria (*Pseudomonadota*), *Bathyarchaeota* (*Thermoproteota*) и MBG-B (*Thermoplasmatota*) (Inagaki et al., 2003; Webster et al., 2009; Forschner et al., 2009; Hoshino et al., 2011; Jorgensen et al., 2012). Помимо бактерий и архей активным компонентом сообществ глубинной биосферы являются грибы (Orsi et al., 2013), молекулярные маркеры которых обнаружены на глубинах до 1740 м ниже поверхности дна (Ciobanu et al., 2014).

Проанализировав 299 проб морских отложений со всего мира, охватывающих глубины отложений от 0.1 до 678 м, Хошино Т. с соавторами (2020) показали, что микробные сообщества в морских осадках состоят из двух основных микробных групп: анаэробной и аэробной. Разнообразие микробных сообществ в морских отложениях уменьшается с увеличением их глубины. Скорость снижения разнообразия была ниже для архей, чем для бактерий. Несмотря на более низкую скорость уменьшения разнообразия архей с глубиной, разнообразие бактерий превышает разнообразие *Archaea* на каждой глубине осадка. Экстраполяция с использованием двух подобранных моделей взаимосвязи вида и площади показало, что таксономическое богатство морских отложений составляет  $7.85 \times 10^3 - 6.10 \times 10^5$  и  $3.28 \times 10^4 - 2.46 \times 10^6$  вариантов последовательности ампликонов (ASV) *Archaea* и *Bacteria* соответственно. Сравнительный анализ микробиомов морских отложений, верхнего слоя почвы и морской воды показал, что каждый биом содержит явно различное сообщество, но



примерно одинаковый уровень глобального микробного богатства. Этот результат указывает на то, что бактерии более разнообразны, чем археи в глобальной биосфере Земли (Hoshino et al., 2020).

Представители филума *Crenarchaeota*, включая *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*), *Euryarchaeota* (*Halobacterota*), *Asgardarchaeota* и *Hadesarchaeaeota* (*Ca. Nadarchaeota*) доминировали в составе анаэробных микробных сообществ в некоторых районах Балтийского моря, у берегов полуострова Симокиита и в некоторых образцах Перуанской окраины (Hoshino et al., 2020). На представителей филума *Hadesarchaeaeota* (*Ca. Nadarchaeota*) приходилось более чем 70% последовательностей с увеличением их количества по глубине осадка. Филум *Asgardarchaeota* почти полностью состоял из представителей филума *Ca. Lokiarchaeota* (p\_*Asgardarchaeota*; c\_*Lokiarchaeia*). Предсказанный метаболизм *Ca. Lokiarchaeia*, на основе анализа геномов, показывает, что они живут гетеротрофно, используя ароматические углеводороды, но термодинамически требуют симбиоза с сульфатредуцирующими бактериями (Farag et al., 2020). Представители филума *Nanoarchaeota* (в н.в. *Nanobdellota*) составляли более 95% архейного сообщества в самой глубинной пробе (678 m.b.sf) из Бенгальского залива (Hoshino et al., 2020). В отличие от анаэробных сообществ, в аэробных сообществах архей преобладали представители *Thaumarchaeota* (*Thermoproteota*) (например, *Nitrososphaera*). Из 3892 общих вариантов ASV, обнаруженных в наборе данных *Archaea*, только 260 ASV являются общими, что составляло примерно 70% от всех последовательностей (Hoshino et al., 2020).

Так же, как и в случае с сообществом архей, различался таксономический состав бактериальных сообществ в зависимости от содержания кислорода в осадках. В кислородных подповерхностных слоях осадков доминировали представители *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonadota*) и *Firmicutes* (*Bacillota*). В бескислородных осадках доминировали представители филумов *Atribacteria* (*Atribacterota*), *Chloroflexi* (*Chloroflexota*) и *Planctomycetes* (*Planctomycetota*). Из 30874 ASV, 5212 являлись общими, как для аэробных, так и анаэробных сообществ (Hoshino et al., 2020). Чтобы определить закономерности совпадения ASV, авторы провели сетевой анализ, основанный на ранговой корреляции Спирмена (Hoshino et al., 2020). Сети были построены с использованием только положительных и значимых корреляций ( $r > 0.6$ ,  $>P < 0.05$ ). В результате анализа, основанного на кластеризации различий, было получено 50 сообществ, 10 из которых являются основными. Эти 10 сообществ (1533 ASV) отражали окислительно-восстановительную среду осадочных пород: пять сообществ, состоящих из ASV, преобладающих в окисленных отложениях и пять сообществ, состоящих из ASV, преобладающих в бескислородных отложениях. Из 10 сообществ, сообщество 1 содержало наибольшее количество ASV (84), которые состояли в

основном из представителей филумов *Chloroflexi* (*Chloroflexota*), *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*) и *Thaumarchaeota* (*Thermoproteota*). Сетевая диаграмма также показала, что *Chloroflexi* (*Chloroflexota*) и *Thaumarchaeota* (*Thermoproteota*) являются значимыми членами совместной сети аэробных осадков. Филум *Thaumarchaeota* представлен семейством *Nitrosopumilaceae* (в н.в. р\_*Thermoproteota*; с\_*Nitrososphaeria*; о\_*Nitrososphaerales*). Представители *Nitrosopumilaceae* широко распространены в океане и могут осаждаться на морском дне из морской воды. Филум *Chloroflexota* представлен классами *Dehalococcoidia* и *Anaerolineae*. Хотя представители *Dehalococcoidia* обычно рассматриваются как строго анаэробные бактерии, они также встречаются в аэробном сообществе. Семейство *Anaerolineaceae* включало изоляты, способные к аэробному росту (Nakahara et al., 2019), что согласуется с результатами исследований геномов *Chloroflexota*. У членов двух филогенетических кластеров были выявлены гены катаболического кислородного дыхания (Ward et al., 2018; Fincker et al., 2020). Филум *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*) в сообществе 1 был представлен семействам, члены которых участвуют в круговороте металлов в марганцевых конкрециях и марганцевых корках, такие как *Magnetospiraceae* (*Pseudomonadota*) (микроаэробные гетеротрофы) и *Kiloniellaceae* (*Pseudomonadota*) (хемогетеротрофные аэробы) (Wang et al., 2015). Другие сообщества, обнаруженные в кислых отложениях, в основном состоят из ASV, отнесенных к высшим таксонам, связанным с анаэробным метаболизмом. В какой степени эти микроорганизмы способны к аэробной деятельности, неизвестно. В дополнение филуму *Thaumarchaeota* (*Thermoproteota*), в окисленных осадках выявлены представители филума *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*) (клада SAR86, *Gammaproteobacteria*) и филума *Cyanobacteria* (*Cyanobacteriota*).

Микробные сообщества из аноксигенных осадков, в основном состояли из представителей *Atribacteria* (*Atribacterota*), *Chloroflexi* (*Chloroflexota*), *Planctomyces* (*Planctomycetota*). Основным компонентом в одном из сообществ выступали представители филума *Chloroflexi* (*Chloroflexota*). Однако почти все обнаруженные хлорофлекси были аффилированы с MSBL9 (*Planctomycetota*), порядком с малоизвестными свойствами. Описанный геном *Phycisphaerae* из MSBL9 показал, что бактерия, вероятно, утилизирует широкий сахаров (Robbins et al., 2016). Таким образом, на основе сетевого анализа Хошино Т. с соавторами (2020) показано, что состав микробных сообществ морских донных осадков определяется окислительно-восстановительными условиями осадков и донорами электронов, доступных в осадке. Результаты этого анализа также свидетельствуют о том, что микроорганизмы, находящиеся в глубинных осадках, взаимодействуют друг с другом, чтобы эффективно использовать ограниченные субстраты, доступные в экстремальной среде.

Изучение микробных сообществ подземных вод в Западной Сибири методами метагеномики показало, что они содержат эндогенные микробные сообщества, адаптированные к экстремальным условиям и длительное время изолированные от поверхностной биосферы (Кадников и др., 2017; Kadnikov et al., 2017; 2020). Западно-Сибирский регион, известный как один из крупнейших в мире нефтегазоносных районов, является также и одним из крупнейших резервуаров глубинных термальных вод, залегающих на глубинах до нескольких километров, сформированных в мезозойских осадочных породах. В скважинах с наиболее высокой температурой (около 70°C) преобладали представители бактериальных филумов *Firmicutes* (*Bacillota*), *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Acetothermia* (*Ca. Acetithermota*) и метаногенные археи рода *Methanothermobacter* (*Methanobacteriota*) (Кадников и др., 2017; Kadnikov et al., 2017; 2020). В составе сообщества были обнаружены две линии фирмикут, ближайшим культивируемым родственником которых является *Desulforudis audaxviator*, термофильная хемолитоавтотрофная бактерия, специфическая для подземной биосферы. Наиболее разнообразным по составу оказалось микробное сообщество скважины с температурой воды около 45°C. Археи в нем были представлены метаногенами всех типов – гидрогенотрофными (*Methanothermobacter*), ацетокластическими (*Methanosaeta*) и метилотрофными (*Methanofastidiosales* и *Methanomassiliicoccales*). Среди бактерий преобладали представители *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Chloroflexi* (*Chloroflexota*), *Deferribacteres* (*Deferribacterota*) и *Firmicutes* (*Bacillota*). Таким образом, обнаруженное сообщество включало микроорганизмы с различным типом метаболизма (метаногенез, сульфатредукция, анаэробное дыхание, ферментативный метаболизм), в том числе относящиеся к «некультивируемым» линиям (Кадников и др., 2017; Kadnikov et al., 2017; 2020).

## 1.2. Термофильные микроорганизмы в холодноводных экосистемах

Термофильные прокариоты – особая группа микроорганизмов, оптимальная температура роста которых составляет >50°C. Термофилы, как правило, ассоциированы с горячими источниками, почвами вулканических и рифтовых зон, глубинными горнодобывающими шахтами и т.д., а также разнообразными антропогенными биоценозами, где повышенная температура обусловлена естественными причинами (компост, угольные отвалы) или поддерживается искусственно (биореакторы, системы горячего водоснабжения и др.) (Лебединский и др., 2007). Вместе с тем, активные популяции анаэробных термофильных микроорганизмов обнаруживаются в глубоко погребенных аноксигенных донных отложениях, нефтяных резервуарах (Hu et al., 2016; Vigneron et al., 2017), проницаемой океанской коре (Robador et al., 2024) и вокруг гидротермальных источников на срединно-океанических хребтах (Topcuoglu et al., 2016; Chakraborty et al., 2018).

По оценкам, более трети морских отложений во всем мире имеют температуру выше 60°C, а четверть – выше 80°C, обусловленную влиянием подземных температурных градиентов (LaRowe et al., 2017). Геологические особенности строения морского дна, такие как углеводородные сипы и венты, связанные со срединно-океаническим хребтом и позволяющие перемещаться жидкости и газонасыщенным флюидам из теплой среды в холодную, физически соединяют подземные экосистемы с вышележащими океанами (Schrenk et al., 2010). Перенос клеток «редкой биосферы» из подповерхностных местообитаний в вышележащий океан может способствовать увеличению биоразнообразия морских микроорганизмов (Sogin et al., 2006; Lynch, Neufeld, 2015; Gonnella et al., 2016; Locey, Lennon, 2016; Hoshino et al., 2017). «Банк семян» морских прокариот в основном состоит из спящих микроорганизмов (Lennon, Jones, 2011), включая неактивные эндоспоры термофильных бактерий, т.е. термоспоры (Hubert et al., 2009; Müller et al., 2014; Volpi et al., 2017; Chakraborty et al., 2018).

Присутствие анаэробных термофильных бактерий в холодноводных морских осадках впервые было зафиксировано в отложениях из Орхусского залива, Дания (Bell et al., 2018). Из донных осадков, имеющих *in situ* температуру 0–15°C был выделен термофильный штамм *Desulfotomaculum*, обеспечивающий свой рост путем восстановления сульфата при нагревании образцов до 60°C (Isaksen et al., 1994). После этого открытия проведено значительное количество исследований, которые показали, что термофильные бактерии представляют собой экзогенный, малочисленный, дремлющий компонент микробных сообществ в холодных морских отложениях по всему миру (Hubert et al., 2009; 2010; de Rezende et al., 2013; Müller et al., 2014; Volpi et al., 2017).

Исследования микробного биоразнообразия, как правило, не обнаруживают бактериальных эндоспор, скорее всего, из-за их устойчивости к физическим или химическим стадиям лизиса, используемым при извлечении ДНК сообщества из образцов окружающей среды (Bueche et al., 2013; Wunderlin et al., 2016). Поэтому для изучения термоспор были использованы высокотемпературные, бескислородные инкубации, которые позволили выявить ежегодные темпы притока  $10^7$ – $10^8$  спор на квадратный метр в холодных донных отложениях Орхусского залива и Шпицбергена (Hubert et al., 2009, 2010; de Rezende et al., 2013). Эти «неуместные» термофилы, как правило, принадлежат к типу *Firmicutes* (*Bacillota*) и включают близких родственников анаэробных *Clostridia*, обитающих в горячих нефтяных резервуарах (Dahle et al., 2008; Gittel et al., 2009). Их оптимальная температура роста (выше 40°C) указывает на то, что они должны попадать в холодные отложения из внешних источников (Hubert et al., 2009). В то время как спорообразование обеспечивает выживание,

позволяющее сохраняться при температурах, значительно ниже диапазона их роста (Bell et al., 2018).

Крупномасштабное исследование биогеографии термоспор из 81 морских отложений показало неслучайную картину распределения во всем мире и определило циркуляцию океана как основной фактор, способствующий контролю над рассеиванием термоспор из их исходных мест обитания (Muller et al., 2014). Обнаружение одних и тех же филогенетических типов гена 16S рРНК, *dsrAB*, как в толще воды Орхусского залива, так и в донных осадках Шпицбергена (расположенных на расстоянии 3000 км друг от друга), свидетельствует, что морская вода действует как вектор для распространения термофильных эндоспор на большие расстояния в океане из общего источника (Hubert et al., 2010; de Rezende et al., 2013; Volpi et al., 2017). Этим общим источником могут быть нефтеносные подземные слои, характеризующиеся достаточной величиной и мощным потоком жидкости, обеспечивающим устойчивое поступление эндоспор (Hubert et al., 2010).

Выходы углеводородов на морское дно, когда газ и нефть из негерметичных подземных резервуаров вытесняются в поверхностные осадки, является примером активной системы геохимических потоков, связывающей глубокую и мелководную биосферы (Suess, 2010; Bell et al., 2018). Морские отложения в местах просачивания углеводородов и вокруг них, как правило, обогащены соединениями, связанными с нефтью, что обеспечивает множество органических субстратов для роста микробных сообществ по сравнению с другими олиготрофными глубоководными отложениями (Ruff et al., 2015). Что, в свою очередь, приводит к формированию локальных микробиомов, в значительной степени отличающихся от окружающих экосистем морского дна (Ruff et al., 2015).

Чтобы ответить на вопрос, как геофлюиды влияют на состав микробиома морского дна и переносят ли они глубоко подповерхностную жизнь в поверхностные морские осадки, Чакраборти А. с соавторами провел анализ 111 образцов донных осадков, отобранных в Восточной части Мексиканского залива, 71 из которых содержал нефть (Chakraborty et al., 2018). Бассейн Мексиканского залива хорошо известен естественными выходами нефти, осуществляемых из глубоко залегающих нефтяных и газовых коллекторов, с предполагаемой годовой скоростью сброса нефти более 30 000 м<sup>3</sup> (Bernard et al., 1976; MacDonald et al., 1996, 2004). Нагрев каждого образца осадка до 50°C с последующим секвенированием гена 16S рРНК показал, что, представители филума *Firmicutes* (*Bacillota*), были доминирующими почти во всех библиотеках (92% от общего числа последовательностей). Большинство ОТЕ были связаны с представителями отрядов *Clostridiales*, *Bacillales* и *Thermoanaerobiales*. Наиболее представленными семействами были *Peptococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae* и *Thermoanaerobacteraceae*. Космополитные ОТЕ были представлены родами

*Caloranaerobacter*, *Desulfotomaculum*, *Gelria*, *Moorella*, *Sulfobacillus*, *Symbiobacterium* и *Thermicanus*. Последующие исследования 172 проб донных осадков (в 132 точках отбора проб, где наблюдалось поступление нефтяных углеводородов, и в 11 точках отбора, где установлен непрерывный адвективный перенос термогенных алкановых газов), проведенные с использованием методов высокопроизводительного секвенирования показали, что в число 10 доминирующих филотипов бактерий входят: *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Chloroflexi* (*Chloroflexota*), *Acidobacteria* (*Acidobacteriota*), *Nitrospirae* (*Nitrospirota*), *Aminicenantes* (*Ca. Aminicenantota*), *Actinobacteria* (*Actinomycetota*), *Aerophobete* (*Ca. Aerophobota*), *Firmicutes* (*Bacillota*), *Atribacteria* (*Atribacterota*) и *Nitrospinae* (*Nitrospinota*). Доминирующими филотипами архей являлись *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota* (*Thermoproteota*), *Asgardaeota*, *Nanoarchaeota* (в н.в. *Nanobdellota*) и *Euryarchaeota* (*Halobacterota*) (Chakraborty et al., 2020).

Установлено, что присутствие мигрировавшей нефти существенно не влияло на состав микробного сообщества поверхностных отложений, в то время как донные осадки из 11 образцов, отобранных в районах, ассоциированных с непрерывным адвективным переносом термогенных алкановых газов, содержали особый микробиом. Доминирующее положение в них занимали представители филумов *Atribacteria* (*Atribacterota*) и *Aminicenantes* (*Ca. Aminicenantota*), а также рода *Sulfurovum* (филум *Campylobacterota*, ранее класс *Epsilonproteobacteria*) и порядка *Ca. Thermoprofundales* (ранее Marine Benthic Group D) (Zhou et al., 2019; Assie et al., 2020; Chakraborty et al., 2020).

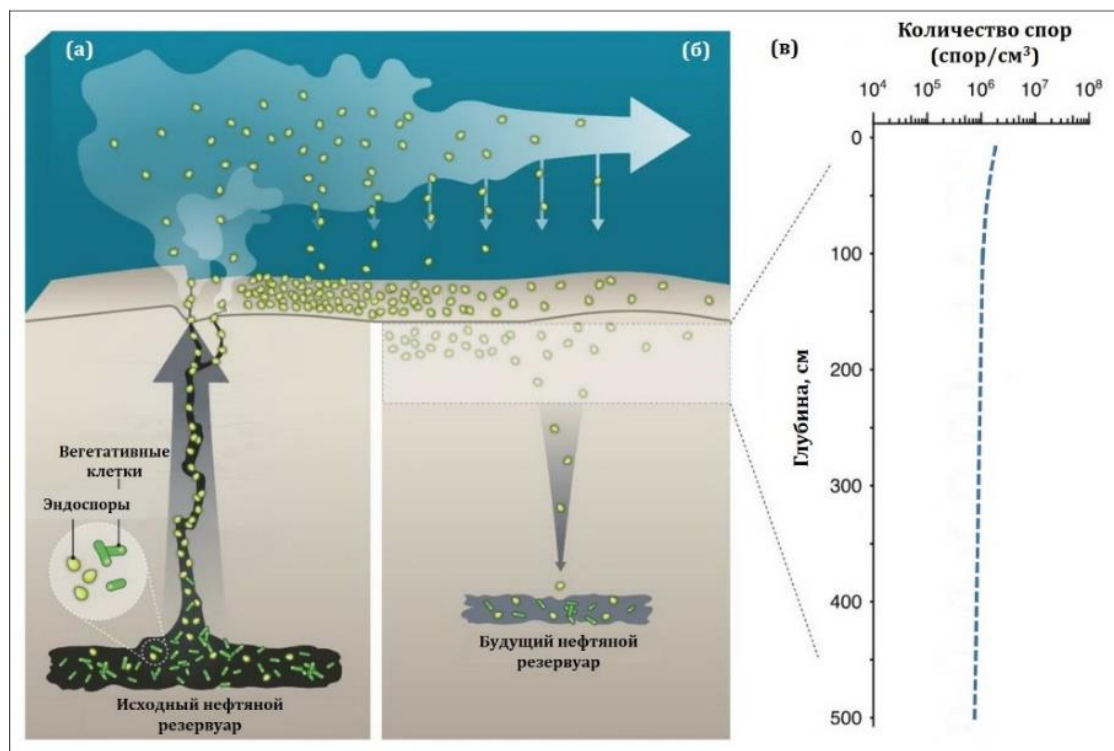
Аннотация геномов из метагеномных массивов данных, полученных из трех образцов донных осадков, включая газонасыщенный образец, позволила реконструировать метагеномы *Atribacteria* (*Atribacterota*), *Aminicenantes* (*Ca. Aminicenantota*), *Sulfurovum* и *Ca. Thermoprofundales*. Респираторные гены, включая цитохром с-оксидазу, периплазматическую нитратредуктазу, гены окисления серы и сульфид-хинонредуктазы были обнаружены только в геноме *Sulfurovum*. Геном *Sulfurovum* также содержал гены, кодирующие полный восстановительный цикл трикарбоновых кислот (rTCA) для автотрофной фиксации углерода, что говорит о дыхательном литоавтотрофном образе жизни с использованием неорганических соединений серы. В отличие от *Sulfurovum*, основным метаболическим путем у *Atribacteria* (*Atribacterota*), *Aminicenantes* (*Ca. Aminicenantota*) и *Ca. Thermoprofundales* является ферментативное окисление органического вещества. Геном *Aminicenantes* (*Ca. Aminicenantota*) содержал гены пути Вуда-Люнгдала, что может свидетельствовать о потенциальной способности к ацетогенезу. В геномах *Atribacteria* (*Atribacterota*), *Aminicenantes* (*Ca. Aminicenantota*) и *Ca. Thermoprofundales* выявлены гены, кодирующие внеклеточные пептидазы, вовлеченные в деградацию детритного белка, а также гены метаболизма водорода. В частности, гены, кодирующие предполагаемую цитозольную группу

3 [NiFe]-гидрогеназы. Эти ферменты связывают перекисное окисление NAD(P)H с ферментативным образованием водорода (Orcutt et al., 2010). В геномах *Atribacteria* (*Atribacterota*) также обнаружены гены, кодирующие группы 1 и 4 [NiFe]-гидрогеназы, отвечающие за ферментативное образование водорода и свидетельствующие о том, что эти бактерии являются анаэробными гетеротрофами (Pop Ristova et al., 2015). Таким образом, обнаруженные в реконструированных геномах гены ацетогенеза, образования водорода и деградации пептидов указывают на ферментативный образ жизни, обнаруженный у микроорганизмов, обитающих в глубоких донных отложениях.

Проведенные исследования также показали, что сульфатредукторы, образующие эндоспоры, активируются при нагревании до 50–70°C и теряют жизнеспособность при температуре  $\geq 80^\circ\text{C}$ . Это температурное ограничение также было установлено для биodeградации углеводов в осадочных средах, так как биodeградация нефти не происходила в пластах-коллекторах, которые были погребены на глубине с температурой более 80°C (Wilhelms et al., 2001; Head et al., 2003). Однако, в работе В.Б. Хойер с соавторами показано (результаты исследования изложены в разделе 1.3), что жизнь в глубоко погребенных морских отложениях не ограничена 80°C и обнаруживается в осадках, нагретых по меньшей мере до 120°C (Heuer et al., 2020). После нагревания осадков до экстремально высокой температуры (80–99°C) в образцах были обнаружены дипиколиновая кислота и органические кислоты, что свидетельствует о прорастании спор и деградации органических веществ. Аннотация геномов показала, что геномы представителей порядка *Symbiobacteriales*, *Thermosediminibacteriales*, *Moorellales* и *Calditerricolales* кодируют многочисленные механизмы высокотемпературной деградации осадочного органического углерода и особенно некромассы, накапливающейся при захоронении осадка, включая сахараиды, аминокислоты и нуклеиновые кислоты (Bell et al., 2022a). Таким образом, чрезвычайно термофильные *Firmicutes* (*Bacillota*), рассеянные в океане, способны прорасти в ответ на нагревание осадка во время захоронения и преобразовывать широкий спектр органических субстратов, тем самым принимая участие в углеродном цикле (Bell et al., 2022a).

Как показано в работе Гиттинс Д.А. с соавторами, эндоспорообразующие микробные популяции, обитающие в глубоких нефтяных системах, распространяются вверх в виде спящих спор в результате разгрузки углеводов по геологическим каналам (рис. 6а) (Gittins et al., 2022). Затем эндоспоры, попадающие в водную толщу, рассеиваются латерально придонными водными течениями, оседают на морское дно и подвергаются захоронению (рис. 6б). Захоронение эндоспор выявлено путем трехкратного измерения концентрации дипиколиновой кислоты в верхних нескольких метрах морского дна в двух кернах отложений Шотландского шельфа, где углеводороды не были обнаружены. Пунктирная линия регрессии

отражает среднюю глобальную оценку эндоспор в биосфере морского дна (рис. 6в) (Wörmger et al., 2019; Gittins et al., 2022).



**Рисунок 6.** Подповерхностный цикл рассеивания микроорганизмов, опосредованный просачиванием, осаждением, дремлющим состоянием и экологическим отбором. Цитировано по Gittins et al., 2022.

Выживание некоторой доли эндоспор в течение длительного времени (de Rezende et al., 2013; Fang, et al., 2017) позволяет осуществлять экологический отбор (т.е. прорастание и активность) на подходящих субстратах в благоприятных тепловых условиях, которые устанавливаются в отложениях, куда мигрирует нефть для создания резервуара (Magoon, Dow, 1994). Последовательность, показанная на рисунках 6 а и б, завершает «подповерхностную микробную петлю», которая включает в себя распространение клеток и биогеохимический круговорот в глубинной биосфере Земли. Таким образом, завершается геологическая микробная петля жизнеспособных клеток, циркулирующих из глубинной биосферы и обратно в нее (Gittins et al., 2022). Полученные результаты демонстрируют, что геологические процессы разгрузки углеводородов и осаждения геофлюидов связывают глубинные нефтяные системы с океаном и опосредуют повторяющийся и пространственно обширный цикл распространения микроорганизмов по недрам. Циркуляция живой биомассы уникальным образом характеризуется определенными эпизодами микробной активности в нефтеносных отложениях, чередующимися с длительными интервалами пассивного расселения – экологическая последовательность, которую трудно четко определить в других условиях окружающей среды (Gittins et al., 2022).



### **1.3. Роль микроорганизмов в процессах образования и окисления углеводов**

Углеводороды представляют собой разнообразные соединения, состоящие из атомов углерода и водорода, различающихся по размеру, строению и реакционной способности. По сложности молекулы углеводороды варьируют от простейшей формы метана до множества различных компонентов нефти. Они могут быть продуктом геологических процессов, а также биогенно продуцироваться организмами во всех сферах жизни (Khot et al., 2022).

#### **1.3.1. Окисление углеводов**

Разложение молекул углеводородов является кинетически сложной задачей из-за химической инертности органической связи C–H и стабильности ароматических кольцевых структур (Rabus et al., 2001, 2016a, б). Метан, алканы и полициклические ароматические соединения могут использоваться микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии. Окисление углеводов происходит в аэробных и анаэробных условиях (рис. 7).

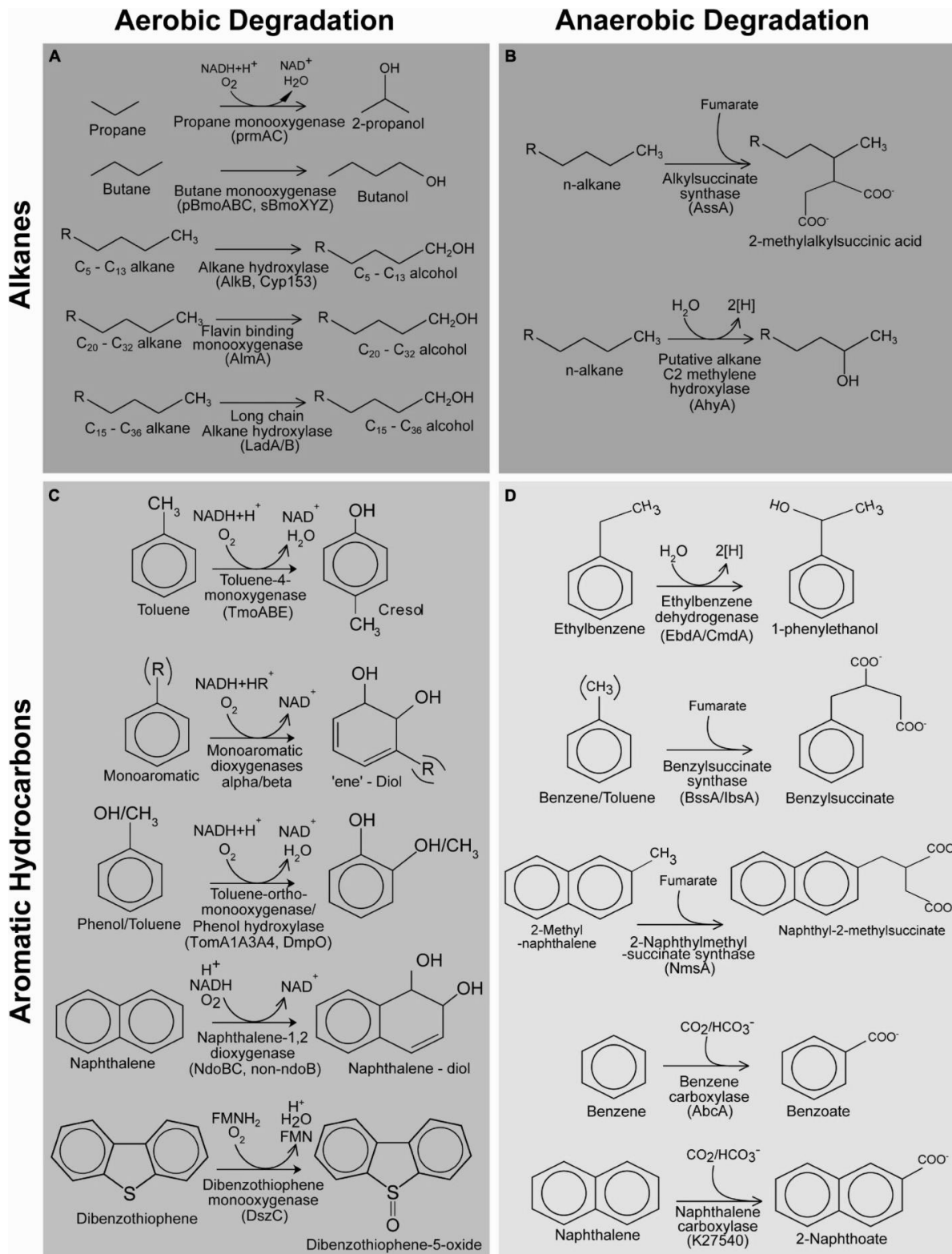
Способность многих бактерий или грибов полностью разлагать алифатические или ароматические углеводороды до CO<sub>2</sub> была признана в 1940-х годах, а вовлеченные ферментативные реакции широко изучались в течение нескольких десятилетий. В кислородных условиях микроорганизмы активируют алканы, используя метановые или алкановые монооксигеназы, в результате действия которых образуется метанол или другие спирты в качестве первичных промежуточных продуктов (Heider et al., 2007; Wang et al., 2017).

Эти ферменты обычно связывают и активируют молекулы O<sub>2</sub> с образованием высокорекционноспособных оксо- или диоксо-комплексов, связанных с металлами, что позволяет отщеплять атомы водорода от высокоинертных C–H-связей углеводов, что приводит к гидроксированию боковых цепей алифатических алканов или колец ароматических соединений через радикальные механизмы (Harayama et al., 1992; McLeod, Eltis, 2008; Fuchs et al., 2011).

Для алкилированных ароматических углеводов типичными продуктами начальных реакций являются спирты с концевыми или субконцевыми гидроксильными группами в их боковых цепях или фенольные соединения с одной или двумя гидроксильными группами в их ароматических кольцах (Boll et al., 2020). Монооксигеназы являются ключевыми ферментами, присутствующими во многих бактериальных фило типах, в чистую культуру получены представители почти 30 родов, которые окисляют метан и алканы (Каллистова и др., 2017; Dedysh, Knief, 2018).

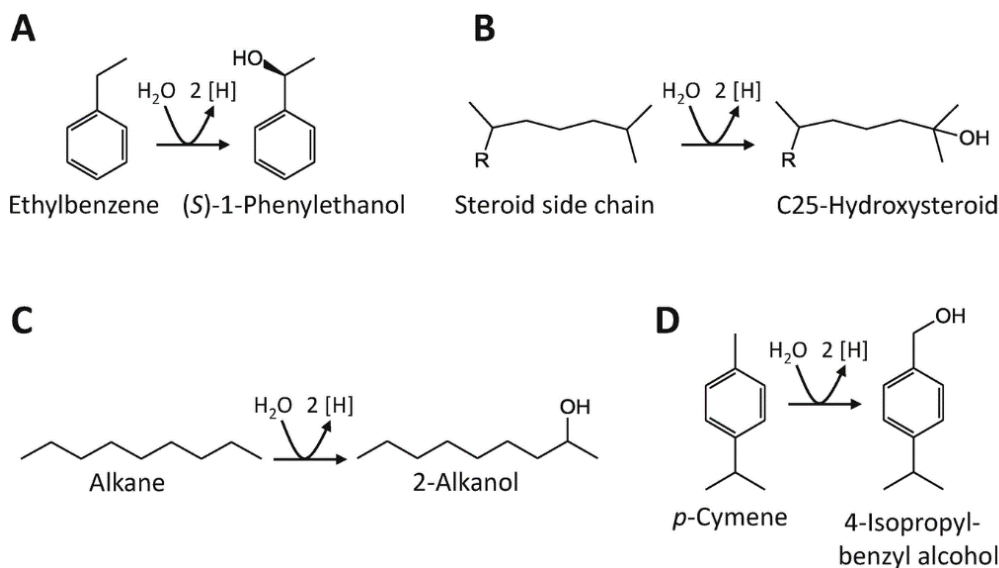
Анаэробные пути биодegradации углеводов более разнообразны, чем аэробный катаболизм углеводов (Abbasian et al., 2015) и могут быть разделены на пять групп: (1) кислороднезависимое гидроксирование на втором или третьем конце углеродных атомов (для получения вторичного или третичного спирта) (Kniemeyer, Heider, 2001), (2)

присоединение фумарата к метиленовой или метильной группе углеводородов (Selesi et al., 2009), (3) карбоксилирование незамещенного атома углерода (Meckenstock, Mouttaki, 2011), (4) гидратация двойной и тройной связи алкенов и алкинов (Tenbrink et al., 2011) и (5) обратный метаногенез (Thauer, 2011; Boll et al., 2020).



**Рисунок 7.** Реакции окисления алканов и ароматических углеводородов в а); в) аэробных и б); г) анаэробных условиях. Цитировано по Khot et al., 2020.

(1) Анаэробное гидроксирование. Первый случай кислород-независимого гидроксирования углеводорода наблюдался при анаэробной деградации этилбензола и пропилбензола денитрифицирующими бактериями. Реакция катализируется этилбензолдегидрогеназой (EBDH, EC 1.17.99.2), растворимым периплазматическим молибденовым ферментом, стереоспецифически гидрокслирующим этилбензол водой до (S)-1-фенилэтанола и двух электронных эквивалентов (рис. 8) (Kniemeyer, Heider, 2001).



**Рисунок 8.** Реакции гидроксирования углеводородов, катализируемые EBDH-подобными ферментами. (A) Гидроксирование этилбензола с помощью EBDH. (B) Гидроксирование боковых цепей стероидов холестерин-С<sub>25</sub>-гидроксилазой. (C) Предполагаемое гидроксирование алканов до изоалкоголей. (D) Гидроксирование п-цимола. Цитировано по Boll, Estelmann, Heider, 2020.

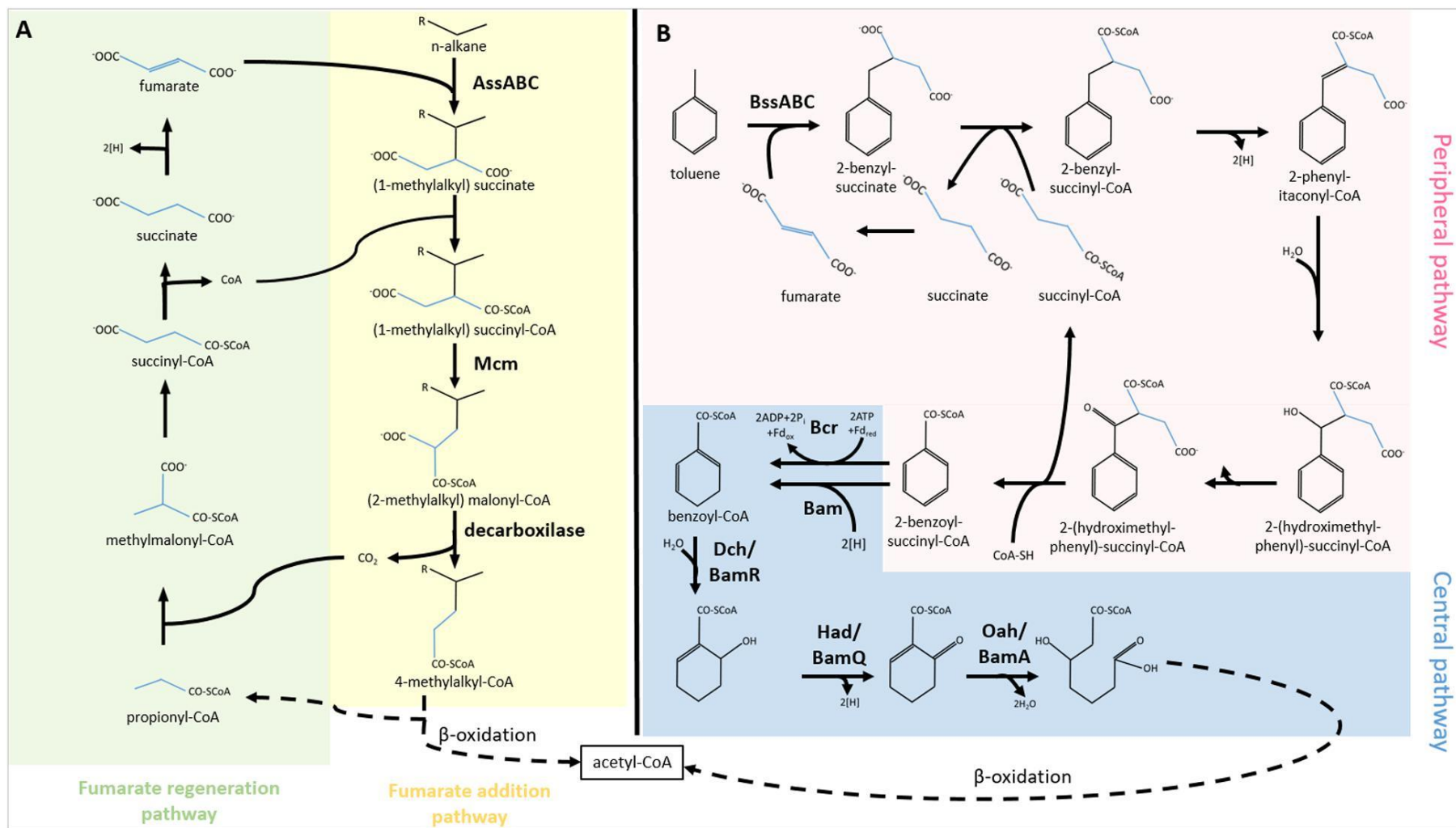
Помимо этилбензола, EBDH, гидроксировывает более 30 субстратов с исключительной стереоспецифичностью (Szalaniec et al., 2007; Knack et al., 2012). Однако фермент, по-видимому, ограничен субстратами с боковыми цепями из двух или более атомов С, поскольку все испытанные аналоги с боковыми метильными цепями действуют как ингибиторы (Knack et al., 2012). Аналогичные реакции были обнаружены при анаэробной деградации ароматического терпеноидного углеводорода п-цимола, который подвергается атаке по метильной группе с образованием 4-изопропилбензилового спирта в одном из двух известных денитрифицирующих деструкторов – *Aromatoleum aromaticum* (Strijkstra et al., 2014; Rabus et al., 2016 в), а также при анаэробном метаболизме холестерина, осуществляемой денитрифицирующей бактерией *Sterolibacterium denitrificans*. Более того, EBDH-подобный фермент может участвовать в альтернативном пути анаэробной деградации алканов сульфатредуцирующей бактерией *Desulfococcus oleovorans*, которая не использует более распространенную реакцию активации алканов посредством добавления фумарата, а скорее гидроксировывает алканы в субконцевой метиленовой группе до изо-спиртов (Heider, Schühle,

2013; Heider et al., 2016a). Известно также, что кислороднезависимые реакции гидроксилирования алкильных заместителей инициируют пути разложения углеводородоподобных фенольных соединений, таких как *p*-крезол (*p*-метилфенол) или *p*-этилфенол, до соответствующих спиртов или альдегидов (Peters et al., 2007; Wöhlbrand et al., 2008).

(2) Присоединение фумарата к метиленовой или метильной группе углеводов. Открытие бензилсукцината как экскретируемого метаболита в культурах, разлагающих толуол, а затем как фактического исходного промежуточного продукта анаэробной деградации толуола, привело к идентификации новой биохимической реакции, а именно присоединения не активированных алкильных цепей к двойной связи косубстрата фумарата (Beller et al., 1992; Evans et al., 1992; Biegert et al., 1996). Фумарат – распространенный клеточный метаболит, содержащий две карбоксильные группы и двойную связь. Ферменты, катализирующие эту реакцию – фумарат-аддитивные ферменты (FAE) – образуют подветвь в составе глицил-радикальных ферментов (GRE), которые также включают пируват-формат-лиазу или анаэробные рибонуклеотид-редуктазы. FAE участвуют в анаэробной активации связи C-H для многих субстратов, включая толуол, ксилолы, этилбензол, крезолы, метилнафталин, циклогексан и *n*-алканы, достигающие длины цепи от пропана до > 16 атомов углерода.

При анаэробной активации алканов, фумарат соединяется с алкановой цепью у второго атома углерода, образуя (1-метилалкил)-сукцинат (рис. 9а) (Laczi et al., 2020). Продукт присоединяется к ацетил-коферменту А и превращается в (2-метилалкил)-малонил-КоА посредством перегруппировки углеродного скелета. Затем образуется 4-метилалкил-КоА, который используется в β-окислении. В первых двух циклах β-окисления от молекулы отщепляются ацетат и пропионат. Пропионат перерабатывается в метилмалонил-КоА-пути с образованием фумарата, который может быть повторно использован в синтезе (1-метилэтил)-сукцината (Davidova et al., 2005).

Ключевым ферментом реакции присоединения фумарата является глицил-радикальный фермент, названный алкилсукцинатсинтазой или (метилэтил)-сукциназой (Ass/Mas). Фермент состоит из трех различных субъединиц (AssABC). Гены Mas были впервые описаны в денитрифицирующем штамме *Aromatoleum* sp. HxN1 (Grundmann et al., 2008). Два гена (*assA1* и *assA2*), кодирующие каталитическую субъединицу Ass обнаружены в различных локусах генома *D. alkenivorans* AK-01 (Callaghan et al., 2008). Метагеномный анализ показал, что *Smithella* sp. и *Anaerolinea* sp. также содержит гены *ass* (Tan et al., 2014; Rossmassler et al., 2019).



**Рисунок 9.** Активация (А) алканов и (В) ароматических соединений путем добавления fumarate и их биоразложение в анаэробных условиях. AssABC, алкилсукцинатсинтаза; Mcm, метилмалонил-КоА-мутаза; BssABC, бензилсукцинатсинтаза; Bcr/Bam, бензоил-КоА-редуктаза; Dch/BamR, диеноил-КоА-гидратаза; Had/BamQ, гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа; Oah/BamA, оксоацил-КоА-гидролаза; Fdox, окисленный ферредоксин; Fdred, восстановленный ферредоксин. Цитировано по Laczi et al., 2020.

Гены, кодирующие алкил-/бензилсукцинатсинтазу, ответственную за присоединение фумарата к алканам и ПАУ и их активацию в анаэробных условиях, выявлены в аннотированных геномах *Ca. Hermodarchaeota* (в н.в. р\_ *Asgardarchaeota*; с\_ *Hermodarchaeia*), (Farag et al., 2020; Zhang et al., 2021). Филум *Ca. Asgardarchaeota* объединяет класс *Ca. Hermodarchaeia* и *Ca. Lokiarchaeia* (Rinke et al., 2021). Археи обладают так называемыми эукариотическими сигнатурными белками (ESP), которые у эукариот участвуют в процессах перемещения через мембраны везикул, формировании и ремоделировании цитоскелета, комплексах эндосомной сортировки. Поэтому они считаются ближайшими родственниками эукариот (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Исследования разнообразия показали, что археи *Asgardarchaeota* широко распространены в различных бескислородных средах, включая отложения мангровых зарослей, эстуарные отложения, пресноводные отложения, гидротермальные местообитания, морские отложения, холодные сипы, горячие источники, грязевые вулканы и почвы (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017; Seitz et al., 2016; 2019; Cai et al., 2020b).

На основании аннотированных геномов предполагается, что археи в первую очередь являются органогетеротрофами, но некоторые из них, такие как *Ca. Lokiarchaeia*, также могут быть миксотрофами, осуществляющие фиксацию углерода посредством пути Вуда-Льонгдаля (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017; Cai et al., 2020a, б). Чтобы изучить распределение генов *ass/bss*, активирующих ферменты *ass/bss* (*ass/bss* АЕ) и *bcr* у *Ca. Asgardarchaeota*, проанализированы 118 геномов. Статистический анализ MAG *Ca. Asgardarchaeota*, показал, что контиги, содержащие гены *ass/bss*, *ass/bss* АЕ, *bcr* и пути Вуда-Льонгдаля, попадают в 95-й перцентиль типичного генома, подтверждая, что эти гены действительно принадлежат соответствующим геномам.

Анализ метаболизма у представителей класса *Ca. Hermodarchaeia* (*Ca. Asgardarchaeota*) показал отсутствие генов, кодирующих метил-кофермент М-редуктазу (*mcr*) и Na<sup>+</sup>-транспортирующий метилтрансферазный комплекс (Mtr) (Zhang et al., 2021). Следовательно, *Ca. Hermodarchaeia* неспособны осуществлять гидрогенотрофный метаногенез. Вместе с тем, в геномах идентифицировано пять гомологов алкилсукцинатсинтазы (*ass*) или бензилсукцинатсинтазы (*bss*). Авторами показано, что *ass/bss*, кодируемые *Ca. Hermodarchaeia*, не монофилетичны, а смешаны с бактериальными последовательностями, указывая на то, что последовательности *ass/bss*, вероятно, были получены путем горизонтального переноса генов от бактерий (Zhang et al., 2021). Геномы *Ca. Hermodarchaeia* содержали почти все гены, обнаруженные в пути бензоил-КоА (*bcr*). В совокупности данные свидетельствуют о том, что *Ca. Hermodarchaeia* могут быть способны использовать различные

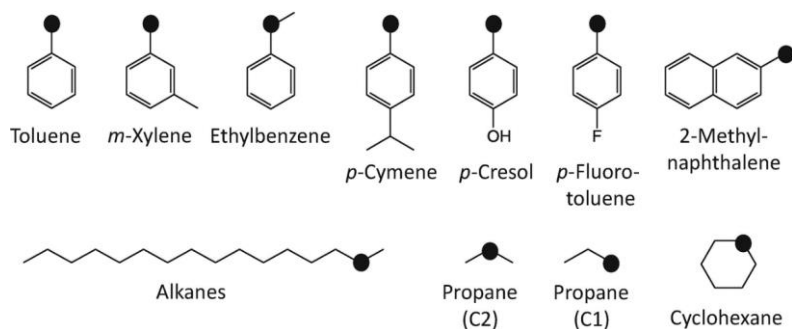
ароматические углеводороды или алканы в качестве источников углерода и энергии (Zhang et al., 2021).

При анаэробной активации толуола, активацию связи С-Н присоединением к фумарату осуществляет бензилсукцинатсинтаза (*bss*) (рис. 9б). Изоферменты *bss* первоначально были выделены и охарактеризованы из денитрифицирующих бактерий *Thauera aromatica* (Leuthner et al., 1998) и р. *Azoarcus* (в н.в. *Aromatoleum*) (Beller, Spormann, 1999). *Bss* катализирует первый этап анаэробного катаболизма толуола, стереоспецифическое присоединение толуола к фумарату с образованием (R)-бензилсукцината (Biegert et al., 1996; Beller, Spormann, 1998; Leutwein, Heider, 1999) (рис 9б). *Bss* состоит из трех субъединиц в виде ( $\alpha\beta\gamma$ ) 2-гетерогексамера: большая  $\alpha$ -субъединица несет глицил-радикал и активный центр, а обе меньшие субъединицы несут необычные кластеры FeS, которые структурно напоминают кластеры из белков железа с высоким потенциалом (НІРІР), но при этом демонстрируют чрезвычайно низкие окислительно-восстановительные потенциалы (Hilberg et al., 2012; Funk et al., 2015). Маленькие субъединицы расположены за пределами комплекса, и их роль в активности *bss* не ясна (Funk et al., 2015).

Далее бензилсукцинат окисляется до бензоил-КоА, который считается первичным ароматическим промежуточным продуктом в анаэробном окислении большого количества ароматических углеводородов (Harwood et al., 1998). В аэробных процессах фенольные гидроксильные группы вводятся оксигеназами для активации ароматического кольца перед его оксидолитическим расщеплением. При анаэробном катаболизме фенольные гидроксильные группы часто удаляются путем восстановления, а ароматическое кольцо также восстанавливается, что приводит к образованию алициклических соединений.

Ключевым этапом анаэробной деградации бензоил-КоА является деароматизация бензольного кольца с помощью бензоил-КоА-редуктазы I класса (*bcr*). АТФ-зависимый путь начинается с реакции восстановления (Boll, Fuchs, 1995). Четыре субъединицы гетеротетрамерного фермента кодируются генами *bcrABCD*, которые организованы в оперон. Фермент расщепляет АТФ на АДФ + Рі в процессе восстановления и принимает ферредоксин в качестве донора электронов. Наличие АТФ-зависимой бензоил-КоА-редуктазы продемонстрировано у гипертермофильного архея *Ferroglobus placidus* (Schmid et al., 2016). Помимо центральной реакции деароматизации, была показана роль *bcr* в дегалогенизации хлорированных, фторированных и бромированных ароматических соединений (Tiedt et al., 2016). АТФ-независимый путь катализируется бензоил-КоА-редуктазой II класса (*bam*). Этот класс ферментов встречается у строго анаэробных бактерий, в том числе у железовосстанавливающих *Geobacter metallireducens* и сульфатредуцирующих бактерий (Wischgoll et al., 2006; Kim et al., 2014; Dong et al., 2016). Фермент состоит из восьми

субъединиц, которые кодируются генами *bamBCDEFGHI* в одном опероне с *bamA*. *Bam* является гидролазой и катализирует окончательное расщепление кольца по АТФ-независимому пути (Loffler et al., 2011). В дополнение к изоферментам *bss* с первичной специфичностью по отношению к толуолу описан ряд более дивергентных FAE с различной субстратной специфичностью (Heider et al., 2016b) (рис. 10). Среди них – активирующий п-цимен фермент, добавляющий фумарат к метильной группе этого субстрата для образования 4-изопропилбензилсукцината (Strijkstra et al., 2014).



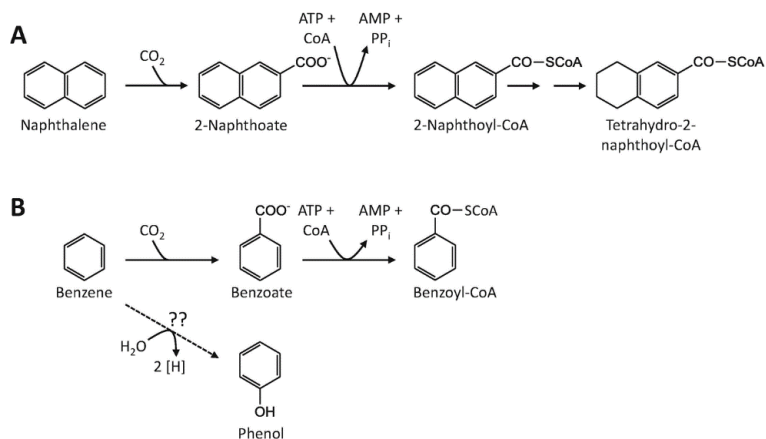
**Рисунок 10.** Известные субстраты, подвергающиеся воздействию фумарат-аддитивных ферментов (FAE). Точкой показан атом углерода, к которому происходит добавление фумарата. Цитировано по Boll, Estelmann, Heider, 2020.

(3) Карбоксилирование незамещенного атома углерода. Первоначальные реакции, участвующие в анаэробной деградации бензола и нафталина, было довольно трудно определить из-за отсутствия хорошо растущих модельных организмов и их медленной скорости роста. Большинство современных знаний было получено с помощью сульфатредуцирующих бактерий (Meckenstock et al., 2016). С использованием меченного  $^{13}/^{14}\text{C}$ -бикарбоната установлено, что прямое карбоксилирование нафталина до 2-нафтойной кислоты является начальной реакцией (рис. 11) (Zhang, Young 1997; Zhang et al., 2000).

Анаэробное разложение бензола было продемонстрировано в накопительных культурах, восстанавливающих сульфат, Fe(III) и нитрат, и даже в метаногенных консорциумах (Ulrich et al., 2005; Kunapuli et al., 2008; Musat, Widdel, 2008; Abu Laban et al., 2009; Luo et al., 2015; Sakai et al., 2019). Энергия диссоциации связи C-H бензола выше, чем у метана, что подразумевает участие еще неизвестной ферментативной реакции. Предлагаемые в настоящее время механизмы представляют собой карбоксилирование до бензоата или гидроксильное до фенола (Meckenstock, Mouttaki, 2011). Субъединицы предполагаемой бензолкарбоксилазы, участвующие в деградации бензола, были идентифицированы протеомным анализом субстрат-индуцированных белков и обнаруживают сходство с несколькими субъединицами нафталинкарбоксилазы (Abu Laban et al., 2010). Обе предполагаемые карбоксилазы для бензола и нафталина, по-видимому, принадлежат к классу ферментов UbiD, который также включает декарбоксилазы, участвующие в биосинтезе убихинона, и



фенилфосфаткарбоксилазу, которая инициирует анаэробный метаболизм фенола и карбоксилирует его субстрат до 4-гидроксибензоата (Schuhle, 2004). В отличие от фенола, бензол и нафталин не могут быть активированы АТФ-зависимым фосфорилированием, которое необходимо для карбоксилирования фенола. Таким образом, если карбоксилирование действительно представляет собой первую стадию разложения бензола или нафталина, предполагаемые карбоксилазы должны действовать по-другому, пока неизвестному механизму.

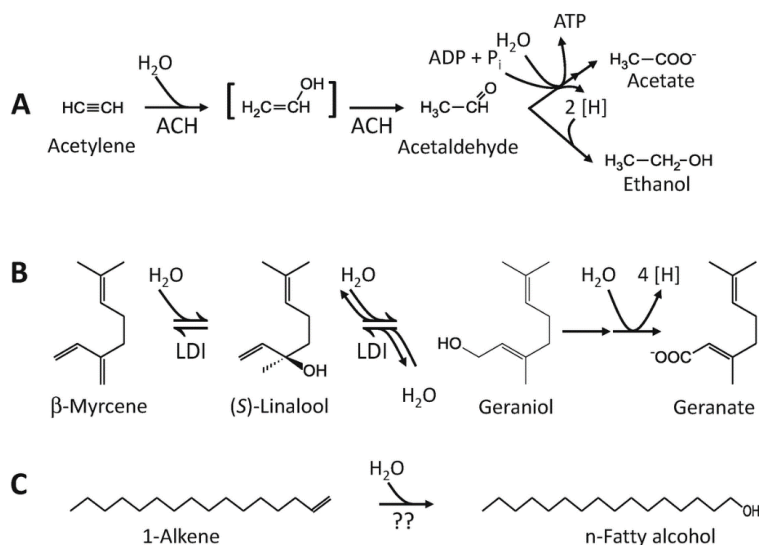


**Рисунок 11.** Пути разложения нафталина (А) и бензола (В). После начального карбоксилирования образовавшиеся органические кислоты активируются КоА и подвергаются восстановлению кольца. Потенциальный альтернативный путь может включать гидроксирование бензола до фенола у некоторых организмов. Цитировано по Boll, Estelmann, Heider, 2020.

Альтернативной реакцией инициации анаэробного метаболизма бензола может быть гидроксирование до фенола, как сообщалось в некоторых случаях (Caldwell, Suflita, 2000; Kunaruli et al., 2008; Zhang et al., 2012, 2013). Возможный альтернативный путь разложения бензола, основанный на гидроксировании, все еще остается весьма спорным, особенно с учетом того, что было показано, что бензол может легко гидроксироваться химическими побочными реакциями гидроксильных радикалов, которые могут случайно образоваться во время работы с образцами (Kunaruli et al., 2008). Сообщалось также о реакциях анаэробного карбоксилирования как начальных этапах разложения некоторых других углеводородов, таких как бифенил, фенантрен или даже алканы, но такие результаты следует интерпретировать осторожно, поскольку включение меченого диоксида углерода в промежуточные соединения не обязательно доказывает предполагаемую прямую реакцию карбоксилирования углеводородных субстратов (Zhang, Young, 1997; So et al., 2003; Callaghan et al., 2006; Selesi, Meckenstock, 2009).

(4) Гидратация двойной и тройной связи алкенов и алкинов. Ненасыщенные углеводороды, такие как алкены и алкины, демонстрируют еще более высокую энергию диссоциации связи С-Н, чем насыщенные соединения. Следовательно, их биологическая

деградация в основном инициируется по множественной связи. Тем не менее, аэробное разложение алкена требует молекулярного кислорода в качестве косубстрата для монооксигеназ, например, для превращения алкена в промежуточный эпоксид. И наоборот, микробное разложение этих соединений в анаэробных условиях инициируется ферментативным добавлением воды по кратной связи. В настоящее время известно, по крайней мере, два совершенно разных типа ферментов, которые катализируют добавление воды к ненасыщенным углеводородам и инициируют их анаэробное разложение: 1) ацетиленгидратаза, содержащая вольфрам (Boll et al., 2016) и 2) лишенная кофакторов линалоолдегидратаза/изомераза (Brodkorb et al., 2010). Ацетиленгидратаза (ACH) первоначально была обнаружена у анаэробного микроорганизма *Pelobactor acetylenicus*, который катализирует окислительно-восстановительную гидратацию ацетилена с образованием ацетальдегида (Schink, 1985). Фермент принадлежит к семейству молибденовых ферментов диметилсульфоксидредуктазы, но содержит вольфрам в форме кофактора, а не молибден (Boll et al., 2016). Первоначально образующийся продукт представляет собой виниловый спирт, который самопроизвольно таутомеризуется с образованием ацетальдегида (рис. 12a).



**Рисунок 12.** Реакции присоединения воды к непредельным углеводородам. (A) Превращение ацетилена в ацетальдегид, катализируемое АСН, с последующим диспропорционированием до ацетата и этанола; (B) Разложение терпеноидного углеводорода  $\beta$ -мирцена путем гидратации до линалоола и изомеризации до гераниола с помощью LDI с последующим окислением до гераниевой кислоты; (C) Добавление воды в качестве начальной реакции гидратации длинноцепочечного алкена. Цитировано по Boll, Estelmann, Heider, 2020.

После того, как ацетилен преобразуется в ацетальдегид с помощью АСН, организмы диспропорционируют альдегид в ацетат (через ацетил-СоА) и этанол, чтобы подпитывать свой энергетический метаболизм, что приводит к почти равным концентрациям ацетата и этанола в качестве продуктов ферментации. Сохранение энергии возможно за счет фосфорилирования

на уровне субстрата ацетил-КоА, которое генерируется КоА-ацилирующей альдегиддегидрогеназой (Schink, 1985). Фермент, участвующий в анаэробной деградации алкенового углеводородного субстрата, охарактеризован из разлагающих терпеноиды денитрифицирующих бактерий *Castellaniella defragrans* и *Thauera linaloolentis* (Brodkorb et al., 2010; Luddeke et al., 2012; Marmulla et al., 2016a, б).

Фермент *C. defragrans* расположен в периплазме и был классифицирован как линалоолдегидратаза/изомераза (LDI, рис. 12b). Было показано, что он катализирует стереоспецифическую обратимую гидратацию ациклического терпеноидного алкена  $\beta$ -мирцена до терпеноидного спирта (S)-линалоола (Brodkorb et al., 2010; Lüddeke, Harder, 2011), а также реакцию обмена гидроксильных групп линалоол и гераниол (Brodkorb et al., 2010). Дальнейшее разложение включает двухстадийное окисление гераниола до гераниевой кислоты, которая, по-видимому, разлагается модифицированным путем бета-окисления (Luddeke, Harder, 2011; Petasch et al., 2014).

Длинноцепочечные алкены, такие как 1-гексадецен, разлагаются многими видами сульфатредуцирующих бактерий. Эти организмы обычно также разлагают длинноцепочечные алканы, но совершенно другими путями. Разложение 1-алкенов, по-видимому, инициируется добавлением воды к атому  $C_1$  с образованием соответствующего жирного спирта (рис. 12c), который затем дополнительно окисляется до жирной кислоты и разлагается посредством бета-окисления или включается в клеточный липидный пул (Aeckersberg et al., 1998; So et al., 2003; Callaghan et al., 2006).

(5) Обратный метаногенез. Как было указано выше, процесс анаэробного окисления метана, в основном, осуществляется различными кладами анаэробных метанотрофных архей (ANME-1, 2, 3), которые относятся к метаногенным порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* и к классу *Methanomicrobia* (*Halobacterota*) (Knittel, Boetius, 2009; Laso-Perez et al., 2019). ANME используют обратный путь метаногенеза для окисления метана. Ключевым ферментом обратного пути метаногенеза является метил-кофермент М-редуктаза (*mcr*) или алкил-кофермент М-редуктаза (*acr*), который активирует метан или другие алканы в виде метил-КоМ или алкил-КоМ соответственно (Thauer, 2019). Различные группы ANME связаны друг с другом филогенетическим сходством на уровне 75–92% (на основе последовательностей 16S рНК (Knittel, Boetius, 2009) и обитают в широком диапазоне бескислородных сред, которые заметно отличаются по своим биогеохимическим условиям. ANME преобладают в бескислородных морских средах, таких как зоны перехода от сульфатов к метану (SMTZ), холодных и горячих источниках, глубинной биосфере, а также, хотя и редко, обнаруживались в почвах, водоносных горизонтах и пресноводных отложениях (Knittel, Boetius, 2009).

В пресноводных экосистемах АОМ осуществляют археи семейства *Methanoperedenaceae* (ранее ANME-2d) (Raghoebarsing et al., 2006; Haroon et al., 2013). В качестве терминального акцептора электронов используют нитрат. Они не нуждаются в бактериальном партнере (в отличие от сульфат-зависимого АОМ) и транспортируют электроны непосредственно на мембрансвязанную нитратредуктазу (*nar*). Образующийся в этом процессе нитрит может восстанавливаться до газообразного азота в результате синтрофного взаимодействия с анаэробными бактериями, если в среде присутствует аммоний, или использоваться анаэробными метанотрофами филума *Methylomirabilota* (ранее NC10) (Ettwig et al., 2010). Представители *Methylomirabilis* и *Ca. Methanoperedens* широко распространены в различных пресноводных местообитаниях (озерах, реках, болотах, рисовниках) и в меньшей степени – в солоноватых и морских экосистемах (Welte et al., 2016). В работе Белл Е. с соавторами показана возможность для *Ca. Methanoperedenaceae* осуществлять сульфат-зависимое АОМ в подземных водах с участием бактерий *Desulfocapsaceae* и *Desulfurivibrionaceae* (*Desulfobacterota*) (Bell et al., 2022 б). В качестве акцепторов электронов в АОМ археи могут использовать четырехвалентный марганец и трехвалентное железо в различных морских и пресноводных водоемах (Timmers et al., 2015). Данный процесс окисления метана в анаэробной зоне более характерен для пресноводных водоемов, обедненных сульфатом и нитратом (Savvichev et al., 2017). Осуществляют Fe-зависимое АОМ по пути обратного метаногенеза представители *Ca. Methanoperedens ferrireducens*, а Mn-зависимое – *Ca. Methanoperedens manganicus* и *Ca. Methanoperedens manganireducens* (Cai et al., 2018; Leu et al., 2020).

Анаэробное окисление пропана и бутана могут осуществлять как археи (Laso-Pérez et al., 2016; Wang et al., 2019), так и бактерии (Kniemeyer et al., 2007; Jaekel et al., 2013). Анаэробное окисление алканов с более длинной цепью ранее было описано только для бактерий (Aeckersberg et al., 1991; Coates et al., 1997), однако метагеномные исследования указывают на большой не исследованный потенциал деградации алканов в домене *Archaea* (Laso-Pérez et al., 2016; Borrel et al., 2019; Wang et al., 2019). При изучении термофильной анаэробной накопительной культуры, полученной из геотермально нагретых донных осадков бассейна Гуаймас и обогащенной бутаном, показано, что основу консорциума архей и бактерий составляет *Ca. Syntrophoarchaeum* (*Halobacterota*) (Laso-Pérez et al., 2016). Архея демонстрировала характерную автофлуоресценцию метаногенов, в ее геноме обнаружены экспрессированные гены *mcr*, а также дивергентные *mcr* (бутил-кофермент М), который участвует в первой стадии активации бутана, аналогичной первой стадии анаэробного окисления метана. Кроме того, *Ca. Syntrophoarchaeum* экспрессирует гены, кодирующие ферменты β-окисления, дегидрогеназу монооксида углерода и ферменты обратимого метаногенеза, что позволяет полностью окислять бутан. Так как в геноме археи отсутствуют

гены для канонического восстановления сульфата (*dsrAB*, *aprAB*), окисление алканов *Ca. Syntrophoarchaeum* сопряжено с восстановлением сульфатов бактериальным партнером *Ca. Desulfofervidus auxilii* (Krukenberg et al., 2016).

Этан является вторым по распространенности компонентом природного газа после метана и, как и метан, химически инертен. Биологическое потребление этана в бескислородных условиях было предположено на основании геохимических профилей в местах выхода морских углеводородов, а также на основании сульфат-восстановления с участием этана в суспензиях (Chen et al., 2019). Окисление этана археями показано на примере психрофильной накопительной культуры, полученной после десяти лет культивирования донных осадков района выхода углеводородов Мексиканского залива (Chen et al., 2019). В накопительной культуре, которая полностью окисляла этан при восстановлении сульфата до сульфида, доминировала архея *Ca. Argoarchaeum ethanivorans* и сульфатредуцирующие *Deltaproteobacteria* (*Desulfobacterota*). Геном *Ca. Argoarchaeum* содержит все гены, необходимые для функционирования метил-кофермент М-редуктазы. Этилкофермент М (этил-КоМ) был идентифицирован как промежуточное соединение с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. Это указывает на то, что *Ca. Argoarchaeum* инициирует окисление этана путем образования этил-КоМ, аналогично процессу активации бутана *Ca. Syntrophoarchaeum* (Laso-Pérez et al., 2016). Дальнейшее окисление промежуточного ацетил-КоА до CO<sub>2</sub> происходит по окислительному пути Вуда-Льюнгаля (Chen et al., 2019).

Если в психрофильной этанокисляющей накопительной культуре доминировала архея *Ca. Argoarchaeum ethanivorans*, в то время как в термофильной – *Ca. Ethanoperedens thermophilum* (GoM-Arc1 clade, в н.в. р *Halobacterota*; с *Methanosarcinia*) и его бактериальный партнер *Ca. Desulfofervidus auxilii* (Krukenberg et al., 2016; Hahn et al., 2020). Ближайшим гомологом для *Ca. Ethanoperedens thermophilum* является психрофильный *Ca. Argoarchaeum* (Chen et al., 2019). Так же как это было показано для *Ca. Argoarchaeum*, аннотированный геном кодирует полный путь метаногенеза, включая метил-кофермент М-редуктазу (*mcr*), которая сильно отличается от такового у метаногенов и метанотрофов. Комбинированный анализ субстрата и метаболита показал, что этан является единственным субстратом для роста, а образование этилкофермента М является продуктом активации (Hahn et al., 2020). Последовательности генов 16S рРНК *Ca. Ethanoperedens* и *Ca. Argoarchaeum*, формирующие кладу GoM-Arc1 (Laso-Perez et al., 2019) составляют до 30% всех последовательностей архей, обнаруженных в богатых углеводородами морских средах, таких как холодные сипы и термально нагретые венты Мексиканского и Калифорнийского заливов (Lloyd et al., 2006; Orcutt et al., 2010; Dowell et al., 2016). Основываясь на их глобальном присутствии в богатых

углеводородами средах, археи клады GoM-Arc1 можно считать ключевыми игроками в анаэробном окислении этана в морских отложениях. Их роль в этом процессе аналогична роли архей ANME в AOM (Hahn et al., 2020).

Анализ MAG показал присутствие сильно модифицированных *mcr* в геномах архей, связанных с другими кладами включая *Bathyarchaeota* (*Thermoproteota*) (Evans et al., 2015), *Hadesarchaeota* (*Ca. Hadarchaeota*) (Baker et al., 2016; Wang et al., 2019), *Archaeoglobi* (*Halobacterota*) (Wang et al., 2019; Boyd et al., 2019), *Helarchaeota* (*p\_Asgardarchaeota*; *c\_Lokiarchaeia*) (Seitz et al., 2019) и *Ca. Methanoliparia thermophilum* (*Halobacterota*) (Borrel et al., 2019). Архея *Ca. Methanoliparia thermophilum*, ранее относящаяся к кладе GoM-Arc2 (Orcutt et al., 2010) (в н.в. *p\_Halobacterota*; *c\_Methanoliparia*), содержит как канонические, так и дивергентные гены *mcr* (Borrel et al., 2019). Было высказано предположение, что *Ca. Methanoliparia thermophilum* может осуществлять окисление алканов в сочетании с метаногенезом в одном организме (Borrel et al., 2019). Аннотация генома подтвердила наличие генов, кодирующих две *mcr*: одну каноническую и одну дивергентную, связанную с *mcr*, ответственной за окисление алканов (Borrel et al., 2019; Laso-Perez et al., 2019). Также *Ca. Methanoliparia thermophilum* может иметь потенциал для активации многоуглеродных алканов, а также для образования или окисления метана. Филогенетический анализ обнаруженного дивергентного типа *mcr* предполагает, что *Ca. Methanoliparia thermophilum* может активировать алканы, образуя алкильную единицу, связанную с КоМ, в качестве первичного интермедиата. Алкильное звено, связанное с КоМ, будет далее разлагаться до CO<sub>2</sub> и тетрагидрометаноптерина (Н<sub>4</sub>МП). Наличие канонического гена *mcr* предполагает две его роли. Либо *Ca. Methanoliparia thermophilum* осуществляет полное окисление метана и/или углеводородов, либо архея диспропорционирует алканы, с образованием метана и CO<sub>2</sub> как конечные продукты. В первом случае *Ca. Methanoliparia thermophilum* будет использовать оба своих *mcr* в окислительном направлении, определяя *Ca. Methanoliparia thermophilum* как новую кладу ANME с дополнительной способностью метаболизировать высшие углеводороды, в результате которой Н<sub>4</sub>МП, полученный из метана или алкана полностью бы окислился в последующей стадии обратного метаногенеза. Однако образующиеся интермедиаты нуждаются в стоке. *Ca. Methanoliparia thermophilum* не имеет бактериального партнера и не кодирует диссимиляционный путь восстановления сульфата или мультигеновые цитохромы, участвующие в прямом переносе электронов. В целом, образующиеся интермедиаты могут быть использованы для образования водорода или ацетата, но в стандартных условиях такие реакции сильно эндергоничны (Laso-Perez et al., 2019).

На основе метагеномных данных, определить диапазон алканов, которые могут метаболизировать *Ca. Methanoliparia thermophilum*, невозможно. В стандартных условиях

метаногенное разложение алканов было бы экзэргоничным для всех многоуглеродных алканов (Schink, 1985), а выход энергии увеличивался бы с увеличением длины цепи алкана (Dolfing et al., 2008). Вместе с тем, в геноме *Ca. Methanoliparia thermophilum* выявлены гены, кодирующие несколько длинноцепочечных ацил-КоА-синтетаз. Это говорит о том, что обнаруженные в геноме *Ca. Methanoliparia thermophilum* дивергентные *mcr* могут катализировать активацию алканов со средней или длинной цепью, связанную с метаногенезом. Примечательно, что осадок с нефтью, из которого изолирована ДНК, принадлежащая *Ca. Methanoliparia thermophilum*, почти полностью обеднен алканами C<sub>12</sub>–C<sub>20</sub>, в связи с чем авторы исследования предполагают, что *Ca. Methanoliparia thermophilum* может разлагать алканы до метана (Laso-Perez et al., 2019).

Таким образом, клада анаэробных архей, населяющих богатую нефтью и в основном обедненную сульфатами среду, способна диспропорционировать алканы, образуя метан и CO<sub>2</sub> в качестве конечных продуктов в одной клетке, не имея при этом синтрофного микроорганизма-партнера. *Ca. Methanoliparia thermophilum* может быть основным участником процессов превращения алканов нефти в метан в глубоких нефтяных резервуарах, в том числе из-за его высокой пропорциональной численности, особенно с учетом того, что канонические метаногены менее распространены в этой среде (от 3% сообщества архей в более глубоких отложениях и до 9.6% на меньших глубинах) (Laso-Perez et al., 2019).

### **1.3.2. Образование углеводородов микроорганизмами в глубинных осадочных отложениях**

Согласно осадочно-миграционной теории нефтегазообразования, нефть формируется в осадочных породах в результате процессов миграции из пород рассеянных битумоидов (микронепти), источником которых является органическое вещество (Конторович, 1998). Органическое вещество (ОВ) представляет собой комплекс органических соединений, возникших прямо или косвенно из живого вещества или продуктов его жизнедеятельности.

Постепенное захоронение морских отложений, содержащих богатые органикой фракции, происходит в направлении постепенного уравнивания с повышением температуры и давления *in situ*. Этот процесс подразделяется на три стадии модификации органического вещества: диагенез (физические и химические изменения, происходящие при преобразовании осадка в осадочную породу), катагенез (процесс термического крекинга, в результате которого органические керогены превращаются в углеводороды) и метагенез (высокотемпературный крекинг образовавшихся углеводородов), каждая из которых приводит к характерным химическим и физическим изменениям с течением времени.

Стадия диагенеза характеризуется затуханием аэробного преобразования органического вещества, установлением физико-химического равновесия в среде осадок-порода. Начинается

анаэробный период превращения органического вещества, формируется «юная» микронефть. Концентрация ее повышается как за счет углеводородов, синтезированных анаэробными микроорганизмами, так и за счет химических превращений органического вещества в низкотемпературных условиях (декарбоксилирование жирных кислот, дезаминирование белков и др.).

Стадия катагенеза разделяется на ряд подстадий: раннюю – протокатагенез (буроугольный этап углефикации), среднюю – мезокатагенез (каменноугольный этап), позднюю – апокатагенез (антрацитовый этап). Протокатагенез характеризуется погружением пород в области температур 50–80°C и давлений 30.4–35.5 МПа. Процесс дальнейшего физико-химического преобразования органики, но в более жестких термобарических условиях, сопровождается преимущественно образованием газообразных углеводородов за счет отщепления периферических групп от исходной макромолекулы органического вещества. Одновременно происходит разукрупнение (отделение низкомолекулярных углеродистых соединений) и укрупнение молекул органического вещества (полимеризация основной матрицы керогена), к концу подстадий – созревание микронефти (жирные кислоты частично декарбоксилируются, частично полимеризуются и переходят в полимерлипиды).

Мезокатагенез (МК) – основная подстадия в истории образования нефти. Породы при погружении продолжают уплотняться, температура к концу МК достигает 200–250°C, давление – 179.2–202.6 МПа. Происходит внутримолекулярная перестройка основной матрицы керогена, в результате которой выделяется широкая гамма углеводородов. На градациях МК<sub>1</sub>-МК<sub>3</sub> при температурах 60–180°C образуется основная масса углеводородов нефтяного ряда – главная фаза (зона) нефтеобразования; на последующих градациях (МК<sub>4</sub>–МК<sub>5</sub>) генерируется в основном газ – зона преимущественно метанообразования, 2-я главная зона газообразования. На подстадии апокатагенеза (температура свыше 250°C) происходит графитизация углефицированного вещества; в начале подстадии продолжается генерация метана, к концу – происходит выделение в основном кислых газов, разложение нефти. В стадийности газонефтеобразования газ начинает процесс нефтегазообразования, сопровождает основную генерацию нефти и завершает ее (зоны конденсата и сухого газа).

Углеводородные газы, образующиеся во время каждой из этих фаз, характеризуются различным составом и изотопным составом углерода (Abrams, 2017). Генерация природного газа в подповерхностных средах происходит в результате термической деградации органического вещества и нефти (термогенный газ), микробной активности, включающей такие реакции, как восстановление диоксида углерода (CO<sub>2</sub>) и ферментация ацетата (первичный микробный газ), а также в результате менее распространенных абиотических процессов с участием CO<sub>2</sub>: при взаимодействии воды и породы в широком диапазоне



температур без присутствия органического вещества или микроорганизмов (абиогенный газ) (Tissot, Welte, 1984; Hunt, 1996; Larter et al., 2005; Hinrichs, 2006; Etiope, Schoell, 2014). При микробной деградации углеводородов нефти также может генерироваться природный газ, который известен как вторичный микробный газ (Larter et al., 2005; Milkov, 2011; Milkov, Etiope, 2018; Cesar et al., 2021a).

Проведенные оценки показали, что вторичный микробный метан более распространен в нефтяных пластах и может составлять 5–11% в общем объеме газа. В то время как на долю первичного микробного газа и термогенный метан приходится 3–4% и 85–92% соответственно (Milkov, 2011). Расширение геохимической базы данных о газах и нефтях из неглубоких нефтяных скоплений и естественных нефтепроявлений привело к признанию того, что некоторые газы, ранее считавшиеся имеющими первичное микробное происхождение, на самом деле образовались из биоразлагаемой нефти в ходе вторичного метаногенеза (Etiope et al., 2009; Milkov, 2010).

Метан ( $C_1$ ), этан ( $C_2$ ) и пропан ( $C_3$ ) являются наиболее распространенными углеводородными газами, образующимися совместно с нефтью, в результате геохимических и микробиологических процессов (Cesar et al., 2021b). Первый процесс – это термическое созревание органического вещества, содержащегося в исходной нефтяной породе, который входит в основной термогенный газогенерирующий интервал при приблизительно 1.35% отражательной способности витринита ( $Ro$ )<sup>7</sup> (кероген типа I и II) (Dow, 1977; Senftle, Landis, 1991). Исходные породы, содержащие кероген типа III (преимущественно наземное органическое вещество; газоносная исходная порода), будут генерировать газ на более низкой стадии термической зрелости (0.8%  $Ro$ ) (Senftle, Landis, 1991). Второй процесс, генерирующий газы углеводороды в исходной нефтяной породе – это термический крекинг жидких углеводородов (иногда называемый вторичным крекингом), который происходит при более высокой термической зрелости ( $\geq 1.5\% Ro$ ) (Zumberge et al., 2012). Термический крекинг для образования газа может происходить в пласте, если он достигает повышенной температуры захоронения после накопления и удержания углеводородов (Hunt, 1996). Третий процесс образования скопления газа включает физические явления, такие как фазовое фракционирование углеводородного заряда на жидкую и газовую фазы (Larter, Nigel, 1991), испарение и миграция летучих соединений в газовой фазе (испарительное фракционирование) (Thompson, 1983). Четвертый процесс – микробная деградация неглубоких органических

---

<sup>7</sup> Отражательная способность витринита – геохимический метод, используемый для определения зрелости материнской породы за счет измерения содержания в нем витринита - вида растительной органической материи.

субстратов и жидких углеводородов из нефти, приводящая к образованию газов  $C_1$ – $C_3$  (Larter et al., 2005; Hinrichs et al., 2006; Xie et al., 2013; Thiagarajan et al., 2020; Cesar et al., 2021).

Для определения происхождения углеводородных газов (термогенное или биогенное происхождение) в качестве критерия предложены отношения  $C_1/(C_2+C_3)$  (Bernard et al., 1976) и  $C_2/C_{2:1}$  (Oremland, 1981). В соответствии с этими критериями, газ имеющий биогенной происхождение характеризуется отношением  $C_1/(C_2+C_3)$  более 1000 и отношением  $C_2/C_{2:1}$  значительно <1. Газ термогенного происхождения имеет соотношение  $C_1/(C_2+C_3)$  <50 и соотношение  $C_2/C_{2:1}$  значительно >1 (Oremland, 1981; Vogel et al., 1982; Kvenvolden, Lorenson, 2000; Ladygina et al., 2016).

Также для различия микробного и термогенного газа несколько десятилетий используются изотопный состав углерода газа (Whiticar, 1999; Milkov, Etiope, 2018; Milkov et al., 2020). Метан биогенного происхождения характеризуется невысокой примесью гомологов (этана, пропана, бутана), и их концентрация, как правило, на три порядка ниже, чем концентрация метана ( $C_1/C_{2+}>1000$ ) и значениями  $\delta^{13}C$  от -55 до -110‰ (Whiticar, 1999; Milkov et al., 2020; Joze, 2020). В то время как термогенные газы состоят из смеси метана, этана, пропана и бутана. Содержание гомологов метана в термогенном газе существенно выше и может достигать 10–15 об.% ( $C_1/C_{2+}<100$ ), значение  $\delta^{13}C$  составляет от ~ -20‰ до -50‰ (Whiticar, 1999). Значение  $\delta D$  микробного метана варьирует от -400 до -150‰, а термогенного – от -275 до -100‰ (Whiticar, 1999). В абиогенном метане, как правило, значение  $\delta^{13}C > -30$ ‰, а вариации  $\delta D$  лежат в пределах от -419 до -100‰ (Ni, Dai, 2009; Калмычков и др., 2020).

Этан микробного происхождения содержит изотопно-легкий углерод ( $\delta^{13}C-C_2 < -40$ ‰), термогенный этан характеризуется более высокими значениями  $\delta^{13}C$  (>-40‰) (Milkov et al., 2004). Кроме того, в осадочной толще наряду с метаном, этаном и пропаном обнаруживаются непредельные углеводороды  $C_2$ – $C_4$  (этилен, пропилен и бутилен), которые не являются типичными составляющими термогенного газа, но могут образовываться как промежуточные продукты деструкции органического вещества (Fukuda et al., 1993).

О способности микроорганизмов образовывать другие углеводородные газы, отличные от метана, впервые было сообщено в 1948 г. (Davis, Squires, 1954). Клейпул Дж.Л. предположил, что биогенный этан может образовываться в результате восстановления  $C_2$  кислот (уксусной и щавелевой) в процессе, аналогичном восстановительному метаногенезу (Claurool, 1999). Гипотеза была подтверждена геохимическими данными, предоставленными Хинрикс К.-У. с соавторами, которые далее предположили, что конденсация растворенного неорганического углерода в соединения  $C_2$  (ацетат или родственные промежуточные продукты) приводит к биогенному пропану. Такой сценарий мог бы объяснить обогащение пропана  $^{13}C$  относительно этана в биогенном газе, поскольку растворенный неорганический

углерод в осадочных поровых водах обычно изотопно тяжелый (Hinrichs et al., 2006). В отдельных исследованиях был подтвержден этан-продуцирующий потенциал (определяемый как эффективность превращения субстрата в этан в течение определенного периода времени) следующих субстратов: этилена, этанола и этилированных соединений серы (Belay, Daniels, 1988; Koene-Cottaar, Schraa, 1998; Oremland, 1981; Oremland et al., 1988). Для пропана единственным испытанным прекурсором был пропанэтиол, который привел лишь к незначительному усилению образования пропана (Oremland et al., 1988).

Предшественники и пути, предложенные в геохимических исследованиях (Claypool, 1999; Hinrichs et al., 2006) для образования биогенного этана и пропана, не были экспериментально оценены (Xie et al., 2013). Поскольку для преобразования прекурсоров в этан и пропан требуется снижение мощности, в исследованиях использовалось высокое парциальное давление  $H_2$  (100–200 кПа) в инкубаторах. Неясно, может ли биологическое образование  $C_2$  и  $C_3$  алканов происходить при более низкой концентрации  $H_2$ , характерной для осадочной среды (Hoehler et al., 1998, Lin et al., 2012). С целью установления возможных прекурсоров этана и пропана, Кси С. с соавторами экспериментально протестировали несколько  $C_2$  и  $C_3$  соединений, включая алкены, спирты, тиолы и карбоновые кислоты со скелетом  $C_2$  или  $C_3$  на их относительный потенциал продуцирования алканов в бескислородных отложениях эстуария (Xie et al., 2013). Максимальная эффективность преобразования субстратов в этан или пропан в порядке убывания наблюдалась в осадке, обогащенном этиленом (до 38%), этанэтиолом (0.01%) и пропанэтиолом (0.003%). Внесение этанола (1 мМ) и ацетата в накопительные культуры не приводило к образованию этана, что согласуется с результатами (Oremland et al., 1988). Так же, как и одновременное присутствие  $H_2$  и ацетата в высокой концентрации не стимулировали выработку этана, который теоретически мог бы служить эффективным стоком для промежуточных продуктов брожения. Повышенная концентрация метана в суспензиях с добавками ацетата указывает на то, что вместо этана ацетат метаболизируется в метан и  $CO_2$ . В результате, авторы сделали вывод, что этилен может быть эффективным предшественником биогенного этана. Кроме того, различные исследования продемонстрировали широкое распространение этилена в холодной морской среде (Bernard et al., 1978; Kvenvolden, Redden, 1980; Vogel et al., 1982; Hunt, 1996). Существует как минимум два природных источника этилена. В почве и пресной воде микроорганизмы, включая грибы (Lindberg et al., 1979), цианобактерии (Hodges, Campbell, 1998) и другие бактерии (Nagahama et al., 1992; Fukuda et al., 1993), могут продуцировать этилен при аэробной деградации метионина, что является наиболее распространенным путем. Кроме того, добавление метионина также вызывало накопление этилена в отложениях Ваттового моря в присутствии  $O_2$  (Jansen et al., 2009). Второй источник – летучие

хлорированные соединения  $C_2$ , которые могут образовываться естественным или антропогенным путем и присутствуют в морской воде. Восстановительное дехлорирование – процесс, который превращает хлорэтилены в этилен и другие продукты в бескислородных условиях (Bradley, 2003).

В экспериментах со стерильным осадком, либо с осадками, обогащенными 2-бромэтансульфоновой кислотой или  $NaNO_3$ , метан и другие алканы не образовывались, из чего авторы сделали вывод, что в генерации этана участвуют метаногенные археи. Филогенетический анализ клональных библиотек гена 16S рРНК и *mcr* показал, что большинство последовательностей принадлежало роду *Methanocalculus* (Xie et al., 2013). Первым представителем рода *Methanocalculus* был *Methanocalculus halotolerans*, выделенный из засоленной подземной нефтедобывающей скважины (Olivier et al., 1998). Этот гидрогенотроф образует метан из  $H_2:CO_2$  или формиата и требует для роста ацетат. Поскольку восстановление этилена до этана является гидрогенотрофной реакцией, Кси С. с соавторами рассматривали представителей рода *Methanocalculus* как кандидата на осуществление этаногенеза. С ферментативной точки зрения этилен до некоторой степени совместим с ферментами и кофакторами метаногенных путей. Заключительный этап метаногенеза катализируется метилкоферментом М-редуктазой и включает кофактор кофермента М (CoM) (Balch, Wolfe, 1979). Кофактор CoM обычно присутствует в метаногенах в виде меркаптоэтансульфоновой кислоты (HS-CoM) или метилтиоэтансульфоновой кислоты ( $CH_3-S-CoM$ ). Установлено, что *Methanobacterium thermoautotrophicum* способен использовать этилтиоэтансульфоновую кислоту (этил-S-CoM) в качестве структурного аналога  $CH_3-S-CoM$  для получения этана из этилена (Gunsalus et al., 1978). Оремленд Р.С. также показал, что этил-S-CoM может служить предшественником для производства этана (Oremland, 1981). Однако причина, по которой метаногены производят этан, до конца не ясна. Основываясь на токсичности этилена по отношению к метаногенам, высказано предположение, что этаногенез представляет собой механизм детоксикации, используемый метаногенами при адаптации к этилену (Koene-Cottaar, Schraa, 1998).

Микроорганизмы глубинных осадочных отложений синтезируют не только газообразные углеводороды, но и соединения с длиной углеродной цепи больше  $C_5$ . Жидкие компоненты нефти включают сложную смесь, состоящую в основном из линейных и циклических углеводородов от  $C_5$  до  $C_{17}$ , в то время как твердые углеводороды включают соединения от  $C_{18}$  до  $C_{40}$ . В течение последних трех десятилетий проведено значительное количество исследований по изучению ранней генерации углеводородов из водорослей, бактерий и высших растений, в результате которых установлено: *n*-алканы в основном образуются из восков и спиртов кутикулы высших растений с преобладанием нечетным

числом атомов углерода (Dehmer, 1995; Qin et al., 2013). Терпеноиды – компоненты смол высших растений, как правило, являются биомаркером хвойных растений. Например, трициклические дитерпеноиды, такие как абиетаны, пимараны и каурены являются неспецифическими маркерами голосеменных растений (Otto et al., 1997). Симонейтом Б.Р.Т. с соавторами показано, что ретен может образовываться из абиетиновых кислот и абиетана (Simoneit et al., 1986).

Результаты данных исследований, направленных на получение сырой нефти, были получены на основании экспериментов, проведенных при высокой температуре (от 200°C до 500°C) и в течение короткого времени (от нескольких часов до суток) (Qin et al., 2008). В противоположность этому, Квин С. с соавторами изучали ранний диагенез органического вещества из морских водорослей при низких температурах (80°C) и в течение более длительного периода – более 5 лет. Эксперименты показали, что на самом раннем этапе моделирования, некоторое количество незрелой нефти было получено в течение 26–56 дней (Qin et al., 2013).

Большой объем информации об углеводородах, синтезируемых микроорганизмами свидетельствует о том, что бактерии могут образовывать многие УВ: алканы, алкены, алкадиены, изопреноиды, циклоалканы и арены (Volkman et al., 1989; Багаева, Зинурова, 2004; Dembitsky et al., 2004; Ladygina et al., 2006; Frias et al., 2009; Schirmer et al., 2010; Choi et al., 2013; Harger et al., 2013; Howard et al., 2013; Kageyama et al., 2015; Coursolle et al., 2015; Sheppard et al., 2016; Юсупова, 2021). Из алканов – это соединения с количеством углеродных атомов от 13 до 35, а из изопреноидов – фитан, пристан и сквален (Пошибаева, 2015). В основном, имеющиеся сведения по составу УВ, относятся к целой культуре бактерий (т.е. образованию внутриклеточных УВ), однако представители р. *Clostridium* и р. *Desulfovibrio* образуют как внутри- так и внеклеточные УВ. При этом сообщается, что внеклеточные УВ *Clostridium* имеют более короткие цепи (C<sub>16</sub>-C<sub>21</sub>), чем внутриклеточные (C<sub>25</sub>-C<sub>35</sub>) (Багаева, Зинурова, 2004). Образование гопана связывают исключительно с бактериями (Peters et al., 2005). Гопан образуется в том случае, если бактерия имеет фермент сквален-гопан-циклазу. Впервые этот фермент был обнаружен у *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Pale-Grosdemange et al., 1999). В последующие годы этот фермент был обнаружен у грамположительных и грамотрицательных бактерий. И определенное время считалось, что синтез гопанов ограничен микроаэрофильными и аэробными бактериями. Однако, в 2009 году образование гопана обнаружили у анаэробного сульфатредуктора *Desulfovibrio bastinii* (Blumenberg et al., 2009). Некоторые бактерии синтезируют стеролы – алициклические природные спирты, относящиеся к стероидам. Так, например, *Methylococcus capsulatus* синтезирует ланостерол (Rohmer et al., 1980), *Polyangium* sp. и *Nannocystis exedens* – холестерол (Tippelt et al., 1997). *Methylococcus*

*capsulatus* содержит оба класса циклических тритерпенов – пентациклические гопаны и тетрациклические стероиды (Rohmer et al., 1980). Стераны менее характерны для бактерий, но их присутствие возможно в цианобактериях, метанооксиляющих и некоторых других бактериях (Еляков, Стоник, 1988). Растительное происхождение фитана стало почти аксиомой, запечатленной даже в его названии. Данные о том, что в археях содержание фитана много больше, чем в растениях пока никак не повлияли на сложившееся убеждение (Пошибаева, 2015). Линейные тетратерпеноиды, состоящие из двух фитанолов, состыкованных «голова к голове», были обнаружены в мембранах архей, с ними вместе находятся дитерпеновые фитаноловые диэфиры. В наибольших количествах бифитаны находят во фракции углеводородов, получаемую при разрушении эфирных связей в керогене осадочных пород. В свободную фракцию должны попадать фрагменты бифитанов, расчлененные по слабому «голова к голове» звену, либо отдельные фитаны. В итоге эти соединения должны образовать смесь фитана и пристана. Таким образом, циклические и ациклические изопреноиды могут достигать значительных концентраций в нефтях и нести надежные признаки своего биогенного происхождения (Чудецкий, 1998; 2002; Пошибаева, 2015).

Постепенное погружение осадков приводит к захоронению биомассы бактерий и архей, которая в условиях повышенных температур становится источником нефтяных углеводородов. Получение нефтяных углеводородов-биомаркеров (УВ-биомаркеры) из биомассы микроорганизмов в результате термолита было показано на примере бактерий *Arthrobacter* sp. RV, *Pseudomonas aeruginosa* RM и архей *Thermoplasma* sp (Строева и др., 2014; Гордадзе и др., 2018). Архея *Thermoplasma* sp. была выделена из источника «Нефтяная площадка» кальдеры вулкана Узон (Камчатка, Россия) (Гордадзе и др., 2018). В растворимой части и продуктах термолита нерастворимой части биомассы, данной археи, методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы насыщенные углеводороды-биомаркеры (*n*-алканы, изопренаны, прегнаны, стераны, хейлантаны, гопаны). Распределение вышеуказанных УВ напоминает слабо преобразованные морские нефти, генерированные в глинисто-карбонатных толщах. Углеводороды, обнаруживаемые в кальдере Узон, признаны самой молодой нефтью в мире, возрастом около 50 лет (Гордадзе и др., 2019). Ученые полагают, что кальдера вулкана Узон (Кроноцкий заповедник, Камчатка) представляет собой уникальную природную лабораторию современного образования нефти (Гордадзе и др., 2019).

#### 1.4. Озеро Байкал как объект исследования осадочной толщи, ассоциированной с разгрузкой углеводородов

Озеро Байкал является одним из перспективных мест изучения экологии, таксономической структуры, геохимической деятельности микробных сообществ в донных осадках, ассоциированных с геологическими аномалиями. Оно расположено в Восточной Сибири на границе Сибирской платформы с Центрально-Азиатским складчатым поясом и является центральным звеном внутриконтинентальной Байкальской рифтовой зоны. Впадина разделена на три котловины – южную, среднюю и северную, отделенные друг от друга подводными возвышенностями – Бугульдейской перемычкой и Академическим хребтом. Длина озера более 636 км, максимальная ширина 80 км, глубина 1637 м (Байкал. Атлас, 1993). Амплитуда смещения фундамента по разломам достигает 10 км. Этот огромный по объему резервуар более чем на три четверти заполнен многокилометровой толщей осадков (Хлыстов, Калмычков, 2020). Общий их объем составляет примерно 75 тыс. км<sup>3</sup> (Логачев, 2003).

Формирование гемипелагических осадков происходит при значительном поступлении вещества водной растительности, преимущественно фитопланктона и диатомовых водорослей (Вотинцев и др., 1975; Намсараев, Земская, 2000; Гранина, 2008; Вологина, Штурм, 2017). Наиболее высокие темпы седиментации характерны для районов вблизи устьев больших рек, менее высокие – для глубоководных котловин озера, минимальные – для подводных поднятий (Вологина, Штурм, 2009). Скорости осадконакопления в открытом Байкале меняются от 0.015 до более 1 мм/год (Колман и др., 1993; Vologina et al., 2000). Сходные величины скорости седиментации (до 1 мм в год) отмечались в мелководном и олиготрофном озере Laguna Potrok Aike (Zolitschka et al., 2013). Средняя концентрация  $C_{орг}$  в осадках Байкала составляет 1.9%, в южной и средней котловинах 1.5–2.5%, в северной котловине – 1.0–1.3% (Выхристюк, 1980), что сопоставимо с отмечаемыми значениями в океанических отложениях в высокопродуктивных континентальных окраинах (Qiu et al., 1993; Prokopenko et al., 2007). В осадках различных типов геологических структур содержание органического углерода ( $C_{орг}$ ) варьирует от 0.2 до 4.8 %, а органического вещества (ОВ) от 0.3 до 8.7%, при этом наибольшие концентрации закономерно приурочены к нефтепроявлениям и осадкам из зоны гидротермальной разгрузки в бухте Фролиха (северная котловина) (Выхристюк, 1980; Афолина и др., 2001; Zemskaya et al., 2020; Morgunova, Pavlova et al., 2022).

Ежегодное поступление в осадки органического вещества и низкие концентрации сульфат-иона обеспечивают доминирование процесса метангенерации на конечных этапах его деструкции (Намсараев, Земская, 2000; Дагурова и др., 2004; Пименов и др., 2014; Букин и др., 2018; Zemskaya et al., 2020; Земская и др., 2021). С использованием метабаркодинга показано, что структура микробных сообществ изменяется в зонах разгрузки газосодержащих

минерализованных флюидов в зависимости от наличия акцепторов электронов, интенсивности и компонентного состава газосодержащих флюидов, обеспечивающих миграцию микроорганизмов из глубинной зоны в поверхностные слои донных отложений и наоборот (Земская и др., 2021; Zemskaya et al., 2015; 2020; 2025).

Распределение спектра углеводородных молекулярных маркеров (*n*-алканов, изопреноидов, терпанов и полициклических ароматических углеводородов) в донных осадках показывает, что наличие древнего органического вещества в поверхностных слоях, где, в том числе, обнаруживается грязевулканическая брекчия, газовые гидраты и аутигенные карбонаты, связано с миграционными процессами. Преобладание гомологов *n*-алканов строения C<sub>12</sub>-C<sub>21</sub> с четным максимумом C<sub>16</sub> при повышенном содержании гопановых структур низкой степени термальной зрелости (гоп-17(21)-енов, гоп-13(18)-енов) в донных осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, может свидетельствовать об активном развитии сообществ микроорганизмов (Моргунова и др., 2018; Morgunova, Pavlova et al., 2022). В то время как, в отложениях фоновых районов молекулярный состав рассеянного органического вещества отложений отвечает нормальным условиям осадконакопления, не осложненным миграционными процессами.

Поровые воды донных отложений в районах со спокойным осадконакоплением наследуют состав озерных вод и характеризуются однородным солевым составом. Наиболее распространенными растворенными ионами в озере Байкал являются HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> и Ca<sup>2+</sup>. Наиболее важным отличием от морской воды является очень малая концентрация растворенного SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> в водах озера Байкал (0.05 мМ) по сравнению с морской водой (28.9 мМ) (Aloisi et al., 2019). Другие ионы, которые составляют большую часть растворенных солей в морской воде (Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и K<sup>+</sup>), присутствуют в водах озера Байкал в очень малых концентрациях (≤ 0.15 мМ) (Погодаева и др., 2007; Pogodaeva et al., 2017; Земская и др., 2021). При диагенетических преобразованиях суммарные концентрации ионов в поровых водах увеличиваются с глубиной осадка за счет увеличения концентрации ионов бикарбоната и кальция. Из-за нехватки акцепторов электронов, таких как SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, большая часть растворенного неорганического вещества, образующегося в результате разложения ОВ и последующих окислительно-восстановительных реакций, находится в форме CO<sub>2</sub>, а не HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, что приводит к более низкому рН в диагенетической среде (Мизандронцев, 1975).

Длительная история осадконакопления и многокилометровая толща осадков с высоким содержанием органического вещества способствовали образованию большого количества нефтяных и газообразных углеводородов (Grachev et al., 1998; Кузьмин и др., 2001; Конторович и др., 2007). Возраст нижних толщ осадков Южной и Средней котловин озера более 25 млн. лет – олигоцен, хотя имеются данные, что осадконакопление в районе дельты р.

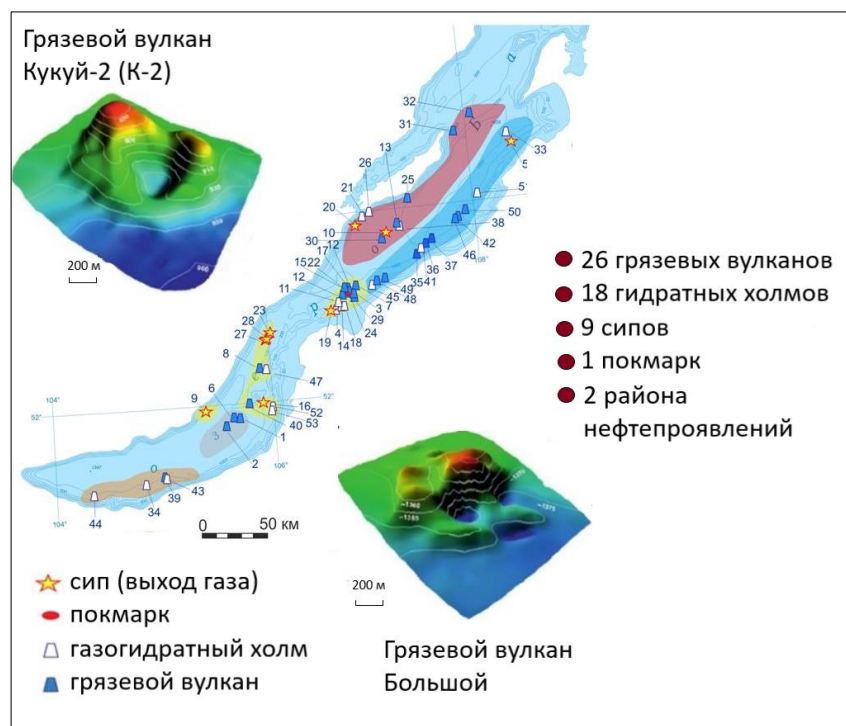


Селенга, началось еще в палеогене, т. е. более 60 млн. л.н. (Николаев, 1998). Именно вблизи дельты по геофизическим данным отмечается максимальная мощность осадков – более 9 км (Scholz et al., 2000). В Южной и Средней котловинах максимальные значения мощности осадков не превышают 7.5 км, а в Северной – 4.4 км (Hutchinson et al., 1991). Столь длительная история осадконакопления и многокилометровая толща осадков с высоким содержанием органического вещества и незначительными процессами сульфатредукции способствовали образованию большого количества нефтяных и газообразных углеводородов.

В оз. Байкал, как в мелководной, так и в глубоководной его части, обнаружены многочисленные районы, где происходит разгрузка метана (Гранин, Гранина, 2002; Исаев и др., 2002; Granin et al., 2010) и нефти со дна озера (Конторович и др., 2007). Термобарические условия (давление достигает 160 атм, температура придонной воды  $\approx 3,4^{\circ}\text{C}$ ) обеспечивают образование газовых гидратов (ГГ) в осадках озера в местах разгрузки газа, где поровые воды насыщены метаном. Газовые гидраты – это клатратные соединения метана с водой, которые образуются при больших давлениях и низких температурах. Озеро Байкал – единственный на Земле пресноводный водоем, в осадках которого обнаружены газовые гидраты. Здесь они образуют как глубинные скопления, так и придонные (залегаящие в пределах первых десятков метров под дном) (Хлыстов и др., 2014; Kuzmin et al., 2000; Khlystov et al., 2013; Манаков, 2021). Впервые такие соединения обнаружены в керне на 121-м и 161-м метре глубоководной скв. BDP-97, пробуренной в осадках Байкала при реализации международного проекта «Байкал-Бурение». Это были глубинные ГГ. В 2000 г. ГГ впервые найдены и в приповерхностных (поддонных) слоях байкальских осадков. Дальнейшие исследования выявили многочисленные районы озера, где присутствовали поддонные скопления ГГ, и к 2020 г. новые находки ГГ стали, по сути дела, обыденным явлением (Хлыстов, Калмычков, 2020).

За более чем 20-летний период поиска и изучения приповерхностных скоплений газовых гидратов на Байкале открыто 63 гидратоносные структуры, которые разделены на 4 типа: грязевые вулканы, гидратные холмы, сипы и покмарк (рис. 13) (Cuylaerts et al., 2012; Khlystov et al., 2013, 2018, 2019; Хлыстов и др., 2017; Хлыстов, Калмычков, 2020).

Большинство гидратоносных структур идентифицированы как грязевые вулканы и гидратные холмы. К последним относятся подводные возвышенности с ГГ, но без слоев с грязевулканической брекчией, по геофизическим признакам ничем не отличающиеся от грязевых вулканов. Отличительной чертой грязевых вулканов является наличие в осадочном разрезе вулкана грязевулканической брекчии – включения в глинистой матрице более плотных и древних обломков глин размерами от 1 мм до 5 см (Хлыстов и др., 2017; Khlystov et al., 2019).



**Рисунок 13.** Схема распределения гидратоносных структур озера Байкал, открытых с 2000 по 2018 гг. Цитировано по Хлыстов, Калмычков, 2020.

К сипам отнесены места скопления газовых гидратов, не выраженные в рельефе. Как и у остальных структур на сейсмических записях отмечается аномалии в записи, в виде хаотичного рисунка. Иногда эти хаотичные области сигнала больше по размерам, чем сам сип, и интерпретируется как газовая шапка. Чаще всего сипы имеют выход газа в пузырьковой форме, но иногда (сип Посольская Банка) он отсутствует и там идет разгрузка газонасыщенного раствора (Granin et al., 2010; Khlystov et al., 2013, 2018).

Такие районы характеризуются повышенными тепловыми потоками, связанными с восходящими по разломам гидротермальными флюидами (Голубев, 1979; Дучков и др., 1999; Van Rensbergen et al., 2002). Значения теплового потока варьируют от 0 до 20 000 мВт/м<sup>2</sup>. Среднее значение измеренного потока составляет 77.8±24 мВт/м<sup>2</sup>. На Северном Байкале узкие положительные аномалии теплового потока связаны с прибрежными разломами, простирающимися вдоль донных предгорий по обе стороны бассейна.

Интенсивная аномалия теплового потока шириной около 8 км протягивается вдоль юго-восточного борта Среднего Байкала (Голубев, 1979, 2007; Golubev, 1998). Ее положение совпадает с разломом, обнаруженным с помощью сейсмического многоканального отражения. На основе геологических данных, структуры, выявленные в Среднем Байкале в районе Кукуйского каньона, были определены как грязевые вулканы. Выход флюидов приурочен, в первую очередь, к разрывным нарушениям, имеющим глубокие корни, активность которых во многом связана с сейсмической активностью байкальской впадины (Cuylaerts et al., 2012; Khlystov et al., 2013). Измерение теплового потока (29–121 мВт/м<sup>2</sup>) и картирование газовых

гидратов в районе Кукуйского каньона позволило выявить особый тип ассоциации тепловых аномалий вблизи гидратобразующих слоев (Poort et al., 2012). Аномально повышенный вынос тепла (более 100–200 мВт/м<sup>2</sup>) зафиксирован вдоль Посольского разлома (Van Rensbergen et al., 2002; Klerkx et al., 2006; Naudts et al., 2012).

Подводная возвышенность Посольская Банка, граничащая с Посольским разломом, характеризуется обширными залежами газовых гидратов и глубоководными выходами метана. В донных осадках Посольской Банки выявлено наличие конвективной флюидной петли, обуславливающей состав микробных сообществ, отличный от таковых в других газогидратных районах (Klerkx et al., 2006; Naudts et al., 2012; Черницына и др., 2016).

Наиболее заметная положительная аномалия шириной более 30 км обнаружена в Южном Байкале (Голубев, 1979, 2007; Golubev, 1998). Ранее была предпринята попытка объяснить эту аномалию инъекцией мантийного материала в верхнюю кору. Оценки, выполненные в отношении гидротермального оттока тепла, показывают, что такая интрузия, даже если бы она была шириной 10–12 км, смогла бы поддерживать аномалию на Южном Байкале в течение менее 1 млн. лет. Если аномалия существовала более длительное время, она должна была подпитываться возобновляемыми источниками тепла. Таким источником могут быть подземные воды. Они проникают вдоль разломов на глубину от 3 до 6 км и глубже под плечами рифта, где нагреваются в региональном тепловом поле, затем движутся в сторону Байкальского бассейна и поднимаются по разлому дна Байкала уже в виде термальных вод (Ломоносов, 1974). Моделирование показывает, что такое перераспределение глубинного тепла движущимися подземными водами также ответственно за низкие тепловые потоки менее 40 мВт/м<sup>2</sup>, наблюдаемые в неглубоких скважинах в плечах рифта (Голубев, 1979, 2007; Golubev, 1998). Повышенный тепловой поток около 100 мВт/м<sup>2</sup> (фон 60 мВт/м<sup>2</sup>) выявлен в районе расположения газогидратоносного грязевого вулкана Кедр-1 и гидратного холма Кедр-2. Предполагается, что на глубине 1 км под грязевым вулканом температура донных отложений составляет 70°C, при фоновых значениях 51°C, а на 2 км – 144°C (фон 88°C) (устное сообщение проф. Джеффри Поорт, Хлыстова О.М.). Структуры находятся на водораздельной части одного из останцов древней поверхности дна озера Байкал на склоне южной котловины в 9 км от берега на глубине 570–640 м. Метан из газовых гидратов этих структур содержит термогенный газ, сопровождаемый вторично-микробным газом (Nashikubo et al., 2020). Если для средней котловины озера наличие на дне природных нефтепроявлений может дать ответ на присутствие вторично-микробного газа, то для Южного Байкала вопрос оставался открытым (Хлыстов и др., 2021). Было высказано предположение, что его образование связано с присутствием в нижележащем разрезе отложений угленосной неогеновой танхойской свиты, которая может быть одним из генераторов такого метана в

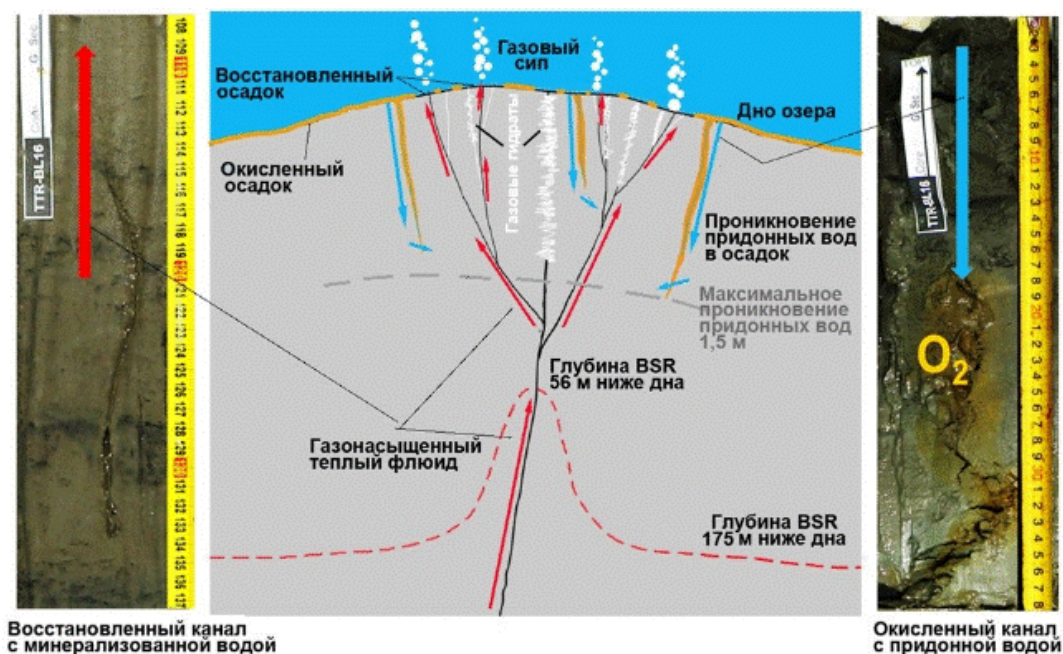
газовых гидратах (Хлыстов и др., 2021). Позднее гипотеза была подтверждена экспериментально и было показано, что активная газогенерация из углей танхойской свиты, являющейся существенным источником флюидов для структур Кедр-1 и -2 происходит при температурах от 50°C и осуществляется микроорганизмами с формированием вторично-микробного метана за счет CO<sub>2</sub>-редукции (Крылов и др., 2023).

Газовые гидраты г/в Маленький характеризуются повышенным содержанием тяжелого кислорода и дейтерия, также изотопов радиогенных аргона и гелия, что свидетельствует о том, что разгружающийся флюид в данном районе поступает со значительных глубин, где происходит насыщение его газовой фазы коровым (около 90%) и мантийным (около 10%) гелием. О поступлении газонасыщенных флюидов с глубины более 300 м свидетельствует также нахождение в голоценовых осадках древних диатомовых водорослей рода *Tertiarius* плиоценового возраста (Клеркс и др., 2003).

Об активной восходящей миграции разогретых флюидов свидетельствуют исследования, проведенные на метановом сипе Красный Яр, расположенном в северо-восточной части южного бассейна озера Байкал, на западном склоне дельты реки Селенги (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020; Земская и др., 2024). Сип состоит из нескольких областей сильного обратного рассеяния, что связано с наличием в донных отложениях приповерхностных газовых гидратов (Хабуев и др., 2016). Донные отложения вне области сильного обратного рассеяния – серые, однородные, биогенно-терригенные диатомовые илы с четкими прослоями и примазками гидротроилита, структура не нарушена. Химический состав поровых вод в этих кернах соответствовал составу водной толщи озера Байкал: низкая сумма ионов и преобладание в качестве основных ионов бикарбоната и кальция. Вместе с тем, в осадках, находящихся внутри области сильного обратного рассеяния значительно отличались, и, в первую очередь наличием окисленных и восстановленных каналов и газовых гидратов. Каналы располагались от поверхности осадка до глубины 150 см. Края каналов были окислены на глубину 2–3 см. Химический состав поровых вод канала показал, что они содержат богатые кислородом придонные воды, в том числе сульфаты с концентрациями придонных вод Байкала, что не характерно для поровой воды в восстановительных условиях, где содержание сульфат-ионов не превышает 0.3 мг/л (Poort, Klerkx, 2004). Донные отложения с восстановленными вертикальными каналами (диаметром 1 см) были обнаружены только внутри области сильного обратного рассеяния и прорезали «нормальные» осадки, в частности, ранее образовавшиеся прослой гидротроилита. Поровая вода каналов имела тот же самый относительный мольный состав ионов, что и в других отложениях в области сильного обратного рассеяния, но со значительно более высокими абсолютными значениями

концентраций и с резким увеличением концентрации с глубиной отложений. Тепловой поток находился в диапазоне 49–170 мВт/м<sup>2</sup> (Pogodaeva et al., 2020).

На основе общего анализа геолого-геофизических, геотермических и геохимических данных авторами исследования была разработана модель разгрузки газонасыщенного флюида (рис. 14).



**Рисунок 14.** Схема разгрузки метанового флюида сипа Красный Яр. Верхняя часть схемы отражает приповерхностную циркуляцию вод при разгрузке газонасыщенного флюида с проникновением холодных придонных вод в осадок до глубины 1,5 м. Нижняя часть схемы отражает подъем разогретого газонасыщенного глубинного флюида и локальное повышение BSR, соответствующее измеренным тепловым потокам. Цитировано по Pogodaeva et al., 2020.

Воды разогретого газонасыщенного флюида мигрируют по трещинам к поверхности дна, где они охлаждаются и способствуют образованию газовых гидратов. Образующиеся газовые гидраты закупоривают каналы и блокируют пути выхода газа. Это может привести к накоплению газа, вызывающему повышение давления, что, в свою очередь, заставит газ мигрировать в боковом направлении и в конечном итоге сформировать линзовидные горизонтальные скопления гидрата метана. Достигая критических давлений, газ периодически прорывается в толщу воды. Газ, накапливающийся в отложениях, способствует увеличению проницаемости отложений, вызывая набухание и разрыв осадка. Это, в конечном итоге, ведет к проникновению придонных вод озера в осадок на отдельных участках в определенное время (Pogodaeva et al., 2020).

Анализ разнообразия и структуры микробных сообществ методом баркодирования гена 16S рРНК в осадках метанового сипа Красный Яр, в зоне миграции флюидопотоков выявил изменения в структуре микробных сообществ, в основном в каналах, заполненных окисленным осадком (Земская и др., 2024). Тогда как вне их, разнообразие как бактерий, так

и архей было сходно с разнообразием в осадках других районов: на всех исследованных глубинах осадочной толщи выявлялись метилотрофные метаногены и микроорганизмы, участвующие в разных этапах окисления ОВ. Наличие аэробных бактерий в осадках отмечалось до глубины 2 м, что совпадает с геохимическими и геотермическими показателями, определяющими зону активной миграции придонных вод (Pogodaeva et al., 2020).

Предложенная модель образования и функционирования сипа (Pogodaeva et al., 2020) может рассматриваться как начальная стадия образования грязевого вулкана. Подобный механизм образования приповерхностных газовых гидратов и сипа для выдавливания не только воды и газа, но и вещества для формирования грязевулканической постройки наглядно был рассмотрен и вещественно доказан на примере грязевых вулканов подводного Академического хребта в озере Байкал. На примере осадков из данного района научно обоснован новый, «байкальский», тип грязевого вулканизма, который отличается от типично морских моделей глубиной и причиной возникновения аномально высокого пластового давления (Khlystov et al., 2019). Классический морской грязевой вулканизм связывают чаще всего с зонами сжатия и с процессами нефтегазообразования, и их корни имеют многокилометровую глубину. Байкальские грязевые вулканы расположены в зоне континентально рифта – зоне растяжения и характеризуются неглубокими корнями. Первопричиной их образования является процесс разложения глубинных ГТ с образованием избыточного давления в зоне нижней границе их стабильности (250–300 м ниже дна озера), что ранее нигде в мире не отмечалось (Khlystov et al., 2019). Совместно с грязевулканическим материалом, на поверхность дна поступают вымершие виды диатомовых водорослей. Диатомовый анализ показал, что в интервале с грязевулканической брекчией зарегистрировано 88 видов и разновидностей диатомовых водорослей из 28 родов. Планктонные диатомеи представлены 13 таксонами, которые встречаются в озере в настоящее время, и 32 – древними, характерными для отложений позднего миоцена – раннего плиоцена. Преобладала *Cyclotella iris et var.*, которая ранее была определены в разрезе скважины глубоководного бурения ВДР–98 в интервале 230–310 м ниже дна. Возраст этой части бурового керна оценивается как 5.6–4.6 млн. лет (Кузьмин и др., 2009). В распределении створок в толще осадков наблюдалось скачкообразное уменьшение численности створок снизу-вверх по разрезу. На верхней границе интервала с грязевулканической брекчией встречаемость створок микрофоссилий минимальна. В верхней части осадкой присутствовали диатомовые водоросли характерные для голоценового комплекса (Хлыстов и др., 2017).

В число уникальных характеристик оз. Байкал входит не только наличие метановых сипов и образование гидратов метана, но и присутствие естественных нефтепроявлений. Естественные нефтепроявления в пресноводных озерах явление достаточно редкое, они установлены в глубоководном рифтовом озере Танганьика и мелководном озере Чапала (Simoneit et al., 2000; Zarate-del Valle et al., 2006). Нефть в этих озерах не содержит полициклических ароматических углеводородов и *n*-алканов. Считается, что нефть образовалась гидротермальным путем из озерного органического вещества при температурах ~ 250°C, в течение короткого геологического периода (Simoneit et al., 2000; Zarate-del Valle et al., 2006). В частности, в оз. Танганьика просачивание нефти происходит по разломам, связанным с гидротермальной системой, которая формирует очень мелкие (10 м ниже дна озера) нефтеносные нефтематеринские породы возрастом менее 25 тысяч лет (Orpo, Hurst, 2018). В них, генерация углеводородов происходит при контакте погребенного органического вещества с гидротермальными водами. Наличие гидротермальной нефти также было зарегистрировано в бассейне Гуаймас, на северо-востоке Тихого океана, в заливе Кагосима (Япония), в Новой Зеландии, в кальдере Узон (Камчатка) и Йеллоустонском национальном парке (Orpo, Hurst, 2018 и ссылки в статье). Выброс горячей воды (65–80°C) связан с выбросами CO<sub>2</sub> (60–90% от общего количества газа и углеводородного газа, от C<sub>1</sub> до C<sub>6</sub>), где основной газ – метан (до 98.87 %) (Orpo, Hurst, 2018).

Научная проблема нефтегазоносности оз. Байкал берет свое начало с 18 века, с момента описания И.Г. Гmeliным (1833 г.) выходов нефти вдоль восточного берега оз. Байкал (Конторович и др., 2007). В разное время многочисленные выходы газа и признаки нефти в виде нефтяных пленок на воде, озокерита и битумов отмечались от станции Боярская до Чивыркуйского залива, на участке от мыса Облом до ручьев Ключи и Стволовая, напротив устьев рек Большая и Малая Зеленовская (Рязанов, 1928; Конторович и др., 2007). В течение длительного времени феномен байкальской нефти был предметом всестороннего геолого-геофизического и микробиологического изучения (Талиев и др., 1985; Петрова, Мамонтова, 1985; Каширцев и др., 1999; Исаев, Преснова, 2003; Исаев и др., 2003; Конторович и др., 2007).

В 2005 г. в глубоководных условиях оз. Байкал (м. Горевой Утес) обнаружен и исследован новый выход нефти, который по всем химическим параметрам отличается от известных ранее (Хлыстов и др., 2007). Нефть, всплывающая на водную поверхность озера, проявлялась в виде нефтяных сликов диаметром до 1 м, была идентифицирована как «свежая» не биodeградирующая парафинистая нефть. Проведенное эхолотирование дна района нефтепроявления показало наличие подводной акустической аномалии – факела высотой ~500 м. Район м. Горевой Утес характеризуется как нефте-метановый сип, где наблюдаются выходы газа, нефти и глубинных вод, мигрирующих по коллекторам нижнего сейсмокомплекса (с

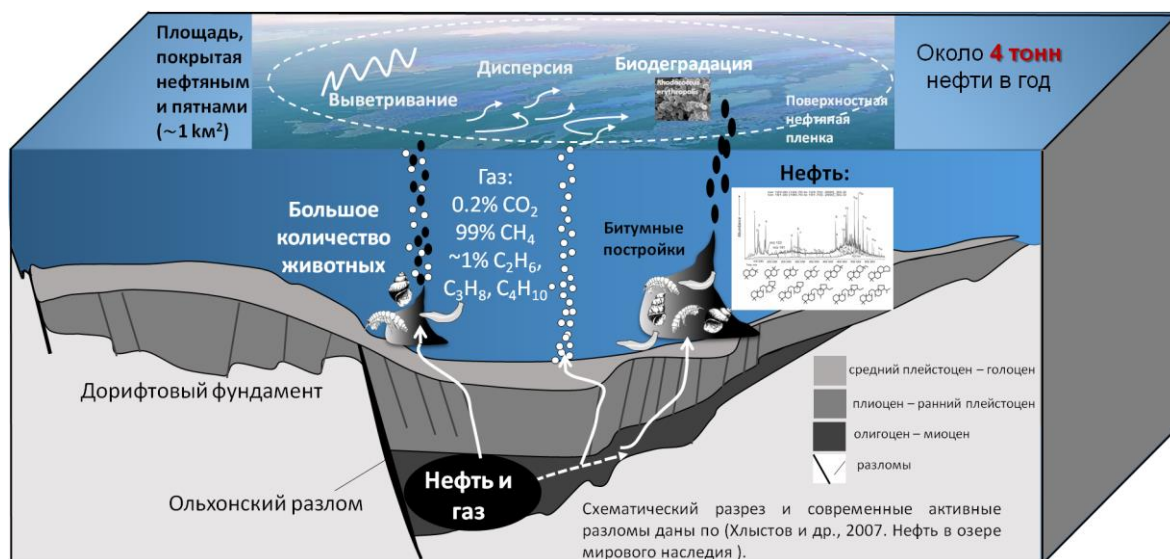
глубины ~4 км) до проницаемой зоны разломов, где в результате вертикальной миграции они поступают на поверхность дна (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007). Нижний сейсмокомплекс соответствует осадкам, образовавшимся в олигоцен-миоцене, так как начало его формирования соответствует первому этапу раскрытия байкальского рифта в олигоцене, а верхняя граница соответствует границе перехода от медленного рифтообразования к быстрому на рубеже миоцена-плиоцена (Хлыстов и др., 2007). Отложения верхней части этого сейсмокомплекса сопоставляются с миоценовыми угленосными отложениями танхойской и халагайских свит, которые известны на восточном побережье южной котловины Байкала и западном берегу о. Ольхон (Зоненшайн и др., 1992; Hutchison et al., 1992; Хатчинсон и др., 1993). Вдоль восточного берега озера осадочный чехол рассечен до фундамента активными в настоящее время сбросами. Очевидно, что нефть, обнаруживаемая на водной поверхности, разгружается в водную толщу вдоль проницаемых зон этих тектонических нарушений. Вполне вероятно, что нефть формируется не непосредственно в осадках района нефтепроявления, а в осадках средней части озера, относящихся к нижнему сейсмокомплексу, где термобарические условия наиболее благоприятны для нефтеобразования (Хлыстов и др., 2007).

Разгрузка нефти происходит каждые 20–30 секунд через битумные постройки, сложенные из парафиновых нефтяных битумов, зачастую имеющие на вершине вертикально стоящую трубку – капельницу. В местах скопления нефти на ровном дне и вблизи построек наблюдалась разгрузка углеводородных газов (УВГ). В составе УВГ 99% приходилось на метан и около 1% на его гомологи. Такое содержание гомологов, выражающееся в необычайно высокой доле пропана по сравнению с этаном, а также высоким содержанием бутана, необычно для современных осадков озера Байкал (Хлыстов и др., 2009) (рис. 15). Битумные постройки плотно заселены бентосными животными (Ситникова и др., 2015), плотность которых на порядок превышала плотность поселения контрольных участков дна, основой пищевой цепи которых являются микроорганизмы, осуществляющие аэробное и анаэробное окисление углеводов (Khlystov et al., 2009; Kadnikov et al., 2013).

Геохимический анализ нефти показал, что источником байкальской нефти является органическое вещество, захороняющееся в пресноводном водоеме (Конторович и др., 2007). В ней наряду с остатками живого вещества озерных организмов значительную роль играло органическое вещество, источником которого были заносимые в водоем остатки высшей наземной растительности. По мнению академика А.Э. Конторовича, возраст нефтематеринских отложений, судя по наличию в нефтях олеанана, не может быть древнее времени появления на суше ангиоспермовых растений, т.е. мелового периода. Все вышеперечисленное существенно отличает байкальские нефти от верхнепротерозойских и кембрийских нефтей Сибирского платформу (Конторович, Стасова, 1978). В том числе нефть



Байкала отличается меньшей концентрацией этил-холестанов, низкой концентрацией трицикланов и сравнительно тяжелым изотопным составом углерода в отличие от древних нефтей, где  $\delta^{13}\text{C}$  лежит в интервале от  $-32$  до  $-35\text{‰}$ .



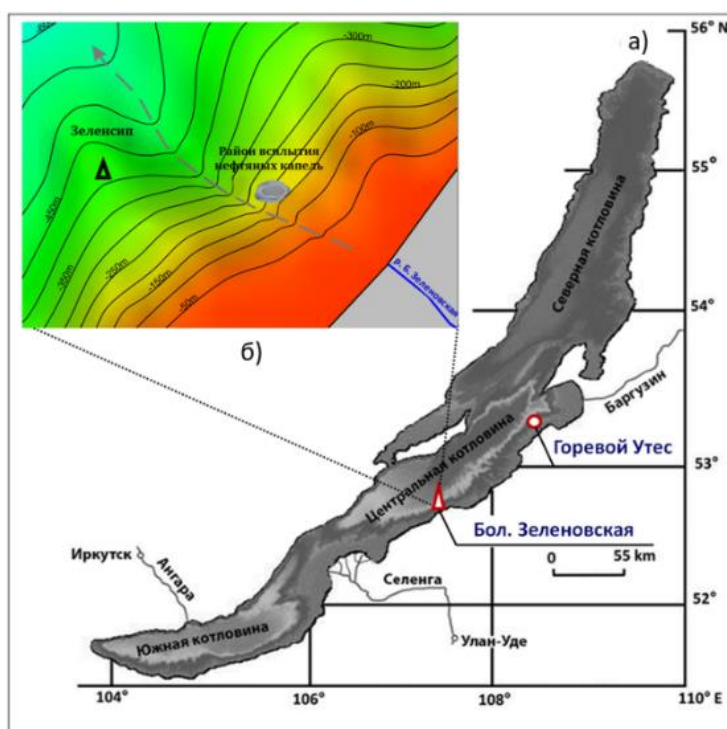
**Рисунок 15.** Схематическое изображение процессов, происходящих в районе естественного нефтепроявления, расположенного у м. Горевой Утес. Схематический разрез и современные активные разломы цитированы по Хлыстов и др., 2007. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

В составе нефти выявлен весь спектр нефтяных углеводородов: *n*-алканы, алкилциклогексаны, изопреноиды (пристан, фитан), полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), гопаны, комплекс уникальных молекул биомаркеров (Каширцев и др., 2006; Gorshkov et al., 2006; Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007). По разнообразному набору молекул-хемофоссилий, сесквитерпанов, стеранов, секогопанов, новых структур гопанов (олеанан, каротаны и т.п.), байкальские нефти могут считаться уникальными. Уникальность нефти обусловлена ее молодым возрастом (олигоцен–миоцен) и специфичностью исходного органического вещества, представляющего смесь компонентов озерного и наземного происхождения (Конторович и др., 2007; Моргунова и др., 2018).

Естественный выход нефти у устья реки Б. Зеленовская, несмотря на свое более длительное существование, остается менее изученным в плане геологического строения донных отложений и рельефа дна в сравнении с нефтепроявлением ГУ. Разгрузка нефти, в виде всплывающих нефтяных капель, обнаруживалась только на водной поверхности напротив устья реки Б. Зеленовская на расстоянии ~ 2 км от береговой линии (рис. 16).

Место выхода нефти на дне долгое время не было установлено. Анализ цифровой модели рельефа дна напротив устья р. Б. Зеленовская выявил подводный каньон, который является продолжением речной долины, склоновые гряды и гребни. Некоторые гребни различной конфигурации, идущие из глубоководных частей озера, могут служить каналами для углеводороднасыщенных флюидов. На перегибах склоновых гряд выявлены небольшие

возвышенности или выравненные участки дна, которые могут служить местом разгрузки нефти (Хлыстов и др., 2022).



**Рисунок 16.** (а) Карта-схема расположения районов нефтепроявлений в оз. Байкал; (б) схема района нефтепроявления напротив устья реки Б. Зеленовская. ○ – район всплытия нефтяных капель; – Δ место расположения нефтегазового сипа; серой линией показано направление подводного каньона. Цитировано по Павлова и др., 2024а.

В 2019 году, в результате проведенных геолого-геофизических работ, в одной из гряд обнаружен гидратоносный сип ЗеленСип (ЗС), характеризующийся разгрузкой газа и накоплением в верхнем слое донных отложений нефти и газовых гидратов (Хлыстов и др., 2022). В 2020 году, опробование донных осадков, проведенное с целью уточнения места разгрузки нефти, выявило следы нефти в кернах, отобранных в стенке каньона, который расположен значительно ближе к месту выхода нефти на водной поверхности, на расстоянии ~ 1 км от всплывающих нефтяных капель. Образцы нефти, собранные как с поверхности озера в районе Большой Зеленовской, так и в верхнем слое донных отложений ЗеленСип представляют собой биodeградированную ароматико-нафтеновую нефть, состоящую из высокомолекулярной битумной фракции (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2022). Метан и этан из осадков и газовых гидратов из этого сипа отнесены к термогенным газам (Хлыстов и др., 2022). В то время как в районе проявления нефтяных капель (БЗ), где разгрузки газа не происходит, в осадках зафиксирован газ микробного происхождения ( $\delta^{13}\text{C}-\text{C}_1 = -71.6 \div -64.3\%$ , среднее =  $-69.63\%$ ;  $\text{C}_1/\text{C}_2 = 17000 \div 109000$ , среднее = 48000) (Калмычков и др., 2019).

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования в работе использовали:

1. Пробы донных осадков для поиска термофильных микроорганизмов: метановый сип Посольская Банка, грязевые вулканы Кукуй, Кедр, Маленький, нефте-метановые сипы Горевой Утес, Зеленсип, фоновые районы Академический хребет, Южный, Северный Байкал (рис. 17, таблица 1).

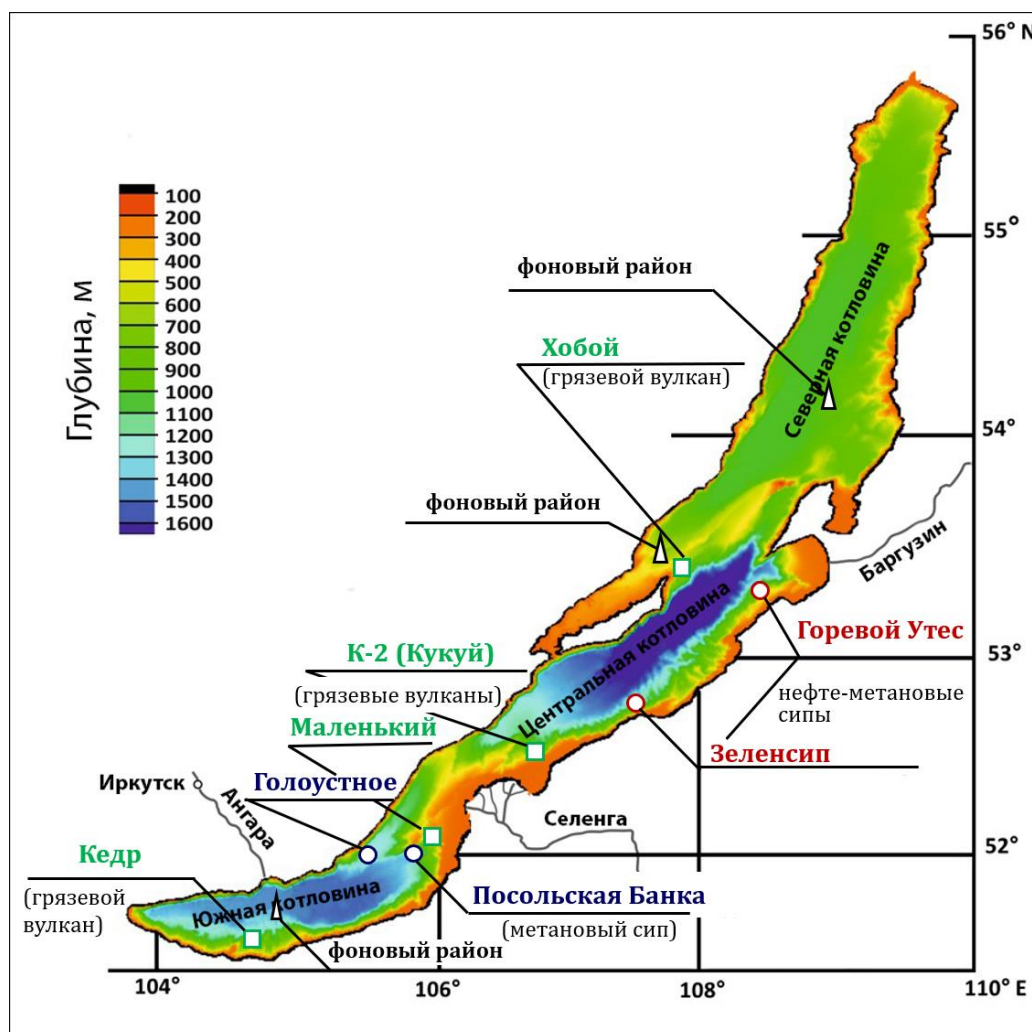


Рисунок 17. Карта – схема районов отбора проб донных осадков.

2. Пробы донных осадков для проведения экспериментов по преобразованию органического вещества в термобарических условиях: метановые сипы Посольская Банка, Голоустное, грязевой вулкан Хобой (Академический хребет);

3. Пробы донных осадков двух районов естественных нефтепроявлений, расположенных у м. Горевой Утес и устья реки Б. Зеленовская, для проведения модельных экспериментов по биодegradации нефти в анаэробных условиях; определения филогенетического разнообразия микробных сообществ в природных осадках и аннотации геномов из метагеномных массивов данных (MAG);

**Таблица 1.** Характеристика донных осадков, используемых для проведения экспериментальных исследований

Исследование / условия инкубации /	Место отбора проб /год / сокращение	Номер керна / глубина осадка, см	Краткая характеристика осадка
Поиск термофильных микроорганизмов / 60°C	Метановый сип Посольская Банка / 2012 / <b>м/с ПБ</b>	St. 6, GC. 4 / 0–2	0–30 см – восстановленный темно-серый диатомовый алевропелитовый ил с примесью алеврита и прослоями гидротроилита; 30–150 см – серая газонасыщенная алевритистая глина; 30–80 см – трещины дегазации; 80–150 см – газовые гидраты (до 97% объемного содержания).
	Грязевой вулкан К-2 / 2013 / <b>г/в К-2</b>	St. 2, GC. 3 / 10–15	0–64 см – восстановленный серый диатомовый алевропелитовый ил, газонасыщенный; 64–146 см – серая глина с прямыми и наклонными слоями газовых гидратов, на глубине 64–67 и 96–105 см газовые гидраты гранулированной формы.
	Нефте-метановый сип Горевой Утес / 2016 / <b>н-м/с ГУ</b>	St. 3, GC. 4 / 15	0–143 см – газонасыщенный алеврито-пелитовый ил, пропитанный нефтью; 143–306 см – глина с вертикальными или слабонаклоненными каналами разгрузок диаметром до 5 мм, трещины скола и дегазации 1–2 мм.
	Академический хребет / 2015 / <b>АХ</b>	St. 3, GC. 4 / 5–10	0–5 см – окисленный слой; 5–320 см – восстановленный серый диатомовый алевропелитовый ил с прослоями гидротроилита.
Термобарическое преобразование органического вещества / 80°C, 5 МПа	Метановый сип Голоустное / 2012 / <b>м/с Гол</b>	St. 5, GC. 2 / 180–200	0–2 см: окисленный слой, с глубины 2 см: восстановленные газонасыщенные осадки содержали гетерогенные, рыхлые и неравномерно увлажненные серо-голубоватые алевропелиты. На глубине 50 см – газовые гидраты.
	Метановый сип Посольская Банка /2012 / <b>м/с ПБ</b>	St. 6, GC. 4 / 60–100	0–30 см: восстановленный темно-серый диатомовый алевропелитовый ил с примесью алеврита и прослоями гидротроилита; 30–150 см: серая газонасыщенная алевритистая глина; 30–80 см: трещины дегазации; 80–150 см: газовые гидраты (до 97% объемного содержания).
	Грязевый вулкан Хобой (Академический хребет) / 2015/ <b>г/в Х</b>	St. 3, GC. 8 / 150–185	Восстановленный рыхлый алевритопелитовый ил серого цвета с многочисленными трещинами дегазации, содержит грязевулканическую брекчию с включениями гидротроилита.

Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал	Метановый сип Посольская Банка /2012/ <b>м/с ПБ</b>	St. 5, GC. 4 /0, 25, 55, 75, 80, 100, 145	Восстановленный с поверхности темно-серый увлажненный алевропелит с примесью алевролита с черными прослоями и пятнами аморфных сульфидов железа (гидротролеита). На глубине 30–80 см – серый алевропелит «творожистой» структуры с многочисленными трещинами дегазации. В слоях 80–150 см присутствовали ГГ, расположенные как отдельными слойками и слоями в алевропелите, так и массивами, занимающими целые интервалы, практически без породы (97% объемного гидратосодержания).
Анаэробное окисление нефти / 10°C	Нефте-метановый сип Горевой Утес / 2018 / <b>н-м/с ГУ</b>	St. 5, GC. 3 / 10–30	Донные осадки керна St.5 GC. 3 представлены в верхнем интервале (от поверхности до 50 см) восстановленным диатомовым алевропелитовым илом с включениями нефти, в среднем интервале (от 50 до 65 см) – обводненным и насыщенным нефтью слоем алевролита, в нижнем (от 120 до 151 см) – серой глиной с множеством нефтяных включений и массивными, слоистыми газовыми гидратами.
		St. 5, GC. 3 / 100–120	
	Нефте-метановый сип Зеленсип / 2020 / <b>н-м/с ЗС</b>	St. 4, GC. 6 / 30–50	Восстановленные с поверхности глины с Eh –146...–216 мВ. Окисленный слой отсутствовал. На глубине 50 и 250 см присутствовали песчаные прослой со следами нефти. Осадки характеризовались низкой газонасыщенностью, концентрация метана составляла 0.08 мг/л осадка на глубине 10 см и 5.2–9.4 мг/л осадка на глубине 50–250 см. Гомологи метана в газе в глубинных слоях осадка представлены этаном в следовых количествах.
		St. 4, GC. 6 / 250–270	
/ 60°C	Нефте-метановый сип Зеленсип / 2021 / <b>н-м/с ЗС</b>	St. 10, GC. 1 / 10–30	Верх керна выдавлен давлением, создающимся в керне при растворении газовых гидратов и утерян. По всей глубине керна (до 227 см) глина алевро-пелитовая оливково-черная с прослоями мелкозернистого песка. На глубинах до 22см и 32–35 см – творожистая, насыщена нефтью и газом; 55–111 см слои газовых гидратов; 75–111см – с нефтью; 111–227 см глина более плотная, насыщена нефтью, с прослоями гидротроилита.
		St. 10, GC. 1 / 140–160	
Метабаркодинговые исследования	Нефте-метановый сип Горевой Утес / <b>н-м/с ГУ</b>	0-10, 10-15, 30-60, 80, 100, 270	Описание кернов приведено выше
	Нефте-метановый сип Зеленсип / <b>н-м/с ЗС</b>	10-30, 30, 50, 100, 200, 250, 300	

	Грязевой вулкан Кедр / <b>г/в КР</b>	0,25, 50, 100, 125, 130, 150, 170, 197	Описание кернов приведено Lomakina et al., 2020, 2023а, б; Bukin et al., 2023
	Грязевой вулкан Кукуй / <b>г/в К</b>	0, 35, 85	
	Грязевой вулкан Маленький / <b>г/в М</b>	0, 25, 40, 70, 80	
	Фоновый район (Южный Байкал) / <b>ЮБ</b>	0, 10, 90, 170	
	Фоновый район (Северный Байкал) / <b>СБ</b>	0, 10, 25, 30	
Реконструирование MAGs	Нефте-метановый сип Зеленсип / <b>н-м/с ЗС</b>	10, 100, 180	Описание кернов приведено выше

5. Пробы воды и донных осадков, отобранные в районах естественных нефтепроявлений для оценки углеводородокисляющей активности микробных сообществ в аэробных условиях (таблица 2);

**Таблица 2.** Характеристики природных образцов, используемых для оценки углеводородокисляющей активности микробных сообществ в аэробных условиях

Район исследования	Годы отбора проб	Характеристика водных образцов; глубина отбора проб из водной толщи	Донные осадки
Естественное нефтепроявление – устье р. Б. Зеленовская	2006 – 2021	нефтяная пленка на поверхности воды; поверхностные образцы свободные от нефтяных slickов; 5, 200, 400, 600, 800 и 860 м.	в соответствии с отбором проб из водной толщи
Естественное нефтепроявление – м. Горевой Утес			

6. Чистые культуры аэробных бактерий, выделенные из образцов воды и донных отложений из районов нефтепроявлений, тестируемые на способность синтезировать биосурфактанты в сопоставлении с наличием в их геноме *alk*-генов;

7. Чистая культура *Rhodococcus erythropolis* (4-08), используемая в качестве тест-объекта для применения «протатранов А» в качестве стимуляторов роста. Культура предоставлена к.б.н. Лихошвай А.В.

8. Пробы воды для изучения филогенетического разнообразия прокариот в горячих источниках (Котельниковский, Давшинский, Хакусский, Змеиный) (рис. 18, таблица 3).



**Рисунок 18.** Карта – схема районов отбора проб воды в горячих источниках. Цитировано по Павлова и др., 2024б.

Котельниковский источник – единственный установленный выход горячих вод на западном побережье оз. Байкал. Термальная вода вытекает в тальвеге оврагообразного понижения, выработанного источником. Коренные породы, представленные метаморфическими образованиями, обнажены в 1 км к западу от источника (Борисенко, Замана, 1978). В настоящее время место излива источника Котельниковский каптировано скважиной и находится в помещении (Кот\_1), после выхода на поверхность источник формирует естественный пруд (Кот\_2) и далее впадает в Байкал (Кот\_3).

Давшинский источник находится в устье р. Давши, на территории Баргузинского заповедника. Он приурочен к зоне разлома в гранитах витимского комплекса, перекрытого чехлом аллювиальных отложений байкальской террасы (Голубев, 1982). Вода источника Давшинский также каптирована скважиной (Д\_1). После выхода на поверхность, источник протекает на небольшой территории и заканчивается прудом (Д\_2).

Хакусский источник расположен в бухте Хакусы на северо-восточном побережье оз. Байкал, в 210 м от его берега. Он имеет три головки в чашеобразном углублении размытого террасированного уступа. Наличие в районе источника мощного чехла рыхлых образований способствует интенсивному разбавлению минеральных вод пресными, о чем свидетельствует высокая концентрация кислорода в газовом составе гидротермы (Борисенко, Замана, 1978). Пробы отобраны в двух источниках: Хак\_1 и Хак\_2.

Змеиный источник находится на полуострове Святой нос на западном берегу Чивыркуйского залива, в бухте Змеиной. Расположен на поверхности террасы, которая тянется неширокой полосой вдоль склона. Разгрузка горячих вод Змеиногo источника приурочена к зоне разлома в гранитовых гнейсах (Борисенко, Замана, 1978). Пробы отобраны в трех местах: большая ванна (Зм\_1), малая ванна (Зм\_2) и устье источника Змеиный (Зм\_3).

По температурному режиму источники Котельниковский, Хакусы и Змеиный (большая ванна) относятся к гипертермальным, Давшинский – к термальным (Голубев, 2007). Источники Котельниковский и Давшинский относятся к термам кульдурского типа, для которых характерно высокое содержание фтора с доминированием натрия среди катионов. В составе свободных и растворенных газов преобладает азот. При этом для Давшинского источника газ более, чем на 99% состоит из азота (Ломоносов, 1974). В отличие от азотных терм других горных районов земного шара, в азотных термах Байкальской рифтовой зоны (БРЗ) мало хлорид-иона. Кроме того, азотные термы характеризуются высоким содержанием кремнекислоты (Ломоносов, 1974).



**Таблица 3.** Физико-химические параметры в термальных источниках

Источник	T, °C	pH	Eh, mV	H <sub>2</sub> S, мг/л	O <sub>2</sub> , мг/л	Тип вод, дебит (Байкал. Атлас. 1993)	Условные обозначения
<b>Котельниковский</b>							
Излив	77.5	9.2	-137	6 (Компанцева Горленко, 1988)	0	Фторидно-гидрокарбонатная натриевая, 10 л/с	Кот_1
Пруд	59	9.2	-110	н.д.*	2.8		Кот_2
Устье	32	9.5	-120	н.д.	14.2		Кот_3
<b>Давшинский</b>							
Излив	37.5	9.2	-66.7	н.д.	8.7	Сульфатная натриевая вода, 1.2 л/с	Д_1
Пруд	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		Д_2
<b>Хакусский</b>							
Излив	44.8	8.5	+58.7	0	3.7	Радоновая содовая вода, 4000 л/с	Хак_1
Излив	24	7.8	+107	0	10.2		Хак_2
<b>Змеиный</b>							
Большая ванна	42.6	9.4	-441	33.04	0	Гидрокарбонатно-сульфатная натриевая, 0.2 л/с	Зм_1
Малая ванна	39.0	9.2	-443	33.04	0		Зм_2
Устье	18.8	8.5	-230	0,7	8.25		Зм_3

\* н.д. – нет данных

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Отбор проб воды и донных осадков

Отбор проб воды проводили системой батометров SBE 32 Carousel Water Sampler. Нефть с водной поверхности, для количественного определения *n*-алканов и ПАУ в водной толще, отбирали с помощью стерильного стакана в стеклянные бутылки объемом 1 дм<sup>3</sup>. К каждой пробе воды добавляли 50 см<sup>3</sup> хлористого метилена, смесь встряхивали и закрывали пробкой с прокладкой алюминиевой фольги, хранили до анализа при +5°C. Отбор проб для микробиологического анализа проводили в стерильные флаконы.

Пробы донных осадков отбирали с помощью либо бентосной трубки, либо гравитационной трубы с пластиковым вкладышем с борта НИС «Г.Ю. Верещагин». Полученные керны разрезали вдоль на две половины, одну из которых использовали для асептического отбора проб для микробиологических и молекулярно-генетических исследований, другую для определения химического состава поровых вод. Донные отложения, предназначенные для выделения ДНК после отбора гомогенизировали, упаковывали в стерильную фольгу и помещали в жидкий азот, до момента их анализа в лаборатории. Постановку накопительных культур и подготовку образцов к химическому анализу поровых вод выполняли на судне.

**2.2.2. Физико-химические методы исследования** проведены на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН, ЦКП «Ультрамикрoанализ».

**Измерение концентраций углеводородных газов** в донных осадках и экспериментальных флаконах проводили методом фазово-равновесной дегазации (Head-Space Technique) (Большаков, Егоров, 1987). Анализ метана в газовой фазе проводили на хроматографе «ЭХО-ПИД» (пламенно-ионизационный детектор, 2-х метровая насадочная колонка с внутренним диаметром 2 мм, сорбент – Porapak, режим изотермический, T=100°C). Объем газа для анализа составлял 0.03–0.05 мл (объем иглы хроматографического шприца). Относительная погрешность измерений 2%.

Расчет концентраций углеводородных газов во флаконах с накопительными культурами осуществляли по формуле:

$$C = \left( \frac{S_1 \times C_{st} \times V_1 \times \rho^*}{100\% \times S_{st} \times M} \right) \div V_2, \quad (1)$$

где C – концентрация определяемого газа, ммоль/дм<sup>3</sup>; S<sub>1</sub> – площадь пика определяемого газа в пробе; C<sub>st</sub> – концентрация определяемого газа в стандартной пробе, %; V<sub>1</sub> – объем газовой фазы во флаконе, дм<sup>3</sup>; ρ\* – плотность определяемого газа при 0°C и атмосферном давлении 720 мм.рт.ст., г/дм<sup>3</sup>; S<sub>st</sub> – площадь пика определяемого газа в стандартной пробе; M – молярная масса определяемого газа, г/ммоль; V<sub>2</sub> – объем жидкой среды во флаконе, дм<sup>3</sup>.

Пробы осадка для анализа химического состава поровых вод отбирались из кернов с шагом 5–30 см. Поровые воды отжимались путем последовательного центрифугирования образцов при 10000 g, а затем при 14000 g и хранились при 4°C до момента анализа. Измерения концентрации анионов в поровых водах проводили методом жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром А-02 (ЭКОНОВА, Россия) (Погодаева и др., 2007; Pogodaeva et al., 2017). В качестве носителя использовали гидрофталаат калия. Относительная погрешность измерений 5–7% (до 10% для хлоридов; Барам и др., 1999). Содержания катионов определяли методами атомной адсорбции (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) и атомной эмиссии (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) с использованием атомно-адсорбционного спектрометра ААС-30 (ZEISS, Германия) (Фомин, 2000). Относительная погрешность измерений 3–5%. Отклонение в ионном балансе не превышали 5–7%.

**Концентрацию нитратов, нитритов и сульфатов** в накопительных культурах измеряли на ионном хроматографе Stayer (Аквилон, Россия), оснащенный колонкой IonPack AS22 (Dionex, США) и детектором проводимости. Аммоний определяли фенол-гипохлоритной реакцией (Chaney, 1962).

**Концентрацию сероводорода** в накопительных культурах определяли согласно (Cline, 1969).

**Анализ состава жирных кислот** у чистых культур микроорганизмов определяли методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-спектрометрическим детектированием (МСД) и пламенно-ионизационным детектированием в соответствии с (Никонова и др., 2020). Качественный анализ метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) методом ГХ-МСД проводился с использованием системы ГХ Agilent 6890В, соединенной с масс-спектрометром 7000С GC/MS Triple Quad (Agilent, США). Количественный анализ МЭЖК методом ГХ-МСД проводился с использованием газового хроматографа Shimadzu GC-2010-Plus (Shimadzu, Япония). Хроматографические пики были обнаружены в диапазоне  $m/z$  40-500. МЭЖК были идентифицированы на основе времени удерживания и их масс-спектров с помощью программы NIST Mass Spectral Search Program для программного обеспечения NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (V.2.2). Инжекция 2 мкл образца в колонку проводилась в режиме splitless с использованием колонки Optima-17MS GC (30 м × 0,25 мм, SGE Macherey-Nagel, Германия). Количественное определение МЭЖК проводилось путем добавления 50 мкл раствора внутреннего стандарта ди-*n*-децилового эфира (C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>O) в *n*-гексане (1 мг/мл) к экстрактам МЭЖК. Для калибровочной функции ΣМЭЖК использовали МЭЖК Mix, C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> (Supelco, США). Кроме индивидуальных значений к МЭЖК были рассчитаны средние значения к насыщенным и мононенасыщенным эфирам жирных кислот для определения некоторых эфиров жирных кислот, отсутствующих в стандартных смесях и растворах.

**Нормальные углеводороды и ПАУ в пробах из водной толщи** определяли жидко-жидкостной экстракцией в хлористый метилен. Перед экстракцией к пробам воды добавляли 100 мм<sup>3</sup> раствора ПАУ (смесь нафталина-d<sub>8</sub>, аценафтена-d<sub>10</sub>, фенантрена-d<sub>10</sub>, хризена-d<sub>12</sub>, перилена-d<sub>12</sub>) в ацетонитриле с концентрацией 5 нг/мм<sup>3</sup> каждого полиарена и 200 мм<sup>3</sup> раствора сквалана в хлористом метиле с концентрацией 0.332 мкг/мм<sup>3</sup>. Смесь встряхивали, переносили в делительную воронку объемом 1 дм<sup>3</sup>, затем добавляли 30 см<sup>3</sup> хлористого метилена и встряхивали в течение 3 мин. После расслоения фаз нижний слой хлористого метилена отбирали и экстракцию повторяли новой порцией 30 см<sup>3</sup> экстрагента, экстракты объединяли и концентрировали до объема ~1 см<sup>3</sup>. К концентратам добавляли Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (прокаленный, хч), смесь встряхивали, центрифугировали, супернатант отделяли и переносили во флаконы автодозатора хромато-масс-спектрометра (Gorshkov, Pavlova et al., 2020a).

**Для определения *n*-алканов и ПАУ в донных осадках**, образцы кернa высушивали при комнатной температуре до постоянного веса, измельчали в ступке до размера частиц менее 0.74 мкм. Затем способом квартования отбирали две навески с массой 2–3 г, к которым добавляли растворы внутренних стандартов 25 мм<sup>3</sup> раствора ПАУ и 50 мм<sup>3</sup> раствора сквалана. ПАУ и *n*-алканы экстрагировали 15 см<sup>3</sup> хлористого метилена в ультразвуковой ванне дважды

по 20 мин. Экстракты объединяли и центрифугировали, супернатант отделяли и концентрировали до объема  $\sim 1 \text{ см}^3$  и переносили во флаконы автодозатора хромато-масс-спектрометра (Gorshkov, Pavlova et al., 2020a).

Подготовленные образцы анализировали на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890B GC System 7000C GC-MS Triple Quad с капиллярной колонкой OPTIMA®–17 ms ( $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$ ) в режиме программирования температуры колонки от 50 до 310°C со скоростью нагрева 20°C/мин и с выдерживаем колонки в финальной части при температуре 310°C в течение 35 мин. Температура инжектора 280°C; температура источника 230°C; энергия ионизации 70 эВ. Для определения *n*-алканов и ПАУ в колонку хроматографа в режиме без деления потока вводили  $2 \text{ мм}^3$  образца. Пики аналитов и внутренних стандартов регистрировали в режиме выбранных ионов с  $m/z$ : 51 и 74 (*n*-алканы), 128, 136, 142, 152, 154, 164, 166, 178, 188, 202, 228, 240, 252, 264, 276 и 278 (ПАУ); и идентифицировали по относительным временам удерживания (Gorshkov, Pavlova et al., 2020a).

**Определение *n*-алканов и ПАУ в модельных экспериментах.** Образцы, отобранные в ходе модельных экспериментов, представляли собой гетерогенные смеси, включающие водную минеральную среду, донные отложения и добавки сырой нефти. Убыль *n*-алканов и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в условиях экспериментов оценивали во всем объеме экспериментальной среды (осадок и культуральная жидкость). Перед анализом образцы центрифугировали; водную фракцию отделяли от осадка гетерогенной смеси. Перед определением *n*-алканов и ПАУ, 20–100 мкл сквалана (в дихлорметане, 0.60–30 мкг/мкл), 30–200 мкл смеси дейтерированных полициклических ароматических углеводородов: нафталин- $d_8$ , аценафтен- $d_{10}$ , фенантрен- $d_{10}$ , хризен- $d_{12}$  и перилен- $d_{12}$  (в смеси *n*-гексан-ацетон (1:1); 5-600 нг/мкл; Supelco, США), добавляли к водной фракции и осадку гетерогенной смеси проб в качестве внутренних стандартов. Объем добавляемых стандартов определялся ожидаемым содержанием углеводородов в образце.

При определении *n*-алканов из водной фазы углеводороды дважды экстрагировали дихлорметаном, экстракты объединяли, и общий экстракт (9 мл) центрифугировали в течение 3 минут при 2000 об/мин. Затем безводный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  добавляли к  $\sim 1$  мл аликвоте экстракта, смесь встряхивали и центрифугировали, а надосадочную жидкость переносили в пробирку автодозатора хроматографа. Углеводороды извлекали из осадка гетерогенной смеси путем ультразвуковой (35 кГц) экстракции 5 мл дихлорметана в течение 15 минут. Экстракт отделяли центрифугированием при 3000 об/мин, безводный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  добавляли к  $\sim 1$  мл аликвоты экстракта, смесь встряхивали и центрифугировали, а надосадочную жидкость переносили в пробирку автодозатора хроматографа. Для определения ПАУ к аликвотам полученных экстрактов добавляли 1 мл *n*-гексана; смесь встряхивали, оставляли на  $\sim 24$  часа при

температуре +4°C и затем центрифугировали. Верхний слой *n*-гексана отделяли, добавляли безводный Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, смесь встряхивали и центрифугировали, надосадочную жидкость переносили в пробирку автосамплера хроматографа. Результаты определения аналитов в водной и в твердой фазах пробы суммировали и представляли в виде суммарного содержания в образцах, отобранных в ходе модельного эксперимента (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024).

Подготовленные образцы анализировали методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии как описано выше. Средние показатели извлечения *n*-алканов и ПАУ составляли 85%. Погрешность определения не превышала 15%.

### 2.2.3. Микроскопия

Морфологию микроорганизмов изучали с помощью методов трансмиссионной, сканирующей электронной и световой микроскопии на базе ЦКП «Ультрамикродиагностика» Лимнологического института СО РАН. Для трансмиссионной электронной микроскопии образцы суспендировали в стерильной воде, суспензию наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, и высушивали. Полученные препараты просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе Leo 906E («Zeiss», Германия).

Для сканирующей электронной микроскопии суспензию клеток фиксировали 4% раствором параформальдегида в 0.066 М буфере Соренсена при комнатной температуре в течение ночи. Далее клетки отфильтровывали на поликарбонатные фильтры (диаметр пор 0.2 мкм) и проводили обезвоживание в серии растворов этанола (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) и ацетоне (100%). Затем проводили сушку в критической точке на приборе CPD 030 Critical Point Dryer (BALZERS, Лихтенштейн). Фильтры помещали на алюминиевые столики и напыляли золотом на установке SCD 004 (BalzersUnion, Лихтенштейн). Препараты просматривали с помощью сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 (FEI Company, США) с ускоряющим напряжением в 20 киловольт.

Для изучения морфологии микроорганизмов методом эпифлуоресцентной микроскопии к препарату, обезвоженному в серии растворов этанола, добавляли рабочий раствор флуорохромного красителя 4,6-диамино-2-фенилиндола (ДАФИ) до конечной концентрации 0.5 мкг/мл, выдерживали 3 мин. Исследование проводили с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 («Zeiss»). Для изучения морфологии микроорганизмов методом световой микроскопии препарат окрашивали по методу Грама. Исследование проводили с помощью микроскопа Axio Imager M1, Zeiss, Germany.

#### 2.2.4. Методы исследования термофильных микроорганизмов в донных осадках оз. Байкал

Для получения накопительных культур образцы донных осадков (10 см<sup>3</sup>) асептически отбирали из центральной части керна и сразу помещали во флаконы объемом 116 мл, содержащие 30 мл стерильной бескислородной минеральной среды (БМС) следующего состава (г/л): NaCl – 0.3; NH<sub>4</sub>Cl – 0.33; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.33; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O – 0.33; CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 0.33; NaHCO<sub>3</sub> – 1; резазурин – 0.001; Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O – 0.3; дрожжевой экстракт – 1; 1 мл раствора витаминов, 1 мл раствора микроэлементов (Практикум..., 2005) и газовую смесь H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20). Конечный pH среды составлял 7.0. Инкубацию проводили в темноте при температуре 60°C без перемешивания (Павлова и др., 2019б).

**Изучение филогенетического разнообразия прокариот в горячих источниках.** Полученные образцы воды (5 л) фильтровали на нитроцеллюлозные фильтры (диаметр 25 мм, размер пор 0.2 мкм; Millipore, Германия) с использованием перистальтического насоса. Каждый фильтр помещали в TE-буфер (10 mM Трис-HCl, pH 7.4; 1 mM ЭДТА, pH 8.0) и замораживали при –20°C для транспортировки в лабораторию (Павлова и др., 2024б).

**Получение чистых культур термофильных бактерий.** Выделение *Thermaerobacter* sp. PB12/4term проводили на среде БМС, состав которой указан выше. 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). (Pavlova et al., 2023).

Для морфологической характеристики штамм PB12/4term культивировали как в аэробных, так и анаэробных условия на средах БМС и АМС соответственно. Морфологию микроорганизмов изучали методами просвечивающей, сканирующей электронной и световой микроскопии.

Влияние температуры, pH и солености на рост штамма PB12/4term изучали на АМС. Оптимальную температуру роста определяли с помощью градиентного термостата Binder BD 53 с диапазоном температур от 30 до 100°C с шагом 5°C. Влияние концентраций NaCl тестировали в диапазоне 0–15 г/л, добавляя различные концентрации NaCl в среду, его не содержащую. Диапазон pH для роста определяли с помощью портативного pH-метра WTW «pH 3310» (Германия). pH регулировали исходными растворами HCl (0.6 н.) и NaOH (10%).

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  $\text{CO}_2$  на рост штамма PB12/4term, изолят культивировали на среде БМС, не содержащей дрожжевой экстракт. Тестировали молекулярный водород в качестве донора электронов,  $\text{S}^0$  (5 г/л),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$  (1 г/л каждого),  $\text{O}_2$  (1–20% о/о) в качестве акцепторов электронов и  $\text{CO}_2$  как источник углерода.

Для изучения влияния концентрации  $\text{CO}_2$  на рост штамма PB12/4term в БМС добавляли  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (1 г/л) в качестве акцептора электронов. Газовую фазу заменяли необходимыми количествами  $\text{H}_2:\text{CO}_2$  (60:40, 80:20, 95:5, 98:2 или 99:1) (Steffens et al., 2021). Культивирование проводили при 60°C без перемешивания.

Гетеротрофный рост в анаэробных условиях определяли в БМС без добавления  $\text{NaHCO}_3$  в атмосфере азота. В качестве акцепторов электронов использовали  $\text{NaNO}_3$  (10 мМ),  $\text{NaNO}_2$  (2,5 мМ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (14 мМ),  $\text{S}^0$  и  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (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). Штамм *Thermaerobacter* sp. PB12/4term депонирован в коллекцию ВКМ (=VKM B–3151).

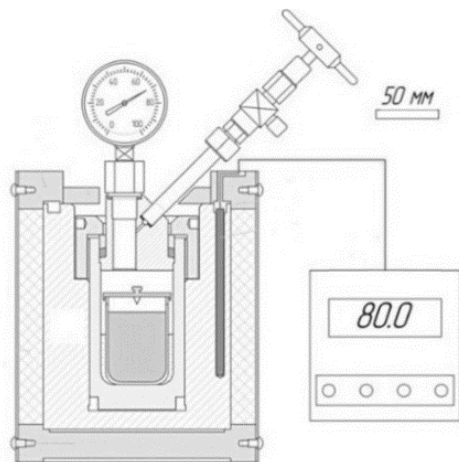
Выделение штамма PB15/Grf7geo проводили на модифицированной среде Видделя для пресноводных форм (МВПФ) (Kojima, Fukui, 2010) следующего состава (г/л):  $\text{NaCl}$  – 0.25,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.1,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.2,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{NaHCO}_3$  – 1, дрожжевой экстракт – 0.5, ацетат натрия – 1, лактат натрия – 14 мМ,  $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$  – 2.5 мМ, 1 мл раствора витаминов, 1 мл раствора микроэлементов (Практикум..., 2005), 1 мл раствора селенита-вольфрамата, газовая смесь  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (80:20). Модификация заключалась в пониженном содержании солей, исключении сульфата и включении  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (10 мМ) и  $\text{KNO}_3$  (20 мМ). В качестве восстановителя использовали сульфид натрия (2.5 мМ). Конечный pH среды составлял 7.0. Культивирование проводили при температуре 60°C без перемешивания. Получение чистой культуры PB15/Grf7geo вели путем последовательных пересевов с последующим выделением колоний на твердой среде того же состава с добавлением агара – 15 г/л. После получения чистой культуры PB15/Grf7geo и определения ее таксономической принадлежности культивирование проводили на среде следующего состава (г/л): В дальнейшем культуры поддерживали на модифицированной среде Луриа-Бертани (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; триптон или пептон – 1.0; агар – 10; гелрит – 4 (Gelrite, Duchefa Biochemie).

Влияние солености на рост штамма определяли, используя МВПФ, добавляя NaCl в концентрации от 0 до 15 г/л при фоновом содержании  $\text{NaHCO}_3$  1 г/л. Определение температуры, оптимальной для роста штамма, проводили с использованием градиентного термостата Binder BD 53 в диапазоне температур от 30 до 100°C. Значения pH для роста штамма PB15/Grf7geo определяли на МВПФ без хлорида натрия, выравнивали молярность по натрию с помощью бикарбоната натрия. Результат снимали через 3 суток инкубации в термостате при 60°C. Исследование физиолого-биохимических характеристик штамма проводили согласно (Logan et al., 2009). Спектр углеводного питания выявляли с использованием диагностических сред Гисса. Органические кислоты, сахара или пептиды добавляли в концентрации 3 г/л, спирты – 5 мл/л. Посевы инкубировали при 60°C. Все исследования проведены в 2-х повторностях.

## **2.2.5. Методы исследования процессов образования углеводов в осадочной толще оз. Байкал**

### **2.2.5.1. Преобразование органического вещества в термобарических условиях**

Экспериментальную инкубацию образцов донных осадков оз. Байкал проводили в камерах высокого давления (КВД), разработанных в Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, позволяющие воспроизвести условия, характерные для тектонически активной зоны озера Байкал (80°C, 5 МПа) (рис. 19).



**Рисунок 19.** Схема КВД с загруженным образцом. Цитировано по Manakov, Pavlova et al., 2019.

Подробное описание разработанного оборудования (комплект автоклавов и печей, предназначенный для выполнения длительных экспериментов по культивированию микроорганизмов, с максимальными значениями давления – до 20 МПа и температуре до +150°C) приведено в статье Манакова А.Ю. с соавторами (Manakov, Pavlova et al., 2019). После отбора проб, гомогенизированный осадок делили на три части: (1) – использовали для проведения химического анализа и определения состава микробного сообщества до постановки эксперимента, (2) – вторую часть осадка использовали в качестве отрицательного



микробиологического контроля (стерилизация автоклавированием при 135°C в течении 40 минут), (3) – использовали непосредственно в эксперименте.

До постановки эксперимента образцы хранили в жидком азоте с момента отбора проб. При постановке эксперимента образцы помещали в стерильный стеклянный стакан объемом 100 мл. Для насыщения образца водой, сверху укладывается слой битого льда, приготовленного из байкальской стерильной воды, объемом примерно 1/4 от объема образца. В качестве дополнительного органического вещества в образцы донных осадков оз. Байкал, отобранных для проведения экспериментов добавляли биомассу диатомовой водоросли *Ulnaria acus* (ранее *Synedra acus*), которая входит в состав доминирующих видов фитопланктона оз. Байкал, вносит существенный вклад в пищевые сети и круговорот кремния, а также является биостратиграфическим маркером байкальской палеолетописи плейстоцена и голоцена (Grachev et al., 1998). Ее аксеничная культура любезно предоставлена отделом Ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН (Shishlyannikov et al., 2011).

Стакан с осадком и диатомеями закрывали тефлоновой крышкой, переносили в автоклав (общий объем 150 мл), и выдерживали 5 часов при комнатной температуре. После размораживания осадка и льда, автоклавы продували газовой смесью  $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$  или  $\text{CH}_4$ , и доводили давление газовой фазы до 4.2 МПа. Используемые газы были простерилизованы фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0.2 мкм (Millipore, США). После этого автоклавы помещали в термостаты с температурой 80°C где, в результате нагревания, давление в них возрастало до 5 МПа. Длительность экспозиции образцов при заданных температуре и давлении составляла от 7 до 17 месяцев. После вскрытия КВД, осадки в них гомогенизировали, после чего 95 г каждой пробы замораживали в жидком азоте с целью последующего их использования для выделения суммарной ДНК (20 г) и определения изменений в содержании и составе органического вещества методом газового хромато-масс-спектрометрического анализа (75 г). Оставшиеся 5 г каждой пробы суспендировали в стерильной воде и использовали для микроскопического анализа (Pavlova et al., 2016; Bukin, Pavlova et al., 2016; Павлова и др., 2019а).

**Состав и распределение углеводов мальтеновой части** в предварительно полученном хлороформном экстракте из образцов донных отложений до начала (с учетом дополнительно вносимых органических субстратов) и в конце эксперимента исследовали хромато-масс-спектрометрическим методом. При подготовке к исследованию  $\text{C}_{\text{орг}}$  образцы осадка высушивали, измельчали до состояния порошка с частицами, не превышающими в диаметре 0.25 мм, и обрабатывали 10% раствором соляной кислоты. Концентрацию  $\text{C}_{\text{орг}}$  устанавливали с помощью экспресс анализатора углерода АН-7529 (ГЗИП, Беларусь) методом сжигания полученных проб в токе кислорода при температуре 1000–1100°C.

Выделение растворимой фракции органического вещества и определение молекулярных биомаркеров проводили согласно методике Каширцева В.А. с соавторами (Каширцев и др., 2001). Битумоиды экстрагировали хлороформом при комнатной температуре. Мальтеновую фракцию битумоидов выделяли путем осаждения асфальтенов избытком петролейного эфира и разделяли на хроматографических колонках на метаново-нафтенновые и нафтенново-ароматические фракции углеводороды (УВ), бензольные и спирто-бензольные смолы. Анализ состава полученных фракций проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии на системе, включающей газовый хроматограф Agilent 6890 (США) и масс-спектрометр Agilent 5973N (США) с капиллярной колонкой Agilent HP-5MS (30 м x 0.25 мм внутренний диаметр; США). Ввод проб осуществлялся без деления. Идентификацию индивидуальных углеводородов проводили поиском по библиотеке NIST-05.

#### **2.2.5.2. Образование углеводородных газов**

Эксперимент проводили во флаконах, содержащих бикарбонатную среду Пфеннига (Widdel, Pfennig, 1982) следующего состава (г/л): NaCl – 0.3; NH<sub>4</sub>Cl – 0.33; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.33; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O – 0.33; CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 0.33; NaHCO<sub>3</sub> – 1; резазурин – 0.001; 1 мл раствора витаминов и 1 мл раствора микроэлементов (Практикум..., 2005). Во флаконы объемом 15 мл, содержащие 10 мл среды, вносили 1 см<sup>3</sup> пробы донных осадков. При приготовлении сред и растворов условия строгой анаэробности достигались кипячением сред, заменой газовой фазы на азот, добавлением редуцирующих агентов (Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O – 0.5 г/л). Для изучения способности микробного сообщества образовывать углеводородные газы по ацетатному пути, в основную среду вносили ацетат натрия в количестве 2 г/л. Для накопления и выделения литотрофных метаногенов газовая фаза в сосудах для культивирования заменялась на смесь H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20). Флаконы инкубировали при температуре 4°C в течение 3-х месяцев (Павлова и др., 2016). Накопительные культуры метаногенных архей получали в жидкой среде Пфеннига, указанного выше состава, с использованием анаэробной техники Хангейта (Hungate, 1969) и метода последовательных разведений (Практикум..., 2005).

#### **2.2.6. Методы изучения анаэробных процессов окисления нефти**

Для получения накопительных культур, образцы донных осадков асептически отбирали из центральной части керна и сразу помещали во флаконы объемом 116 мл, содержащие 50 мл стерильной анаэробной минеральной среды следующего состава (г/л): NaCl – 0.25, KCl – 0.1, NH<sub>4</sub>Cl – 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.1, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O – 0.2, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 0.1, NaHCO<sub>3</sub> – 1, Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O – 0.5 мМ, резазурин – 0.001, раствор витаминов – 1 мл, раствор микроэлементов по Пфеннигу (Практикум..., 2005) – 1 мл. Флаконы закрывали резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками, продували очищенным от кислорода азотом и встряхивали 15 минут при 160–180

grm на орбитальном шейкере (OS-20, BioSan, Рига, Латвия). Полученную суспензию с помощью шприца переносили во флаконы с минеральной средой указанного выше состава, содержащей различные акцепторы электронов:  $\text{H}_2:\text{CO}_2$  (80:10 об.);  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (20 ммоль), газовая фаза  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (90:10 об.);  $\text{NaNO}_3$  (2.3 ммоль), газовая фаза  $\text{N}_2$  (100% об.). Аморфный оксид Fe(III) (10 ммоль), полученный согласно (Slobodkin et al., 1997), вносили в минеральную среду, не содержащую восстанавливающих агентов, газовая фаза  $\text{CO}_2$  (100% об.). В результате получено 16 накопительных культур (табл. 4).

**Таблица 4.** Условные обозначения полученных накопительных культур и условия культивирования

Район отбора проб	Глубина отбора проб донных осадков / условное обозначение	Температура культивирования, °C	Акцептор электронов			
			$\text{H}_2:\text{CO}_2$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{NO}_3^-$	$\text{Fe}^{3+}$
Горевой Утес	St. 5, GC. 3, 10–30 / GUI	10	GUI_ $\text{HCO}_3$	GUI_ $\text{SO}_4$		
	St. 5, GC. 3, 100–120 / GUII		GUII_ $\text{HCO}_3$	GUII_ $\text{SO}_4$		
Б. Зеленовская	St. 4, GC. 6, 30–50 см / K1 БЗ		K1_ $\text{HCO}_3$	K1_ $\text{SO}_4$	K1_ $\text{NO}_3$	K1_ Fe
	St. 4, GC. 6, 250–270 см / K2 БЗ		K2_ $\text{HCO}_3$	K2_ $\text{SO}_4$	K2_ $\text{NO}_3$	K2_ Fe
Б.Зеленовская	St. 10, GC. 1, 10–30 см / T1 БЗ	60	T1_ $\text{HCO}_3$	T1_ $\text{SO}_4$		
	St. 10, GC. 1, 140–160 см / T2 БЗ		T2_ $\text{HCO}_3$	T2_ $\text{SO}_4$		

В качестве источника углерода использовали 50 мкл (38 мг,  $\rho = 760$  мкг/мкл) нефти (Ангарская нефтехимическая компания, Россия), стерилизованной фильтрованием через фильтр-насадку (0.2 мкм, Minisart, Sartorius Stedim). Эксперименты проводили в трех повторностях при температуре 10°C и 60°C в темноте без перемешивания. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду с нефтью без добавления проб осадков (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024a).

### 2.2.7. Методы изучения аэробных процессов окисления нефти

**Учет численности культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов (УВОМ),** получение чистых культур УВОМ проводили на агаризованной среде Бушнелла-Хасса (Bushnell, Haas, 1941) следующего состава, г/л:  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.2$ ;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0.02$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.0$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 1.0$ ;  $\text{KNO}_3 - 1.0$ ;  $\text{FeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.05$ ; pH 7.0 с добавлением на поверхность агаризованной среды 70 мкл сырой нефти или *n*-алканов  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$  и  $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ . Сырую нефть (АНХК, г. Ангарск) и реактивы *n*-алканов стерилизовали фильтрованием через

фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и хранили в стерильных флаконах. Органотрофные бактерии определяли на рыбо-пептонном агаре, разбавленном в десять раз. Посевы инкубировали при 10°C в течение 7 дней.

**Активность сообщества байкальских микроорганизмов в процессе деградации нефти, определяемую по убыли *n*-алканов,** оценивали путем культивирования в байкальской воде, в которую добавляли нефть в количествах от 1.3 до 7.2 мг/100 мл. Пробы воды отбирали с водной поверхности в районе нефтепроявлений у м. Горевой Утес – в зоне нефтяного пятна и за его пределами, на фоновой станции Баргузинский залив (около 15 км от нефтепроявления). При культивировании в экспериментальные колбы (объем 250 мл) с 100 мл байкальской воды добавляли 25, 50, 100, 125 мкл стерильной нефти (месторождение Югринское, Западная Сибирь), содержащей 13, 25, 55, 72 нг/мкл *n*-алканов соответственно (три колбы для каждой концентрации нефти и проб воды из каждой зоны). В качестве контроля использовали смесь стерильной байкальской воды и нефти с соответствующими концентрациями. Модельный эксперимент проводили при 4°C в течении 60 суток (Павлова и др., 2012).

Культивирование микроорганизмов для определения способности продуцировать внеклеточные биоПАВ проводили на средах следующего состава:

- для бактерий, отнесенных к роду *Rhodococcus* использовали среду следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2.0;  $\text{NaCl}$  – 1.0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.02;  $\text{FeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01; р-р микроэлементов (Практикум..., 2005) – 1 мл. Для повышения выхода биосурфактанта в минеральную среду вносили дрожжевой экстракт – 0.1 г/л (Куюкина, 2006).

- для бактерий, отнесенных к роду *Pseudomonas*, использовали среду согласно (Карпенко и др., 2006) (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.2;  $\text{NaNO}_3$  – 3.0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 5.

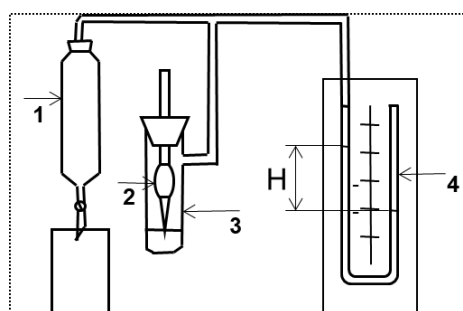
- для бактерий родов *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Novospingobium*, *Microbacterium*, *Micromonospora* использовали минеральную среду Бушнелла-Хасса.

В качестве единственного источника углерода во всех средах использовали 3% *n*-гексадекан (о/о). Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, объемом 300 мл, содержащих 100 мл питательной среды, на орбитальном шейкере (140 об/мин) в течение 4 суток при температуре 22°C.

Способность микроорганизмов к синтезу клеточно-связанных биоПАВ изучали у четырех штаммов, отнесенных к р. *Rhodococcus* и у одного штамма, отнесенного к р. *Pseudomonas*. Культивирование проводили на средах, описанных выше, в колбах

Эрленмейера, объемом 3000 мл, содержащих 1000 мл питательной среды, на орбитальном шейкере (140 об/мин) в течение 4 суток при температуре 22°C.

*Определение показателей синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ).* Способность микроорганизмов к синтезу биоПАВ оценивали по снижению уровня поверхностного натяжения ( $\sigma$ ) 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). Снижение уровня поверхностного натяжения супернатанта культуральной жидкости оценивали после отделения клеток (4 суток культивирования), поверхностное натяжение (ПН) рассчитывали, используя прибор Ребиндера (рис. 20), в качестве контроля использовали чистую минеральную среду (72 мН/м). В пробирку помещали 2.8 мл воды, 200 мкл исследуемого образца в метаноле и регистрировали разность высот столбов жидкости в момент отрыва пузырька воздуха. Показатель ПН эмульсии рассчитывали, учитывая температуру окружающего воздуха в момент измерения.



**Рисунок 20.** Схема прибора для определения поверхностного натяжения жидкостей (прибор Ребиндера): 1-делительная воронка; 2-капилляр; 3-пробирка; 4-манометр.

Для оценки наличия клеточно-связанных биоПАВ готовили эмульсию добавлением различных объемов (10–200 мкл) экстракта биомассы бактерий в метаноле к 2.8 мл дистиллированной воды, и рассчитывали поверхностное натяжение эмульсии. Контролем служили растворы метанол-вода с соответствующим содержанием метанола.

**Эмульгирующую активность** определяли по методу (Назина, 2003). В качестве субстрата для эмульгирования использовали подсолнечное масло. К 3 мл исследуемого раствора добавляли 3 мл подсолнечного масла и встряхивали в течение 5 минут. Индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) определяли через 24 часа по формуле:  $E_{24} = (V_{эм} / V_{полн}) \times 100\%$ , где  $V_{эм}$  – объем эмульсии, мл;  $V_{полн}$  – полный объем, мл.

**Экстракция биосурфактантов.** Потенциальные биосурфактанты извлекали из флокул бактерий методом жидкостной экстракции хлороформом (50% к объему экстрагируемой смеси, 2 x 15 минут). Органические слои объединяли и упаривали на роторном испарителе до постоянного объема при температуре 40°C. Для удаления остаточного гексадекана пробу

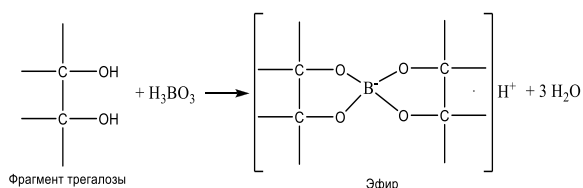
наносили на концентрирующий патрон для твердофазной экстракции Discovery® DSC-Si SPE Tube (500 мг, объем 6 мл, Supelco). Гексадекан элюировали 50 мл гексана, контролируя наличие гексадекана в элюате методом ГХ-МС. Фракцию потенциальных биосурфактантов элюировали с картриджа 10 мл смеси хлороформ – метанол = 2:1 (фракция Б); элюат упаривали досуха на роторном испарителе при температуре 40°C и перерастворяли в 750 мкл хлороформа. Фракция Б введена на новый картридж, липиды разделены элюцией растворителями с повышающейся полярностью: гексан-хлороформ-уксусная кислота (20:80:0,5, v/v/v); хлороформ-метанол (95:5, v/v); хлороформ-метанол-вода (85:15:2, v/v/v); хлороформ-метанол-вода (65:15:2, v/v/v) и метанол (по 10 мл каждого элюента) (Kretschmer et al., 1982). Элюаты собраны отдельно, высушены досуха и перерастворены в хлороформе. Каждый элюат проверен на наличие гликолипидов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

**Выявление гликолипидов.** Аналитическая ТСХ фракции Б выполнена на пластинках «Sorbfil» (силикагель СТХ-1А, 5-17 мкм, толщина слоя 110 мкм с УФ-индикатором (254 нм), ЗАО «Сорбполимер», Краснодар, Россия, 10 x 15 см) с использованием подвижной фазы хлороформ/метанол/вода (65:15:2 о/о/о) (Kretschmer et al., 1982).

Вариант 1. Фракцию Б в хлороформе наносят на пластинку. После высушивания ТСХ-пластинки обрабатывают реактивом на углеводы (фенол/этанол/серная кислота, 3 г фенола в смеси этанол-серная кислота 95:5) и нагревают при 105°C (Kuyukina et al., 2001). Гликолипиды проявляются в виде двух коричневых пятен с Rf=0.32 (низкая интенсивность) и 0.38 (высокая). Значения Rf, рассчитанные по центрам пятен, соответствуют Rf гликолипидов.

Вариант 2. После высушивания ТСХ-пластинки обработаны дистиллированной водой. В процессе высыхания на пластинках обнаруживаются светло-серые пятна с теми же значениями Rf. После высушивания пятна вырезают, экстрагируют метанолом, экстракт упаривают досуха и сухой остаток перерастворяют в 200 мкл MeOH-0,1% HCOOH в воде=1:1 (для ЖХ-МС) или в хлороформе (для 2D-ТСХ).

**Двумерная ТСХ (2D-ТСХ).** Известно, что тетраборат натрия ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) гидролизует в водной среде  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 7\text{H}_2\text{O} = 4\text{H}_3\text{BO}_3 + 2\text{NaOH}$  и образующая борная кислота легко образует эфиры со спиртами и органическими соединениями, содержащими гидроксильные группы, например, с углеводами. Трегалоза, входящая в состав гликолипида, будет образовывать с борной кислотой эфир по реакции:

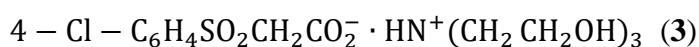
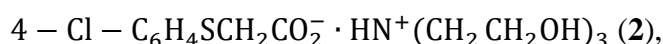
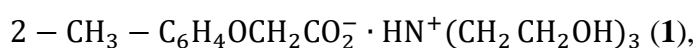


Таким образом, снижение Rf соединений при замене элюента хлороформ/метанол/вода (65:15:2 о/о/о) на элюент хлороформ/метанол/0.1% Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (65:15:2 о/о/о) будет свидетельствовать о наличии в молекуле углеводной части.

После полупрепаративного разделения фракции Б в системе хлороформ/метанол/вода (65:15:2 о/о/о) вся пластинка разрезана на 5 частей, фракция 3 соответствует полосе с Rf=0.38. После экстракции, упаривания и перерастворения все фракции разделены в системе хлороформ/метанол/0.1% Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (65:15:2 о/о/о). Фракции 2 и 3 в системе с тетраборатом натрия элюируются в виде трех пятен каждая, что также подтверждает присутствие гликолипидов в этих фракциях.

**Масс-спектрометрическое исследование фракций.** ЖХ-МС анализ выполняли на хроматографе Agilent HP 1200 (Hewlett Packard, США) в сочетании с времяпролетным масс-спектрометром Agilent 6210 (Agilent Technologies, США) ионизацией методом электростатического распыления (ESI) в режиме регистрации положительных ионов. Хроматографическое определение фракций проведено на колонке Ø 2.1 x 150 mm, упакованной Zorbax 300 SB C18, 5 µm. Элюент А – 0.1% муравьиная кислота в воде, элюент Б – 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле. Режим элюирования: от 10% до 80% Б за 30 мин, от 80% до 100% Б за 5 мин и 100% Б – 5 мин. Скорость потока 0.3 мл/мин. Температура 35°C; объем пробы 10 мкл, длины волн определения 214, 222, 238, 330 нм. Полученные масс-спектры обрабатывали с помощью программы Agilent MassHunter Workstation Software.

Для установления влияния протатранов А (Adamovich et al., 2017) на рост микроорганизмов, отнесенных к *Rhodococcus erythropolis* (4–08) и *Pseudomonas fluorescens* (5–05) использовали соединения 1, 2 и 3 со следующей химической формулой:



Культивирование бактерий проводили в минеральной среде следующего состава (г/л): КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1.0; К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> – 1.0; СаСl<sub>2</sub> x 2Н<sub>2</sub>О – 0.02; МgSO<sub>4</sub> x 7Н<sub>2</sub>О – 0.2; FeСl<sub>3</sub> – 0.05; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, – 1; рН – 7.2. При культивировании в экспериментальные колбы (объем 250 мл) со 100 мл минеральной среды добавляли 50 мкл нефти, 1 мл суспензии штамма, предварительно подготовленной по стандарту мутности (до 10<sup>4</sup> кл/мл), а также соединения 1–3 в концентрации от 0.0001% (10<sup>-4</sup> мас. %) до 0.00000001% (10<sup>-8</sup> мас. %). Культивирование проводили в течение 7 суток при 10°C и постоянной аэрации с использованием орбитального шейкера (BioSan OS-20, Латвия). Эксперимент проводили в трех повторностях для каждого вещества, каждой концентрации и двух штаммов микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* (4–08) и *Pseudomonas fluorescens* (5–05), выделенных из района естественного нефтепроявления,

расположенного у м. Горевой Утес. В качестве контроля посева микроорганизмов проводили на минеральную среду с нефтью без внесения соединений 1–3. Учет численности микроорганизмов проводили прямым счетом в момент постановки эксперимента (исходное количество бактерий), затем на 1, 2, 3, 4, 7 сутки (Pavlova et al., 2019). Убыль *n*-алканов и ПАУ определяли по указанной выше методике (раздел 2.2.2) (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024).

### 2.2.8. 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 рРНК бактерий 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-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 вариабельной области V2–V3 гена 16S рРНК бактерий использовали универсальные праймеры 16S\_BV2f (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-3'), 16S\_BV3r (5'-CCGCGGCTGCTGGCAC-3') (Sahm et al., 2013), а также праймеры для участка V5–V6 гена 16S рРНК архей Arch-0787f (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3'), Arch-1059r (5'-GCCATGCACCWCCTCT-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 углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из водной толщи, донных осадков и битумных построек, проводили посредством ПЦР-амплификации с тремя группами специфичных праймеров (табл. 5) (Sei et al., 2003).

**Таблица 5.** Праймеры на функциональные гены (*alkB*)

Название	Структура 5'-3'
ALK 1f	CATAATAAAGGGCATCACCGT
ALK 1r	GATTCATTCTCGAAACTCCAAAC
ALK 2r	GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA
ALK 2r	TTGTTATTATTCCAACATATGCTC
ALK 3r	TCGAGCACATCCGCGGCCACCA
ALK 3f	CCGTAGTGCTCGACGTAGTT



**Клонирование продуктов амплификации фрагментов гена 16S рРНК бактерий и архей** (500–1300 п.н.) осуществляли в плазмидный вектор pGEM-T (Promega, США) с помощью набора реагентов pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя.

Лигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл лигазного буфера, 1 мкл Т4 ДНК-лигазы, 1 мкл вектора (50 нг), 1 мкл деионизированной воды и 2 мкл ПЦР-продукта. Лигазную смесь инкубировали при 4°C в течение ночи и использовали для трансформации химически-компетентных клеток *Escherichia coli* (штамм XL-1).

В каждую пробирку с компетентными клетками (100 мкл) добавляли 4 мкл β-меркапроэтанола, 5 мкл лигазной смеси и инкубировали во льду 30 мин. Затем проводили «тепловой шок» при 42°C в течение 40 сек. Далее пробирки охлаждали во льду 2 мин, после чего добавляли по 1 мл среды SOC и инкубировали полученную суспензию 1.5 часа при 37°C. Для анализа полученных клонов методом бело-голубого скрининга (Sambrook et al., 1989) клетки высевали на чашки Петри с твердой средой LB (Lysogeny broth), содержащей 20 мкг/мл ампициллина, 0.0005% X-gal, 100 mM IPTG. Чашки инкубировали 12 часов при 37°C. После инкубации все выросшие колонии белого цвета переносили в 0.6 мл пробирки и суспендировали в 20 мкл безбактериальной воды. Суспензию клеток кипятили 5 мин, после чего замораживали при –20°C, оттаивали при комнатной температуре и центрифугировали 5 мин при 8 000 g. Анализ клеток на наличие вставки нужного размера проводили с помощью ПЦР. На реакцию 10 мкл (набор «АмплиСенс PCR») брали 1 мкл суспензии клонов в качестве матрицы, плазмидные праймеры 1F (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'), 1R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') комплементарные концам плазмидного полилинкера, по 0.2 мкл каждого, 5 мкл Redmix, 0.2 мкл dNTP и 3.4 мкл H<sub>2</sub>O. Условия амплификации: 94°C – 5 мин; 94°C – 1 мин, 57°C – 1 мин 10 сек., 72°C – 1 мин 30 сек. (30 циклов); 72°C – 10 мин.

После электрофоретического разделения продуктов ПЦР-реакции в 1% агарозном геле, полосы, соответствующие по размерам вставкам анализируемых фрагментов гена 16S рРНК, вырезали и готовили к секвенированию по методу Сэнгера. Для этого вырезанные кусочки геля подвергали заморозке и центрифугированию при 14 000 g в течение 20 мин для элюции нуклеотидного материала. Элюированный материал разделяли на две половины и сушили с 1 мкл праймеров 1f или 1r из набора для клонирования.

Секвенирование проводили на платформах GS FLX 454 Roche (454 Life science, США) и Illumina MiSeq (Illumina, Inc., США) 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).

### 2.2.9. Методы биоинформатического анализа

**Определение состава микробных сообществ.** 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 филотивов, 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 (Schloss 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](http://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).

**Секвенирование и сборка полных геномов микроорганизмов.** Подготовку библиотек и «shotgun» секвенирование проводили с использованием платформы GeneMind GenoLab M в формате 2×150 п.н. на базе ООО «СЕСАНА» (Москва, Россия). 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 рРНК (Barrnap (Seeman, 2014)) и тРНК (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).

**Секвенирование и анализ генома *Thermaerobacter* PB12/4term** проводили на нанопоровом секвенаторе MinION в Центре коллективного пользования «Геномика», г. Новосибирск. Геномную ДНК выделяли из чистой культуры с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) и разрезали с помощью g-tube (Covaris, США) со средним размером распределения фрагментов около 8 т.п.н. Секвенирование фрагментированной ДНК MinION

проводили в соответствии с протоколом геномной ДНК 1D Native barcoding с использованием наборов проточных ячеек EXP-NBD103, SQK-LSK108 и R9 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Весь геном штамма PB12/4term собран с использованием Canu v1.9 (Koren et al., 2017), включая коррекцию и обрезку. Для полировки CLC GW v20.0 (Qiagen) использовались чтения Miseq (Baturina et al., 2018). Результаты автоматической функциональной аннотации получены с использованием конвейера аннотации генома прокариот NCBI (Angiuoli et al., 2008). Геном также проанализирован с помощью программного обеспечения для аннотации Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014) и BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016). Цифровая ДНК-ДНК-гибридизация (dDDH) выполнена с использованием метода расстояния между геномами (GGDC) с моделью GGDC 2.0 blast+, предоставленной Калькулятором расстояния между геномами [Genome-to-Genome Distance calculator] (Meier-Kolthoff et al., 2021; <https://www.dsmz.de/>). Для таксономической классификации генома использовали GTDB-tk v 1.5.1 со справочными данными для GTDB R06-RS202 (Chaumeil et al., 2019). Значения ANI (средняя идентичность нуклеотидов) и AF (фракция выравнивания) также рассчитывались в GTDB-tk. Для визуализации кольцевой хромосомы использовали CGView Server (Stothard, Wishart, 2005).

**Визуализация полученных результатов.** 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 (Kanehisa, Goto, 2000), выполнено с помощью PICRUSt2 алгоритма (Douglas et al., 2020) путем поиска ближайшего гомологичного аннотированного референсного генома для каждой ОТЕ<sub>0.03</sub>. Визуализация полученных результатов в виде тепловой карты выполнена с использованием программных пакетов *cluster*, *vegan* и *heatmap* в R. Все ресурсоемкие операции выполнены с использованием высокопроизводительного кластера «Академик В.М. Матросов» центра коллективного пользования «Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН».

**Доступность данных.** Все данные, полученные с помощью молекулярно-биологических методов депонированы в NCBI GenBank. Номера последовательностей приведены в таблице 6.

**Таблица 6.** Номера последовательностей бактерий и архей, полученных из образцов водной толщи и донных осадков, библиотек ампликонов из природных осадков (*Bacteria* и *Archaea*) зарегистрированных NCBI GenBank

Наименование образцов	Номера последовательностей в NCBI GenBank	Сведения об опубликовании
Последовательности фрагмента гена 16S рРНК чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов	EU443820–EU443829 EU449113–EU449122 EU487604–EU487613 EU496540–EU496554 EU521681–EU521688 EU581636–EU581637	Ломакина, Павлова и др. Известия РАН. Сер. Биол. 2009, № 5. С. 515–522.
	MG786582–MG786588 MG786759	Павлова и др. Геология и геофизика. 2020. Т. 61. С. 1231–1240.
Клональная библиотека генов архей 16S рРНК накопительных культур, образующих этан	KJ736828–KJ736834	Павлова и др. Микробиология. 2014. Т. 83. С. 694–702.
Последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма PB15/Grf7geo	KY55292	
Последовательность гена 16S рРНК / полный геном штамма <i>Thermaerobacter</i> sp. PB12/4term	KY492688/ CP048407	Pavlova et al. Microbial Ecology. 2023. V. 86. P. 1604–1619.
Массивы последовательностей, полученных из природных осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводородных газов	секция SRA: PRJNA434024	Букин, Павлова и др. Микробиология. 2018. Т. 87. С. 409–420.
Клональная библиотека генов бактерий 16S рРНК, полученных из донных осадков метанового сипа «Голоустное» и накопительных культур (термобарический эксперимент)	X900863–JX900882 KM55254–KM55272	Pavlova et al. Geomicrobiology J. 2016. V. 33. P. 599–606.
Массивы последовательностей, полученных из донных осадков метанового сипа Посольская Банка (термобарический эксперимент)	до эксперимента SRR2912888, SRR2912890	Bukin, Pavlova et al. Front. Microbiol. 2016. V. 7, № 690.
	после эксперимента SRR2146995	
Клональная библиотека генов бактерий 16S рРНК термофильных накопительных культур	MH107331, MH159723, MH159724, MH555074– MH555082, MK183756– MK183759, MK183694– MK183695	Павлова и др. Микробиология. 2019. Т. 88. С. 358–366.
Клональная библиотека генов бактерий и архей 16S рРНК, полученная из анаэробных	MW595796–MW595818, MW599318–MW599325, MW599327, MW599328,	Pavlova et al. Microbial. Ecol. 2022. V. 83. № 4.

накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов (м. Горевой Утес)	MW617235–MW617240, MW617242–MW617261, MW624372–MW624377, MW633226–MW633230	Р. 899–915.
Массивы последовательностей, полученные из донных осадков и анаэробных накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов (Б. Зеленовская)	PRJNA1056780	Павлова и др. Микробиология. 2024. Т. 93. № 5. С. 548–561.
Массивы последовательностей, полученные для анализа из горячих источников	PRJNA801752: SAMN25378416, SAMN25378417, SAMN25378418	Павлова и др. Микробиология. 2024. Т. 93. № 3. С. 323–329.

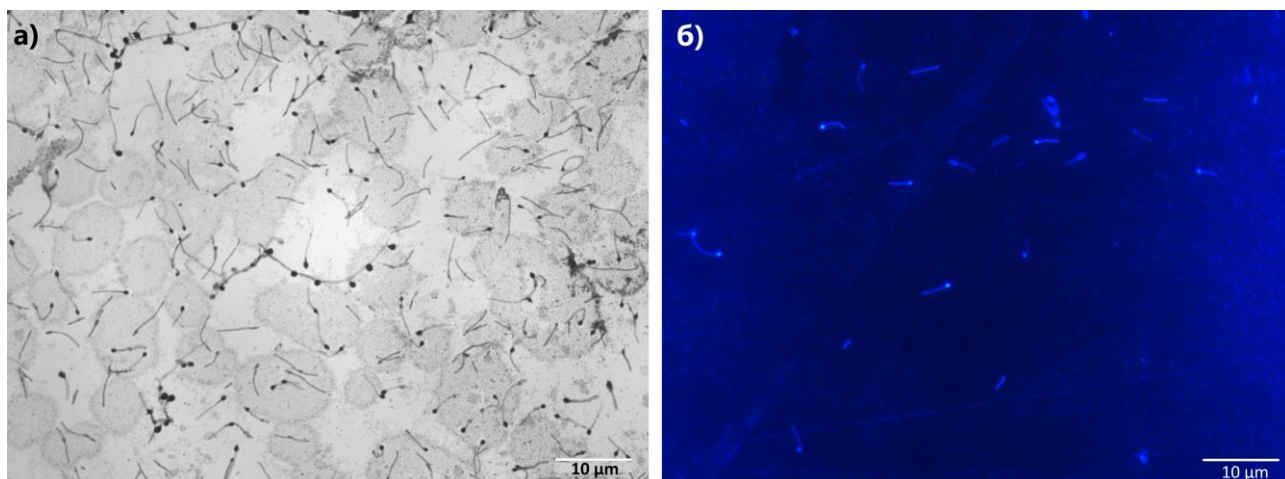
### ГЛАВА 3. ТЕРМОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ В НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ДОННЫХ ОСАДКАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ

Донные осадки озера Байкал характеризуются стабильно низкими температурами (3.1–5.7°C) (Кожов, 1963) и не относятся к биотопам, где традиционно проводится поиск и выделение термофильных прокариот. Учитывая геологические особенности озера Байкал, высказано предположение, что в нем могут иметь место механизмы поступления термофильных прокариот из зоны генерации углеводородов в поверхностные осадки, как в Мировом океане. На побережье оз. Байкал расположено значительное количество гидротерм, которые также могут быть источником поступления термофилов в озеро Байкал.

В связи с этим, 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 (табл. 1, рис. 17; Павлова и др., 2019б).

В результате культивирования образцов при 60°C, накопительные культуры термофильных бактерий получены только из донных осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводородов. При культивировании образцов АХ получить термофильную накопительную культуру не удалось. С помощью эпифлуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии в культуре м/с ПБ выявлены микроорганизмы различной морфологии: палочки размером 0.3–0.5×1.8–3 мкм с терминально расположенными спорами, одиночные палочки, не содержащие спор, а также тонкие нитевидные клетки со спорами (рис. 21а). По морфологии клетки имели некоторое сходство с представителями родов *Thermaerobacter* и *Planifilum* (Spanevello, Patel, 2015; Yu et al., 2015). В накопительной культуре из осадка грязевого вулкана К-2 обнаружены тонкие палочки 2–3×0.2 мкм (рис. 21б), в то время как в накопительной культуре ГУ – тонкие неспорообразующие палочки 2–3×0.2 мкм и палочковидные клетки с центрально расположенной спорой, расширяющей клетку.



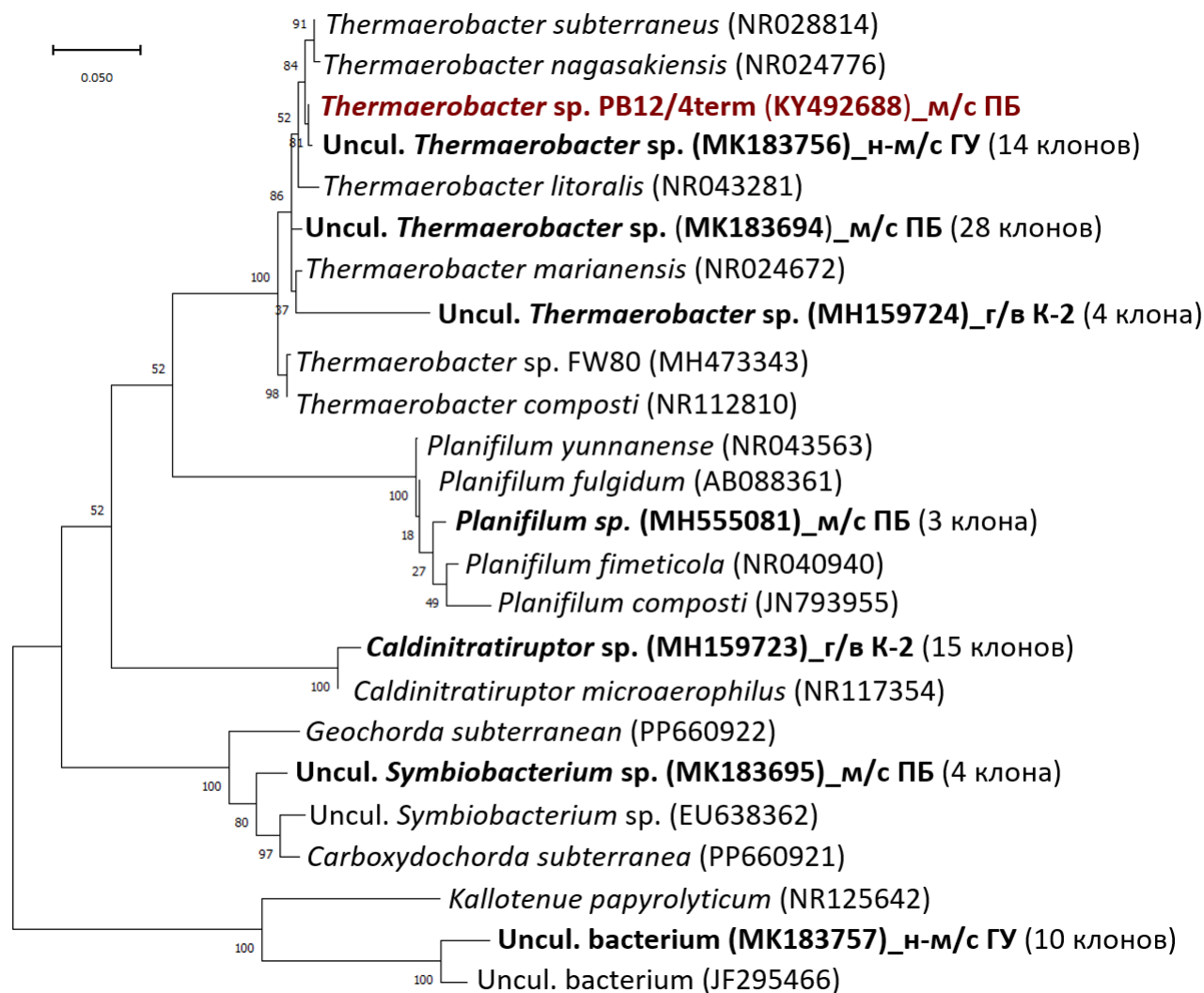
**Рисунок 21.** Морфология клеток в накопительных культурах из метанового сипа ПБ (а), грязевого вулкана К-2 (б); (а) – трансмиссионная электронная микроскопия, (б) – эпифлуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка – 10 мкм. Цитировано по Павлова и др., 2019б.

В составе поровых вод осадков керна К-2 обнаружены ионы брома (до 10 мг/л), отсутствующие в фоновых районах, а также повышенное содержание ионов хлора (до 30 мг/л) и ионов аммония (до 5 мг/л). Исследование состава поровых вод керна ГУ показало трехкратное превышение (против фонового) минерализации, достигаемое в основном за счет повышения (до 300 мг/л) концентрации гидрокарбонат- и ацетат-ионов. Химический состав поровых вод из керна АХ характерен для типичных байкальских осадков (Погодаева и др., 2007; Pogodaeva et al., 2017), что отражает отсутствие подтоков флюидов и других седиментологических процессов.

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. 22).

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 fumarата и O<sub>2</sub> соответственно (Karnachuk et al., 2024).



**Рисунок 22.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей гена 16S рНК, показывающее положение термофильных бактерий из осадков оз. Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводов. Полученные последовательности выделены жирным шрифтом; красным цветом – последовательность культивируемого штамма *Thermaerobacter* sp. PB12/4term.

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



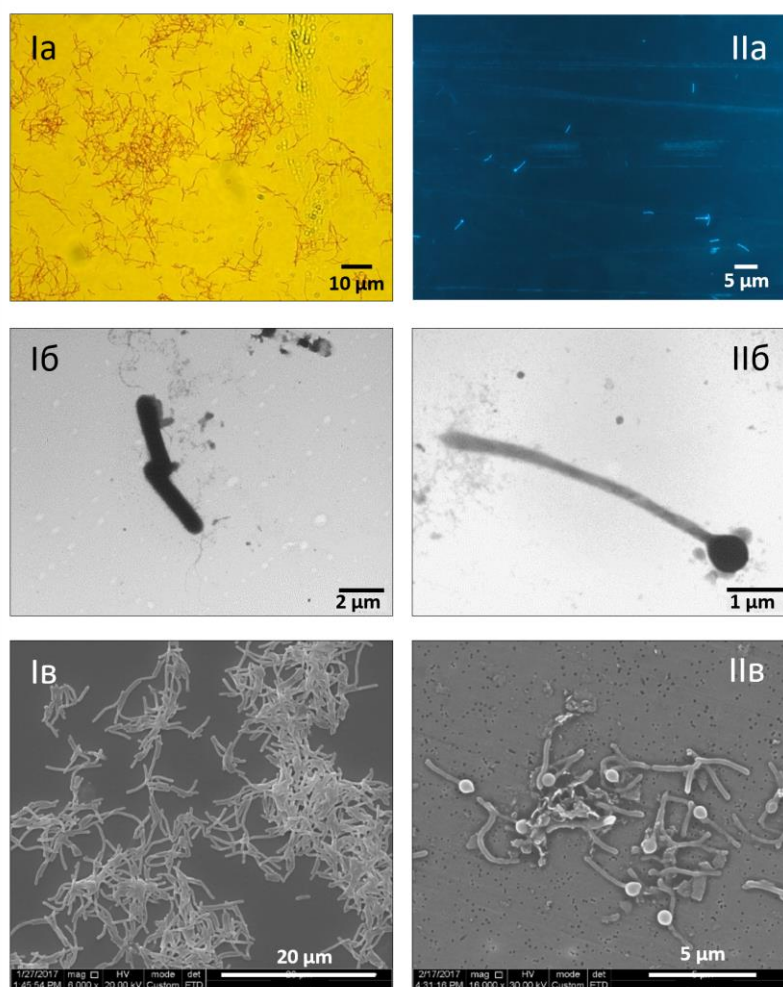
накопительных культур характеризовались небольшим разнообразием. Последовательности актиномицетов, факультативно-анаэробных бактерий и нитратредуцирующих микроаэрофильных термофилов обнаружены в незначительных количествах. Во всех библиотеках наиболее представленными были последовательности рода *Thermaerobacter* (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 Deerp» 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). Образование спор происходит в анаэробных условиях. Споры круглые 0.58–0.6 мкм в диаметре, локализованы терминально на одном конце клетки (рис. 23). Микроорганизм подвижен за счет полярного жгутика (Pavlova et al., 2023).

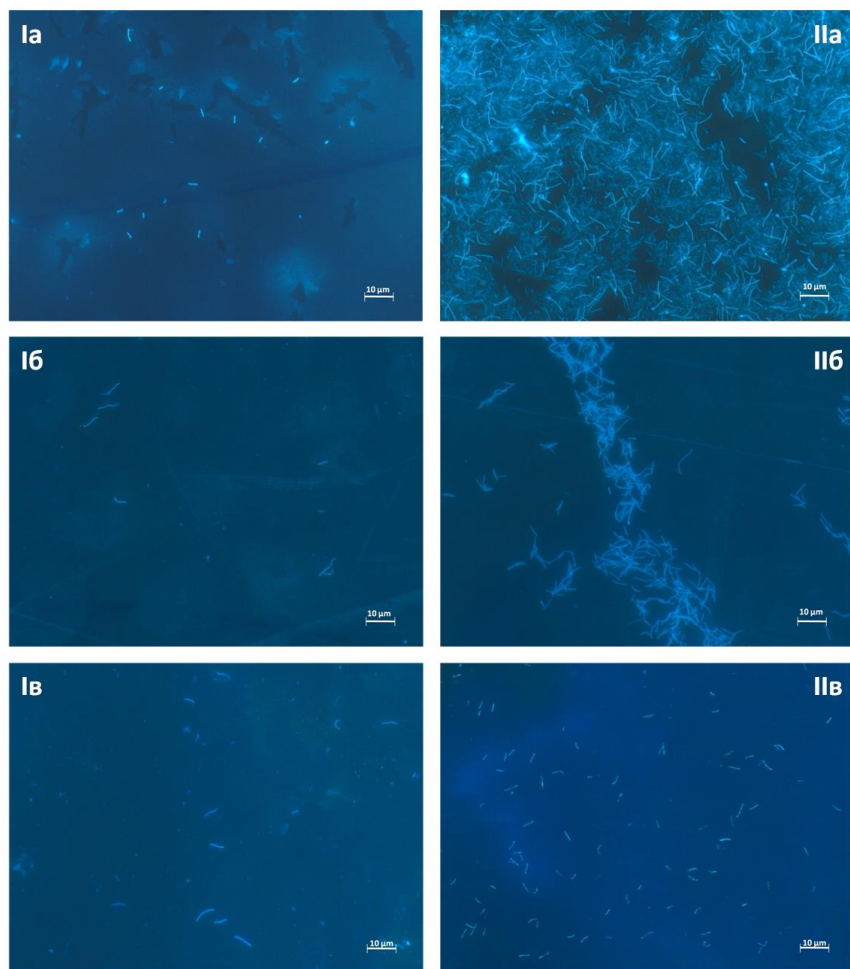
Оптимальный рост наблюдался при 60°C, тогда как при 45 или 85°C роста не происходило. Штамм PB12/4term является нейтрофилом с областью роста pH 5.0–8.0 и оптимумом pH 7.0. При pH ниже 4.5 и выше 8.5 рост отсутствовал. Изолят хорошо рос при концентрации NaCl до 5 г/л с оптимумом 1 г/л. Аэробный рост наблюдался только на жидких средах; на плотных средах штамм PB12/4term колонии не образовывал. Глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, арабиноза, дрожжевой экстракт, пептон, галактоза и желатин использовались как субстраты для аэробного органотрофного роста. Рибоза, ксилоза, фруктоза, мальтоза, раффиноза, салицин, сорбит, инозитол, дульцит, адонит, глицерин, цитрат натрия, тартрат, ацетат, пируват, сукцинат, лактат, целлюлоза, крахмал, метанол, этанол, бутанол и пропанол не поддерживали рост штамма PB12/4term. В своем метаболизме не использовал аргинин, гистидин, серин, орнитин, аргинин, лизин, фенилаланин, триптофан, глицин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, тирозин и цистеин.



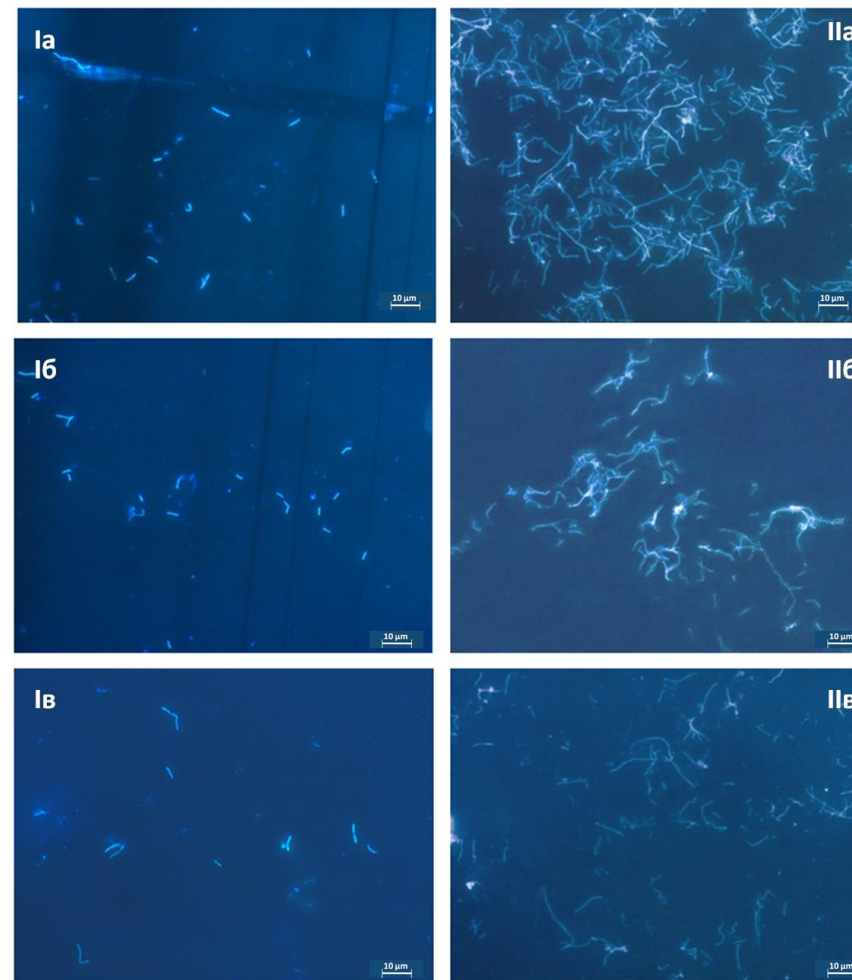
**Рисунок 23.** Морфология клеток штамма RB12/4term в аэробных (I) и анаэробных (II) условиях в световом/эпифлуоресцентном (а), электронном (б) и сканирующем микроскопе (в). Масштаб для (I, II а) соответствует 10 мкм, (I б) – 2 мкм, (II б) – 1 мкм, (I в) – 20 мкм, (II в) – 5 мкм. Цитировано по Pavlova et al., 2023.

В литоавтотрофных условиях штамм RB12/4term использовал  $H_2$  в качестве донора электронов,  $CO_2$  в качестве источника углерода, элементную серу, тиосульфат и  $O_2$  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 наблюдался в облигатно-анаэробных условиях на среде  $H_2:CO_2$  (80:20) и в факультативно-анаэробных условиях при культивировании на среде с  $H_2:CO_2:O_2$ , с содержанием кислорода 1 и 2% (рис. 24).

При анаэробном росте с тиосульфатом, кроме увеличения количества клеток выявлено образование сульфата (0.2 мМ), при росте с серой – образование сероводорода в следовых количествах (0.15 мг/л) (рис. 24). Исследование влияния концентрации  $CO_2$  на рост RB12/4term показало, что культура хорошо росла при 5%  $CO_2$  в газовой смеси и умеренно при 20% и 40%  $CO_2$ . При 1% или 2%  $CO_2$  в газовой фазе роста не наблюдалось (рис. 25). Изолят RB12/4term не был способен к анаэробному хемоорганогетеротрофному росту.



**Рисунок 24.** Количество клеток *Thermoerobacter* sp. PB12/4term в контроле (I) и литотрофных условиях (II) при культивировании на бескислородной минеральной среде (БМС), содержащей (а) –  $O_2$ , (б) –  $S_2O_3$ ; (в) –  $S^0$ . Масштаб соответствует 10 мкм. Цитировано по Pavlova et al., 2023.



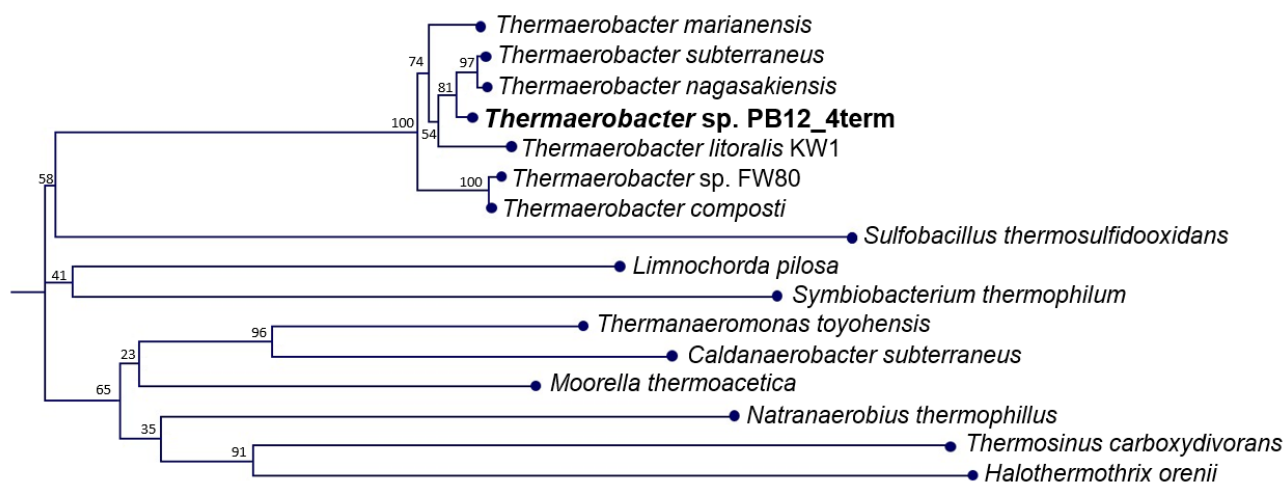
**Рисунок 25.** Количество клеток *Thermoerobacter* sp. PB12/4term в начале эксперимента (I) и через 7 дней культивирования (II) в литотрофных условиях при культивировании на БМС, содержащей  $S_2O_3$  и газовую фазу  $H_2:CO_2$  (а) – 95:5; (б) – (80:20); (в) – (60:40). Масштаб соответствует 10 мкм. Цитировано по Pavlova et al., 2023.

В профиле клеточных жирных кислот преобладали iso-C<sub>15:0</sub> (53%), iso-C<sub>17:0</sub> (20.1%), iso-C<sub>16:0</sub> (13.7%), iso-C<sub>14:0</sub> (3.84%), anteiso-C<sub>15:0</sub> (3.73%) и C<sub>16:0</sub> (2.37%). Всего было идентифицировано 13 отдельных жирных кислот (табл. 7). Общее содержание жирных кислот составляло 23.1±1.6 мг/г сухого веса.

**Таблица 7.** Состав жирных кислот у штаммов *Thermaerobacter marianensis* 7p75a<sup>T</sup> и *Thermaerobacter* sp. PB12/4term в % от суммы

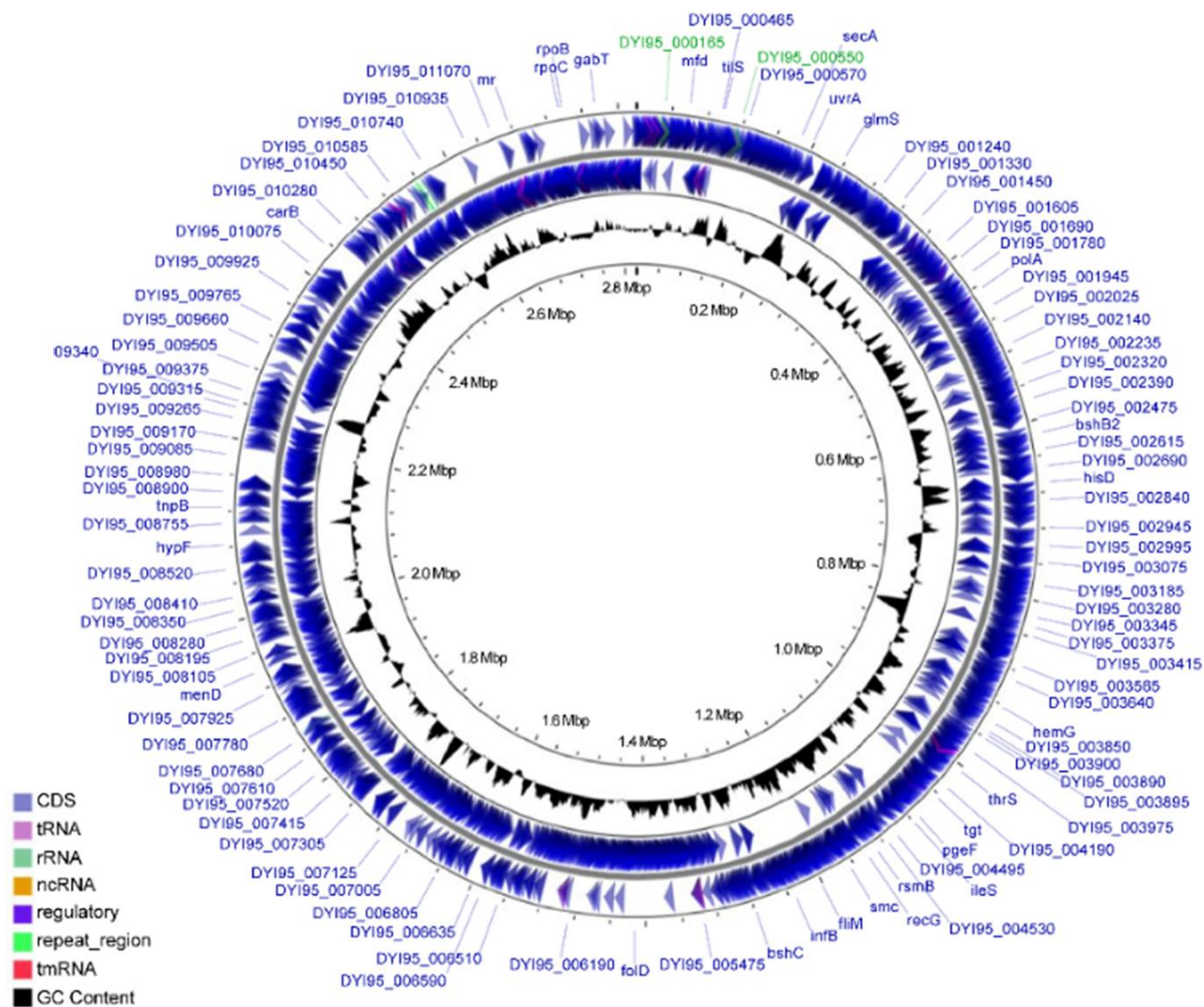
Жирная кислота	<i>Thermaerobacter marianensis</i> 7p75a <sup>T</sup> (Takai et al., 1999)	<i>Thermaerobacter</i> sp. PB12/4term
iso-C <sub>13:0</sub>	–	0.64 ± 0.25
iso-C <sub>14:0</sub>	–	3.84 ± 0.25
C <sub>14:1</sub>	27.6	–
C <sub>14:0</sub>	–	0.42 ± 0.03
iso-C <sub>15:0</sub>	4.3	53 ± 4
anteiso-C <sub>15:0</sub>	3.5	3.73 ± 0.26
C <sub>15:0</sub>	–	0.32 ± 0.02
iso-C <sub>16:0</sub>	–	13.7 ± 1.0
C <sub>16:0</sub>	2.1	2.37 ± 0.17
iso-C <sub>17:0</sub>	52.3	20.1 ± 1.4
anteiso-C <sub>17:0</sub>	9.3	0.85 ± 0.06
iso-C <sub>18:0</sub>	–	0.192 ± 0.013
C <sub>18:1</sub>	–	0.045 ± 0.003
C <sub>18:0</sub>	0.9	0.66 ± 0.05

Сравнение последовательности гена 16S рНК (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<sup>T</sup> (99%), *T. composti* (98%) и *T. marianensis* 7p75a<sup>T</sup> (98%) (рис. 26).



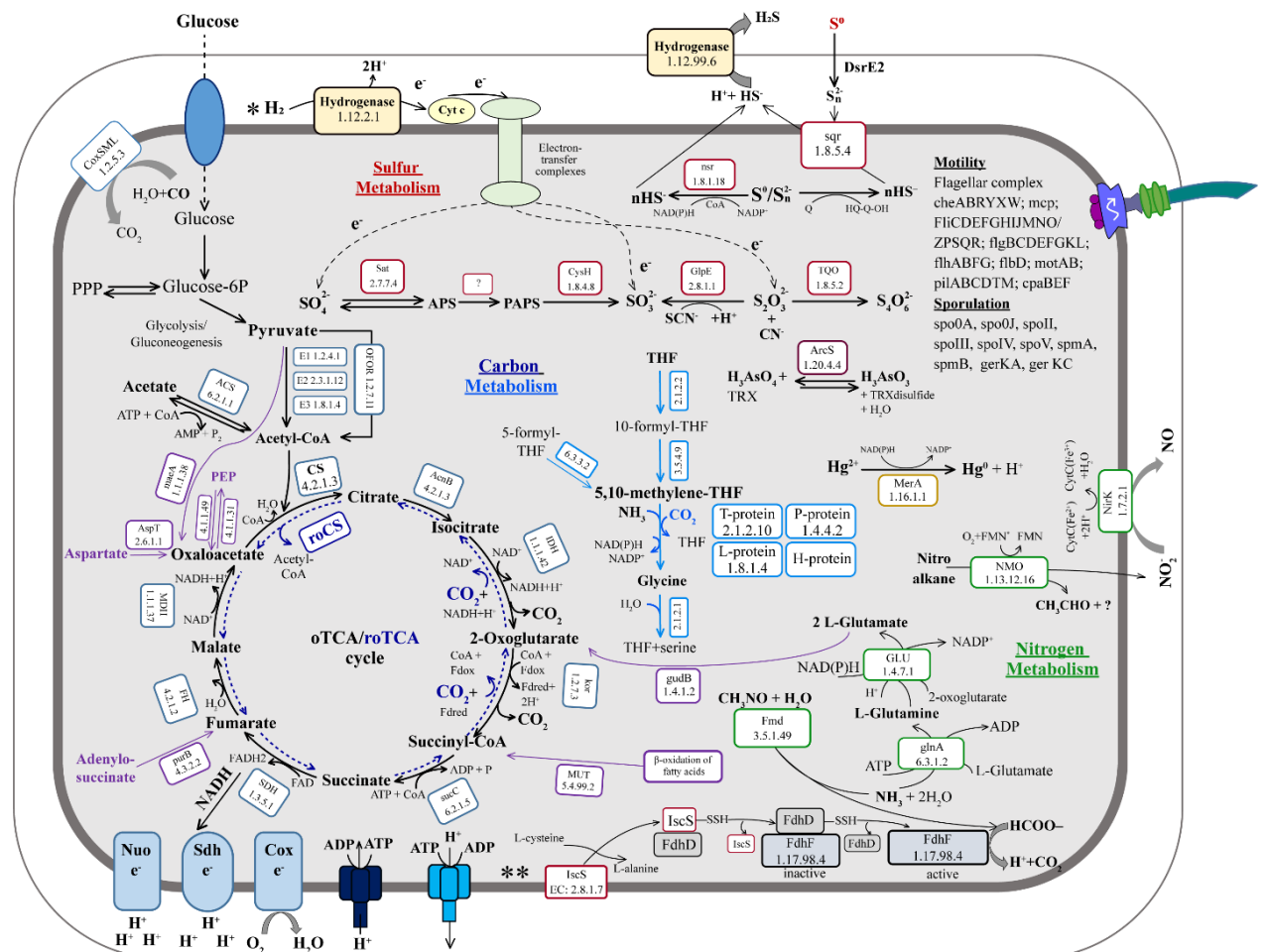
**Рисунок 26.** Филогенетическое дерево максимального правдоподобия на основе последовательностей генов 16S рНК, показывающее положение штамма PB12/4term среди других представителей рода *Thermaerobacter* и аутгрупп термостабильных *Bacillota*. Цитировано по Pavlova et al., 2023.

Геном штамма PB12/4term состоит из одной хромосомы общей длиной 2820915 п.н. и содержанием G-C 72.2% (Baturina 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. (рис. 27).



**Рисунок 27.** Круговая геномная карта хромосомы *Thermoaerobacter* sp. PB12/4term. Цитировано по Pavlova et al., 2023.

**Метаболизм углерода.** Данные полногеномной последовательности в целом соответствовали основным метаболическим особенностям, экспериментально выявленным у штамма PB12/4term. Основной тип питания – хемоорганогетеротрофный рост. Геном штамма PB12/4term содержит все гены, необходимые для гликолиза/глюконеогенеза (путь Эмбдена-Мейергофа), цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) с глиоксилатным шунтом и окислительного фосфорилирования (рис. 28).



**Рисунок 28.** Схема метаболизма *Thermoanaerobacter* sp. PB12/4term, реконструированная на основе геномных данных. CoxSML – аэробная дегидрогеназа монооксида углерода; ACS – ацетил-КоАсинтетазы; E1 – пируватдегидрогеназа; E2 – дигидролипоилтрансацилилаза; E3 – дигидролипоамиддегидрогеназа; OFOR – 2-оксокислотная редуказа (ферридоксин); CS – цитратсинтаза; AspB – аконитатгидратаза; IDH – изоцитратдегидрогеназа (NADP+); kor – 2-оксоглутаратсинтаза; sucC – АДФ-формирующая сукцинат-КоАлигаза; SDH – сукцинатдегидрогеназа; FH – фумаратгидратаза; MDH – малатдегидрогеназа; maeA – малатдегидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая); gudB – глутаматдегидрогеназа; AspT – аспаратамиотрансфераза; purB – аденилосукцинатлиаза; EC:4.1.1.31 – фосфоенолпируваткарбоксилаза; EC:4.1.1.49 – фосфоенолпируваткарбоксикиназа (АТФ); MUT – метилмалонил-КоА-мутаза; THF – тетрагидрофолат; EC:2.1.2.2 – фосфорибозилглицинамидформилтрансфераза; EC:3.5.4.9 – метенилтетрагидрофолатциклолидроллаза; EC:2.1.2.10 – аминотетрагидрофолатциклолидроллаза; EC:1.4.4.2 – глициндегидрогеназа; EC:1.8.1.4 – дигидролипоамиддегидрогеназа; белок H системы расщепления глицина; EC:2.1.2.1 – серингидрокси метилтрансфераза; Cyt c – цитохром c; Nuo – NADH-хиноноксидоредуктаза; Cox – цитохром c оксидаза; dsrE2 – DsrE/DsrF/DrsH-подобный белок семейства; sqr – сульфид:хинон-оксидоредуктаза; nsr – КоА-зависимая NAD(P)H-серооксидоредуктаза; Sat – сульфат-аденилилтрансфераза; CysH – фосфоаденилилсульфат-редуктаза (тиоредоксин); GlpE – тиосульфат-сульфуртрансфераза; TQO – тиосульфатдегидрогеназа (хинон); ArcS – арсенат-редуктаза (тиоредоксин); MerA – ртуть(II) редуказа; NirK – нитрит-редуктаза ( $NO$ -образующая); NMO – нитронат монооксигеназа; glnA – глутаминсинтетазы; GLU – глутаматдегидрогеназа; Fmd – формамидаза; IscS – цистеиндисульфуразы; FdhD – форматдегидрогеназа аксессуарная сульфуртрансфераза; FdhF – форматдегидрогеназа (гидрогеназа) Семейство FdhF/YdeP. Флагеллярный и хемотаксисный комплекс: CheABRYXW – белок хемотаксиса; Msp – метил-акцепторный белок хемотаксиса; MotAB – белок хемотаксиса; FliCDEFGHIJMN/O/ZPSQR – белок сборки/биосинтеза жгутиков; FlgBCDEFGK/L – жгутиковый белок базального тела стержня/крючка; FlhABFG – жгутиковый белок биосинтеза; FlhD – жгутиковый белок; PilABCDTM – белок сборки пилуса IV типа; SpaBEF – белок сборки пилуса. Споруляция: Spo0A, Spo0J – белки, инициирующие споруляцию; spoII, spoIII, spoIV, spoV – белки II-V стадии споруляции; SpmAB – белок созревания споры; GerKA и gerKC – белки прорастания споры. \* схема приведена по Fukuda, Wakagi, 2002; \*\* - схема приведена по Mall et al., 2018. Цитировано по Pavlova et al., 2023.

Гены, вовлеченные в процесс восполнения промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, включая малатдегидрогеназу (оксалоацетатдекарбоксилирующую) (ЕС:1.1.1.38), глутаматдегидрогеназу (ЕС:1.4.1.2), аспартаттрансаминазу (ЕС:2.6.1.1), аденилосукцинатлиазу (ЕС: 4.3.2.2), PEP-карбоксилазу (ЕС:4.1.1.31), PEP-карбоксилазу (ЕС:4.1.1.49), метилмалонил-КоА-мутазу (ЕС:5.4.99.2), также были обнаружены в геноме штамма PB12/4term (рис. 28).

Субстратное фосфорилирование может происходить в ходе гликолиза при участии фосфоглицераткиназы (ЕС:2.7.2.3) и пируваткиназы (ЕС:2.7.1.10), а также в ЦТК при участии сукцинат-КоА лигазы (гуанозиндифосфат-формирующей) (ЕС:6.2.1.4). Пируват не может быть обратимо декарбоксилирован до ацетил-КоА пируват:ферредоксин оксидоредуктазой из-за отсутствия этого фермента. Для превращения пирувата в ацетил-КоА в геноме исследуемого штамма присутствует ген, кодирующий 2-оксокислотную оксидоредуктазу (ферредоксин) (ЕС:1.2.7.11). Этот фермент обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к 2-оксокислотам и связывает множество субстратов, включая 2-оксоглутарат, 2-оксобутаноат и пируват (Fukuda, Wakagi, 2002). Кроме того, присутствует мультиферментный пируватдегидрогеназный комплекс, состоящий из трех основных ферментов (ЕС:1.2.4.1, ЕС:2.3.1.12 и ЕС:1.8.1.4).

Дальнейшее превращение ацетил-КоА в ацетат с образованием АТФ происходит под действием ацетил-КоА-синтетазы или ацетил-КоА-синтетазы (АДФ-образующей). Метаболизм других углеводов осуществляется не полностью, поскольку многие гены, необходимые для полного окисления фруктозы, маннозы, галактозы и т.д., отсутствуют. Метаболизм фруктозы в штамме PB12/4term может идти только до L-сорбозы, поскольку в геноме присутствует только L-идитол-2-дегидрогеназа и нет генов, кодирующих превращение фруктозы в глюкозу. Окисление D-маннозы происходит последовательно до D-фруктозо-1,6-бисфосфата; окисление лактозы до альфа-D-глюкозы + D-галактозы и обратно облегчается бета-галактозидазой (*lacZ*), а окисление крахмала до декстрина + мальтозы и обратно - альфа-амилазой (*amyA*). Геном *Thermaerobacter* sp. PB12/4term содержит гены, кодирующие рибокиназы (*rbsK* и *rpiB*), что указывает на возможность использования D-рибозы в качестве субстрата исследуемым микроорганизмом.

Штамм PB12/4term может расти литотрофно, используя CO<sub>2</sub> в качестве источника углерода. В связи с этим был проведен поиск генов, обеспечивающих функционирование основных циклов автотрофной фиксации углекислого газа. Три основных фермента (рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (RuBisCO), фосфорibuлокиназа А (*PrkA*) и седогептулозо-1,7-бисфосфатаза), необходимые для фиксации CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина-Бенсона, отсутствовали, как и ферменты, необходимые для реализации восстановительного

пути ацетил-КоА (путь Вуда-Льонгдала). Геном PB12/4term содержит большинство генов, кодирующих восстановительный цитратный цикл (цикл Арнона-Бьюкенена). Поскольку в геноме отсутствуют гены, кодирующие ключевые ферменты этого цикла – цитратлиаза АТФ/цитрил-КоА синтетаза и цитрил-КоА лиаза, восстановительный цитратный цикл не может осуществляться в этом организме.

Было высказано предположение, что фиксация CO<sub>2</sub> происходит через обратный окислительный цикл трикарбоновых кислот (rTCA) (Mall et al., 2018; Nunoura et al., 2018). Геном исследуемого штамма содержит все ферменты цикла rTCA, включая цитратсинтазу (ЕС:2.3.3.16), аконитазу (ЕС:4.2.1.3), изоцитратдегидрогеназу (ЕС:1.1.1.42), 2-оксоглутаратсинтазу (ЕС:1.2.7.3), АДФ-образующая сукцинат-КоА лигазу (ЕС:6.2.1.5), сукцинатдегидрогеназа/фумаратредуктазу (ЕС:1.3.5.1), фумаратгидратазу (ЕС:4.2.1.2) и малатдегидрогеназу (ЕС:1.1.1.37). Фиксация CO<sub>2</sub> может также проходить по пути восстановления глицина (rGlyP), как это было показано на примере *Desulfovibrio desulfuricans* (Sánchez-Andrea et al., 2020). У *Desulfovibrio desulfuricans*, rGlyP начинается с восстановления CO<sub>2</sub> до формиата. Затем формиат активируется кофактором тетрагидроfolатом в 10-формилтетрагидроfolата (ТГФ) за счет одной АТФ (Sánchez-Andrea et al., 2020). Поскольку в геноме *Thermaerobacter* sp. PB12/4term нет генов, отвечающих за эти процессы, но есть гены метаболизма тетрагидроfolата (ТГФ), то rGlyP, вероятно, начинается с последовательного превращения ТГФ в 5,10-метилентГФ с помощью фосфорибозилглицинамидформилтрансферазы (ЕС:2.1.2.2), циклогидролазы метенилтетрагидроfolата (ЕС:3.5.4.9) и 5,10-метенилтетрагидроfolат-синтетазы (ЕС:6.3.3.2). Затем 5,10-метиленттетрагидроfolат конденсируется и восстанавливается CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub><sup>-</sup> и NADH до глицина. Образование глицина катализируется комплексом глициндекарбоксилазы - обратимым четырехкомпонентным ферментом, состоящим из аминотетрагидроfolата (Т-белок), глициндегидрогеназы (Р-белок), дигидролипоил-дегидрогеназы (L-белок) и системы расщепления глицина CO<sub>2</sub> (Н-белок) (рис. 28) (Claassens et al., 2022). Геном *Thermaerobacter* sp. PB12/4term также содержит гены coxSML, кодирующие дегидрогеназу монооксида углерода, которая необходима для окисления СО до СО<sub>2</sub> в аэробных условиях и состоит из S, М и L субъединиц.

*Метаболизм серы и водородный обмен.* На основе фенотипических характеристик, полученных экспериментально при культивировании штамма PB12/4term, установлено, что микроорганизм способен к хемолитотрофному росту с восстановленными соединениями серы. Наиболее изученным в настоящее время способом окисления серы в цитоплазме является так называемый Dsr путь. Показано, что наличие полного набора генов диссимиляционной сульфатредукции не является необходимым условием для способности к



диспропорционированию  $S^0$  (Слободкин, Слободкина, 2019). Для осуществления этого процесса не обязательно наличие диссимиляционной сульфитредуктазы (Dsr) и аденилилсульфатредуктазы (Apr). Важными компонентами серодиспропорционирования являются белки, переносящие серосодержащие группы, а также ферменты, восстанавливающие элементную серу и/или полисульфиды (Слободкин, Слободкина, 2019). Основываясь на результатах аннотирования сервера Prokka, геном штамма PB12/4term содержит ген *dsrE2*, кодирующий крупный трансмембранный белок, связанный с активацией и переносом нерастворимых соединений серы внутрь клетки. Кроме гена *dsrE2*, в геноме выявлен ген *sqr*, кодирующий сульфид:хинон оксидоредуктазу (EC:1.8.5.4), необходимую для окисления серы и образования полисульфида. В ряде работ показано, что фактическим акцептором электронов для микробных клеток является не элементарная сера, а растворимые полисульфиды, которые образуются из  $S^0$  в присутствии сероводорода (Poser et al., 2013; Слободкин, Слободкина, 2019).

Вероятно, у штамма PB12/4term, связанный с мембраной комплекс может использовать полисульфид путем окисления хинона, как это было показано для *Thermovibrio ammonificans* (Giovannelli et al., 2017). С помощью программы BLAST сервера NCBI установлено, что ген *sqr* штамма PB12/4term имеет 74–93% сходства с сульфид:хинон оксидоредуктазой других представителей рода *Thermaerobacter* (таблица) и 40–49% с представителями Terrabacteria group bacterium. Для восстановления серы штамм PB12/4term также может использовать КоА-зависимую NAD(P)H-серооксидоредуктазу (*nsr*) (EC:1.8.1.18) и мембранносвязанную [NiFeSe] гидрогеназу (EC:1.12.99.6), которая использует водород для восстановления субстратов, по механизму, описанному ранее для восстанавливающей серу археи *Pyrococcus furiosus* (Schut et al., 2007). Образование сероводорода в эксперименте коррелирует с геномными данными, свидетельствующие о том, что сера может восстанавливаться до  $H_2S$  исследуемым штаммом. Кроме того, синтез  $H_2S$  может быть обусловлен активностью цистеиновой десульфуразы, так как в геноме обнаружен ген *IscS*, ее кодирующий. На примере *Escherichia coli* было показано, что эндогенное образование  $H_2S$  в анаэробных условиях поддерживает клеточную биоэнергетику в условиях дефицита кислорода и обусловлено активностью цистеиндессульфуразы (*IscS*), а не 3-меркаптопируватсульфотрансферазы (Wang et al., 2019).

В геноме *Thermaerobacter* sp. PB12/4term были идентифицированы гены *sat* и *cysH*, которые кодируют аденилилтрансферазу и фосфоаденилсульфатредуктазу. *Thermaerobacter* sp. PB12/4term не имеет полного набора ферментов ассимиляционного процесса сульфатредукции, так как в геноме отсутствуют гены *cysJ*, кодирующие сульфитредуктазу (НАДФН) флавопротеиновый альфа-компонент, *cysI* (сульфиредуктазу (НАДФН) бета-компонент гемопroteина) и *sir* (сульфитредуктаза (ферредоксин)).

Также была выявлена способность штамма PB12/4term к росту на средах, содержащих тиосульфат. Согласно результатам аннотирования, полученных с помощью баз данных KEGG и Prokka, геном исследуемого штамма содержит ген *glpE*, кодирующий тиосульфатсульфотрансферазу/роданазу (EC:2.8.1.1). Роданазы являются мито-хондриальными ферментами, осуществляющими детоксикацию цианида ( $CN^-$ ) путем преобразования его в тиоцианат ( $SCN^-$ ) (Cipollone et al., 2008). Было показано, что роданезоподобные сульфотрансферазы могут играть решающую роль в процессе дыхания серы/полисульфид и эти белки следует учитывать при поиске метаболизма серы (Florentino et al., 2019). Геном также содержит ген *tqo* кодирующий фермент тиосульфатдегидрогеназу (хинон). TQO представляет собой периплазматический фермент, относящийся к семейству цитохромов с-типа, который присутствует у широкого круга бактерий (Denkman et al., 2012). Предлагаемая функция TQO заключается в окислении тиосульфата до тетратионата; в некоторых случаях он действует как биофункциональный фермент для восстановления тетратионата до тиосульфата (Zhang et al., 2020).

*Thermaerobacter* sp. PB12/4term синтезирует две L-цистеиновые десульфуразы: SufU и IscS. Функция SufU является спорной. Предполагалось, что SufU является белком-скаффолдом для сборки железо-серных кластеров, однако последние данные свидетельствуют о том, что он скорее является сульфуртрансферазой, чем белком для сборки скаффолда (Albrecht et al., 2011). Цистеиновая десульфураза (IscS, EC:2.8.1.7) представляет собой фермент, содержащий пиридоксальфосфат, который катализирует превращение цистеина в аланин и сульфид-сера посредством образования связанного с белком промежуточного продукта цистеинперсульфида на консервативном остатке цистеина. Цистеиндесульфураза действует как донор серы и участвует в биологическом транспорте серы, сборке железосернистых кластеров и биосинтезе серосодержащих биофакторов, таких как тиамин, тионуклеозиды переносной РНК, биотин и липоевая кислота (Wang et al., 2019). Цистеиновая десульфураза осуществляет еще одну важную функцию, связанную с активностью формилдегидрогеназ. В исследовании Тоум Р. с соавторами (2012) показано, что IscS взаимодействует с FdhD – белком, необходимым для активности формилдегидрогеназ (FDH). Взаимодействие IscS с FdhD приводит к переносу серы между IscS и FdhD, так как FdhD стимулирует 1-цистеиндесульфуразную активность IscS и получает персульфиды от IscS. Таким образом FdhD функционирует как сульфотрансфераза между IscS и FdhF. Дополнительный атом серы в активном центре FdhF приводит к образованию активного фермента, окисляющего формил до протонов и углекислого газа (Thome et al., 2012).

Геном PB12/4term кодирует цитохром-с3 гидрогеназу (EC:1.12.2.1). Фермент катализирует обратимую гетеролитическую диссоциацию молекулярного водорода до двух

протонов и двух электронов, которые затем передаются на цитохром-с3 (<https://www.ebi.ac.uk/enzymeportal/ec/1.12.2.1>). Дальнейший перенос образовавшихся электронов, в основном, описан для сульфатредуцирующих бактерий р. *Desulfovibrio*, где конечным акцептором электронов является сульфат или оксианионы серы, такие как сульфит или тиосульфат (Heidelberg et al., 2004; Sim et al., 2013). Так как в геноме *Thermaerobacter* sp. PB12/4term обнаружены все необходимые гены (цистеиновая десульфуреза, форматдегидрогеназа акцессорная сульфуртрансфераза [FdhD] и гидрогеназа) для активирования формиатдегидрогеназы и переноса электронов от водорода на окисленные соединения серы для ее последующего восстановления, высказано предположение, что исследуемый штамм может осуществлять указанный путь в своем метаболизме, как это показано для *Escherichia coli* и *Desulfovibrio* spp. в исследованиях (Heidelberg et al., 2004; Thome et al., 2012). Также в геноме PB12/4term обнаружены гены, кодирующие белки посттрансляционной экспрессии/образования гидрогеназ (HupF/HupC), необходимые для их созревания.

*Метаболизм азота.* Штамм PB12/4term был отрицательным почти по всем протестированным генам, участвующим в азотном цикле. В геноме идентифицирован ген, кодирующий формамидазу (EC: 3.5.1.49), которая катализирует обратимую реакцию образования аммония и формиата из формамида. Образующийся формиат может быть окислен до CO<sub>2</sub> формиатдегидрогеназой (EC: 1.17.1.9), а образующийся аммоний + глутамат конденсируется до глутамина синтетазой глутамина (EC: 6.3.1.2). Кроме того, в геноме была обнаружена медьсодержащая нитрит-редуктаза, которая отвечает за восстановление нитрита до оксида азота (NO) в процессе денитрификации. Геном штамма PB12/4term содержит ген *nto* (EC: 1.13.12.16), кодирующий нитронатную монооксигеназу – фермент, катализирующий окисление нитроалканов до ацетальдегида, нитрита и других продуктов.

*Споруляция, подвижность и хемотаксис.* Штамм PB12/4term является спорообразующим. В геноме *Thermaerobacter* sp. PB12/4term выявлены гены, кодирующие белки положительной регуляции спорообразования: *spo0A* и *spo0J* – иницирующие образование споры; *spoII*, *spoIII*, *spoIV* и *spoV* – споруляционные белки стадии II-V; двухдоменные белки слияния белка созревания спор А (*SpmA*) и белка созревания спор В (*SpmB*). Считается, что *SpmA* и *SpmB* участвуют в обезвоживании ядра спор, как это было показано для *Bacillus subtilis*. Дегидратация спор важна для термоустойчивости и преобразования протеазы прорастания спор GPR в активную форму (Illades-Aguilar, Setlow, 1994). Также обнаружены гены, кодирующие белки, *gerKA* и *gerKC*, необходимые для прорастания спор.

Штамм PB12/4term подвижен и имеет полный набор генов, участвующих в правильной сборке и функционировании жгутиков. У *Thermaerobacter* sp. PB12/4term имеются гены, кодирующие белки жгутикового комплекса: белок сборки/биосинтеза жгутиков FlcDEFGHIJMNO/ZPSQR, белок жгутиков, ассоциированный со стержнем/крючком, FlgBCDEFGKL, белок биосинтеза жгутиков FlhABFG, а также белок жгутиков FlbD и белок MotAB, отвечающие за для формирования статора. Помимо генов, ответственных за синтез белков жгутикового комплекса, *pilABCDTM* в геноме идентифицированы оперон, кодирующий образование белка сборки ворсинок IV типа, и гены *spaBEF*, кодирующие белок сборки ворсинок. Белок сборки ворсинок IV типа является компонентом внутренней мембраны ворсинки (Т4Р), который играет роль в адгезии к поверхности и клеткам хозяина, колонизации, созревании биопленки, вирулентности и перекручивании. Изолят также имеет систему хемотаксиса, направляющую движение в более благоприятное место, включая оперон *cheABRYXW* и гены, кодирующие гомологи нескольких метилакцепторных белков хемотаксиса (MCP).

*Филогеномный анализ.* Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК показал, что штамм PB12/4term наиболее тесно связан с представителями рода *Thermaerobacter*. Дальнейшее уточнение таксономического положения штамма PB12/4term проводили с использованием геномных методов, включая определение средней нуклеотидной идентичности (Average Nucleotide Identity – ANI), фракции выравнивания (Alignment Fractions – AF) и предсказанные *in silico* значения гибридизации ДНК-ДНК (digital DDH(0)). Попарное значение ANI между геномами штамма PB12/4term и его ближайшего родственного организма *T. subterraneus* DSM 13965 составил 95.08%. Значение ANI для штамма *T. marianensis* DSM 12885 было ниже и составляло 84.98%. Значения AF 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*, составили 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*.

Таким образом, штамм PB12/4term является первым охарактеризованным факультативно-литоавтотрофным представителем рода *Thermaerobacter*. В настоящее время метод идентификации микробных видов (Microbial Species Identifier) для демаркации видов включает следующие пороговые критерии: ANI > 95%, AF > 0.6 и dDDH > 70% (Goris et al., 2007; Richter, Rosselló-Móra, 2009; Varghese et al., 2015; Konstantinidis et al., 2017). 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 прокариотических видов. Полученные геномные данные свидетельствуют о том, что изолированный штамм RB12/4term не является новым видом рода. В то же время штамм RB12/4term показал значительные физиологические и биохимические различия от близкородственных представителей рода *Thermaerobacter*.

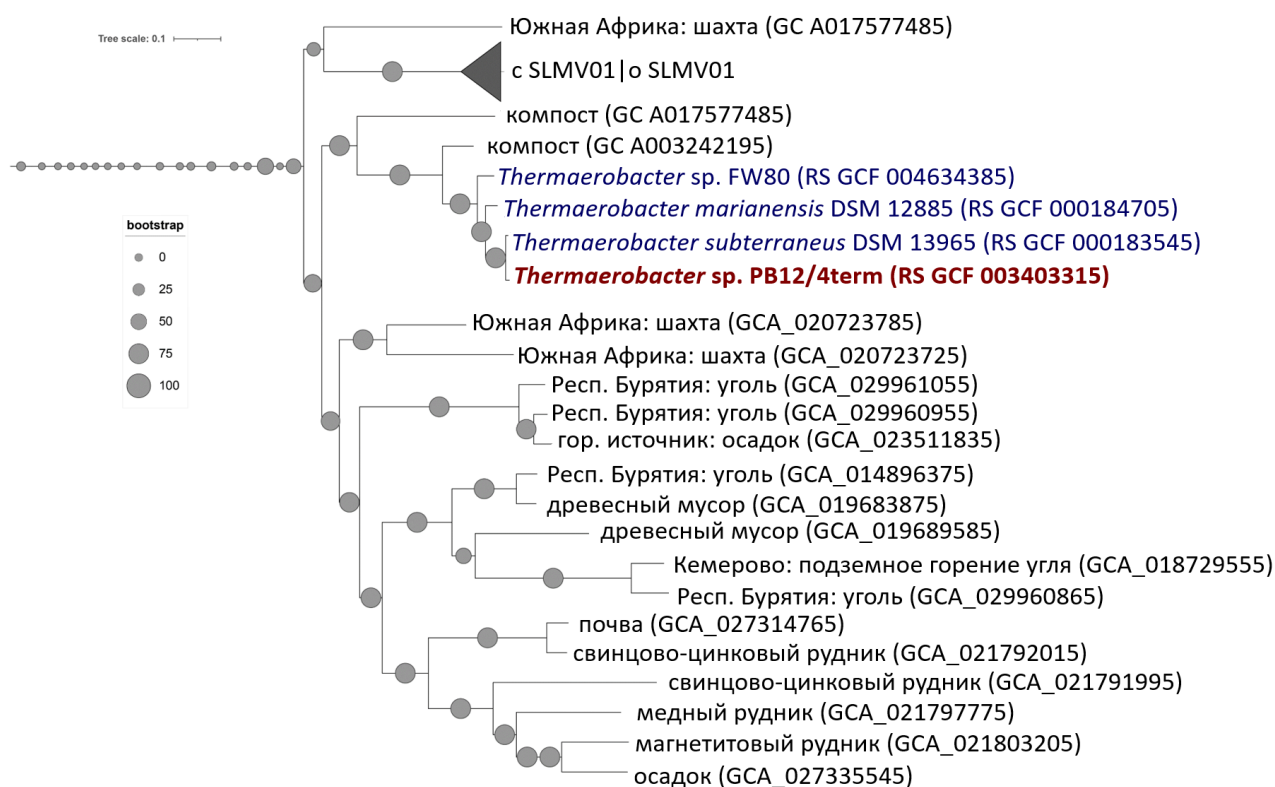
Подобно представителям рода *Thermaerobacter*, новый штамм имеет респираторный тип метаболизма с использованием кислорода и способен к органогетеротрофному росту с сахарами, пептидами и белками. В отличие от других видов рода *Thermaerobacter*, являющихся экстремальными термофилами, новый изолят – умеренный термофил с более низкими температурным оптимумом и температурными границами роста. Изолят RB12/4term образует споры, что для *T. marianensis*, *T. nagasakiensis* и *T. litoralis* показано не было. У *T. marianensis* и *T. nagasakiensis* споры не обнаружены, хотя ПЦР выявила ген споруляции *spo0A*, но не ген *ssp* (Spanevello, Patel, 2015). Его клетки подвижны за счет полярного жгутика, что роднит его с типовыми штаммами *T. nagasakiensis* и *T. litoralis*.

Состав жирных кислот (ЖК) штамма RB12/4term характеризовался длинными *n*-насыщенными, изо-разветвленными и антеизо-разветвленными цепями. Среди жирных кислот выявлены нормальные и изо-кислоты, встречающиеся при каждом числе, а также антеизо-кислоты, встречающиеся только при нечетных числах углерода в том же диапазоне. Преобладающими ЖК штамма RB12/4term были изо- $C_{15:0}$  (53%), изо- $C_{17:0}$  (20.1%), изо- $C_{16:0}$  (13.7%), изо- $C_{14:0}$  (3.84%), антеизо- $C_{15:0}$  (3.73%) и  $C_{16:0}$  (2.37%). Указанный состав жирных кислот значительно отличается от типового штамма *T. marianensis*, содержащего  $C_{14:1}$  (27.6%), которая не была идентифицирована в RB12/4term. Кроме того, штамм RB12/4term синтезирует ряд жирных кислот, которые не были обнаружены в *T. marianensis* или представлены в низкой концентрации, например, изо- $C_{15:0}$  (табл. 7). Процент разветвленных жирных кислот у *Thermaerobacter* RB12/4term достигал 96%, тогда как у *T. marianensis* 7p75a<sup>T</sup> он составляет всего 69%. Основной жирной кислотой RB12/4term была изопентадекановая кислота (53%) в отличие от *T. marianensis*, где преобладала изогептадекановая кислота (52%). Преобладание изо- $C_{15:0}$  и изо- $C_{17:0}$  жирных кислот также характерно для термофильных *Bacillus* и *Anoxybacillus* (Inan et al., 2012).

Отличительной особенностью штамма RB12/4term от других представителей рода *Thermaerobacter* является его способность к факультативно-литоавтотрофному росту. Новый изолят рос в анаэробной среде с молекулярным водородом в качестве донора электронов, элементарной серой и тиосульфатом в качестве акцепторов электронов и  $CO_2$  в качестве источника углерода. Факультативно-литотрофный рост штамма RB12/4term может обеспечиваться наличием в геноме генов, кодирующих гидрогеназы, формиатдегидрогеназу,

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 CO<sub>2</sub> (рис. 28).

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. 29), который находится в одном кластере с культивируемыми бактериями рода *Thermaerobacter*.



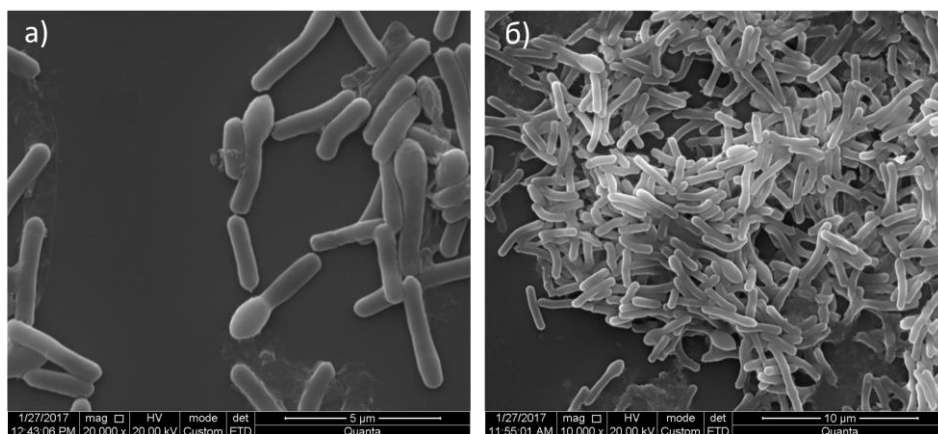
**Рисунок 29.** Филогеномное дерево представителей подфилума *Bacillota\_E*. Красным цветом выделена последовательность генома *Thermaerobacter* sp. PB12/4term, синим – культивируемых бактерий рода *Thermaerobacter*, черным – MAGs (аннотированные геномы из метагеномных массивов данных).

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. 30). 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 30.** Морфология клеток изолята PB15/Grf7geo на плотной питательной среде. 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 идентифицированы 15 пиков. Из них 5 насыщенных жирных кислот (НЖК) и 7 метиловых эфиров разветвленных НЖК, 2 метиловых эфира мононенасыщенных ЖК и один метиловый эфир разветвленной мононенасыщенной ЖК. Анализ пиков показал преобладание метиловых эфиров жирных кислот изо-С<sub>15:0</sub> – 33%; изо-С<sub>16:0</sub> – 13.6%; изо-С<sub>17:0</sub> – 32.3%; изо-С<sub>17:1</sub> n-11 – 7.3%. Остальные жирные кислоты содержатся в минорных количествах (табл. 8). Известно, что жирные кислоты определяют физико-химические свойства клеточных стенок микроорганизмов, такие как текучесть, устойчивость к температурам, гидрофобность. Разветвленные или алициклические жирные кислоты, благодаря особенностям химического строения у грамположительных бактерий выполняют адаптивную функцию, придавая пластичность и текучесть мембране (Будников и др., 2010; Захарова, Сухих, 2015).

**Таблица 8.** Состав жирных кислот у изолята PB15/Grf7geo в % от суммы

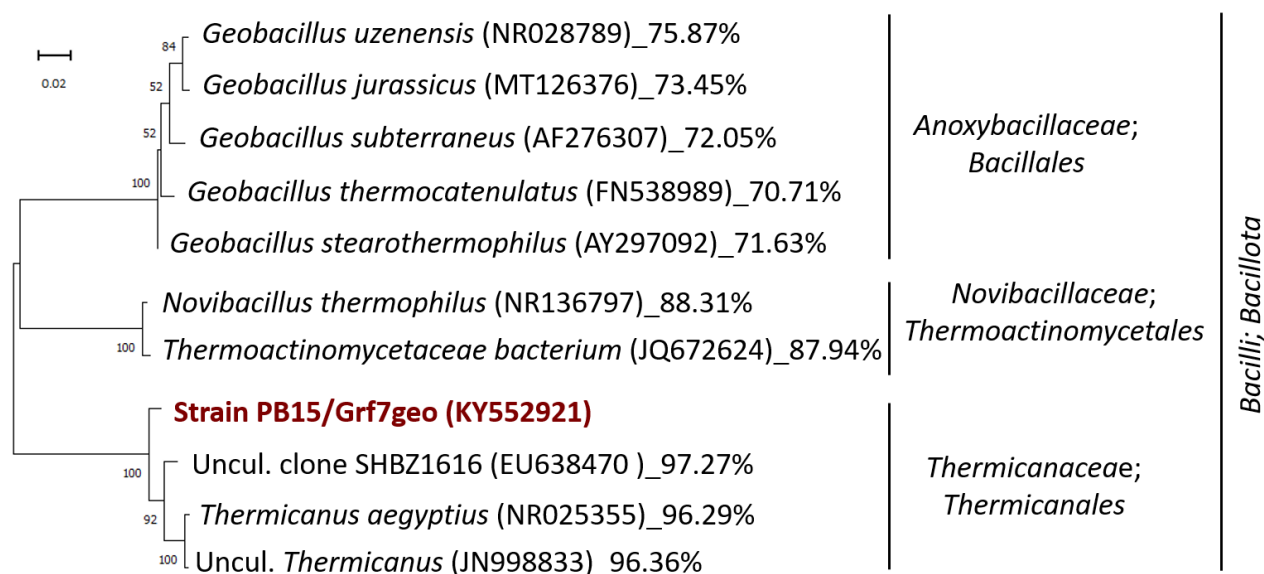
Жирная кислота	PB15/Grf7geo
iso-C <sub>14:0</sub>	0.29
C <sub>14:0</sub>	0.27
iso-C <sub>15:0</sub>	<b>33</b>
C <sub>15:0</sub>	0.23
iso-C <sub>16:0</sub>	<b>13.6</b>
C <sub>16:0</sub>	3.49
iso-C <sub>17:0</sub>	<b>32.3</b>
C <sub>17:0</sub>	0.29
anteiso-C <sub>17:0</sub>	1.0
iso-C <sub>17:1</sub> n-11	<b>7.3</b>
iso-C <sub>18:0</sub>	0.8
C <sub>18:0</sub>	1.73
Другие	6

Содержание Г+Ц пар в ДНК PB15/Grf7geo составляет 53.0 мол.%. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рНК PB15/Grf7geo показал, что она обнаруживает 96.3%–96.4% сходства с последовательностью типового штамма *Thermicanus aegyptius* ET-5b<sup>T</sup> 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. 31).

Род *Thermicanus* состоит из единственного валидно описанного вида – *Thermicanus aegyptius* ET-5b<sup>T</sup> (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 O<sub>2</sub> 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 aegyrius* ET-5b<sup>T</sup> 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](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*.



**Рисунок 31.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма PB15/Grf7geo среди других представителей класса *Bacilli*, филума *Bacillota*.

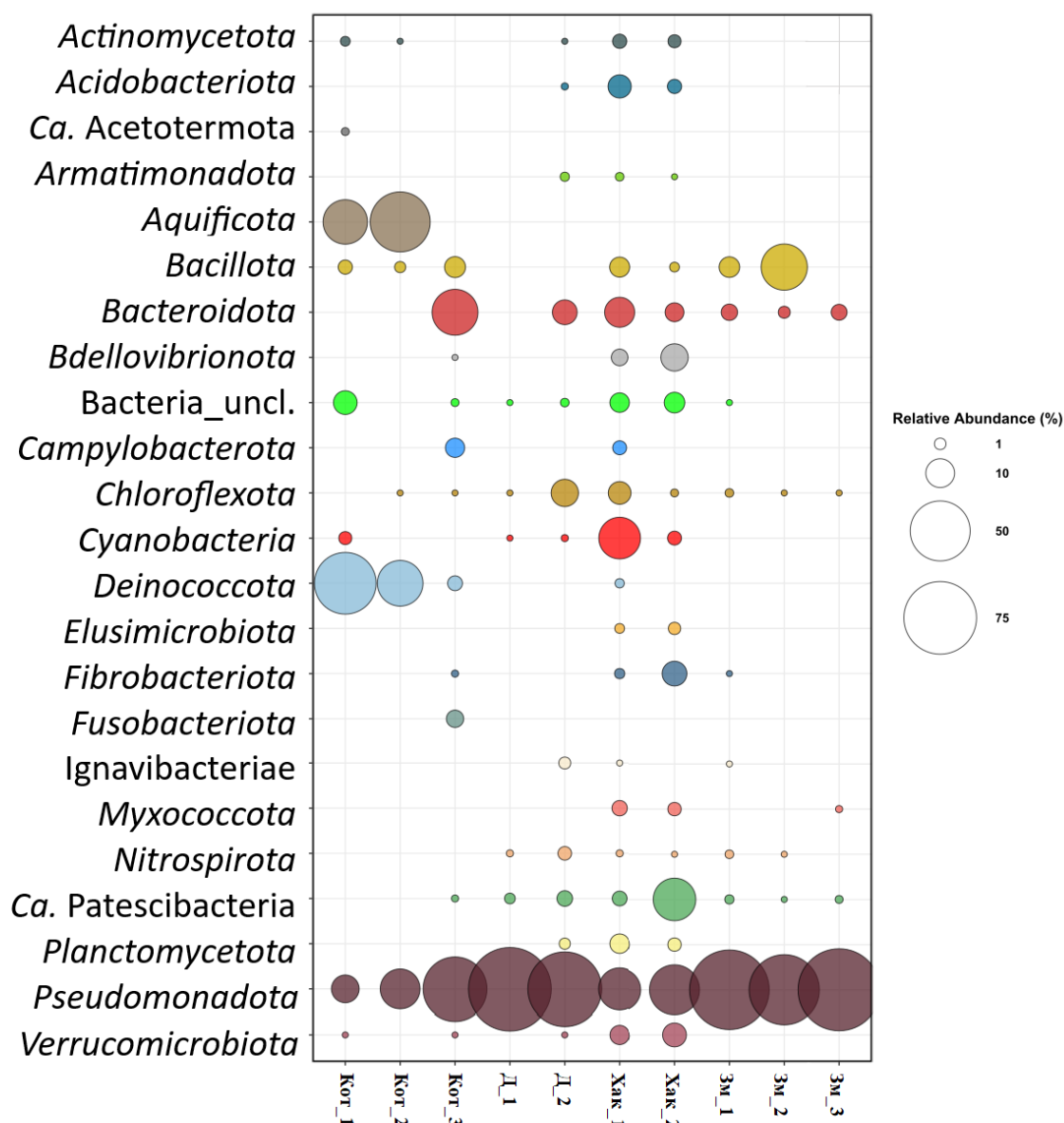
Несмотря на то, что термофильный, факультативно-анаэробный изолят PB15/Grf7geo выделен из низкотемпературного биотопа, его физиолого-биохимические свойства не отличаются от свойств типового штамма этого рода, выделенного из почвы Египта, где температура может составлять 28–40°C. Подобно *Thermicanus aegyrius* ET-5b<sup>T</sup>, новый изолят PB15/Grf7geo – умеренный термофил, аэроб, факультативный анаэроб. В отличие от *Thermicanus aegyrius* ET-5b<sup>T</sup>, 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?

Территория Байкальской рифтовой зоны (БРЗ) характеризуется значительным количеством подземных источников минеральных вод, разнообразных по составу и свойствам (Ломоносов, 1974). Источники, выходящие на поверхность или вскрытые скважинами, изучены с большей или меньшей детальностью более чем в 100 районах БРЗ. На побережье расположены азотные источники Горячинский, Нечаевский, Хакусский, Фролихинский, Змеиный, Котельниковский и Давшинский (Ломоносов, 1974). Источники характеризуются различными физико-химическими параметрами, в частности различаются по химическому составу, температуре и окислительно-восстановительному потенциалу (табл. 3) (Борисенко, Замана, 1978).

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 (табл. 2; Павлова и др., 2024б).

**Филогенетическое разнообразие прокариот в горячих источниках.** Во всех микробных сообществах абсолютное большинство микроорганизмов составляли бактерии (Павлова и др., 2024б). Неклассифицируемые представители домена *Archaea* выявлены в разливах источников Давшинский и Хакусский, где их доля не превышала 0.02%. Микробное сообщество источника Давшинский представлено одним доминирующим филумом – *Pseudomonadota* (98.5% всех последовательностей генов 16S рРНК), в котором более 95% последовательностей принадлежали хемолитотрофным сера/сульфид/тиосульфат-окисляющим бактериям рода *Thiovirga* (рис. 32, 33). Представители филумов *Ca. Patescibacteria*, *Nitrospirota*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexota*, *Deinococcota* и *Bacteroidota* составляли менее 1%. В разливе источника Котельниковский (Кот\_1) основную часть микробного сообщества составляли *Deinococcota* – 53.2%, *Aquificota* – 26.2%, *Pseudomonadota* – 9.1%, неклассифицируемые *Bacteria* – 6.4%, *Bacillota* – 1.7% и *Cyanobacteria* – 1.4%. Филумы *Deinococcota* и *Aquificota* представлены ОТЕ, принадлежащим родам *Thermus* и *Hydrogenobacter* соответственно. К минорным компонентам микробного сообщества относились представители филума *Desulfobacterota* (р. *Caldimicrobium* – факультативно-литоавтотрофные, анаэробные бактерии с оптимумом роста 75°C), *Ca. Acetithermota* и *Armatimonadota* (Oren, Goker, 2023). В микробном сообществе Кот\_2, в сравнении с разливом источника, увеличилась доля представителей рода *Hydrogenobacter* (50%) и уменьшилась рода *Thermus* (28%).



**Рисунок 32.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, представленных на уровне филума в библиотеках из горячих источников. Перечислены таксоны, составляющие >1% в каждой библиотеке. Цитировано по Chernitsyna et al., 2023; Павлова и др., 2024б.

Термофильные и гипертермофильные бактерии, обнаруживаемые в геотермальных системах, нефтяных резервуарах, анаэробных реакторах и очистных сооружениях, относящиеся к родам *Fervidobacterium* (*Thermotogota*), *Caldisericum* (*Caldisericota*), *Ca. JS1* (*Atribacterota*) (Oren, Garrity, 2021) находились в числе минорных представителей.

В месте впадения источника Котельниковский в оз. Байкал (Кот\_3) увеличивается доля *Pseudomonadota* (57%) и *Bacillota* (4.8%). В сообществе Кот\_3 выявлены ОТЕ, отнесенные к *Bacteroidota* (28.2%), *Campylobacterota* (4%), *Fusobacteriota* (3%) и *Deinococcota* (2%). Менее 1% составляли последовательности представителей *Ca. Patescibacteria*, *Fibrobacterota*, *Bdellovibrionota* и *Chloroflexota*.



**Рисунок 33.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, представленных на уровне рода в библиотеках из горячих источников. Перечислены таксоны, составляющие >1% в каждой библиотеке. Цитировано по Chernitsyna et al., 2023; Павлова и др., 2024б.

Последовательности микроорганизмов, составляющие более 1% выявлены в 13 высших таксонах домена *Bacteria* (*Pseudomonadota*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Chloroflexota*, *Bacillota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Bdellovibrionota*, *Мухосoccota*, *Ca. Patescibacteria*, *Actinomycetota*, *Campylobacterota*) в составе микробного сообщества источника Хакусский с температурой +44.8°C (Хак\_1).

Представители *Spirochaetota*, *Desulfobacterota*, *Armatimonadota*, *Ca. Dependientiae*, GAL15 составляли менее 1%. В микробном сообществе Хак\_2 доминировали представители пяти филумов: *Pseudomonadota* (33.7%), *Ca. Patescibacteria* (24%), *Bdellovibrionota* (8.8%), *Fibrobacterota* (7%), *Verrucomicrobiota* (6.5%). Неклассифицируемые *Bacteria*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetota*, *Мухосoccota*, *Actinomycetota*, *Elusimicrobiota* составляли 1.2–4.6%. Представленность *Ca. Dependientiae*, *Bacillota*, *Chloroflexota*, *Gemmatimonadota*, *Armatimonadota*, *Desulfobacterota*, *Ca. PAUC34f*, *Ca. SAR324* (*Marine\_group\_B*), *Ca. WPS-2*, *Spirochaetota* была менее 1%.

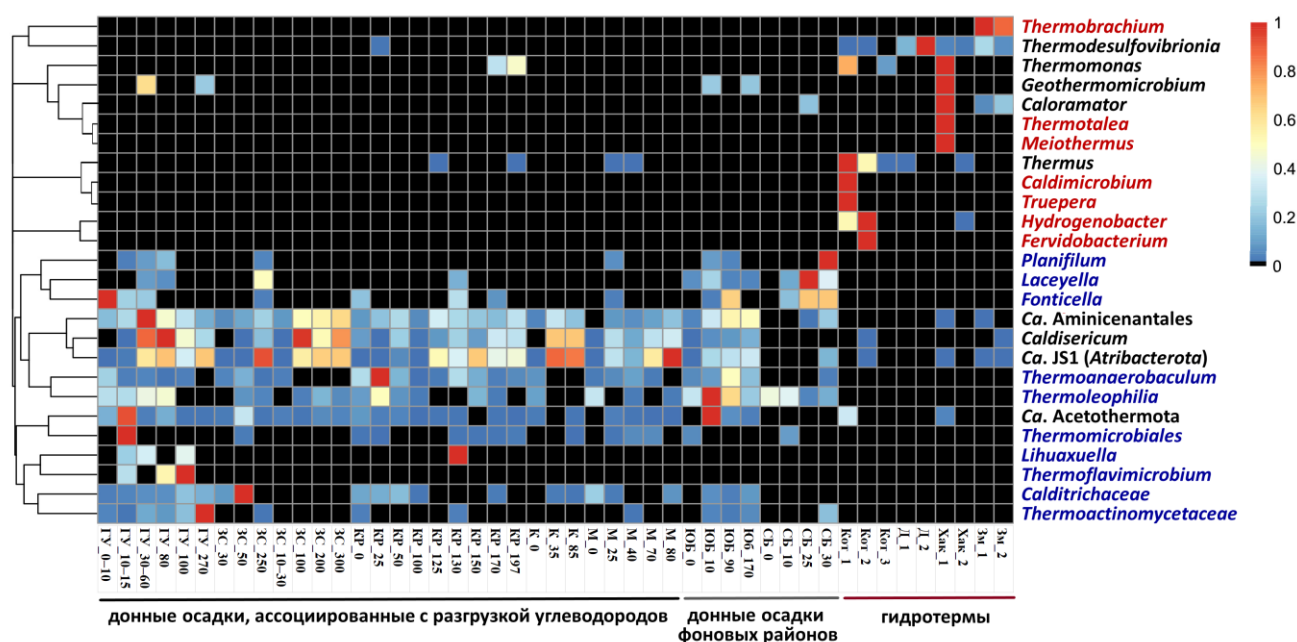
Микробное сообщество источника Змеиный (Зм\_1–Зм\_3), так же, как и источника Давшинский характеризовалось невысоким разнообразием на уровне филумов, где 91% последовательностей генов 16S рРНК принадлежало филуму *Pseudomonadota*. Представители филумов *Bacteroidota* и *Bacillota* составляли 2.6–4.6%. В минорном количестве (менее 1%) выявлены представители филумов *Desulfobacterota*, *Spirochaetota*, *Synergistota*, *Atribacterota*, *Hydrogenedentes*, *Ca. Sva0485*, *Ca. TA06*, *Ca. WS2* (Chernitsyna et al., 2023).

Таким образом, представители филумов *Pseudomonadota*, *Ca. Patescibacteria* и *Chloroflexota* обнаружены в сообществах всех источников. Представители филума *Aquificota* и *Deinococcota* в значительном количестве детектированы только в источнике и пруде Котельниковский. За исключением источника Котельниковский, микробные сообщества исследованных горячих источников представлены, в основном, мезофильными микроорганизмами, где основная доля принадлежит бактериям родов *Thiothrix*, *Thiovirga*, *Paludibacter*, *Azonexus*, *Acetoanaerobium*, *Hydrogenophaga* и др. (рис. 33).

**Сравнительный анализ таксономического разнообразия термофильных микроорганизмов в горячих источниках и донных осадках оз. Байкал.** 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%.

Бактерии родов *Thermus*, *Caldisericum*, *Thermomonas*, *Geothermophilum*, *Caloramator*, а также некультивируемые представители *Atribacterota*, *Ca. Acetithermota*, *Ca. Aminicenantales* и *Thermodesulfovibrionia* обнаружены в сообществах как гидротерм, так и донных осадков.

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*, *Lihuaxuella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*, *Fonticella* и некультивируемые представители *Calditrichaceae*, *Thermoactinomycetaceae* и *Thermomicrobiales* (рис. 34).

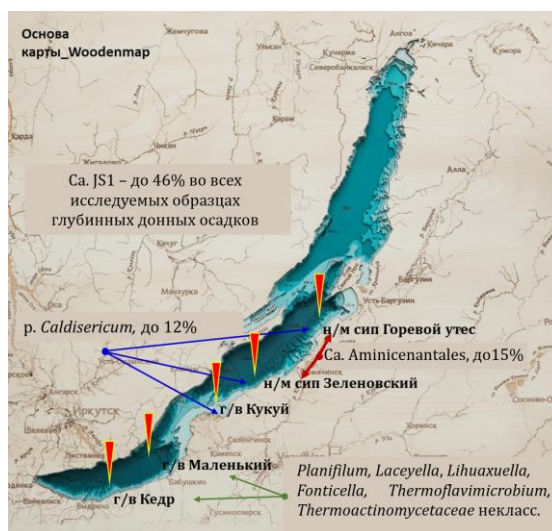


**Рисунок 34.** Тепловая карта распределения последовательностей термофильных бактерий в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК микробных сообществ воды горячих источников и донных осадков оз. Байкал. Последовательности, обнаруженные только в горячих источниках, выделены красным цветом; только в донных осадках – синим; и в донных осадках, и в горячих источниках – черным. Цитировано по Павлова и др., 2024б.

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 углеводов. 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 Горевой Утес и Большая Зеленовская, а также в г/в Кукуй. Последовательности бактерий, установленные только в сообществе донных осадков и отнесенные к филуму *Bacillota* (некульт. *Thermoactinomycetaceae*, *Laceyella*, *Lihuaxuella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*, *Fonticella*), преобладали в глубинных слоях осадков г/в Кедр и г/в Маленький (рис. 35).



**Рисунок 35.** Типы геологических структур, в которых обнаружены последовательности термофильных бактерий.

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*.

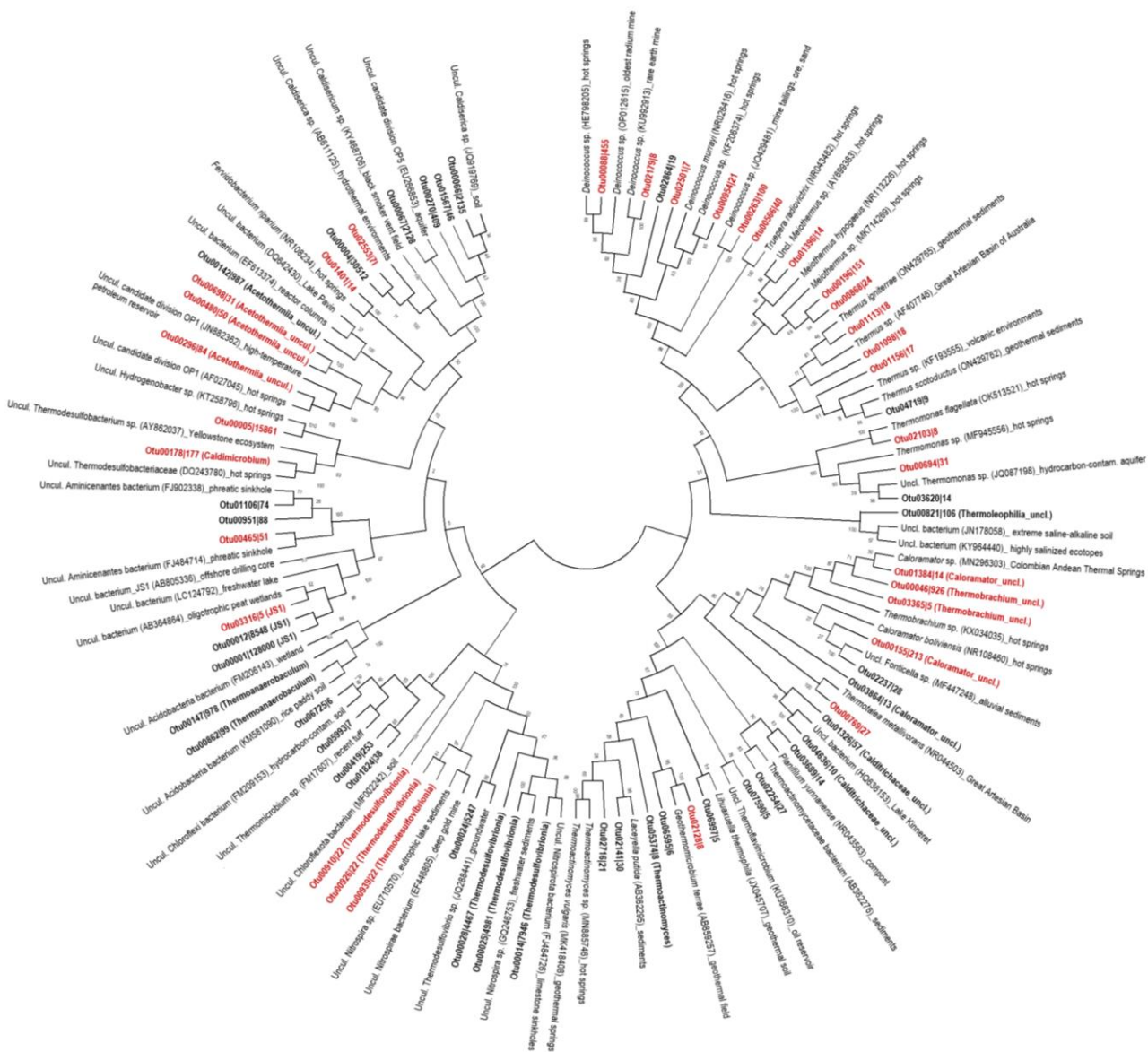
Ранее анализ MAGs, реконструированных из образцов воды придонной зоны фонового района в Южном Байкале, показал, что геномы, принадлежащие микроорганизмам различных таксономических групп, содержат гены разложения ароматических соединений и алкан/метансульфонатмонооксигеназы (Cabello-Yeves et al., 2020). Донные осадки этого района напрямую не связаны 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. Отсутствие проведенных

сейсмических исследований и измерений тепловых потоков в данных районах не позволяет достоверно подтвердить данную гипотезу.

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 горячих источников не была идентичной 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 (рис. 36).

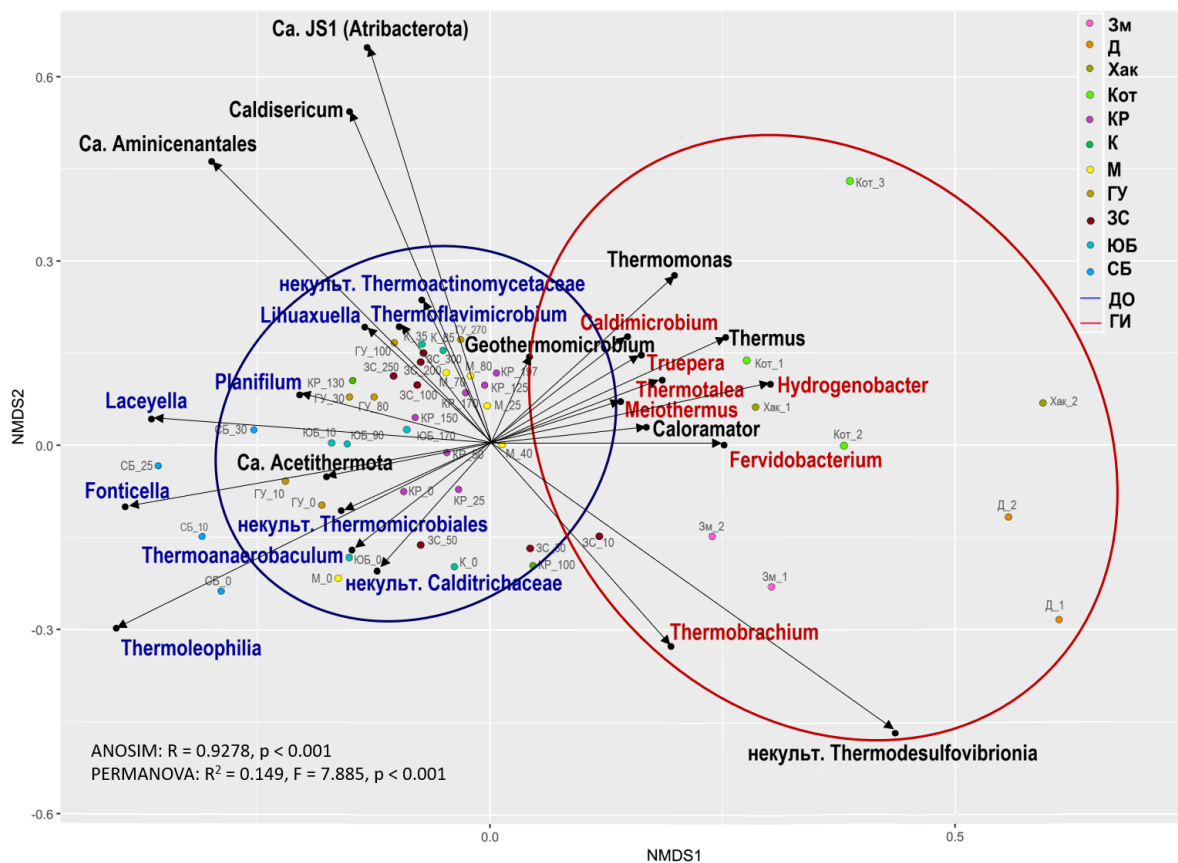
Например, ближайшими гомологичными последовательностями для бактерий р. *Thermus* из ГИ, являются последовательности, выявленные в горячих источниках Китая, Алла и Уро (БРЗ). Для бактерий р. *Caldimicrobium*, р. *Fervidobacterium*, р. *Hydrogenobacter* – горячие источники, расположенные на территории Йеллоустонского национального парка, Большого Артезианского бассейна в Австралии, Курильских островов и Монголии. Представители р. *Caldisericum*, обнаруженные в источнике Котельниковский и Змеиный, а также в донных осадках нефте-метановых сипов ГУ и БЗ, г/в Кукуй, ранее выявлялись в анаэробных накопительных культурах, содержащих донные осадки н-м/с Горевой Утес и для них были определены ближайшие идентичные последовательности (Pavlova et al., 2022). Но эти последовательности не гомологичны обнаруженным в горячих источниках. Последовательности бактерий рода *Planifilum*, *Symbiobacterium*, *Caldinitratiruptor*, *Thermaerobacter*, выявленные в накопительных термофильных культурах, из метанового сипа Посольская Банка, нефте-метанового сипа Горевой Утес и грязевого вулкана Кукуй-2, не обнаружены в составе микробных сообществ всех исследуемых горячих источников.





**Рисунок 36.** Филогенетическое положение бактерий из горячих источников (выделены красным цветом) и донных осадков (выделены черным цветом). Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap» – анализа 100 альтернативных деревьев.

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. 37).



**Рисунок 37.** 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.

Наличие в низкотемпературных осадках термофильных микроорганизмов, филогенетически отличающихся от обитателей гидротерм делает более 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 (Chakraborty et al., 2020), оседают в донных отложениях, где сохраняются в течение многих лет и постепенно захораниваются. 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).

Согласно осадочно-миграционной теории нефтегазообразования, нефть формируется в осадочных породах в результате процессов миграции из пород рассеянных битумоидов (микронепти), источником которых является органическое вещество (Конторович, 1998). Органическое вещество (ОВ) представляет собой комплекс органических соединений, возникших прямо или косвенно из живого вещества или продуктов его жизнедеятельности. 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).

Трансформация органического вещества сопряжена с процессом литогенеза вмещающих его пород, поэтому стадии газонефтеобразования в определенной мере совпадают со стадиями литогенеза. В цикле литогенеза выделяют пять стадий: 1) образование и мобилизация исходного вещества осадков в процессе физического и химического разрушения исходных пород и его перенос к месту захоронения – поверхностный гипергенез; 2) поступление осадков в водоемы и окончательное осаждение – седиментогенез; 3) физико-химическое уравнивание насыщенного водой осадка, завершающееся преобразованием его в осадочную породу – диагенез; 4) дальнейшие изменения породы по мере увеличения глубины ее погружения под влиянием возрастающих температуры и давления – катагенез; 5) последующее преобразование состава пород, особенно глинистых, при дальнейшем их погружении – метагенез, или собственно метаморфизм.

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. 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 (Manakov, Pavlova et al., 2019). 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 Ультроструктуры 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). С помощью различных пробоотборников и глубоководных обитаемых аппаратов «Мир», 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 при 80°C и давлении метана 50 атм. КВД № 1 содержал нативный природный осадок с добавлением биомассы диатомовой водоросли *Ulnaria acus*, осадок в КВД № 2 был стерилизован автоклавированием и выступал в качестве отрицательного контроля (Pavlova et al., 2016). Характеристика осадка приведена в таблице 1.

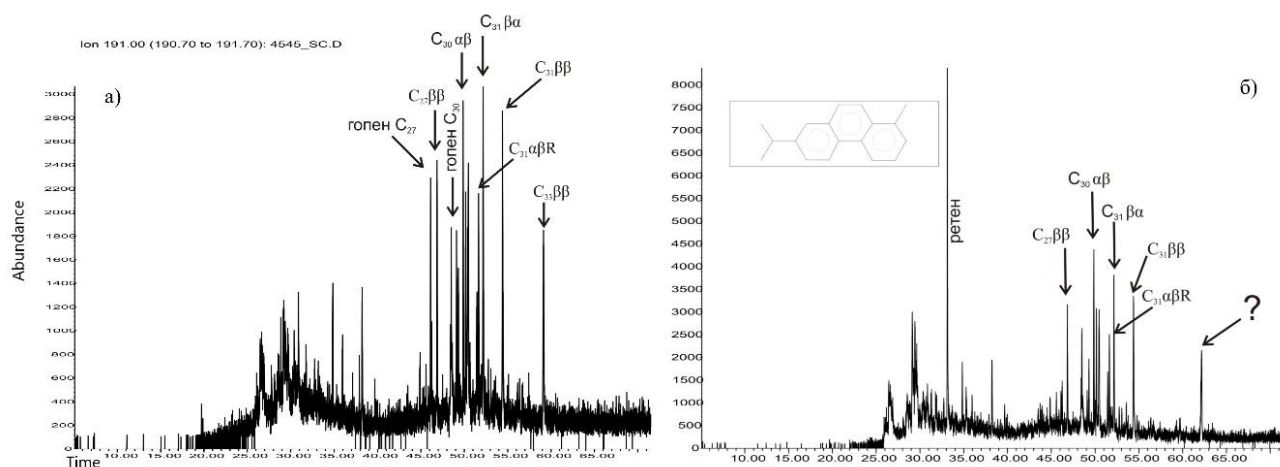
В природном байкальском осадке до эксперимента отмечалось присутствие гопенев  $C_{27}$ ,  $C_{30}$ , а также гопанов  $C_{27}$ ,  $C_{31}$  и  $C_{33}$  с «биологической» стереохимической конфигурацией  $\beta\beta$ . После экспозиции среди «геогопанов» (конфигурация  $\alpha\beta$  и  $\beta\alpha$ ) идентифицированы лишь «биогапаны»  $C_{27}$ ,  $C_{31}$ , а также углеводород, структуру которого расшифровать не удалось. В образце до и после эксперимента, среди высокомолекулярных углеводородов преобладали нечетные углеводороды. Известно, что в ОВ осадков, не испытавших диагенетических и катагенетических преобразований, преобладают молекулы УВ с нечетным количеством атомов углерода. Поэтому отношение нечетные/четные (коэффициент CPI в различных модификациях) имеет значения 5–6. В процессе превращения ОВ количество четных и нечетных молекул УВ выравнивается. Коэффициент CPI по величине становится близким к единице и в последующих преобразованиях не меняется (Mukhopadhyay et al., 1979). Индекс нечетности (carbon preference index, CPI), рассчитанный по формуле:  $I_{нч} =$

$(C_{25}+C_{27}+C_{29}+C_{31})/(C_{26}+C_{28}+C_{30}+C_{32})$  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 углеводов составила 17.4%. Содержание органического вещества ( $C_{орг}$ ) в образцах изменялось от 0.93% в начале эксперимента до 0.79% после его завершения. Масса растворимого в хлороформе битумоида уменьшалась с 0.0063 г до 0.0058 г. Битумоидные коэффициенты (отношение выхода экстракта к содержанию  $C_{орг}$ ) соответственно составили 2.56 и 2.76 (табл. 9) (Pavlova et al., 2016).

**Таблица 9.** Хромато-масс-спектрометрические показатели мальтеновой части экстракта образца донного осадка до эксперимента и после

Показатель	До эксперимента	После эксперимента
Содержание ОВ ( $C_{орг}$ )	0.93%	0.79%
Масса растворимого в хлороформе битумоида	0.0063 г.	0.0058 г.
Битумоидные коэффициенты (отношение выхода экстракта к содержанию $C_{орг}$ )	2.56	2.76
Индекс нечетности	4.24	3.5
Степень преобразованности ОВ		17.4%

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. 38). Ретен, как правило, рассматривается как биомаркер хвойных растений (van Aarssen et al., 2000; Meyers, 2009). Частичная деградация абиеиновых кислот – основного компонента смолы хвойных деревьев, приводит к образованию типичных ароматических абиетанов, таких как ретен и симонелит.

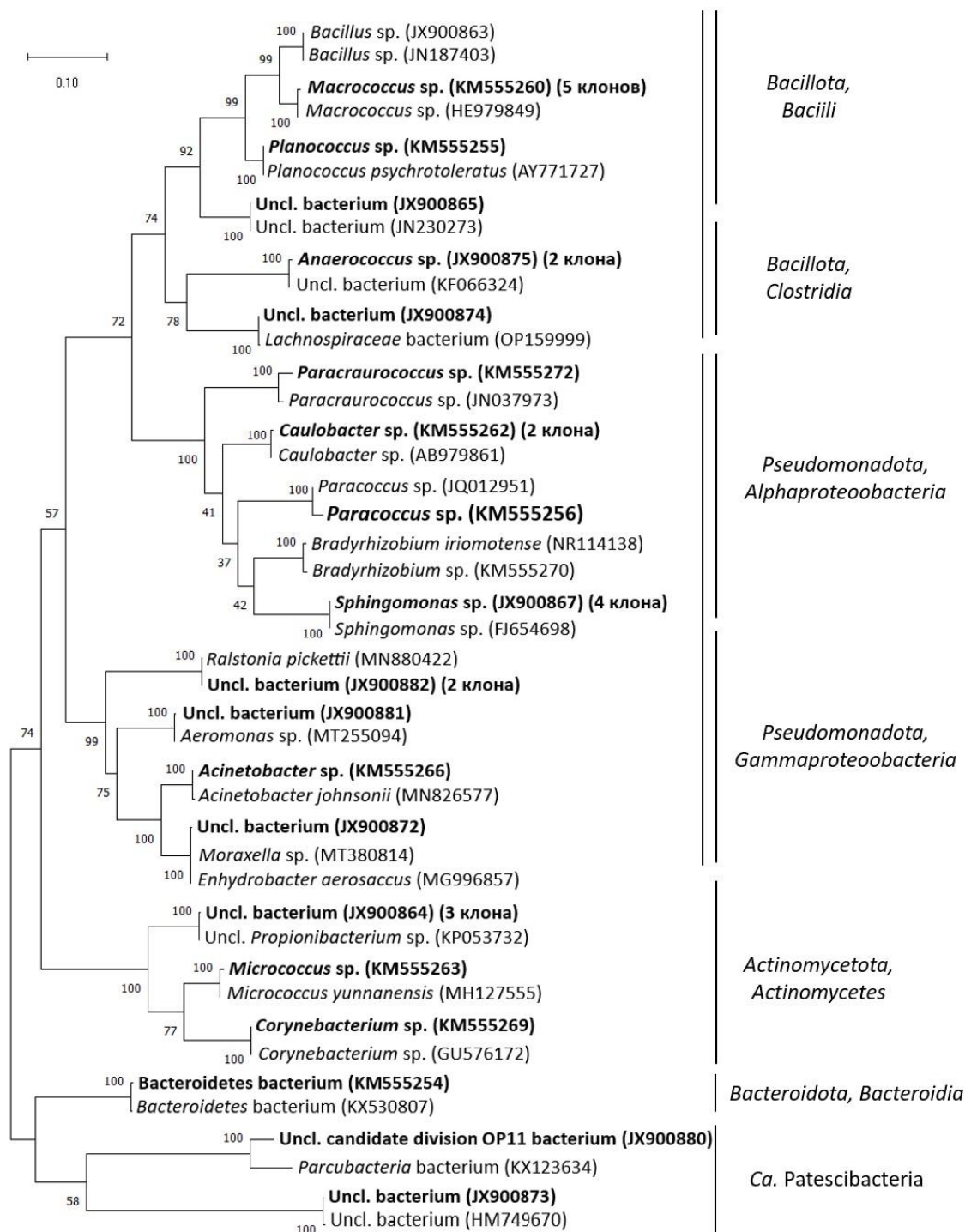


**Рисунок 38.** Масс-хроматограмма терпановых углеводородов по фрагментному иону  $m/z$  191– до эксперимента (а) и после (б). Цитировано по Pavlova et al., 2016.

Фактически, все абиептаны, образующие класс биодитерпеноидов, могут быть деградированы с образованием ретена (Otto, Simoneit, 2001; Hautevelle et al., 2006). 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. Обнаружение ретена в верхних силурийских – нижних девонских осадках показывает, что этот биомаркер может быть ассоциирован не только исключительно с голосеменными растениями, которые эволюционировали лишь в позднем девоне, но может также образовываться из водорослей при участии микроорганизмов (Wang, 1990; Zhang et al., 1999; Romero-Sarmiento et al., 2010). Его образование из биомассы водорослей и цианобактерий *Chlorella protothecoides* и *Synechocystis* sp. отмечалось ранее лишь в процессе пиролиза (+200–300°C) (Wen et al., 2000). Поэтому его происхождение в осадках, содержащих органическое вещество наземных растений и водорослей, оставалось дискуссионным.

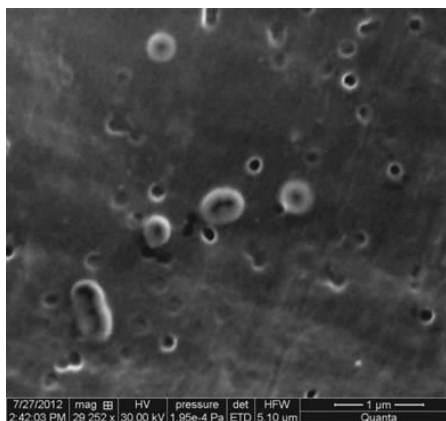
В продуктах амплификации генов 16S рРНК с суммарной ДНК, выделенной после окончания эксперимента, были выявлены нуклеотидные последовательности филумов *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota* и *Pseudomonadota* (классы  $\alpha$ ,  $\gamma$ ) (Pavlova et al., 2016). Всего было получено и проанализировано 33 клон фрагментов генов 16S рРНК. Следует отметить наличие в исследуемом микробном сообществе последовательностей с низким процентом сходства (84%) с представителями Candidate division OP11 (в н.в. суперфилума *Ca. Patescibacteria*) (рис. 39). Последовательности генов 16S рРНК, отнесенные к группе OP11, впервые были выявлены в результате молекулярно-филогенетического исследования в отложениях термального источника Обсидианового бассейна (Obsidian Pool) в Йеллоустонском национальном парке (США) (Hugenholtz et al., 1998).

Позднее, последовательности OP11 были обнаружены в морских и пресноводных отложениях, геотермальных бассейнах, подповерхностных экосистемах, почве и других, в основном бескислородных, богатых органикой средах (Harris et al., 2004). В настоящее время, на основе анализа геномов, Ринке С. с соавторами (Rinke et al., 2013) установлено, что геномы *Ca. Microgenomatus* (OP11), *Ca. Parcubacteria* (OD1) и *Ca. Gracilibacteria* (GN02) образуют монофилетические группы в рамках суперфилума *Ca. Patescibacteria* (Kadnikov et al., 2020b). Ультрамалые по размеру бактерии *Ca. Patescibacteria* имеют ограниченные метаболические возможности, включая общее отсутствие полных путей для биосинтеза аминокислот, нуклеотидов и липидов, что предполагает зависимый от партнера симбиотический или паразитический образ жизни. Представители классов *Ca. Parcubacteria* и *Ca. Saccharimonadia*, а также новая клада *Ca. Patescibacteria* обнаружена в глубинной зоне озера Байкал, для которой показано наличие большего количества анаболических путей в сравнении с представителями этого суперфилума из других экосистем (Naro-Moreno et al., 2023).

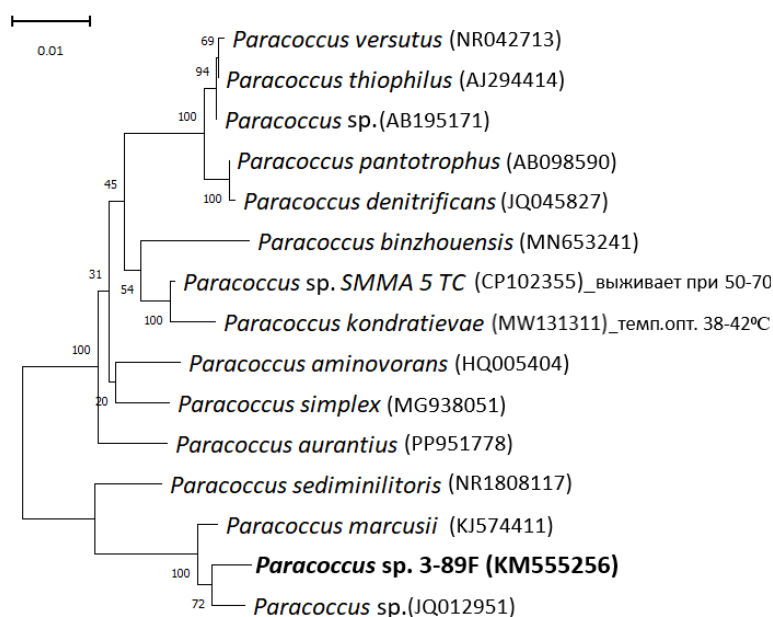


**Рисунок 39.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей генов 16S рРНК бактерий, полученных из проб донных осадков после эксперимента (выделены жирным шрифтом).

Для подтверждения жизнеспособности микроорганизмов после завершения эксперимента, часть образца донного осадка извлеченного из КВД, помещали в минеральную среду Пфеннига и культивировали при температуре 60°C в атмосфере  $H_2:CO_2$  в соотношении 4:1. После 2-х недель культивирования получена накопительная культура 3-89F, состоящая из клеток кокковидной формы, расположенных парами или по одиночке диаметром не более 0.5 мкм (рис. 40).



**Рисунок 40.** Морфология клеток микроорганизмов из накопительной культуры 3-89F на плотной питательной среде. Цитировано по Pavlova et al., 2016.



**Рисунок 41.** Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рНК, показывающее положение бактерий рода *Paracoccus* и последовательности, полученной из накопительной культуры 3-89F.

Анализ клональной библиотеки фрагментов гена 16S рНК бактерий накопительной культуры показал преобладание в ней последовательностей, принадлежащих бактериям рода *Paracoccus*. Последовательности имели 98% гомологии с последовательностью бактерии, изолированной из водной толщи Балтийского моря (JQ012951) и почвы, загрязненной тяжелыми металлами (MT023394) (рис. 41). В конце прошлого века, род *Paracoccus* включал 2 вида – *Paracoccus denitrificans* и *Paracoccus halodenitrificans* (Van Verseveld, Stouthamer, 1992). В настоящее время род *Paracoccus* включает 73 вида гетеротрофных бактерий [https://gtdb.ecogenomic.org/-tree?r=g\\_Paracoccus](https://gtdb.ecogenomic.org/-tree?r=g_Paracoccus). Некоторые представители этого рода способны расти как метилотрофы на одноуглеродных соединениях, как автотрофы за счет окисления водорода или неорганических соединений серы, как автотрофы на тиоцианатах или сероуглероде, а также как миксотрофы на метилированных сульфидах. Типовой вид (*Paracoccus denitrificans*) и некоторые другие виды этого рода являются факультативными денитрификаторами (Kelly et al., 2006). Бактерии, в основном, мезофильны, оптимум роста составляет 30°C. Оптимальная температура роста 38–42°C выявлена у штамма *Paracoccus kondratievae* (VKM В-2222<sup>PT</sup>) (Kelly et al., 2006). Рост/выживание при высоких температурах был обнаружен у штамма SMMA\_5 TC, филогенетического родственника мезофильного *Paracoccus kondratievae*, выделенного из воды с температурой от 78 до 85°C в трансгималайском серно-борном источнике. Авторами *in vitro* показано, что мезофильные бактерии, случайным образом попадающие в географически и геологически разнообразные



системы горячих источников под воздействием геодинамических сил способны выдерживать высокие температуры вплоть до роста в особых условиях (Mondal et al., 2022). Вероятно, обнаружение в накопительной культуре 3-89F, последовательностей *Paracoccus* sp., обусловлено его похожими адаптационными способностями, позволяющими выживать при высоких температурах в автотрофных условиях.

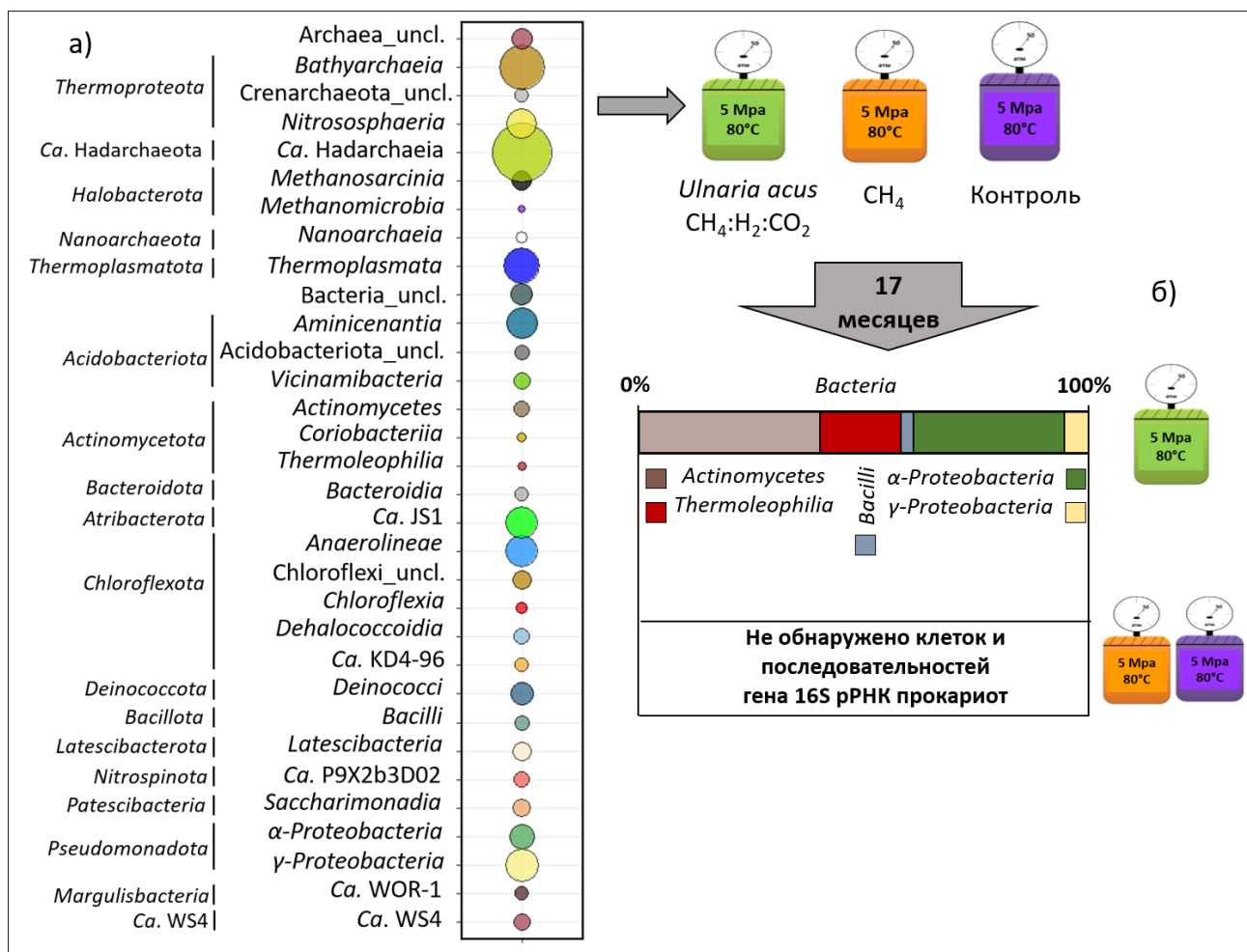
#### **4.2. Преобразование органического вещества микробным сообществом донных осадков метанового сипа Посольская Банка**

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 в трех КВД: 1) к образцу донных отложений добавлена биомасса диатомовой водоросли *Ulnaria acus*; газовая фаза  $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$ ; 2) донные осадки без дополнительных субстратов; 3) стерильный образец донных отложений (рис. 42; Bukin, Pavlova et al., 2016). Газовая фаза в КВД №2 и №3 состояла из метана.

Анализ фрагментов гена 16S рРНК в образце до эксперимента показали, что среди *Bacteria* наиболее многочисленны последовательности представителей филумов *Chloroflexota* (18.5%), *Pseudomonadota* (17.6%), *Acidobacteriota* (16.8%), *Atribacterota* (11%) и *Deinococcota* (5.1%). Последовательности представителей филумов *Actinomycetota*, *Ca. Latescibacterota*, *Ca. Patescibacteria*, *Ca. WS4* составляли 2.3–3.6%. Менее 2% составляли последовательности, принадлежащие представителям филумов *Nitrospinota*, *Bacillota*, *Margulisbacteria* и *Bacteroidota* (рис. 42a). Филум *Chloroflexota* представлен 4 семействами (*Anaerolineaceae*, *Dehalococcoidaceae* и KD4-96) и неклассифицируемые *Chloroflexota*. Представители самых многочисленных семейств *Anaerolineaceae* и *Dehalococcoidaceae* в исследуемом образце, 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 углеводов и галогенорганическое дыхание (*Dehalococcoidaceae*) (Liang et al., 2015; Löffler et al., 2015).



**Рисунок 42.** 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.

Филум *Pseudomonadota* представлен семействами *Sphingomonadaceae* (класс *Alphaproteobacteria*, 33.4%), *Burkholderiaceae* и *Moraxellaceae* (класс *Gammaproteobacteria*, 5.2%). Филум *Acidobacteriota* состоял из анаэробных, хемоорганогетеротрофных бактерий порядка *Ca. Aminicenantales* (10.1%). ОТЕ из филума *Atribacterota* принадлежали классу-кандидату JS1. В совокупности, 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).

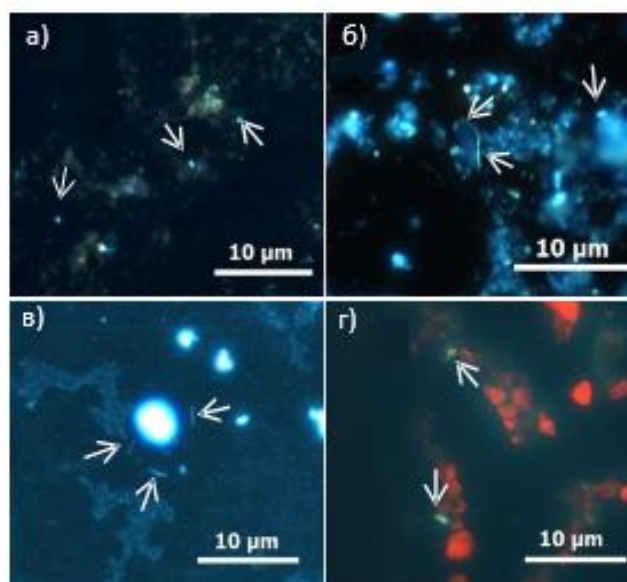
Филум *Deinococcota* представлен полиэкстремофильными бактериями р. *Deinococcus*. Последовательности, отнесенные к филумам *Actinomycetota* и *Bacillota* принадлежали бактериям р. *Kocuria* (семейство *Micrococcaceae*) и р. *Staphylococcus* (семейство

*Staphylococcaceae*). Для бактерий этих родов, выделенных из углеводородоокисляющих накопительных культур, показана способность к биодegradации ПАУ (Ahmed et al., 2015; Hentati et al., 2021; Sahu, Shrivastava, 2022).

Архейная компонента представлена филумами *Ca. Hadarchaeota* (41.6%), *Thermoproteota* (33.6%), *Thermoplasmata* (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 *Thermoplasmata* 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).

Микроскопия образцов донных осадков, извлеченных из КВД через 17 месяцев термобарического культивирования, позволила выявить единичные клетки микроорганизмов только в образцах донных отложений из КВД №1 (с добавлением биомассы диатомовой водоросли *Ulnaria acus*, в атмосфере  $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$ ). Микроорганизмы, ассоциированные с частицами осадка, в основном были представлены палочковидными формами (рис. 43; Vukin, Pavlova et al., 2016).

ПЦР-продукты после эксперимента получены только для ДНК из КВД №1 (с добавлением биомассы диатомовой водоросли *Ulnaria acus*, в атмосфере  $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$ ). Для данного образца была получена библиотека продуктов амплификации фрагмента генов 16S рРНК, включающая 13072 п.н., принадлежащих домену *Bacteria*. Археи детектированы не были. Полученные последовательности были сгруппированы в 41 ОТЕ0.03. Кривые разрежения, а также полученные значения индексов ACE, *Chao1* указывают, что полученного объема секвенирования достаточно для характеристики разнообразия сообществ на уровне рода (генетическая дистанция 0.03).



**Рисунок 43.** Морфология микроорганизмов в донных отложениях метанового сипа ПБ после культивирования в термобарических условиях, на снимках флуоресцентной микроскопии при окрашивании (а–в) ДАФИ и акридин оранжевым (г). Цитировано по Bukin, Pavlova et al., 2016.

В библиотеках гена 16S рРНК не выявлены последовательности представителей домена *Archaea*. Среди *Bacteria* 58% составляли последовательности филума *Actinomycetota*, 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. 42б). 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  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$  и давлении 40 МПа показано в работе (Ohtomo et al., 2013). Авторами установлено, что добавление высоких концентраций  $\text{CO}_2$  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 (табл. 10).

**Таблица 10.** Хромато-масс-спектрометрические показатели мальтеновой части экстракта образца донного осадка до эксперимента и после

Показатель	До эксперимента	После эксперимента
Содержание ОВ ( $C_{орг}$ )	0.77	0.66
Битумоидные коэффициенты (отношение выхода экстракта к содержанию $C_{орг}$ )	2.68	3.48
Индекс нечетности	5.1	3.5
Соотношение пристан/фитан	0.53	0.63
Степень преобразованности ОВ		41%

Так, значимые изменения в составе органического вещества наблюдались лишь в образце из КВД №1. Содержание  $C_{орг}$  в осадке снизилось с 0.77% до 0.66% в течении эксперимента. Содержание растворимого в хлороформе битумоида составило 0.02% до и после эксперимента, что не позволило обнаружить асфальтены. Доля насыщенных углеводородов в битумоиде составляла 19.6% до эксперимента, асфальтово-смолистых компонентов – 80.4%. После эксперимента содержание последних увеличилось до 91.2%.

Ароматическая фракция отсутствовала до эксперимента, тогда как после эксперимента ее доля составила 4.4%. Битумоидные коэффициенты (отношение выхода экстракта к содержанию  $C_{орг}$ ) в образцах до и после эксперимента составили 2.68 и 3.48 соответственно. Соотношения ациклических изопреноидов пристан/фитан возросло с 0.53 до 0.63. Значение коэффициента CPI уменьшилось с 5.1 до 3 в процессе культивирования, что указывает на то, что превращение углеводородной составляющей органического вещества достигло 41%. Кривая распределения нормальных алканов в образце до эксперимента «пилообразная», асимметричная с максимумом на  $C_{31}$ . Величина отношения  $n-C_{27}/n-C_{17}$  составляла 10. После эксперимента параметры распределения нормальных алканов изменились, отношение  $n-C_{27}/n-C_{17}$  увеличилось до 15.4. В составе циклических углеводородов-биомаркеров стеранового ряда ( $C_{27}-C_{30}$ ) в насыщенной фракции образцов до и после эксперимента преобладали этилхолестаны (37.3% и 39.2% соответственно). 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, таких как гаммацерен и ретен (Bukin, Pavlova et al., 2016). Согласно (dos Santos Neto et al., 1998),  $\delta^{13}C$  гаммацерена указывает на его происхождение из биомассы простейших, цианобактерий и других микроорганизмов, растущих в различных палеоусловиях (dos Santos Neto et al., 1998). Гаммацерен 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).

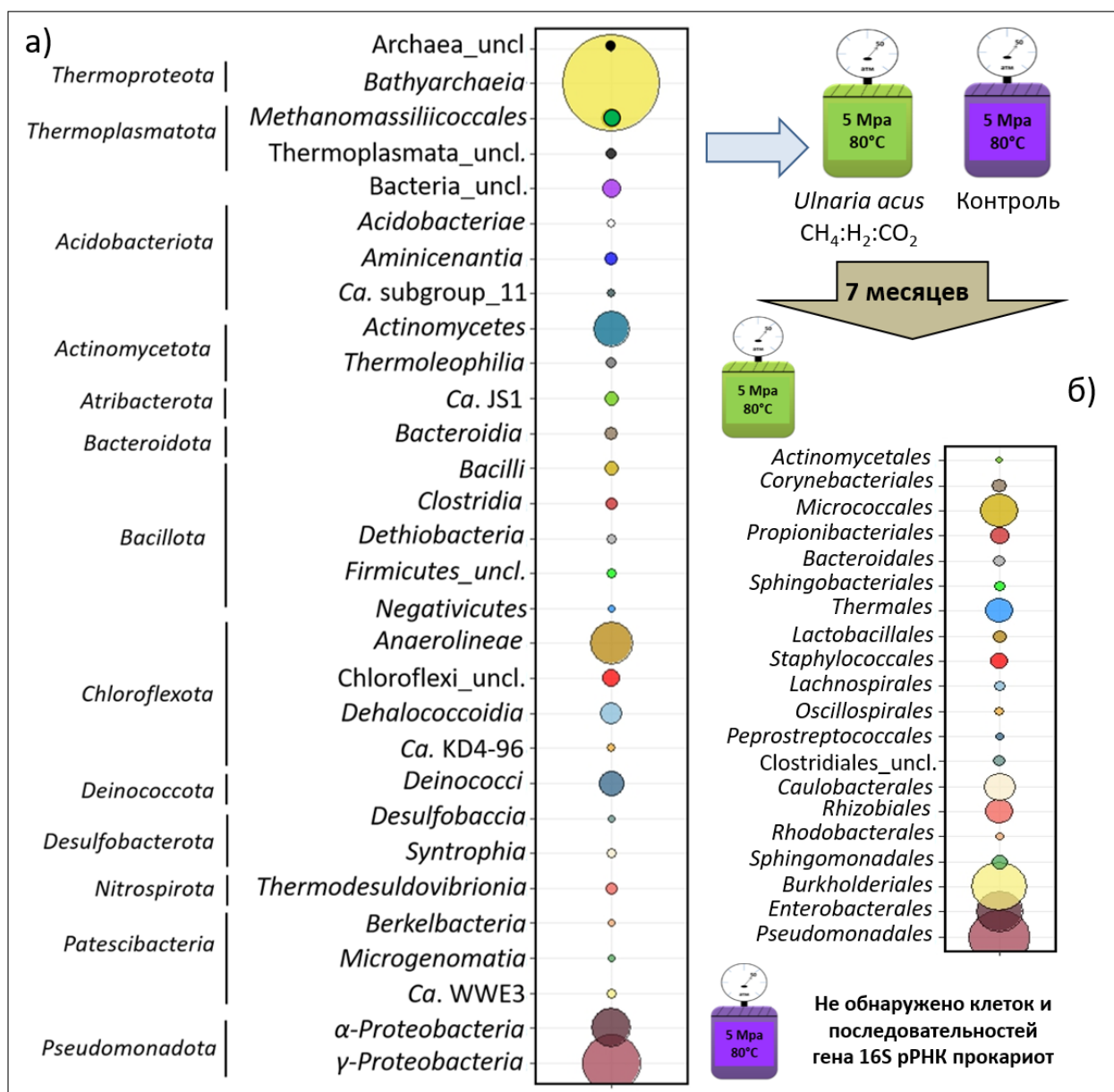
Экспериментальную инкубацию проводили в КВД в течение 7 месяцев (рис. 44; Павлова и др., 2019а). КВД № 1 содержал нативный природный осадок, обогащенный биомассой *Ulnaria acus*; осадок в КВД № 2 был стерилизован автоклавированием и выступал в качестве отрицательного контроля.

В настоящее время в районе Академического хребта, где признаки нахождения грязевых вулканов или газовых гидратов прежде не регистрировались, описана новая грязевулканическая гидратоносная область озера Байкал. С помощью съемки многолучевым эхолотом на склоне Академического хребта обнаружена группа грязевых вулканов (Хлыстов и др., 2017). Как известно, грязевые вулканы в Мировом океане являются естественными скважинами к глубоководным осадочным отложениям и в их грязевых потоках содержится материал далекого прошлого. Практически во всех кернах на холмах и склонах кратеров исследуемых кернов Академического хребта встречена грязевая брекчия в виде разноразмерных глинистых плотных включений светло-серого цвета в мягкой оливково-серой глинистой матрице. На интервалах с грязевулканической брекчией обнаружены скелеты древних вымерших видов диатомей (Хлыстов и др., 2017). При помощи биостратиграфической и сейсмостратиграфической корреляции было установлено, что материал, входящий в грязевую брекчию исследуемых грязевых вулканов, имеет возрастной интервал от позднего миоцена до раннего плиоцена (от 5.6 до 4.6 млн лет) и мог быть поднят с глубины не более 310 м ниже дна. Гряда грязевых вулканов в средней части хребта получила название АкадемХребет, грязевой вулкан около о. Ольхон – Хобой (Хлыстов и др., 2017). Микробиологических исследований в районе этих структур ранее не проводилось.

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. 44а).

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. 44а) (Павлова и др., 2019). В библиотеке генов 16S рРНК микробного сообщества отмечено высокое содержание представителей класса *Gamma*- и *Alphaproteobacteria* (33.6–13.8% соответственно).



**Рисунок 44.** 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.

Класс *Gamma*proteobacteria представлен семействами *Halomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Shewanellaceae* и *Pseudomonadaceae*. *Halomonas* – разнообразный род галофильных алкалофильных γ-протеобактерий, большинство из которых были выделены из гиперсоленых сред, таких как почва, солончаки и соленые озера. Вместе с тем, для многих видов этого рода показана способность к окислению компонентов нефти с образованием гликолипидных биосурфактантов (Mnif et al., 2009; Neifar et al., 2019), а также к окислению

тиосульфата до тетратионата (Du et al., 2022). Способность окислять углеводороды, а также окислять водород в газонефтяных коллекторах установлена для бактерий *Pelomonas*, *Shewanella* и *Pseudomonas*, доминирующих в составе микробного сообщества природного образца до эксперимента (Reyes-Sosa et al., 2018; Nazina et al., 2023).

Последовательности *Chloroflexota* составляли 22.7% от общего числа всех выявленных последовательностей в библиотеке генов 16S рРНК *Bacteria*. Филум в основном представлен последовательностями некультивируемой группы MSB-5B2, класса *Dehalococcoidia* и семейства *Anaerolineaceae*. Среди последовательностей семейства *Anaerolineaceae* были наиболее представлены последовательности бактерий рода *Pelolinea*, анаэробные представители которого изолированы из метаногенного сообщества донных осадков в Японии (Imachi et al., 2014). Филум *Deinococcota* представлен родом *Thermus* – хемоорганогетеротрофными, экстремально термофильными бактериями, обитающих в горячих источниках, глубоководных морских источниках и гейзерах Йеллоустонского национального парка (Huber, Stetter, 2004).

Через 7 месяцев термобарического культивирования в КВД № 1 содержащем донный осадок, обогащенный биомассой *Ulnaria acus* выявлены изменения, как в составе органического вещества, так и в составе микробного сообщества. В библиотеках генов 16S рРНК не выявлены последовательности представителей домена *Archaea*. Среди последовательностей домена *Bacteria* не выявлены представители филумов *Acidobacteriota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota*. Процент последовательностей филумов *Actinomycetota*, *Deinococcota*, *Bacillota* остался на том же уровне. Увеличилась доля *Bacteroidota* и *Pseudomonadota* (в 1.7 раза) (рис. 44б).

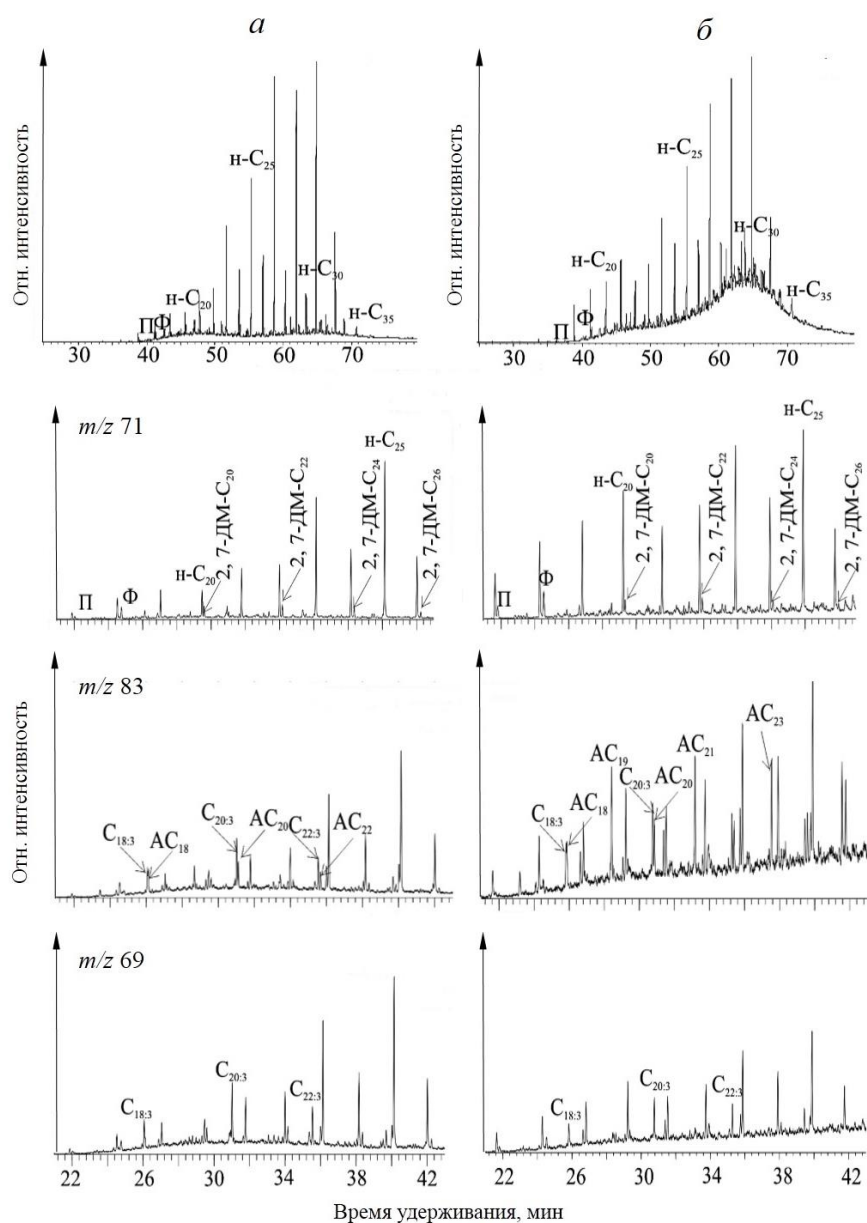
В результате проведенного эксперимента, в контрольном образце из КВД № 2 геохимических изменений в составе ОВ не установлено. В составе ОВ донных осадков, обогащенных биомассой *Ulnaria acus* (КВД № 1), выявлены процессы его преобразования. Содержание органического углерода ( $C_{орг}$ ) в образцах после эксперимента (0.79%) практически не изменилось ( $\pm 0.09\%$  на породу) относительно первоначальных (0.88%), хлороформенного битумоида (вхл) с 0.02 до 0.05% (табл. 11).

**Таблица 11.** Хромато-масс-спектрометрические показатели мальтеновой части экстракта образца донного осадка до эксперимента и после

Показатель	До эксперимента	После эксперимента
Содержание ОВ ( $C_{орг}$ )	0.88%	0.79%
Индекс нечетности	4.28	3.61
Соотношение пристан/фитан	0.5	0.5
Степень преобразованности ОВ		16%



Маленькие навески битумоидов (7 мг) не позволили выделить асфальтены и разделить мальтены на насыщенные и ароматические УВ. Количество углеводородов и асфальтово-смолистых компонентов в битумоиде из образца до эксперимента составило 22.8% и 77.2% соответственно. После эксперимента концентрация углеводородов возросла до 29.3%, асфальтово-смолистых компонентов уменьшилась до 70.7%. Степень преобразованности органического вещества составила 16%. Кривая распределения нормальных алканов «пилообразная» с доминированием нечетных углеводородов ( $C_{23}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ,  $C_{33}$ ), при этом с ростом их молекулярной массы в образце до эксперимента концентрация увеличивается, достигая максимума на  $n$ - $C_{31}$  до 17% от суммы  $n$ -алканов (рис. 45).



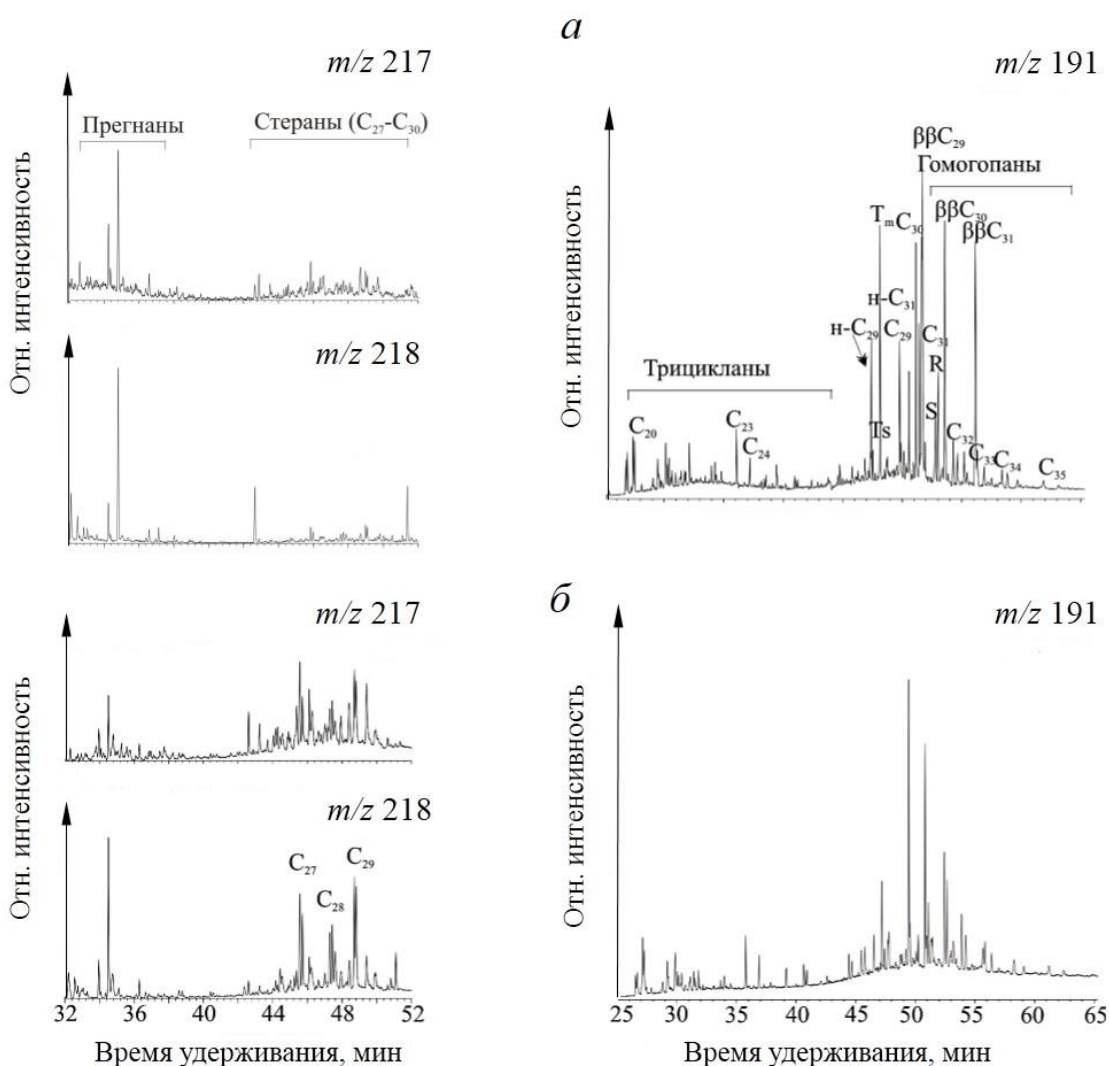
**Рисунок 45.** Хроматограммы и хромато-масс-фрагментогаммы  $n$ -алканов ( $m/z$  71), алкилциклогексанов ( $m/z$  83) и 3-алкенов ( $m/z$  69) в битумоидах из образцов до (а) и после эксперимента (б).  $n$ - $C_n$  – нормальные алканы,  $AC_n$  – алкилциклогексаны,  $C_n:3$  – 3-алкены, 2,7-ДМ- $C_n$ -2, 7 диметилалканы, где  $n$  – количество атомов углерода, П – пристан, Ф – фитан. Цитировано по Павлова и др., 2019а.

Содержание  $n$ -C<sub>33</sub> сопоставимо с  $n$ -C<sub>23</sub> (6.4–6.8% от суммы  $n$ -алканов) соответственно в образцах до эксперимента и с  $n$ -C<sub>24</sub> (4.8% от суммы  $n$ -алканов) в образце после эксперимента. Индекс CPI уменьшился незначительно с 4.3 до 3.6. Соотношение концентрации нормальных алканов к ациклическим в образце после эксперимента уменьшилось почти в 2 раза (32 против 58). Значение отношения  $n$ -C<sub>27</sub> к  $n$ -C<sub>17</sub> после эксперимента снизилось в 5 раз (6 против 31). В составе УВ как до эксперимента, так и после идентифицированы 1 и 3-алкены, что подтверждает невысокую степень преобразованности ОВ (рис. 45). В составе углеводов (УВ) идентифицированы алкилциклогексаны (АС) при  $m/z$  83 с доминированием в образцах до эксперимента четных УВ (АС<sub>20</sub>, АС<sub>22</sub>, АС<sub>24</sub>). В образцах после эксперимента максимум алкилциклогексанов сместился на нечетные УВ (АС<sub>19</sub>, АС<sub>21</sub>, АС<sub>23</sub>, АС<sub>25</sub>). На хроматомасс-фрагментограммах при  $m/z$  127 идентифицированы 2.7-диметилалканы с максимальной концентрацией нечетных УВ, которая уменьшилась по сравнению с содержанием нормальных алканов после эксперимента (рис. 45). Разница в доминировании четных и нечетных алкилциклогексанов, более низкие концентрации 3-алкенов и 2.7-диметилалканов объясняются большей преобразованностью ОВ в образце после эксперимента. Среди изопреноидов (C<sub>13</sub>–C<sub>25</sub>) в максимальной концентрации находится фитан. Значение отношения пристана к фитану равно 0.5 как до, так и после эксперимента.

В составе циклических УВ-биомаркеров стеранового ряда доминируют этилхолестаны – 39–48% от суммы стеранов C<sub>27</sub>–C<sub>30</sub>. Значения отношения стеранов C<sub>29</sub> к C<sub>27</sub> в осадке до эксперимента и после равны 1.2–1.4. В образце после эксперимента понижена концентрация низкомолекулярных стеранов – прегнанов (значение отношения (стераны+прегнаны) к прегнанам равно 12.7 против 3.6), что видно из хромато-масс-фрагментограмм  $m/z$  217, 218. В составе терпанов преобладают гопаны (C<sub>27</sub>–C<sub>35</sub>) (рис. 46). Среди трицикланов (C<sub>19</sub>–C<sub>31</sub>) доминируют УВ со средней длиной цепи C<sub>23</sub>–C<sub>26</sub> (37.8% от суммы трицикланов). Трициклановый индекс  $(2(C_{19}+C_{20})/\Sigma C_{23-26})$  равен 0.6. В образцах до эксперимента идентифицированы биогопаны ( $\beta\beta$ -гопаны) и концентрации R изомеров выше, чем S в гомогопанах (C<sub>31</sub>–C<sub>35</sub>). В образце после эксперимента как видно на хромато-масс-фрагментограмме  $m/z$  191 биогопаны находятся в следовых количествах, изомеров S больше, чем R в гомогопанах, что подтверждает увеличение степени преобразованности ОВ (рис. 46).

Значение отношения гопанов Ts к Tm остается невысоким и после эксперимента ( $T_s / T_m \leq 0.5$ ). В мальтеновой фракции битумоидов идентифицированы также и ароматические соединения. В составе фенантронов отмечается увеличение метилзамещенных гомологов после эксперимента. Значение метилфенантронового индекса  $(MPI-I = (1.5 \times (2MP+3MP))/(P+1MP+9MP))$  изменяется незначительно ( $\leq 0.8$ ), больший разброс (от 1.4 до 2.1)

получается при подсчете параметра зрелости ( $PP-1_{modified} = (1MP+9MP)/(2MP+3MP)$ ) (Peters et al., 2007).



**Рисунок 46.** Хромато-масс-фрагментограммы стеранов и терпанов в битумоидах из образцов до (а) и после эксперимента (б). Цитировано по Павлова и др., 2019а.

В составе фенантронов отмечается также наличие ретена. В составе дибензотиофенов зафиксировано увеличение метилзамещенных гомологов после эксперимента, при этом используемый параметр зрелости 4-МДБТ/1-МДБТ не меняется и равен 2. В мальтенах после эксперимента при  $m/z$  253 идентифицированы моноароматические стероиды, а по иону  $m/z$  366 еще и 4 диастереомера 17-дисметил,23-метилмоноароматические стероиды C<sub>27</sub>, которые ранее были определены в отложениях карбона, перми и мела (Каширцев и др., 2016; 2018). Концентрация ароматических соединений увеличивается по сравнению с нормальными алканами после эксперимента. Изменения в составе ароматических соединений также подтверждают увеличение преобразованности ОВ после эксперимента. В составе углеводородной фракции идентифицирован перилен, полиароматический углеводород. Его концентрация выше в образце осадка после эксперимента. Считается, что его источником

может быть, как аквагенное, так и террагенное ОВ. Проведенные исследования показали, что за время культивирования изначально незрелое ОВ из донных осадков смешанного типа (террагенно-аквагенное) стало более зрелым в ходе эксперимента несмотря на то, что значение коэффициента СРІ уменьшилось незначительно.

Регистрируемые изменения в составе ОВ донных осадков г/в Хобой не столь значительны (16%) в сравнении с данными, полученными в эксперименте с донными осадками метанового сипа Посольская Банка, где данный показатель был равен 41% (Bukin, Pavlova et al., 2016). Но даже при достаточно небольшом времени инкубации (7 мес.) при культивировании осадка из г/в Хобой зафиксировано снижение концентрации фенантронов относительно его метилзамещенных гомологов, включая ретен и увеличение серосодержащих соединений (ДБТ и его метилзамещенных гомологов) относительно нормальных алканов, а также образование моноароматических стероидов, включая и 4 диастереомера 17-дисметил, 23-метилмоноароматические стероиды С<sub>27</sub> и триароматических стероидов. Доминирование S над R – изомерами в гомогпанах, наличие биогпанов в следовых количествах также свидетельствует о большей преобразованности ОВ в образце после эксперимента.

Снижение концентрации фенантронов может быть обусловлено деятельностью представителей филумов *Pseudomadota*, *Actinomycetota* и *Bacillota*, последовательности генов 16S рРНК 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 р. *Pseudomonas* и *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 составляла 18–30% (Павлова и др., 2005).

Как известно, стероиды широко распространены в биосфере. Преимущественно они представлены производными холестерина (С<sub>27</sub>), кампе- и криностеролов (С<sub>28</sub>), сито- и стигмастеролов (С<sub>29</sub>), ланостерола и циклоартенола (С<sub>30</sub>). Наиболее широкий спектр стероидов, включающий производные всех групп, присутствует в водорослях (Volkman et al., 1986; Kodner et al., 2008). Увеличение концентрации три- и моноароматических стероидов в образце осадка после эксперимента может свидетельствовать о биодеструкции биомассы байкальской диатомеи *Ulnaria acus*. Как показано ранее, диатомовые водоросли продуцируют разнообразные стероиды, которые в выделенных фракциях стеринов могут быть представлены 3–10 соединениями (Калиновский и др., 2010). 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).

Полученные результаты коррелируют с данными, полученными в работе Серебренниковой О.В. с соавторами (2014). Авторами показано, что в образцах торфа из низинных болот Западной Сибири в составе органического вещества преобладают стероиды C<sub>29</sub>, что свидетельствует о том, что основными растениями-торфобразователями были микроводоросли *Botryococcus braunii* (Metzger et al., 1990). Эти водоросли характеризуются преобладанием высокомолекулярных гомологов *n*-алканов и содержат в своем составе C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> стеролы. Дибензотиофены (ДБТ), как правило, накапливаются в ходе диагенетических преобразований аквагенного органического вещества в осадках морских водоемов с сероводородным заражением либо дефицитом кислорода в придонных водах. В случае пресных или даже соленых, но хорошо аэрируемых водоемов образование ДБТ в значительных концентрациях не происходит. Не образуются они в составе битумоидов в пресноводных, хорошо аэрируемых водоемах (Конторович и др., 2004). В данном случае культивирование микробного сообщества проведено в бескислородных условиях, в атмосфере метана, что могло способствовать образованию ДБТ в пресноводных образцах осадка. Преобразование аквагенно-террагенного органического вещества исследуемых донных осадков привело к образованию моно- и триароматических стероидов и серосодержащих соединений – дибензотиофенов. Полученные результаты коррелируют с результатами, отраженными в исследовании Конторовича А.Э. с соавторами. При изучении битумоидов разнофациальных юрских пород Западно-Сибирского бассейна авторами установлено, что в террагенном ОВ образуются в основном фенантрен и его метилпроизводные, а в аквагенном наряду с фенантренами – большое количество ароматических стероидов; стероиды захороненного аквагенного ОВ в большей степени преобразуются в три-, а в террагенном – в моноароматические (Конторович и др., 2004).

Таким образом, различающиеся геохимические условия осадочной толщи 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. Так, в микробном сообществе природного донного осадка из метанового сипа Посольская Банка выявлено большее таксономическое разнообразие представителей домена *Bacteria* и *Archaea*, чем в осадке из грязевого вулкана Хобой. Сообщества двух типов осадков, характеризовались значительным вкладом представителей хемоорганогетеротрофных *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* и *Deinococcota*. В составе микробных сообществ донных осадков грязевого вулкана и метанового сипа выявлены различия на уровне семейств и родов.

Филум *Deinococcota* в донных осадках м/с представлен мезофильными бактериями р. *Deinococcus*, в осадках г/в – р. *Thermus*. Доля бактерий этого филума составляет 5% от всех

выявленных последовательностей в библиотеках гена 16S рРНК, в сравнении с восстановленными осадками грязевых вулканов (Кедр, Красный Яр, Маленький) и осадками из районов нефтепроявлений (Горевой Утес, Б. Зеленовская), где последовательности *Deinococcota* составляли менее 1% (Zemskaya, Pavlova et al., 2025). Значительная доля (до 15%) представителей филума *Deinococcota* была выявлена ранее, при молекулярно-биологическом анализе глубинных осадков из метанового сипа Посольская Банка (Черницына и др., 2016).

Различия выявлены и в составе архейной компоненты из осадков двух различных геологических структур. В составе домена *Archaea* из ДО м/с Посольская Банка доминировали представители пяти филумов, среди которых почти половина последовательностей приходилась на представителей *Ca. Nadarchaeota* (~42%) в сравнении с восстановленными осадками грязевых вулканов (Кедр, Кукуй, Маленький, Санкт-Петербург) (до 6%) и донными осадками из районов нефтепроявлений (Б. Зеленовская, Горевой Утес) (до 3.8%; Zemskaya, Pavlova et al., 2025).

Последовательности *Ca. Nadarchaeota* впервые были обнаружены на золотом руднике в Южной Африке на глубине около 3 км, донных осадках метановых холодных сипов, содержащие газовые гидраты. *Ca. Nadarchaeota* участвуют в окислении  $\text{CO}_2$  водой, восстанавливают  $\text{CO}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  до  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ , образуя водород в качестве побочного продукта. Согласно данным реконструкций геномов *Ca. Nadarchaeota*, археи обладает генами, связанными с путем фиксации углерода через путь Вуда-Льонгдаля, метаногенезом и метаболизмом алканов и считаются посредниками в ключевых геохимических процессах, специализированных для выживания в глубинной биосфере (Baker et al., 2016).

Архейная компонента микробного сообщества ДО г/в Хобой состояла из двух филумов, где более 96% составляли последовательности представителей класса *Bathyarchaeia* (филум *Thermoproteota*), содержащего большое число разнообразных филогенетических линий и распространенных повсеместно (Inagaki et al., 2006; Webster et al., 2006; Yanagawa et al., 2014; Parkes et al., 2014). Батиархеи играют важную роль в глобальном круговороте углерода, являются наиболее распространенной группой микроорганизмов в анаэробных экотопах. Реконструкция генома представителей различных филогенетических линий *Bathyarchaeia* показала наличие у них набора генов для метаболизма углерода, включая гликолиз, глюконеогенез и путь  $\text{H}_4$ -МРТ Вуда-Льонгдаля, а также углеводно-активные ферменты и пептидазы (Hou et al., 2023). Это позволяет им использовать широкий спектр органических соединений, включая детритные белки, углеводы, лигнин, короткоцепочечные алканы и многочисленные соединения  $\text{C}_1$ , такие как  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ , формиат, формальдегид, метанол и метан (Evans et al., 2015; Yu et al., 2018; Zhou et al., 2018; De Anda et al., 2021). Метанотрофные археи

в сообществе данного осадка не выявлены, но вместе с тем установлены метаногены порядка *Methanomassiliicoccales* (филум *Thermoplasmata*), восстанавливающие метанол до метана.

После эксперимента, в донных осадках грязевого вулкана, вмещающих грязевулканическую брекчию, увеличивается доля представителей термофильных таксонов (*Deinococcota*, *Bacillota* и др.), которые могли поступить в поверхностные осадки в составе газонасыщенного материала с глубин в несколько километров. В то время как в образцах донных осадков метановых сипов выявлены типично мезофильные обитатели донных отложений. Большинство выявленных после эксперимента последовательностей гена 16S рРНК принадлежат бактериям родов *Arthrobacter*, *Solirubrobacter*, *Sphingomonas*, *Ralstonia* – микроорганизмам, утилизирующих широкий спектр органических субстратов, в том числе ароматические углеводороды, хлорированные и другие соединения (Daane et al., 2002; Choi et al., 2004; Story et al., 2004; Nordin et al., 2005; Kostenko et al., 2013) и играющих важную роль в микробных сообществах нефтезагрязненных почв (Peng et al., 2015). Кроме того, способность к росту в анаэробных условиях за счет восстановления нитрата или брожения установлена только для некоторых видов *Arthrobacter* (Eschbach et al., 2003). По этой причине маловероятно, что, будучи аборигенными представителями психрофильного микробного сообщества поверхностного слоя донных отложений, они были бы способны приспособиться к термофильным условиям обитания за время эксперимента.

Одна из возможных причин их присутствия в осадках после культивирования, это то, что они являются представителями термофильного микробного сообщества глубинных слоев донных отложений, которые мигрировали в поверхностные слои через зону разлома совместно с газонасыщенным флюидом. Расположение исследуемой разгрузки Посольская Банка в глубоководной зоне, а также фиксируемые в данном районе тепловые аномалии (Naudts et al., 2012) могут свидетельствовать о ее функционировании по модели конвективной флюидной петли, циркулирующих в зоне стабильности газовых гидратов (400 м) (Vanneste et al., 2002). Ранее, для донных осадков поднятия Посольская Банка, было показано присутствие особых путей миграции флюидных потоков, приносящих в поверхностные осадки глубинное микробное сообщество, что выразилось в значительной относительной численности последовательностей филумов *Deinococcota*, *Desulfobacterota*, *Acidobacteriota* и *Atribacterota* в поверхностных осадках (Черницына и др., 2016). Формирование донных осадков Посольской Банки под влиянием миграционных процессов, в результате которых в поверхностных слоях осадков отмечаются признаки более древнего ОВ, показано также на основании вертикального распределения гомологов  $C_{16}$  и  $C_{31}$  и индекса  $C_{27}/C_{31}$  (Моргунова и др., 2018).

Представители *Arthrobacter*, *Solirubrobacter* и *Sphingomonas* были изолированы из глубинной биосферы (Fredrickson et al., 1995; Balkwill et al., 1997; Crocker et al., 2000; Chang et

al., 2007; Kobayashi et al., 2008), в том числе в термофильных условиях (Ciobanu et al., 2014). Также их присутствие в глубинной биосфере подтверждается с помощью молекулярно-генетических исследований (Inagaki et al., 2006; Mason et al., 2010; Breuker et al., 2011; Purkamo et al., 2013). Согласно одной из гипотез, широкое распространение представителей актиномицетов и протеобактерий может быть объяснено наличием «гибкого» метаболизма, позволяющего адаптироваться к изменениям условий окружающей среды, которые происходят при захоронении отдельных слоев отложений и циркуляции флюидопотоков (Ciobanu et al., 2014). Этим фактом объясняется присутствие представителей *Actinobacteria* (в н.в. *Actinomycetota*), *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Firmicutes* (*Bacillota*) (типичных обитателей лесных почв) в угольных прослоях донных отложениях Тихого Океана, залегающих на глубине до 2.5 км ниже уровня дна и имеющих температуру 40–60°C (Inagaki et al., 2015).

Отсутствие геохимических изменений в составе органического вещества, так же как клеток микроорганизмов и последовательностей 16S рРНК представителей *Bacteria* и *Archaea* в контрольных (стерильных) образцах осадка свидетельствует о том, что деструкция органического вещества в условиях эксперимента обусловлена деятельностью микроорганизмов. В структуре микробных сообществ донных осадков различных типов геологических структур, наряду с типично мезофильными микроорганизмами выявлены облигатно аэробные, хемоорганогетеротрофные, термофильные микроорганизмы, с разным типом метаболизма, осуществляющие ферментативный и/или метилотрофный метаногенез, органолипидное дыхание, окисляющие водород, метанол и ацетат. Очевидно, что их наличие в глубинных отложениях может обуславливаться выносом минерализованных газосодержащих грязевых потоков в приразломных областях.

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 (ретена и гаммацерена) (Pavlova et al., 2016; Vukin, Pavlova et al., 2016; Manakov, Pavlova et al., 2019; Павлова и др., 2019а). Полученные экспериментальные данные, в более мягких условиях, чем пиролиз, доказывают, что ретен, гаммацерен и другие соединения является продуктом деструкции биомассы диатомовых водорослей, осуществляемых микробным сообществом. Участие анаэробных микроорганизмов в образовании ретена предполагалось и ранее (Martin et al., 1999), но экспериментально не было подтверждено. Учитывая, что ретен используется в качестве биомаркера хвойных растений при реконструкции палеоклимата, полученные данные позволят более корректно интерпретировать происходившие в далеком прошлом процессы.

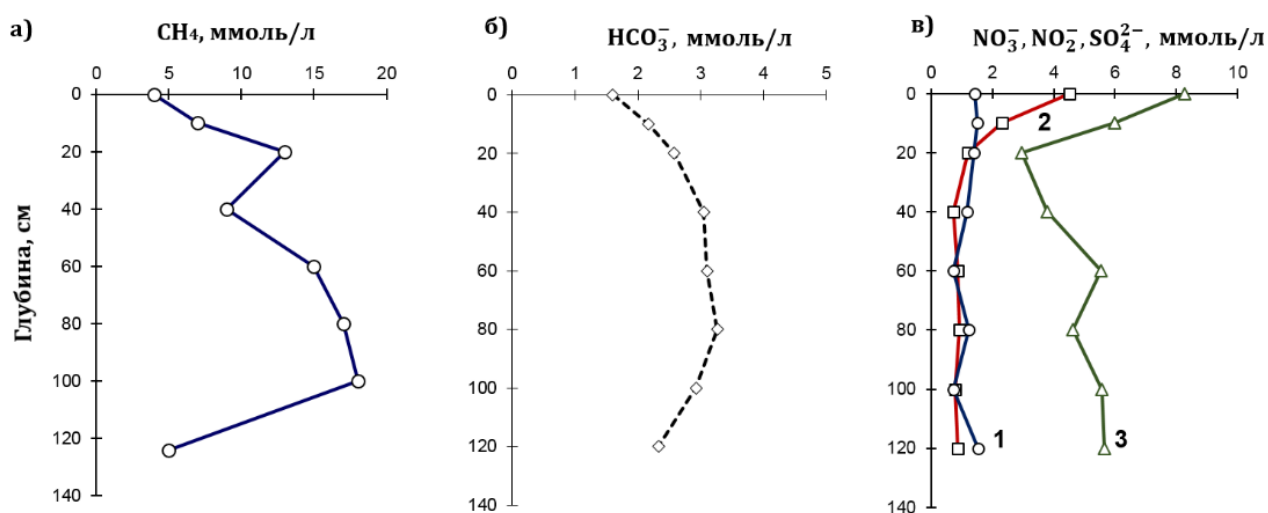


## ГЛАВА 5. АНАЭРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ДОННЫХ ОСАДКОВ РАЙОНОВ ЕСТЕСТВЕННЫХ НЕФТЕПРОЯВЛЕНИЙ

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 конца 18 века; второй – у м. Горевой 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 уже глубоко биodeградированной нефти на водной поверхности (как это наблюдается в районе БЗ). Эти процессы могут иметь различия в двух районах нефтепроявлений в оз. Байкал, так как районы различаются 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

Исследуемые донные осадки (St.5, GC.3) представлены восстановленным диатомовым алеврито-пелитовым илом с включениями нефти в среднем интервале и серой глиной с множеством нефтяных включений и массивными, слоистыми газовыми гидратами (табл. 1). Осадки керна St.5, GC.3 обладали высокой газонасыщенностью, концентрация метана по глубине керна варьировала от 4 ммоль/л (64 мг/л  $\text{CH}_4 = 89.7$  мл/л  $\text{CH}_4$ ) до 18 ммоль/л (288 мг/л  $\text{CH}_4 = 403.5$  мл/л  $\text{CH}_4$ ) (рис. 47а; Pavlova et al., 2022).

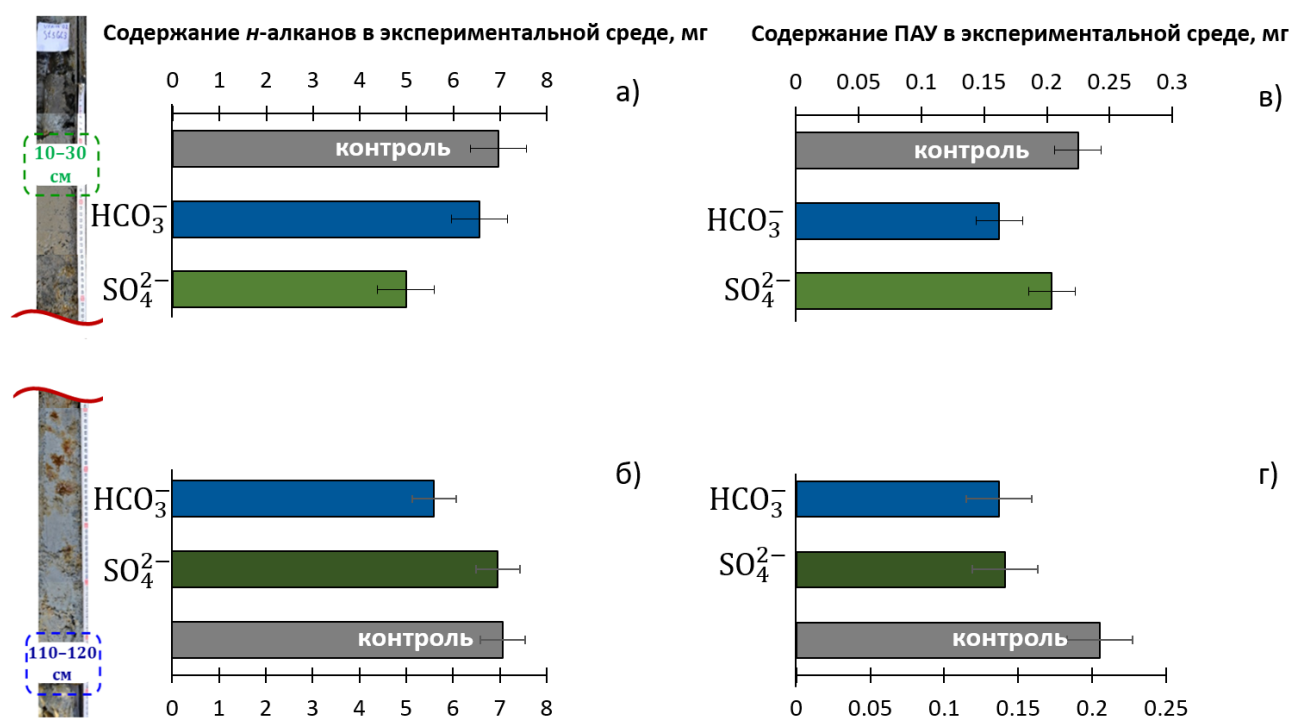


**Рисунок 47.** Профиль концентраций компонентов химического состава поровых вод из керна St.5, GC.3: (а) метан, (б) бикарбонат-ион, (в) нитрат-ион (1), нитрит-ион (2) и сульфат-ион (3). Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Наибольшие концентрации метана выявлены на глубине 20 и 100 см (13 ммоль/л = 208 мг/л и 18 ммоль/л = 288 мг/л  $\text{CH}_4$  соответственно). Гомологи метана в газе представлены в основном этаном (от 1 мкмоль/л = 0.03 мг/л до 10 мкмоль/л = 0.3 мг/л). Поровые воды отложений во всех слоях осадка – гидрокарбонатно-кальциево-натриевые. Минерализация выше фоновой (Pogodaeva et al., 2017), сумма ионов варьировала по глубине керна от 136.6 мг/л до 278.8 мг/л. Поровые воды обогащены ионами гидрокарбоната (до 3.3 ммоль/л = 199.1 мг/л на глубине 80 см) (рис. 47б).

Нитрат- (0.7–1.4 мкмоль/л = 0.05–0.09 мг/л) и нитрит-ионы (0.7–4.5 мкмоль/л = 0.04 – 0.21 мг/л) присутствовали по всему профилю керна. Концентрация сульфат-иона по всей глубине керна была ниже, чем в фоновых районах и в байкальской воде (Погодаева и др., 2007; Pogodaeva et al., 2017) и составляла 2.9–8.3 мкмоль/л (0.28–0.79 мг/л) (рис. 47в).

**Дегградация углеводородов в условиях эксперимента.** 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. 48а; Pavlova et al., 2022).



**Рисунок 48.** 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.

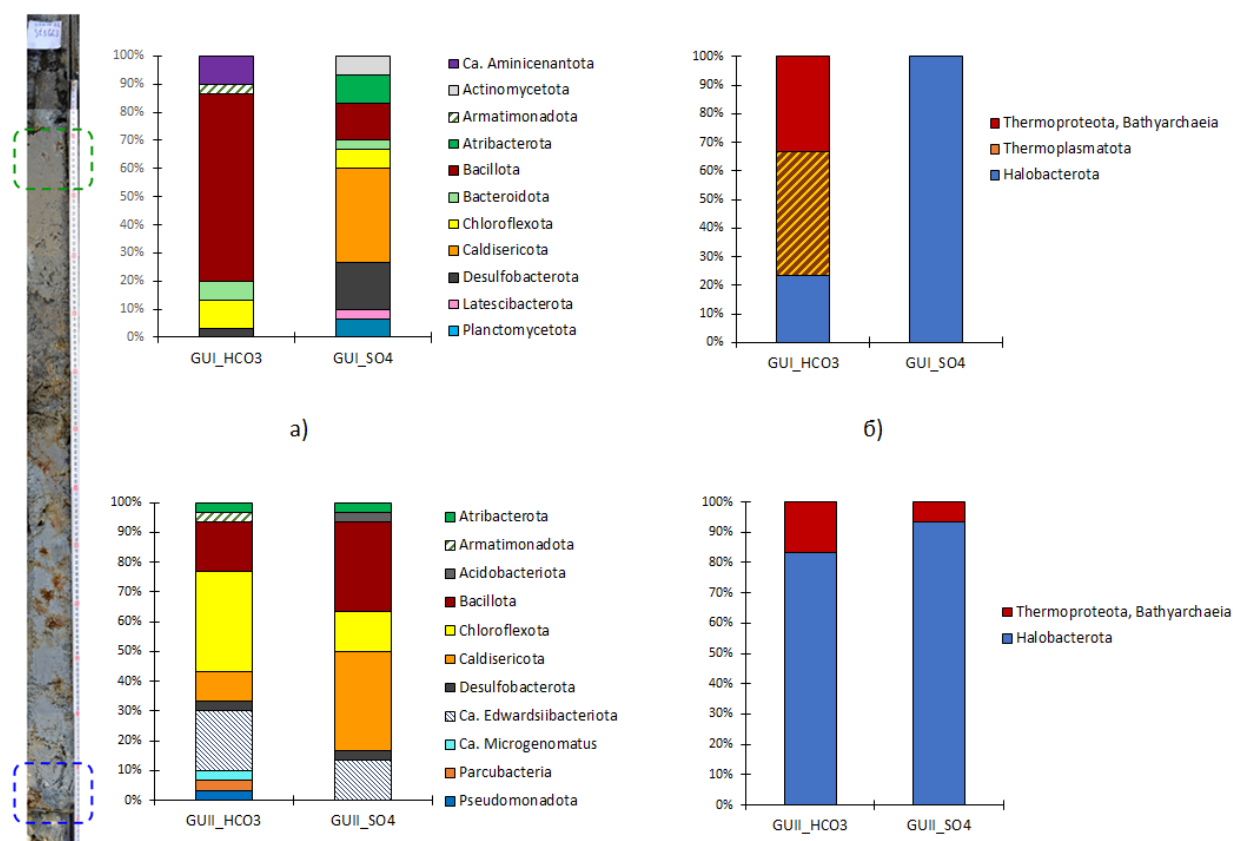
В культурах, содержащих  $\text{H}_2:\text{CO}_2$  в газовой фазе, уменьшение количества алкановой фракции нефти было незначительным (6.6 мг) и составило 6%. Содержание  $\Sigma_{\text{ПАУ}}$  в присутствии сульфат- и гидрокарбонат-ионов в накопительных культурах GUI\_ $\text{SO}_4$  и GUI\_ $\text{HCO}_3$  снизилось на 20–37% соответственно (рис. 48в).

Конверсия нефтяных углеводородов в GUI\_ $\text{HCO}_3$ , сопровождалась образованием метана. Нативный образец осадка изначально был газонасыщен, концентрация метана в газовой фазе накопительных культур в начале эксперимента составляла 13 ммоль/л = 208 мг/л = 291.4 мл/л. Через три месяца культивирования концентрация метана увеличилась до 27 ммоль/л = 432 мг/л = 605.2 мл/л. Наибольшая его концентрация (32 ммоль/л = 512 мг/л = 717.2 мл/л) зафиксирована через 6 месяцев культивирования в накопительных культурах, содержащих подповерхностный образец осадка. Данный уровень концентрации метана сохранялся до завершения эксперимента (31 ммоль/л = 496 мг/л = 694.8 мл/л).

В накопительных культурах с глубинным осадком (GUI), обогащенных гидрокарбонат-ионом, конверсия *n*-алканов составила 20%, сульфат-ионом – не более 1.5% (рис. 48б). Степень конверсии ПАУ составила 45–46% вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов (рис. 48г). В накопительных культурах GUI концентрация метана в течение всего эксперимента оставалась практически неизменной (3.0–3.8 ммоль/л = 48–60.8 мг/л), т.к. значения были сопоставимы со значениями, определенными в начале эксперимента (3.2 ммоль/л = 51.2 мг/л). Убыль сульфат-иона в накопительных культурах, содержащих как подповерхностные, так и глубинные образцы составила 25% от начальной концентрации.

**Состав клональных библиотек гена 16S рНК в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенных  $\text{H}_2:\text{CO}_2$ .** Анализ клональных библиотек бактериального сообщества в накопительных культурах GUI\_ $\text{HCO}_3$  и GUI\_ $\text{HCO}_3$  выявил представителей 12 филумов (рис. 49). Общими для двух образцов были последовательности бактерий, отнесенных к *Bacillota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota* и *Armatimonadota*. Представители филумов *Bacteroidota* и *Ca. Aminicenantota* обнаружены только в накопительной культуре подповерхностного образца; *Pseudomonadota* (класс *Alphaproteobacteria*), *Caldisericota*, *Atribacterota*, *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1), *Ca. Microgenomatus* (OP11), *Ca. Patescibacteria* (*Parcubacteria*, OD1) – только глубинного (рис. 49).

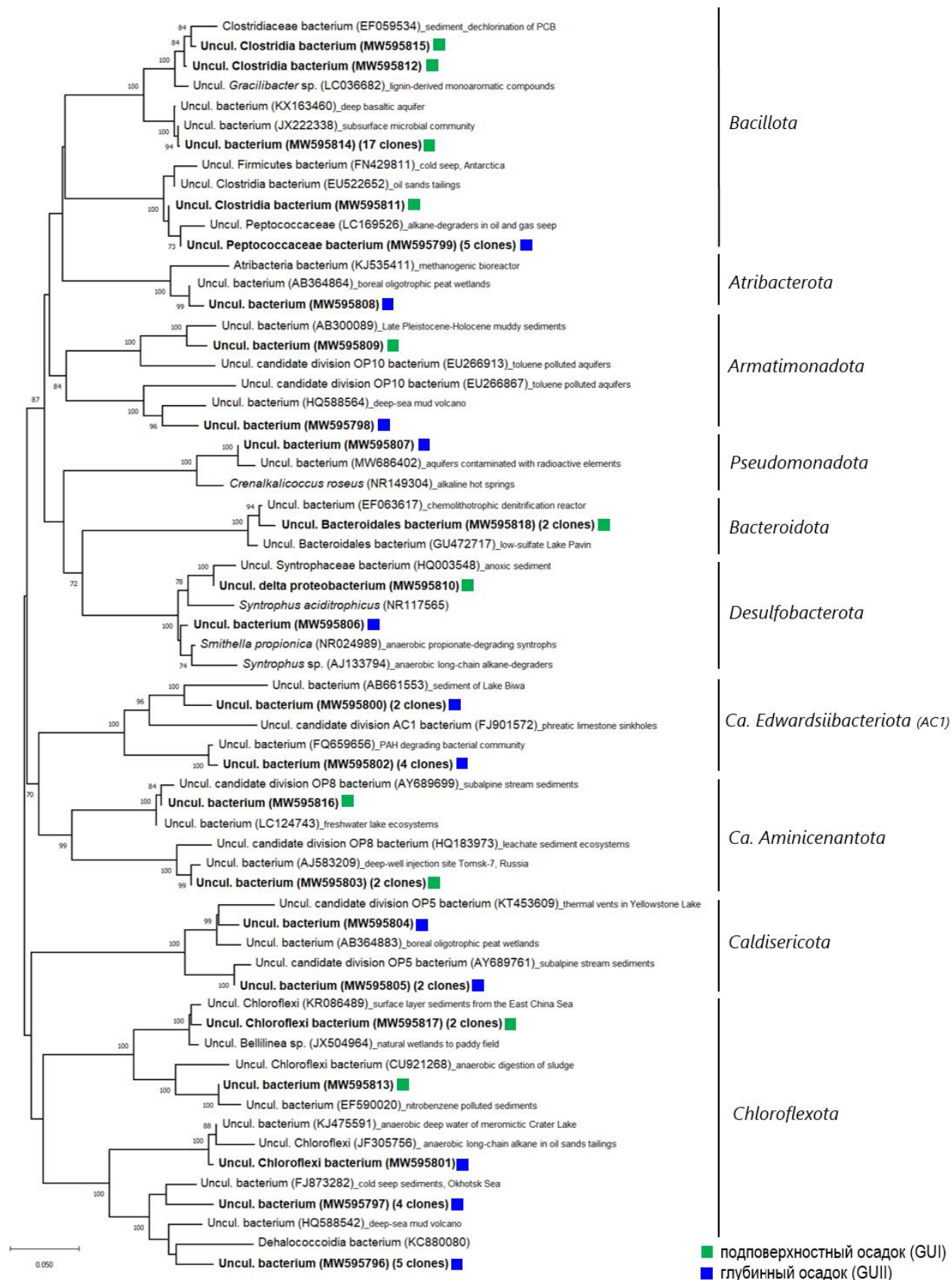
В клональной библиотеке GUI\_ $\text{HCO}_3$  большинство последовательностей *Bacillota* (20 клонов) принадлежало некультивируемым бактериям из осадков пресноводных водоемов, холодных сипов Антарктики и хвостохранилищ из нефтеносных песков. В библиотеке генов 16S рНК бактерий образца GUI\_ $\text{HCO}_3$  выявлены 5 последовательностей с высоким уровнем сходства с представителями семейства *Peptococcaceae* (рис. 49).



**Рисунок 49.** Состав клональных библиотек гена 16S рНК бактерий (а) и архей (б) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные отложения, обогащенные  $H_2:CO_2$  и сульфат-ионом. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Представители филума *Chloroflexota* были вторыми по распространенности в библиотеках генов 16S рНК бактерий и представлены порядками *Anaerolineales* и *Dehalococcoidales*. Их наибольшее количество (10 клонов) было идентифицировано в библиотеке GUII\_HCO<sub>3</sub>. На филогенетическом дереве они не образовывали единого кластера, а формировали отдельные ветви с последовательностями некультивируемых бактерий, выявленных в донных осадках холодного метанового сипа Охотского моря, осадках грязевого вулкана и в хвостах нефтеносных песков при анаэробном биодegradации длинноцепочечных *n*-алканов. Последовательности из подповерхностного образца (3 клон) были гомологичны последовательностям некультивируемых бактерий из речных осадков, загрязненных нитробензолом и консорциумов микроорганизмов, участвующих в анаэробном превращении осадков.

Представители филума *Desulfobacterota* и *Armatimonadota* выявлены в минорном количестве (по 1 клону в каждой библиотеке). Последовательность, отнесенная к *Desulfobacterota*, имела 98.7% гомологию с некультивируемой бактерией семейства *Syntrophaceae* и последовательностями бактерий родов *Syntrophus* sp. культивируемые гомологи которых получены из синтрофных ассоциаций метанобразующих архей и пропионат-, бензоат-, алканокисляющих микроорганизмов (рис. 50).



**Рисунок 50.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей генов 16S рНК бактерий, полученных из накопительных культур, содержащих подповерхностные и глубоководные осадки, обогащенные  $H_2CO_2$ . Полученные последовательности выделены жирным шрифтом. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Обнаруженные только в подповерхностном образце последовательности, отнесенные к филуму *Bacteroidota* (2 клона), были гомологичны некультивируемым бактериям из хемолитотрофного денитрифицирующего реактора и осадков озера Павин. К *Ca. Aminicenantota* отнесены три клона, имеющих 99% гомологию с последовательностями некультивируемых бактерий из заводняемых нефтяных резервуаров, сточных вод и пресноводных экосистем.

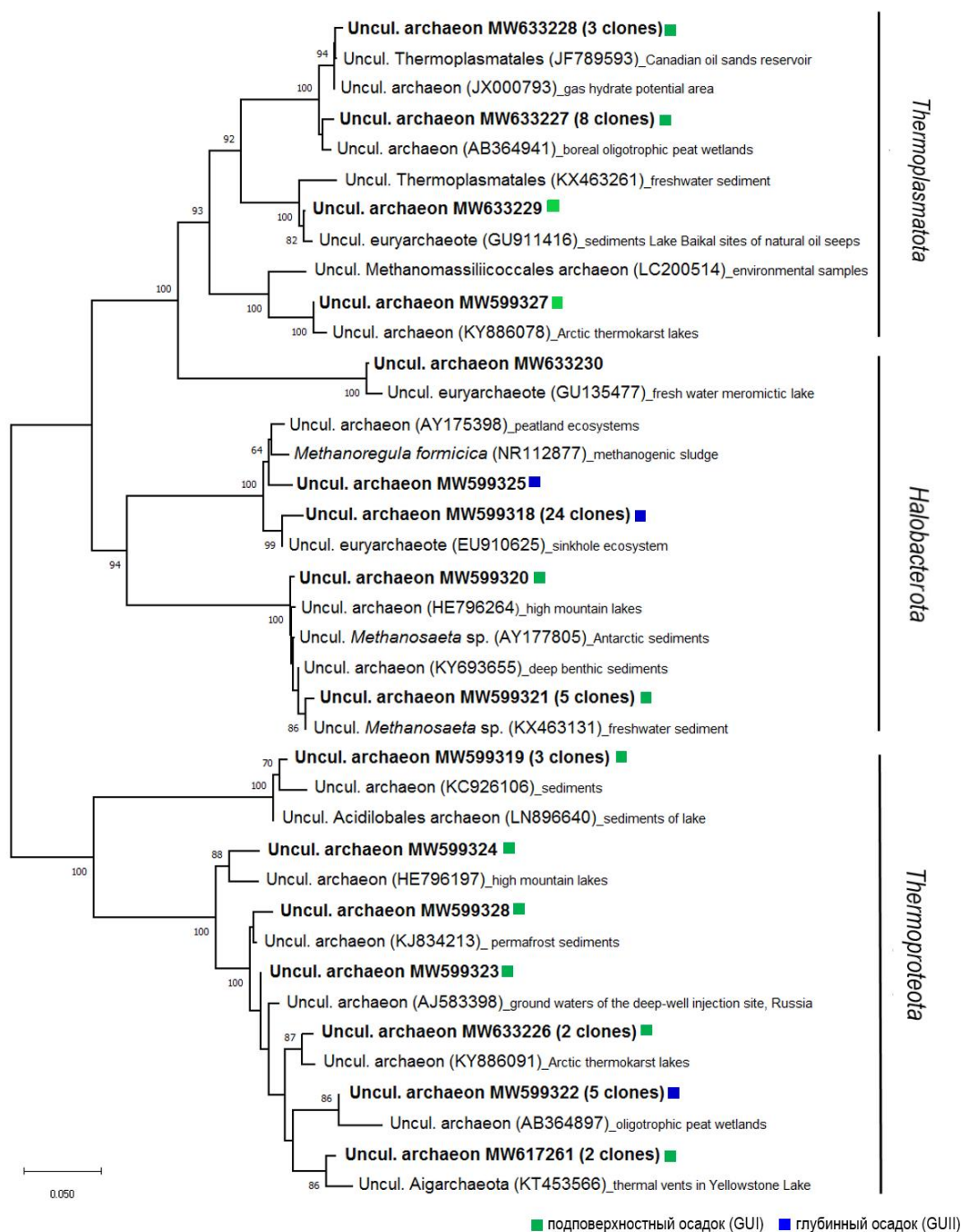
Библиотека генов 16S рРНК бактерий глубинного образца отличалась бóльшим разнообразием. В ней выявлено 6 последовательностей, отнесенных к некультивируемому *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1) – филуму-кандидату с неизвестным метаболизмом, обнаруженному в глубоководных озерах (Rissanen et al., 2019). Последовательности формировали на филогенетическом дереве два подкластера. Один кластер последовательностей был гомологичен последовательностям некультивируемых бактерий из консорциума бактерий, окисляющих ПАУ в нефтезагрязненных почвах, другой – последовательностями некультивируемых бактерий из донных осадков озера Бива и карстовых образований из фреатического известняка, Мексика.

Следующим по представленности в библиотеке генов был филум *Caldisericota* (3 клона). Последовательности на 96–99% были гомологичны последовательностям некультивируемых бактерий из бореальных олиготрофных торфяных водно-болотных угодьев, субальпийских речных отложений и на 94% гомологичны последовательностям некультивируемых бактерий из термальных источников в Йеллоустонском озере (Pavlova et al., 2022).

Минорные последовательности (по 1 клону) были идентифицированы как относящиеся к *Pseudomonadota*, класс *Alphaproteobacteria* и *Atribacterota*. Ближайшими гомологами последовательности MW595807 (*Alphaproteobacteria*) были термофильные бактерии *Caldovatus sediminis* и *Crenalkalicoccus roseus*, изолированные из горячих источников. Последовательность MW595808 (*Atribacterota*) была гомологична последовательностям некультивируемых бактерий из метаногенного реактора и донных осадков олиготрофного озера (рис. 50). Две последовательности из библиотеки генов глубинного образца имели низкий процент сходства (82–93%) с некультивируемыми бактериями филумов кандидатов – *Ca. Microgenomatus* (OP11) и *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1) (на филогенетическом дереве не представлены).

В клональной библиотеке 16S рРНК генов архей культуры GUI\_HCO<sub>3</sub> обнаружены представители филума *Halobacterota*, *Thermoplasmatota* и *Thermoproteota*. Филум *Halobacterota* (8 клонов) представлен классами *Methanomicrobia* и *Methanosarcinia*, филум *Thermoplasmatota* – порядком *Thermoplasmatales* (11 клонов) и *Methanomassiliicoccales* (1

клон), ближайшие гомологи которых выявлены в нефтяных резервуарах Канады, гидратных полей, пресноводных и морских донных осадков (рис. 51).



**Рисунок 51.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей генов 16S рНК архей, полученных из накопительных культур, содержащих подповерхностные и глубоководные осадки, обогащенные  $H_2:CO_2$ . Полученные последовательности выделены жирным шрифтом. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Филум *Thermoproteota* (8 клонов) представлен классом *Bathyarchaeia*, согласно базе данных EzBioCloud. Последовательности на 96–97% были гомологичны последовательностям из грунтовых вод на участке закачки глубоководной скважины Томск-7 (Россия). Две последовательности имели 98% сходства с последовательностью, отнесенной к

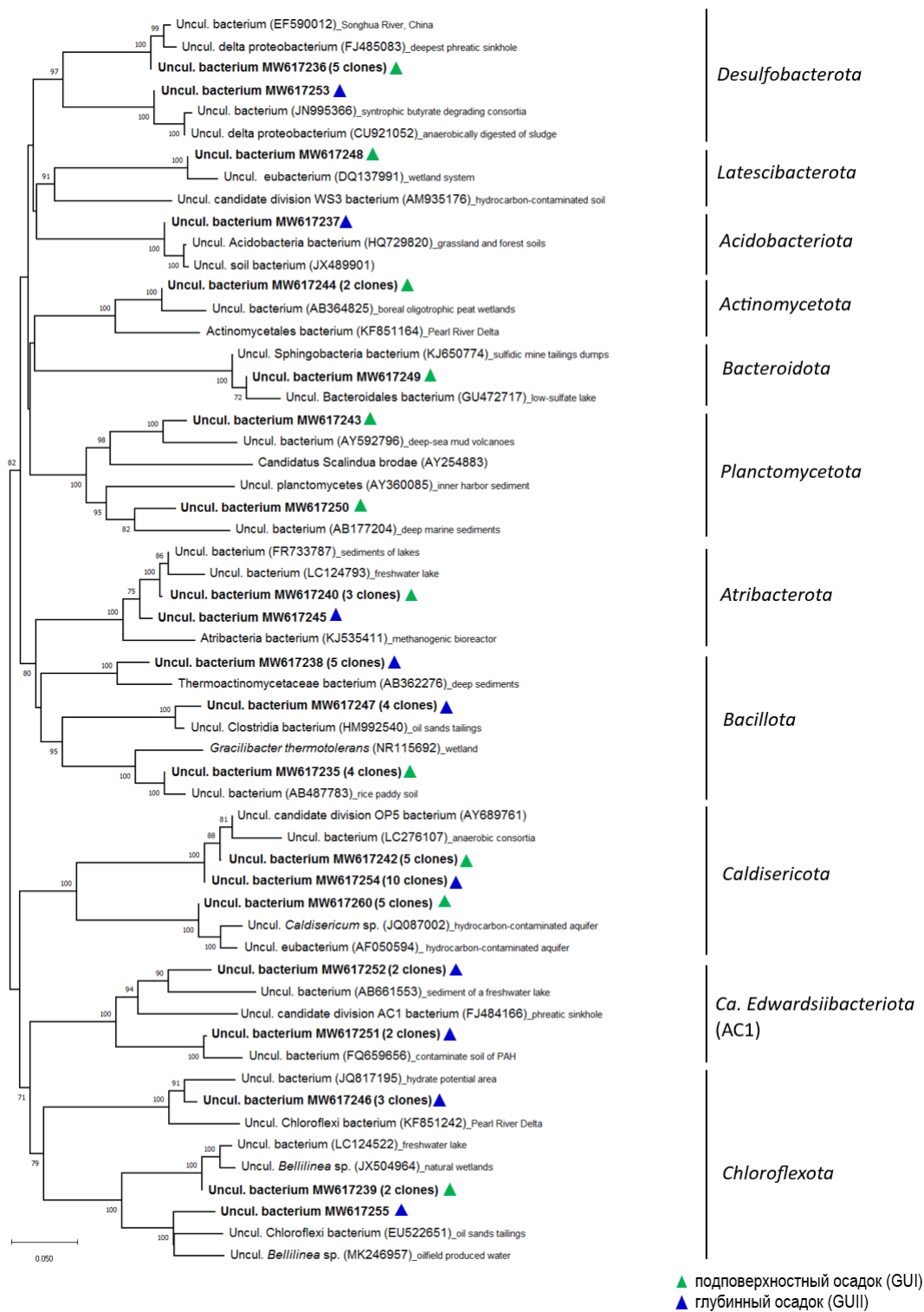
некультивируемым археям «Aigarchaeota» и выявленной в термальном источнике Йелоустонского озера. «Aigarchaeota» представляет эволюционно разнообразную группу архей, которые в основном обитают в высокотемпературной среде, включая геотермальные источники, глубокие подповерхностные слои, морские отложения и морские гидротермальные источники (Hua et al., 2018). В настоящее время филум выделен в новый филум-кандидат *Ca. Aenigmatarchaeota* (Oren, Goker, 2023).

Необходимо отметить, что последовательности из библиотеки генов 16S рРНК бактерий из микробных сообществ термального вента Йелоустонского озера уже встречались в настоящем исследовании при анализе библиотеки генов бактерий накопительной культуры GUI\_НСО<sub>3</sub>. Так, клон MW595804 показал сходство 94% с последовательностью некультивируемой бактерии, отнесенной к филуму *Caldisericotia* из Йелоустонского озера.

Библиотека 16S рРНК генов архей культуры GUI\_НСО<sub>3</sub> была менее разнообразной по составу, чем GUI\_НСО<sub>3</sub>. Библиотека генов на 100% состояла из последовательностей, ближайшие гомологи которых выявлены в бореальных олиготрофных торфяно водно-болотных угодьях (Pavlova et al., 2022). Из них 87% составляли последовательности семейства *Methanoregulaceae* (*Methanospirillaceae*, *Halobacterota*) и 13% последовательности некультивируемых архей класса *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) представлен классом (рис. 51).

**Состав клональных библиотек гена 16S рРНК в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенных сульфат-ионом.** В библиотеках генов поверхностного и глубинного образцов более 30% выявленных последовательностей принадлежало микроорганизмам филума *Caldisericotia*. Ближайшими гомологами являлись последовательности некультивируемых бактерий, обнаруженных в загрязненных углеводородами водоносном горизонте и нетронутых отложениях субальпийских ручьев. Следующие по распространенности были представители филума *Bacillota*, семейств *Thermoactinomycetaceae* и *Gracilibacteraceae*, а также неклассифицируемые *Clostridia*. Общими для обоих образцов были представители филумов *Desulfobacterota*, *Atribacterota* и *Chloroflexota* (рис. 52). Последовательности, отнесенные к филуму *Desulfobacterota*, имели высокий процент сходства с последовательностью некультивируемой бактерии из карстового колодца Закатон, Мексика и *Syntrophus* sp., ранее выявленными в накопительных культурах, обогащенных гидрокарбонат-ионом в настоящем исследовании. Филум *Chloroflexota* также был представлен последовательностями, ранее обнаруженными в накопительных культурах, обогащенных гидрокарбонат-ионом. Последовательности филумов *Ca. Latescibacterota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota*, *Planctomycetota* выявлены только в поверхностном образце, филумов *Acidobacteriota* и *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1) – только в глубинном (рис. 52).





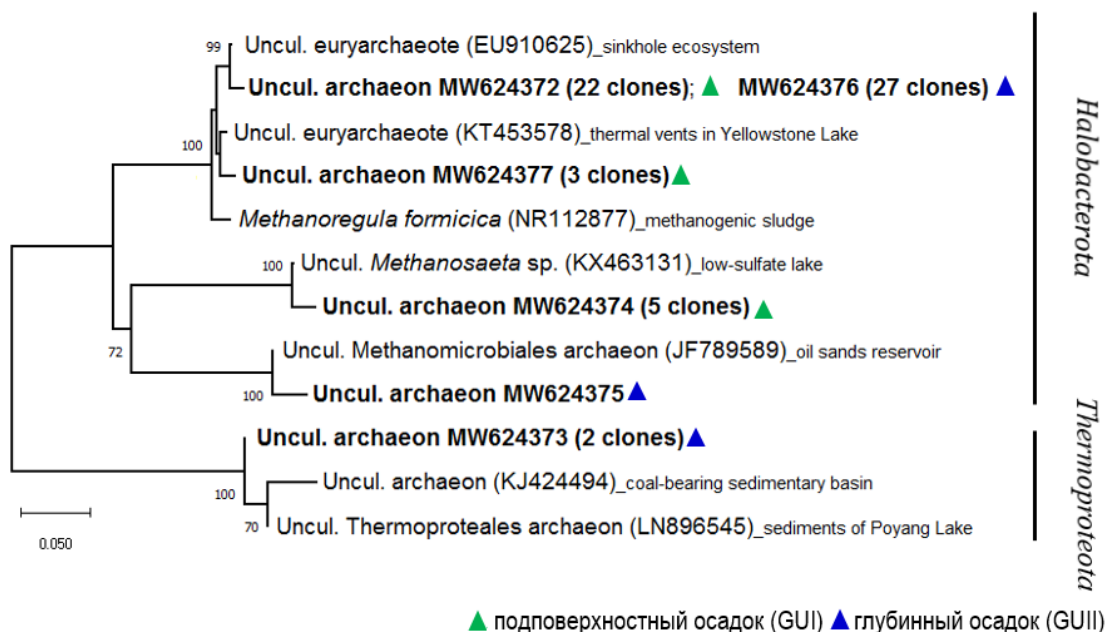
**Рисунок 52.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей генов 16S рРНК бактерий, полученных из накопительных культур, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные сульфат-ионом. Полученные последовательности выделены жирным шрифтом. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Последовательности, отнесенные к филуму *Planctomycetota* имели не высокий процент сходства (90–92%) с ближайшими гомологами из глубоководных морских отложений, содержащих гидраты метана, в Тихом океане и глубоководных грязевых вулканов в Восточном Средиземноморье. Одна из последовательностей была отнесена к *Ca.*

Latescibacterota (Ca. division WS3), гетеротрофным микроорганизмам, окисляющих белки, липиды и полисахариды. Единственным, наиболее близким гомологом (98%) этой последовательности был некультивируемый клон из кислых сульфатных сточных вод промышленного, горнодобывающего предприятия.

Низкий процент сходства имели 2 последовательности, отнесенные к филуму *Actinomycetota* из бореального олиготрофного торфянно водно-болотного угодья. Два клона из библиотеки генов глубинного образца (MW617252) формировали на филогенетическом дереве ветвь в отдельном кластере и имели отдаленное сходство с некультивируемой бактерией, отнесенной к *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1) из донных осадков озера Бива и карстовых образований из фреатического известняка, Мексика. Вторая ветвь в этом кластере была сформирована двумя последовательностями, с неясным филогенетическим положением (рис. 52).

Клональная библиотека 16S рРНК генов архей накопительной культуры GUI\_SO<sub>4</sub> на 100% состояла из представителей филума *Halobacterota*. На филогенетическом дереве последовательности порядка *Methanomicrobia* образовывали три ветви (рис. 53).



**Рисунок 53.** Филогенетическое дерево на основе последовательностей генов 16S рРНК архей, полученных из накопительных культур, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенных сульфат-ионом. Полученные последовательности выделены жирным шрифтом. Цитировано по Pavlova et al., 2022.

Группа с наибольшим количеством последовательностей (25 клонов) отнесена к семейству *Methanoregulaceae* (*Methanospirillaceae*), ближайшие гомологи которой выявлены в карстовых образованиях из фреатического известняка, термального вента в Йелоустонском озере, как и последовательности, обнаруженные в библиотеке 16S рРНК генов архей в накопительных культурах, обогащенных гидрокарбонат-ионом. Пять последовательностей

показали высокий уровень сходства с *Methanosaeta* sp. (в н.в. *Methanothrix* sp.), из пресноводных осадков озера Орн, формирующих кластер ANME-2d (Pavlova et al., 2022). Последовательности, гомологичные последовательностям архей из микробного сообщества из пресноводных осадков озера Орн уже выявлялись в библиотеке генов архей поверхностного образца, культивирование которых проводилось в метаногенных условиях. Три последовательности на 98% были гомологичны последовательностям из термального вента Йелоустонского озера. В библиотеке 16S рРНК генов архей накопительной культуры GUI\_SO<sub>4</sub>, также, как и GUI\_SO<sub>4</sub>, доминировали (87%) последовательности порядка *Methanomicrobia*, выявленные в карстовых образованиях и нефтяных песках Канады. Класс *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) представлен двумя последовательностями, имеющими 96–97% процентов идентичности с последовательностями некультивируемых архей из донных осадков различных экосистем (рис. 53).

Таким образом, проведенные эксперименты показали убыль *n*-алканов и ПАУ, сопровождающуюся образованием метана в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные образцы из района нефтепроявления ГУ. В культурах, содержащий подповерхностный осадок, конверсия *n*-алканов наиболее интенсивно протекала в присутствии сульфат-иона, в глубинных – гидрокарбонат-иона, что может быть обусловлено составом микробных сообществ, развивающихся при различных условиях. В глубинных осадках микробное сообщество более ориентировано на анаэробное окисление полициклических ароматических углеводородов, о чем свидетельствует высокая степень их биodeградации (до 46%), вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов.

Инкубирование подповерхностного осадка с H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> 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 углеводородов. Убыль *n*-алканов в накопительной культуре GUI\_HCO<sub>3</sub> может обеспечиваться представителями филумов *Chloroflexota* и *Acidobacteriota*. Также в анаэробном окислении нефти могут принимать участие архей, представители филумов *Thermoproteota* и *Thermoplasmata*, составляющие 33 и 43% соответственно от библиотеки генов архей образца GUI\_HCO<sub>3</sub>.

В культуре GUI\_HCO<sub>3</sub>, процесс деградации углеводородов сопровождался образованием метана. Скорости метангенерации в озере Байкал значительно варьируют в зависимости от геологического строения районов озера (Намсараев, Земская, 2000; Земская и др., 2021). Концентрация метана (32.54 ммоль/л), выявленная при культивировании поверхностного образца по истечению 6 месяцев эксперимента значительно превышала значения,

установленные ранее (до 11.2 ммоль/л) в условиях лабораторного моделирования, при культивировании микробных сообществ метанового сипа и грязевых вулканов (Павлова и др., 2014; Букин и др., 2018).

В культуре GUII\_НСО<sub>3</sub> основная роль в деградации алканов может принадлежать бактериям филума *Chloroflexota* (доля в библиотеке генов – 33%) и *Bacillota* (17%), представленных порядком *Peptococcaceae*. Микроорганизмы из порядка *Peptococcaceae* наиболее часто выявляются в аноксигенных биотопах, ассоциированных с анаэробной деградацией ароматических углеводов (Rabus et al., 2016a, б) и в накопительных анаэробных алкан-деградирующих культурах совместно с метаногенными *Archaea* (*Methanosaetaceae* и *Methanomicrobiaceae*) (Tan et al., 2015). В культуре GUII\_НСО<sub>3</sub> основную долю среди архейных последовательностей (83%) составляли представители класса *Methanomicrobia*. Тем не менее, присутствие последовательностей синтрофных бактерий и метаногенных архей в библиотеках генов глубинного образца, значительной генерации метана не выявлено. Отсутствие процесса метангенерации в глубинных слоях осадка в ряде случаев было установлено ранее, как в нативных природных осадках, так и в условиях эксперимента (Намсараев, Земская, 2000; Букин и др., 2018), несмотря на присутствие метаногенных архей в составе микробных сообществ.

В морских осадках сульфат-ион является наиболее предпочтительным акцептором электронов и скорость деградации нефтяных углеводов последовательно уменьшается в сульфатредуцирующих – метаногенных – нитратредуцирующих условиях (Voorthuyt, 2004). Содержание сульфат-иона в пресных водах оз. Байкал не велико (55 мкмоль/л) (Falkner et al., 1991). Вместе с тем, донных осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводов, концентрация некоторых ионов в поровых водах может быть аномально высокой (Погодаева и др., 2007; Pogodaeva et al., 2017). В исследуемом керне не отмечено повышенных концентраций сульфат- и нитрат-ионов. Повышенная минерализация обусловлена в основном за счет концентрации гидрокарбонат-иона, который не препятствует развитию микроорганизмов с различным типом метаболизма. 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 *Caldiseriaceae* (*Caldisericota*); *Anaerolineaceae*, *Dehalococcoidaceae* (*Chloroflexota*); *Thermoactinomycetaceae*, *Gracilibacteraceae* (*Bacillota*) и *Syntrophaceae* (*Desulfobacterota*). Несмотря на различные условия культивирования, в библиотеках генов 16S рРНК бактерий GUII\_НСО<sub>3</sub> и GUII\_СО<sub>4</sub> 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 дегградации углеводов принимают участие одни и те же микроорганизмы вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов.

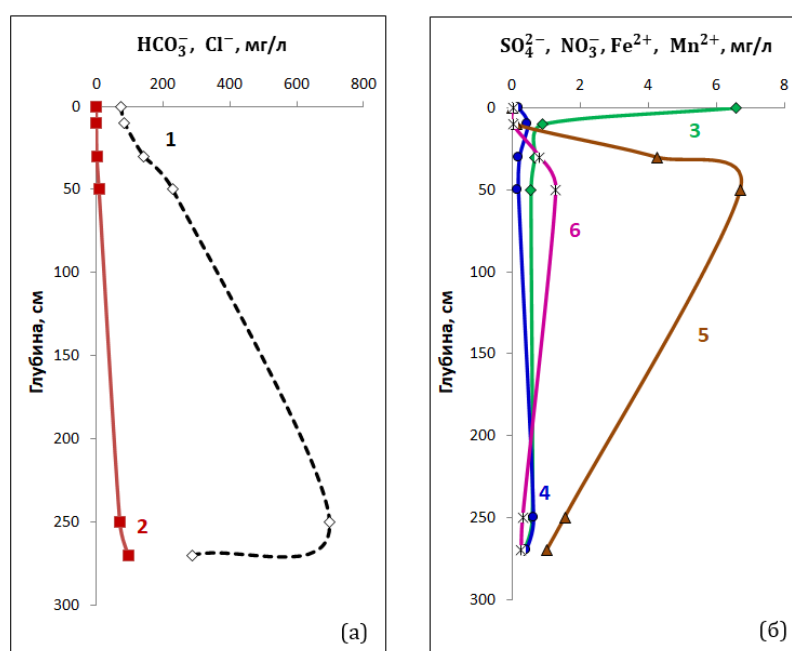
Выявленные в накопительных культурах микроорганизмы могут быть участниками процессов дегградации не только *n*-алканов, но и ПАУ. В настоящее время на основе метаболической реконструкции геномов *Acidobacteriota*, *Atribacterota*, *Desulfobacterota*, *Ca. TA06* и классов *Dehalococcoidia*, *Anaerolineae* (*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. Выявленные в экспериментальных накопительных культурах доминирующие таксоны также характерны для микробных сообществ из глубоководных, содержащих газовые гидраты, донных осадков метанового сипа Санкт-Петербург, где *Chloroflexota* (38%), *Armatimonadota* (19%) и *Caldisericota* (8%) являлись доминирующими компонентами (Zemskaya et al., 2015). Исследуемые осадки, в частности глубинный образец, включал не только нефть, но и газовые гидраты. Таким образом, влиянием газонасыщенных флюидов может быть обусловлен близкий к гидратным осадкам состав микробных сообществ и присутствие в донных осадках и накопительных культурах представителей «редких таксонов» – *Planctomycetota*, *Ca. Edwardsiibacteriota* (AC1), *Ca. Microgenomatus* (OP11), *Ca. Patescibacteria* и *Ca. Latescibacterota* (*Ca. division WS3*), которые могут принимать участие в процессах окисления углеводов.

## 5.2. Анаэробное окисление углеводородов микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская

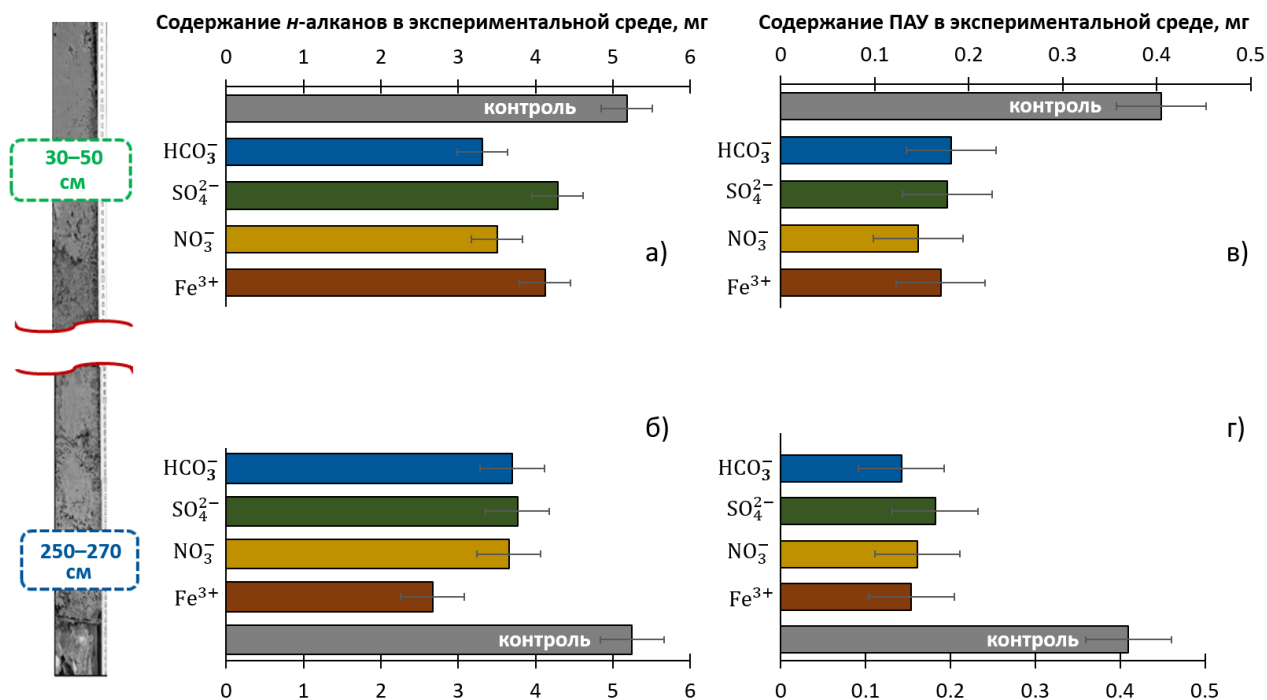
### 5.2.1. Анаэробное окисление углеводородов нефти микробным сообществом донных осадков района естественного нефтепроявления, расположенного у устья р. Б. Зеленовская в психрофильных условиях

Характеристика исследуемого керна St.4 GC.6 представлена в таблице 1. Осадки характеризовались низкой газонасыщенностью, концентрация метана составляла 0.08 мг/л осадка на глубине 10 см и 5.2–9.4 мг/л осадка на глубине 50–250 см (Павлова и др., 2024а). Гомологи метана в газе в глубинных слоях осадка представлены этаном в следовых количествах. Поровые воды отложений у поверхности пресные гидрокарбонатно-кальциевые первого типаменяются с глубиной на пресные гидрокарбонатно-натриевые первого типа. Минерализация у поверхности осадка (105 мг/л) схожа с фоновой в Среднем Байкале (90–180 мг/л) (Pogodaeva et al., 2017). С глубиной она аномально нарастает на порядок (до 1030 мг/л на 250 см). Концентрация ионов гидрокарбоната увеличивается с глубиной от 73 мг/л, достигая максимальных значений 700 мг/л на глубине 250 см. Концентрация ионов хлора увеличивается от 0.6 до 86 мг/л на глубине 270 см (рис. 54а). Нитрат-ионы варьируют от 0.2 до 0.6 мг/л по всему профилю керна. Наибольшая концентрация сульфатов выявлена в поверхностном осадке (6.6 мг/л); по глубине керна она снижалась от 0.9 до 0.3 мг/л. Исследуемые осадки обогащены ионами Mn(II) и Fe(II), максимальные концентрации которых отмечены на глубине 50 см (1.3 и 6.7 мг/лсоответственно) (рис. 54б).



**Рисунок 54.** Концентрационные профили компонентов поровых вод керна St.4, GC.6: (а) гидрокарбонат-иона (1) и ионов хлора (2); (б) ионов сульфата (3), нитрата (4); Mn(II) (5) и Fe(II) (6). Цитировано по Павлова и др., 2024а.

**Дегградация углеводородов в условиях эксперимента.** Накопительные культуры, полученные на средах с разными акцепторами электронов и нефтью, в течение одного года показали различную степень конверсии *n*-алканов и ПАУ (рис. 55).



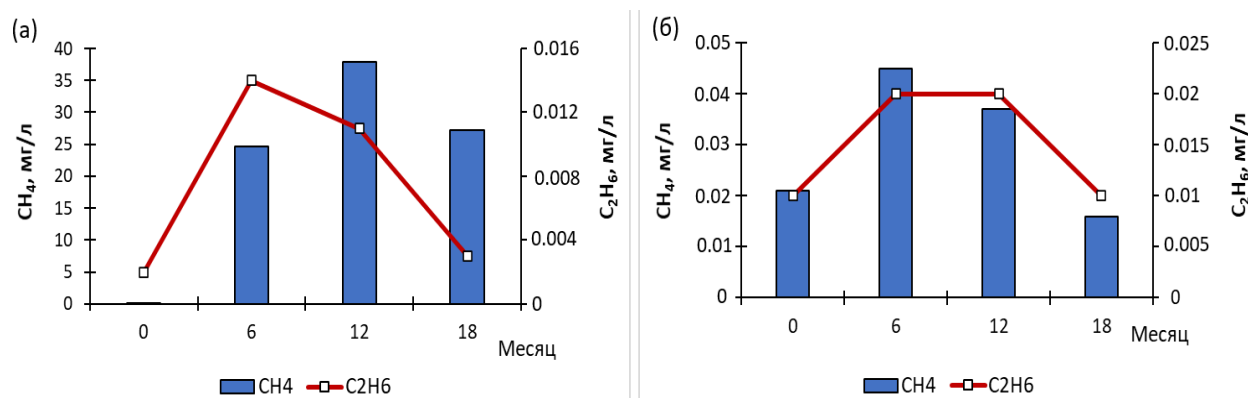
**Рисунок 55.** Убыль *n*-алканов (а, б) и ПАУ (в, г) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные гидрокарбонат-, сульфат, нитрат-ионами и Fe(III) в течение одного года инкубации. Цитировано по Павлова и др., 2024а.

В культурах, содержащих подповерхностный осадок К1, наибольшая убыль *n*-алканов (32–36%) отмечена в среде с нитратом и H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> в газовой фазе. В этих культурах содержание Σ<sub>алк</sub> в нефти в экспериментальной среде снизилось до 3.3–3.5 мг в сравнении с контролем (5.2 мг). В сульфатредуцирующей (K1\_SO<sub>4</sub>) и железоредуцирующей культуре (K1\_Fe) содержание алкановой фракции уменьшилось на 17–20% (рис. 55а). В культурах из глубинного осадка (K2) максимальная конверсия *n*-алканов (48%) отмечена в среде с Fe<sup>3+</sup>. В присутствии других акцепторов электронов (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) биодegradация *n*-алканов составляла 27–29% (рис. 55б; Павлова и др., 2024а). Дегградация ПАУ (55–65%) была сопоставима в накопительных культурах К1 и К2 (рис. 55в, г). Наибольшая конверсия полициклических ароматических углеводородов (64–65%) зафиксирована в культурах K1\_NO<sub>3</sub> и K2\_HCO<sub>3</sub>, где отмечено снижение Σ<sub>ПАУ</sub> 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 К1 и К2, вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. Наименьшей дегградации (1–14%) подверглись 1-метилфенантрен, 9-

метилфенантрен, пирен и бензо[е]пирен в накопительных культурах К1. Добавление нитрата увеличивало степень конверсии этих соединений до 25%. В культурах К2 деградация 1-метилфенантрена, 9-метилфенантрена, пирена и бензо[е]пирена составила 12–29%.

В накопительной культуре К1\_НСО<sub>3</sub> 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 СН<sub>4</sub> составляла 27.2 мг/л (рис. 56а). В накопительных культурах К2\_НСО<sub>3</sub> концентрация метана в течение всего эксперимента оставалась практически неизменной (0.02–0.05 мг/л осадка), что свидетельствует об отсутствии метаногенеза (рис. 56б).

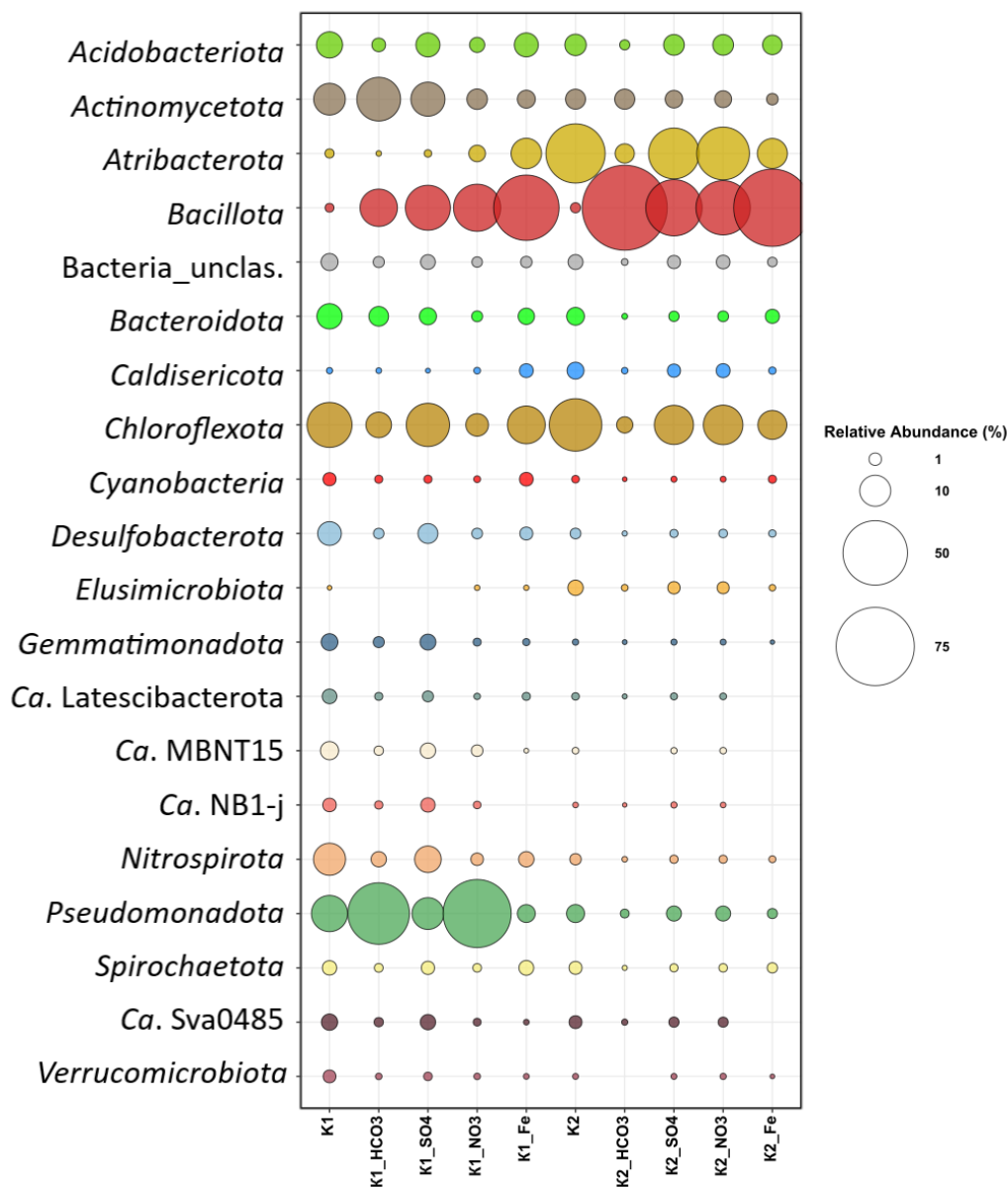


**Рисунок 56.** Динамика образования метана и этана в накопительных культурах, содержащих подповерхностные (а) и глубинные (б) осадки, обогащенных гидрокарбонат-ионом. Цитировано по Павлова и др., 2024а.

Образование этана было выявлено в накопительных культурах как с подповерхностным, так и с глубинным осадком, в сравнении с контролем (рис. 56). В культуре К1\_НСО<sub>3</sub> через 6 месяцев культивирования концентрация С<sub>2</sub>Н<sub>6</sub> 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 К2\_НСО<sub>3</sub> 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 К1\_НСО<sub>3</sub> и К2\_НСО<sub>3</sub> составляла 0.003–0.01 мг/л осадка соответственно.

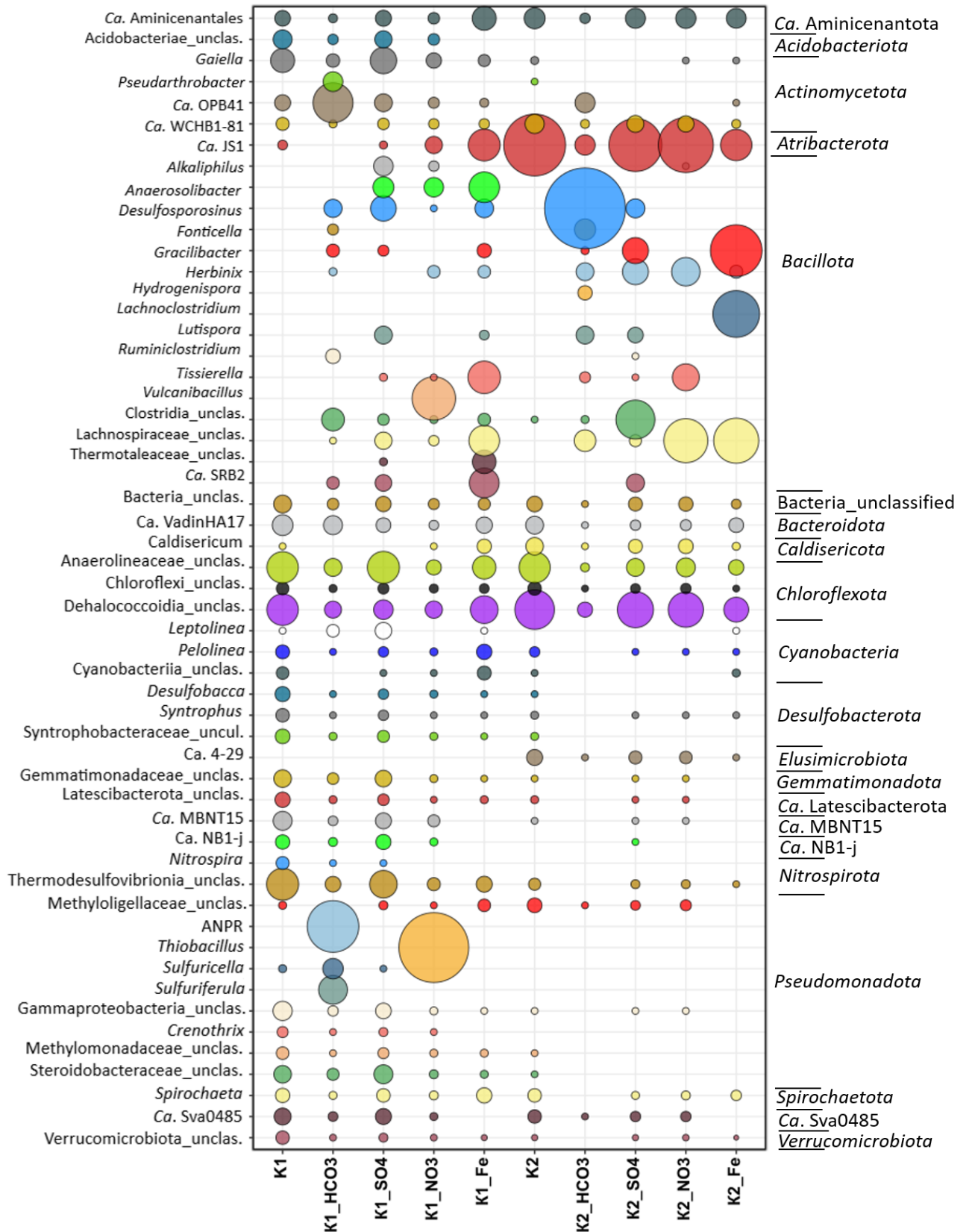
**Филогенетическое разнообразие микробного сообщества подповерхностного осадка и накопительных культур К1.** В составе микробного сообществ донного осадка с глубины 30–50 см были обнаружены представители 41 филума домена *Bacteria* и 10 филумов домена *Archaea*, среди которых только 17 и 6 филумов соответственно, включали более 1% последовательностей в составе библиотек. В сообществе доминировали бактерии филумов *Chloroflexota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Nitrospirota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota* и *Desulfobacterota* (рис. 57).





**Рисунок 57.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне филума в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек. Цитировано по Павлова и др., 2024а.

Инкубация подповерхностного осадка в присутствии разных акцепторов электронов привело к увеличению доли представителей некоторых таксонов, в частности *Bacillota* и *Pseudomonadota* (рис. 57). В контрольном осадке доля представителей *Bacillota* составляла 0.3% от всех последовательностей гена 16S рРНК, филум представлен неидентифицированными родами семейства *Clostridiaceae*. В культуре K1\_HCO<sub>3</sub> доля *Bacillota* увеличивалась до 15.3%. Доминирующее положение в ней занимали представители родов *Desulfosporosinus* (2.5%), *Gracilibacter* (1%), *Ruminiclostridium* (1.4%) и неидентифицированные *Clostridia* (4.4%) (рис. 58).



**Рисунок 58.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне рода в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек. Цитировано по Павлова и др., 2024а.

В культуре K1\_SO<sub>4</sub> доля бактерий рода *Desulfosporosinus* возростала до 5.8% в сравнении с K1\_HCO<sub>3</sub>. В числе доминирующих ОТЕ выявлены последовательности бактерий родов *Anaerosolibacter* (3.6%), *Alkaliphilus* (3%), *Lutispora* (2.4%), неклассифицируемых бактерий семейства *Lachnospiraceae* (2.2%) и SRB2 (2%). В культуре K1\_Fe доля *Bacillota* составляла 51.5% и была самой бóльшей в сравнении с другими культурами K1. Наряду с последовательностями *Anaerosolibacter* и *Desulfosporosinus* выявлены последовательности бродильных бактерий рода *Tissierella* и неидентифицированных *Lachnospiraceae*.

Бактерии рода *Anaerosolibacter* способны осуществлять анаэробное дыхание, восстанавливая трехвалентное железо, сульфат, тиосульфат и элементарную серу за счет окисления органических соединений (Hong et al., 2015). Сульфатвосстанавливающие бактерии рода *Desulfosporosinus* используют углеводы, короткоцепочечные жирные кислоты и ароматические соединения, способны расти хемолитотрофно, окисляя водород (Spring, Rosenzweig, 2006). Бактерии родов *Gracilibacter*, *Ruminiclostridium*, *Alkaliphilus* и *Lutispora* характеризуются как строго анаэробные, хемоорганотрофные, термотолерантные микроорганизмы. В культуре K1\_NO<sub>3</sub> основную долю (19.5%) составляли последовательности строго анаэробных, хемоорганотрофных бактерий рода *Vulcanibacillus*, использующих нитрат в качестве единственного акцептора электронов (L'Haridon et al., 2006).

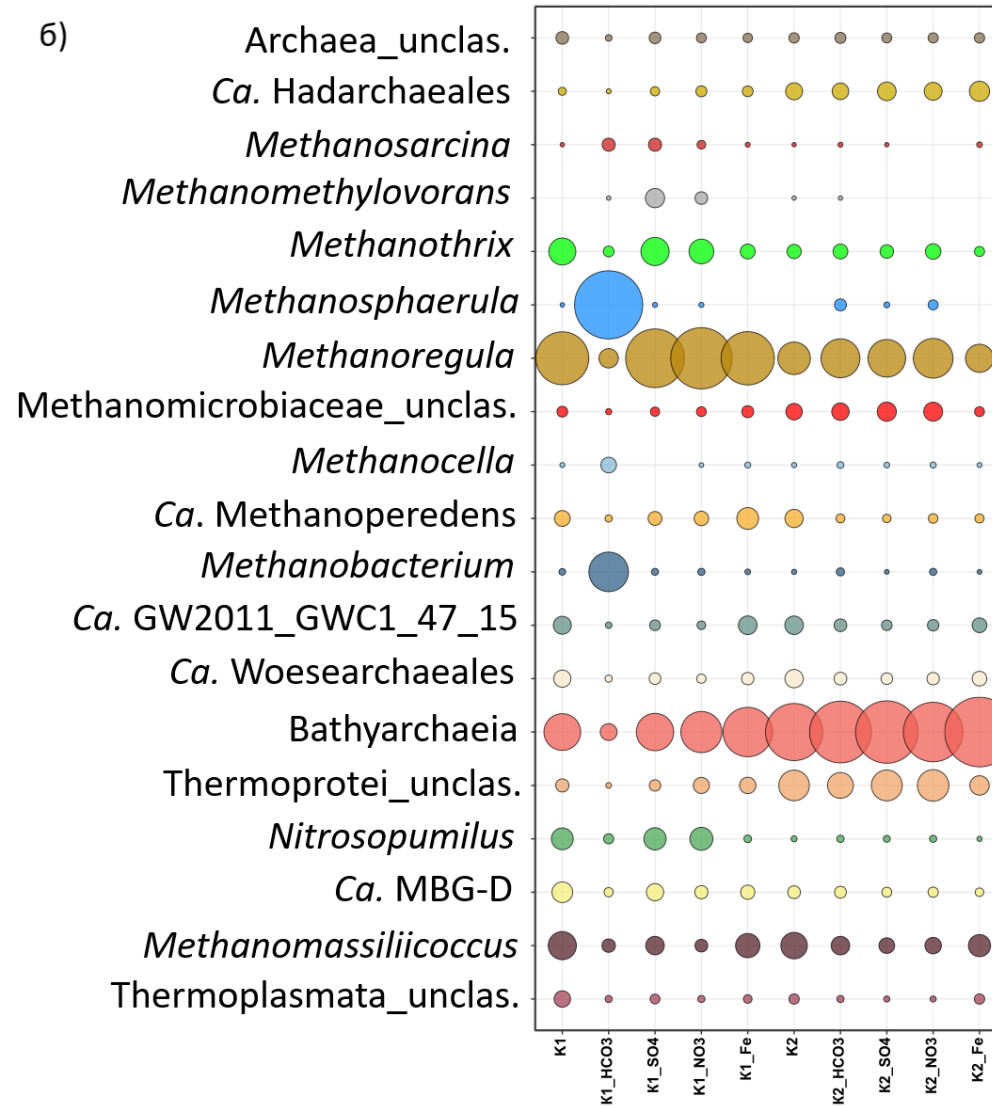
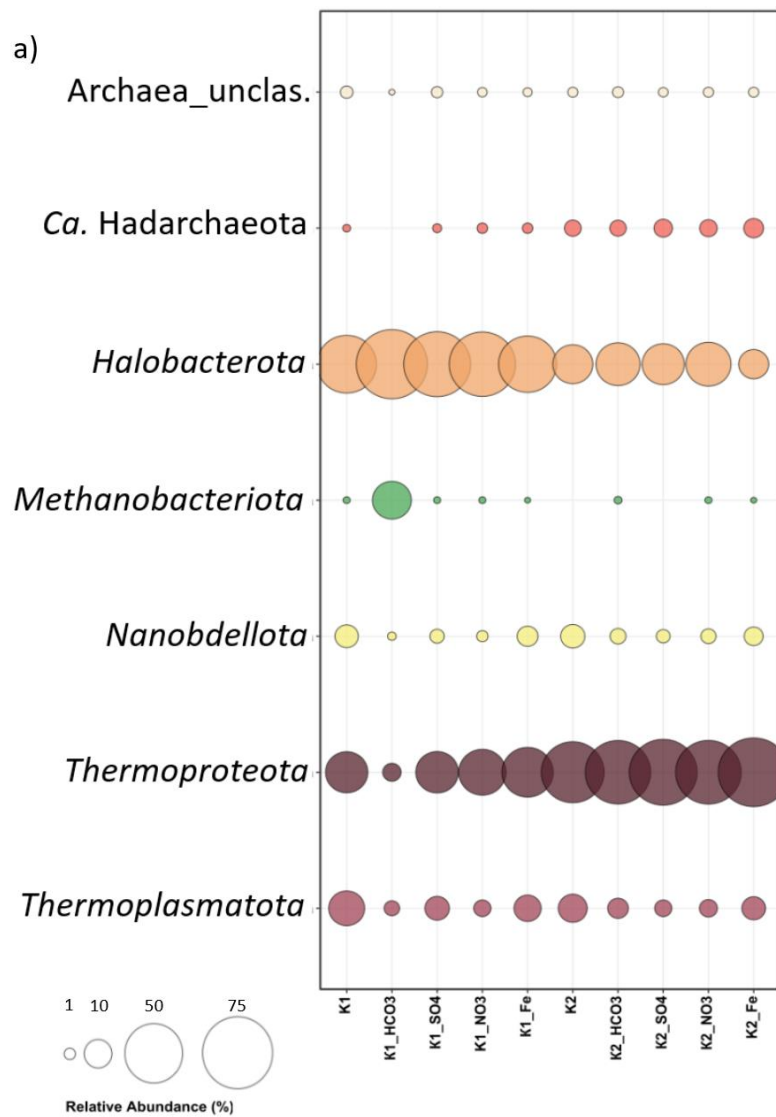
Филум *Pseudomonadota* в контрольном осадке K1 был представлен неидентифицированными представителями класса *Gamma proteobacteria* и семейств *Methylomonadaceae* и *Steroidobacteraceae*. Инкубация осадка K1 с H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> в газовой фазе привело к увеличению содержания сероокисляющих бактерий родов *Sulfuricella*, *Sulfuriferula* и ANPR. В базе данных рРНК SILVA последовательности, связанные с *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* и *Rhizobium*, помещены в отдельный род ANPR в пределах семейства *Rhizobiaceae*. Бактерии этого семейства характеризуются как хемоорганогетеротрофы, способные к биодegradации нефтяных углеводородов в почве (Wang et al., 2021). В накопительной культуре K1\_NO<sub>3</sub> доля *Pseudomonadota* составляла 56%. Наиболее многочисленная ОТЕ (54%) отнесена к роду *Thiobacillus* и имела 97.2% сходства с геном 16S рРНК хемолитотрофной бактерии *Thiobacillus denitrificans*, сочетающей окисление соединений серы с денитрификацией (Robertson, Kuenen, 2006).

Филумы *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota*, *Nitrospirota* и *Desulfobacterota*, как в контрольном осадке, так и накопительных культурах, были представлены одними и теми же родами бактерий. Наблюдались количественные изменения в составе доминирующих родов в накопительных культурах. Филум *Acidobacteriota* состоял из неидентифицированных представителей семейства *Acidobacteriaceae* и анаэробных, хемоорганогетеротрофных бактерий порядка *Ca. Aminicenantales* (OP8), которые в настоящее

время отнесены к *Ca. Aminicenantota* (Oren, Goker, 2023). Последовательности *Ca. Aminicenantota* наиболее часто выявляются при анализе обогащенных углеводородами биотопов, включающих нефтяные резервуары, глубоководные морские гидротермальные экосистемы и др. (Kadnikov et al., 2019). ОТЕ из филума *Actinomycetota*, в основном, принадлежали бактериям группы ОРВ<sub>41</sub> и хемоорганотрофным бактериям рода *Gaiella*. Представители рода *Pseudarthrobacter* (*Actinomycetota*) выявлены только в культуре К1\_НСО<sub>3</sub>. Филотипы ОРВ<sub>41</sub> были обнаружены в нефтеносных, осадочных и подповерхностных средах. Культивируемые представители группы ОРВ<sub>41</sub> являются анаэробными литотрофами, фиксирующими СО<sub>2</sub> через восстановительный глициновый путь и использующими тиосульфат, элементную серу, либо Fe(III) в качестве акцепторов электронов (Khomyakova et al., 2022). Для психрофильных бактерий рода *Pseudarthrobacter* показана способность к биодegradации фенолов и других ПАУ (Asimakoula et al., 2023).

Филум *Chloroflexota* состоял из неклассифицируемых представителей семейств *Anaerolineaceae* и *Dehalococcoidaceae*. Филум *Bacteroidota* представлен семейством VadinHA17, протеолитическими бактериями, ферментирующими углеводы с образованием летучих жирных кислот (Kampmann et al., 2012). ОТЕ, отнесенные к филуму *Desulfobacterota*, принадлежали анаэробным бактериям, окисляющим органические субстраты (*Syntrophaceae*, *Syntrophobacteraceae*) или ацетат (*Desulfobacca*) в процессе синтрофного роста с метаногенными археями. Нуклеотидные последовательности бактерий филума *Nitrospirota* составляли от 1 до 11% в анализируемых библиотеках образца К1 и принадлежали неклассифицированным бактериям класса *Thermodesulfobionia*, известных способностью восстанавливать сульфат до сульфида за счет окисления органических субстратов или водорода (Umezawa et al., 2021).

Архейная компонента контрольного осадка К1 была представлена филумами *Halobacterota*, *Methanobacteriota*, *Thermoproteota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Nadarchaeota* (рис. 59а). Доминирующее положение в контрольном осадке и в накопительных культурах К1\_СО<sub>4</sub>, К1\_НО<sub>3</sub> и К1\_Fe занимали гидрогенотрофные археи рода *Methanoregula* (*Halobacterota*), где они составляли от 37.8 до 51.7% от состава сообщества, за исключением К1\_НСО<sub>3</sub> (3.9%) (рис. 59б). Инкубация осадка К1 с Н<sub>2</sub>:СО<sub>2</sub> в газовой фазе привело к увеличению доли гидрогенотрофных архей родов *Methanobacterium* (*Methanobacteriota*, ранее *Euryarchaeota*) (20.1%), *Methanosphaerula* (64.7%) и *Methanocella* (2.3%) (*Halobacterota*) в сравнении с контрольным осадком (до 0.2%).



**Рисунок 59.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Achaea*, представленных на уровне филума (а) и рода (б) в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек. Цитировано по Павлова и др., 2024а.

В накопительных культурах K1\_SO<sub>4</sub>, K1\_NO<sub>3</sub> и K1\_Fe их доля не превышала 0.3–1.1%. В K1\_SO<sub>4</sub> и K1\_NO<sub>3</sub> филум *Halobacterota* был представлен ацетокластическими археями рода *Methanotherix* (7.0–9.5%), метанол, моно-, ди- и триметиламин-использующими археями рода *Methanomethylovorans* (1.3–3.8%) и археями рода *Methanosarcina* (0.4–1.4%), осуществляющими все известные пути метаногенеза. Среди ОТЕ, отнесенных к филуму *Halobacterota*, также выявлены последовательности, принадлежащие роду *Ca. Methanoperedens*.

Их представленность была наибольшей в накопительной культуре K1\_Fe – 5.2%, наименьшей в K1\_HCO<sub>3</sub> – 0.2%. Филум *Thermoproteota* (ранее *Crenarchaeota*) представлен классами *Bathyarchaeia*, *Nitrososphaeria* (род *Nitrosopumilus*) и неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei*. Наибольшая доля *Bathyarchaeia* выявлена в культуре K1\_Fe – 32.7%, наименьшая в K1\_HCO<sub>3</sub> – 2.8%. В контрольной осадке, K1\_SO<sub>4</sub> и K1\_NO<sub>3</sub> их доля варьировала от 17.1 до 21.9%.

На основе анализа геномов, космополитным археям *Bathyarchaeia* предсказана способность осуществлять ацетогенез, метаногенез и брожение (Zhou et al., 2018; Hou et al., 2023). Анализ фенотипических и геномных свойств первого культивируемого штамма M17C<sup>Ts</sup>, отнесенного к *Ca. Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., показал его способность к использованию сложных белковых субстратов и метоксилированных ароматических соединений (Khomuyakova et al., 2023). В накопительных культурах K1\_SO<sub>4</sub> и K1\_NO<sub>3</sub> выявлена наибольшая доля (5.5%–5.9%) последовательностей архей рода *Nitrosopumilus*, окисляющих аммиак и осуществляющих автотрофную фиксацию углерода через 3-гидроксипропионат/4-гидроксипропионатный путь (Liu et al., 2021).

Филум *Thermoplasmata* был представлен археями рода *Methanomassiliicoccus* и порядка *Ca. Thermoprofundales* (Marine Benthic Group D), восстанавливающих метанол и окисляющих водород, характеризующиеся как космополиты донных осадков, со специфическим миксотрофным метаболизмом, включающим гетеротрофию и автотрофную фиксацию CO<sub>2</sub> (Zhou et al., 2019). Наибольшая доля *Methanomassiliicoccus* выявлена в K1 (9.4%), K1\_SO<sub>4</sub> (3.5%) и K1\_Fe (6.7%); MBG-D – в K1\_SO<sub>4</sub> (2.9%). Филум *Nanoarchaeota* состоял, в основном, из ОТЕ, отнесенных к семействам GW2011\_GWC1\_47\_15 и *Woesearchaeales* – археям, выявленным в различных средах обитания, среди которых нефтяные резервуары и серные источники. Эти археи являются частью консорциума с бактериями, где бактерии участвуют в круговороте углерода, а археи – в фиксации азота, денитрификации и восстановлении сульфата в анаэробных условиях (Liu et al., 2021; Köhler et al., 2023). Их наибольшая доля выявлена в K1 (6.4%), наименьшая – в K1\_HCO<sub>3</sub> – 0.4%.

**Филогенетическое разнообразие микробного сообщества глубинного осадка и накопительных культур K2.** В составе микробного сообществ донного осадка с глубины керна 250 см обнаружены представители 27 филумов домена *Bacteria* и 10 филумов домена *Archaea*. Последовательности, составляющие более 1% в составе библиотек, выявлены в 11 высших таксонах домена *Bacteria* и 5 филумах *Archaea* (рис. 57, 59а). Доминирующее положение занимали представители филумов *Atribacterota* (41.5%) и *Chloroflexota* (32%). Около 2.2–3.6% последовательностей принадлежало представителям *Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Caldisericotota*, *Bacteroidota* и *Pseudomonadota*. Доля *Elusimicrobiota*, *Spirochaetota*, Sva0485 и неклассифицируемых *Bacteria* не превышала 1.6%. Архейная компонента представлена филумами *Thermoproteota*, *Halobacterota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Nadarchaeota*. Филум *Thermoproteota* представлен классом *Bathyarchaeia* (44%) и неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei* (12%); филум *Halobacterota* – родом *Methanoregula* (13%), *Ca. Methanoperedens* (3.3%) и родом *Methanosaeta* (2%); филум *Thermoplasmata* – неидентифицированными *Methanomassiliicoccaceae* (8%) и *Ca. Thermoprofundales* (1.3%). Последовательности филума *Ca. Nadarchaeota* составляли 2.8–4.3% от общего числа последовательностей в каждой из библиотек K2, в сравнении с библиотеками из образцов K1, где доля этих архей не превышала 0.8%.

Несмотря на различные условия культивирования, накопительные культуры K2, содержащие сульфат- и нитрат-ионы не отличались значительно по составу бактерий, варьировало соотношение микроорганизмов различных таксономических групп. Общими для этих накопительных культур были последовательности бактерий порядка *Ca. Aminicenantales* (*Acidobacteriota*), группы WCHB1-81 (*Actinomycetota*) и рода *Caldisericum* (*Caldisericotota*). В трех накопительных культурах (K2\_HCO<sub>3</sub>, K2\_SO<sub>4</sub>, K2\_NO<sub>3</sub>) присутствовали *Atribacterota* (3.1–32%); неидентифицированные представители филума *Chloroflexota*, семейств *Dehalococcoidaceae* и *Anaerolineaceae* (1.65–13.5%) и филума *Bacillota*, род *Herbinix* (6.2–27.4%). Представители группы OPB<sub>41</sub> (*Actinomycetota*) и рода *Fonticella* (*Bacillota*) выявлены только в культуре K2\_HCO<sub>3</sub>, а неклассифицируемые бактерии семейства *Clostridiaceae*, рода *Gracilibacter* и группы SRB\_2 – только в культурах K2\_SO<sub>4</sub> и K2\_Fe. Последовательности бактерий родов *Desulfosporosinus* (2.8–74.5%) и *Lutispora* (1.8–2.3%), обнаружены в библиотеках накопительных культур K2\_SO<sub>4</sub> и K2\_HCO<sub>3</sub>. В накопительных культурах, содержащих железо, доминирующее положение занимали представители родов *Gracilibacter*, *Lachnoclostridium* и неклассифицированные *Lachnospiraceae*. Как и в случае с бактериальной компонентой, инкубирование осадка K2 в присутствии различных акцепторов электронов незначительно повлияло на состав архей в накопительных культурах в сравнении с природным осадком. Варьировала доля представителей различных таксонов. Доминирующее положение

в библиотеках всех четырех накопительных культур занимали последовательности представителей класса *Bathyarchaeia*, которые составляли 48.5–67.7% от общего количества ридов в каждой библиотеке. Филум *Thermoproteota* также был представлен неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei* (8–12.4%). Метаногенные археи были представлены родами *Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanomassiliicoccus* и неклассифицируемыми представителями семейства *Methanomicrobiaceae*. Последовательности *Woesearchaeales* и MBG-D составляли 0.62–1.4% в K2 библиотеках.

Анализ потенциальных функциональных характеристик микробных сообществ с использованием базы данных KEGG показал, что, бактерии, входящие в сообщество подповерхностного донного осадка K1, обладали потенциальной способностью осуществлять основные пути метаболизма углеводов, липидов и энергетического метаболизма, а также деградацию бифенола, стероидов, толуола, этилбензола и аминобензоата. Изменение условий, в частности культивирование микробного сообщества в присутствии  $H_2:CO_2$ , привело к экспрессии генов, участвующих в метаболизме серы и азота, а также ответственных за деградацию ПАУ, ксенобиотиков, стирола, солей бензойной кислоты, нафталина и хлорированных углеводородов, в дополнение к функциональным характеристикам, приведенным выше. У архей, входящих в исследуемые сообщества, предсказано наличие ферментов метаболизма метана, фиксации углерода, цикла азота и серы, деградации стеранов, ксилола, ксенобиотиков, толуола, хлоралканов, нафталина, хлорциклогексана, хлорбензола и фторбензоата. Бактерии из глубинного осадка K2 характеризовались, в основном, присутствием генов «домашнего хозяйства» и отсутствием потенциальной способности деградировать углеводороды. Для архей предсказаны функции деградации бензоата, этилбензола, бутирата. Потенциальная способность осуществлять деградацию ксилола, диоксинов, хлоралканов, хлоралкенов и нитротолуола выявлена у бактерий, культивируемых в присутствии  $H_2:CO_2$ .

В подповерхностном осадке K1 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*, *Ca. Methanoperedens*), а также синтрофно окислять углеводороды нефти (бактерии филумов *Bacillota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota* и археи *Halobacterota* и *Methanobacteriota*).

Инкубирование подповерхностного осадка в различных условиях приводило к увеличению доли бактерий некоторых таксонов, в частности *Bacillota*, *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* в составе накопительных культур. Исследуемый керн K1 имел повышенную минерализацию за счет гидрокарбонат-, сульфат-, нитрат-ионов и ионов хлора (рис. 54).



Компонентный состав поровых вод исследуемого керна, вероятно, нивелировал действие добавленных акцепторов электронов в накопительные культуры, что выражалось в доминировании 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 *Methanoperedens*, первоначально описанных, как анаэробно окисляющих метан в сочетании с восстановлением нитрата (Nagoon et al., 2013). В настоящее время показано, что в геномах этих архей 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). Ранее, представители семейства *Methanoperedenaceae*, были выявлены в донных осадках г/в Маленький, м/с Посольская Банка, а также в железомарганцевых отложениях Северного Байкала (Lomakina et al., 2020, 2023).

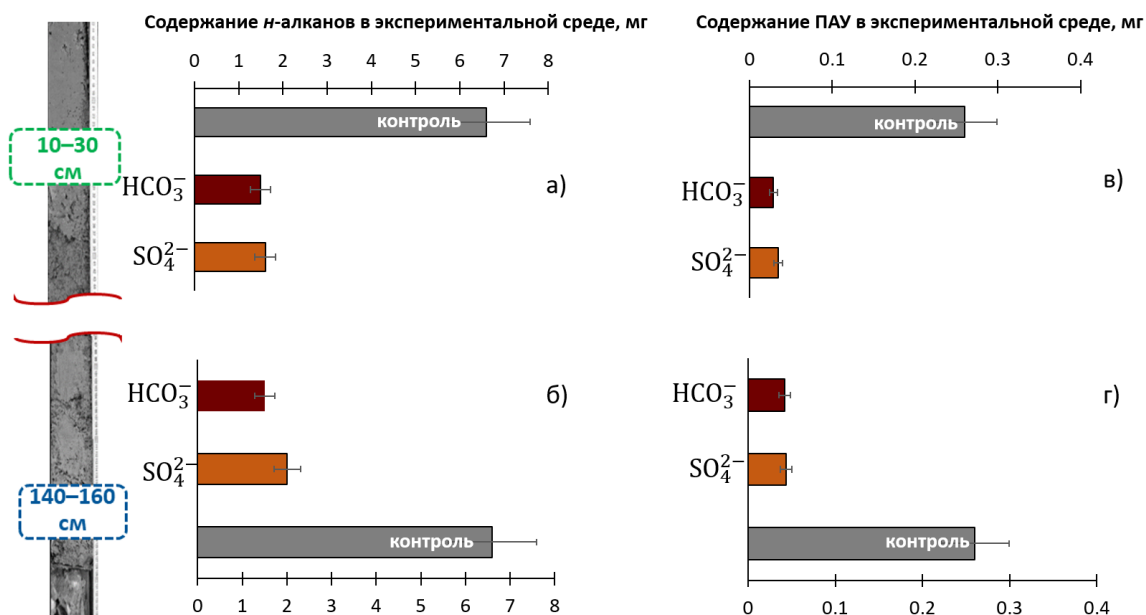
Несмотря на то, что бактерии глубинного осадка K2 характеризовались отсутствием потенциальной способности деградировать углеводороды, сырая нефть, добавленная в накопительные культуры, подвергалась биодеградациии, о чем свидетельствует убыль *n*-алканов и ПАУ. Значимое влияние на биодегградацию *n*-алканов имело только добавление Fe<sup>3+</sup>. В накопительных культурах, содержащих H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, степень конверсии *n*-алканов была одинаковой, так же, как и состав микробных сообществ, отличающийся незначительным варьированием процентного содержания микроорганизмов различных систематических групп. В глубинном осадке, конверсия углеводородов, вероятно, может проходить при участии представителей филумов *Bacillota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota* и класса *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) для которых показана способность осуществлять не только ферментацию углеводов, но и окислять короткоцепочечные *n*-алканы и ароматические соединения до жирных кислот, которые затем потребляются вторичными деструкторами. Окисление *n*-алканов происходит путем гидроксирования, добавления фумарата к углеводородам, а также деградации анаэробных ароматических соединений с использованием бензоил-КоА-редуктазы I класса (Dong et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021). В библиотеках генов 16S рРНК из образца K2 в значимых количествах (1.8–4.3%) выявлены последовательности представителей филумов *Elusimicrobiota* и *Ca. Nadarchaeota*. На основании реконструкции геномов *Elusimicrobiota* показано, что бактерии обладают ферментативным метаболизмом, магнитотаксисом и участвуют в круговороте железа и серы (Uzun et al., 2023). Термофильные облигатные анаэробные гетеротрофы филума *Caldisericotota*, восстанавливающие соединения

серы, также входили в число доминирующих таксонов в глубинных осадках. Последовательности бактерий этого филума выявляются при анализе гидротермальных экосистем, водоносных горизонтов, загрязненных углеводородами, содовых озер, биореакторов и т.д. (Mori et al., 2009). Филогенетический анализ, основанный на различных наборах связанных консервативных белковых последовательностей, показал, что филум *Caldisericotota* наряду с *Coprothermobacterota*, *Dictyoglomota*, *Thermotogota* и *Thermodesulfobiota* образуют древнюю кладу, предком которой могла быть термофильная, строго анаэробная, подвижная, водородзависимая, миксотрофная бактерия по метаболизму схожая с последним универсальным общим предком (last universal common ancestor, LUCA) (Leng 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**

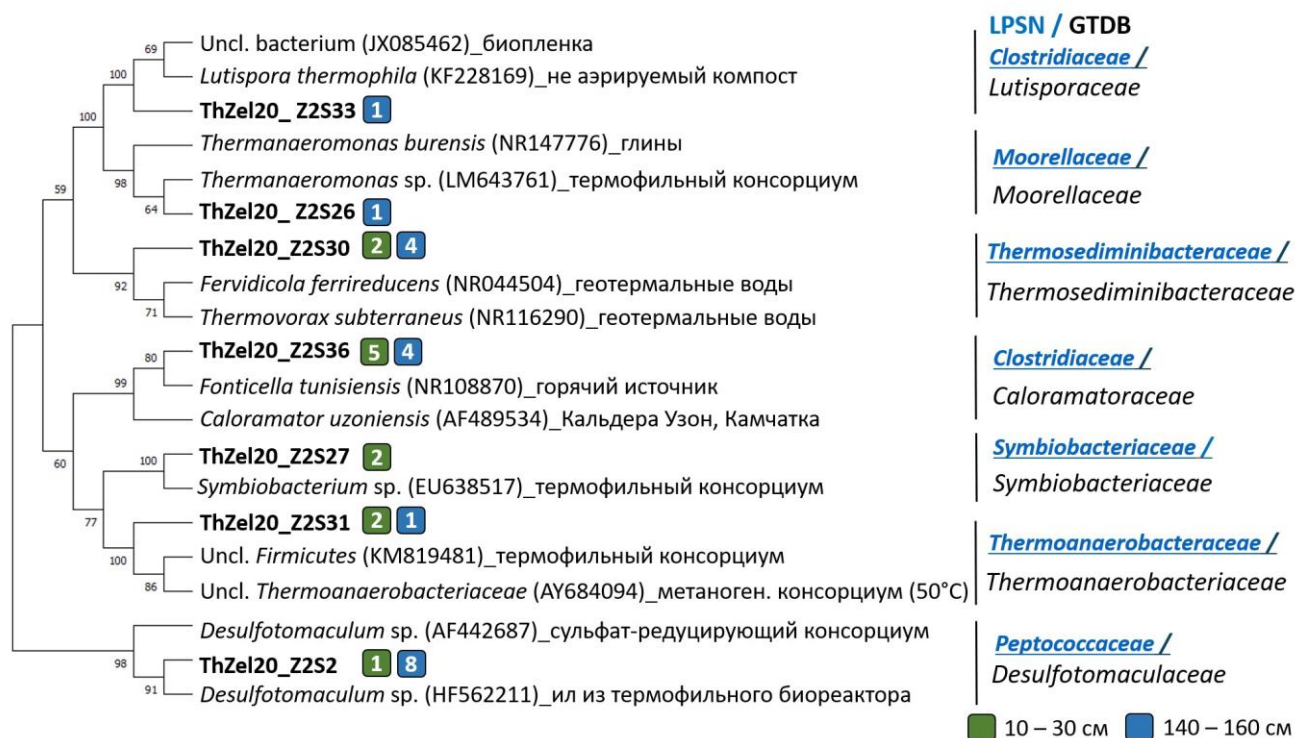
Исследование образцов нефти, собранных с поверхности озера в районе Б. Зеленовской, показало, что это биodeградированная ароматико-нафтенная нефть, значения биомаркерных показателей катагенеза соответствует градации МК2 и глубине погружения нефтепроизводящих отложений не менее 3 км (Конторович и др.,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

Для подтверждения этой гипотезы, керн донных осадков был отобран в 2021 году (табл. 1), получены накопительные культуры и проведены эксперименты по деградации нефти в анаэробных, термофильных условиях при температуре 60°C (табл. 4). В результате проведенного эксперимента по истечении 2.5 месяцев культивирования, установлены сопоставимые значения убыли *n*-алканов и ПАУ в накопительных культурах, содержащих как подповерхностный, так и глубинный осадок (рис. 60). Содержание  $\Sigma_{\text{алк}}$  в накопительных культурах T1\_HCO<sub>3</sub> и T1\_SO<sub>4</sub>, снизилось до 1.5–1.6 мг/объем экспериментальной среды, в сравнении с контрольными накопительными культурами (6.6 мг), в культурах T2\_HCO<sub>3</sub> и T2\_SO<sub>4</sub> – до 1.5 мг (рис. 60а, б). Концентрация  $\Sigma_{\text{ПАУ}}$ , в присутствии сульфат- и гидрокарбоната иона 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) (рис. 60в, г).



**Рисунок 60.** Убыль *n*-алканов (а, б) и ПАУ (в, г) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные гидрокарбонат- и сульфат-ионами.

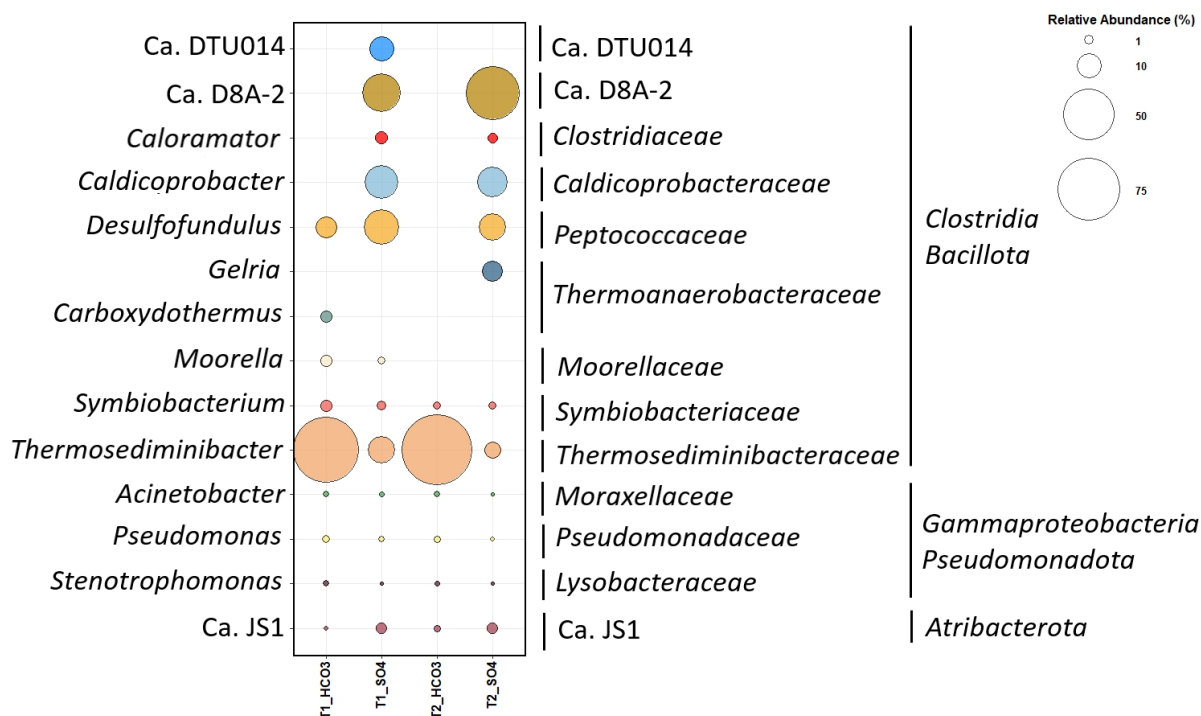
Определение филогенетического разнообразия термофильных накопительных культур по истечении 2.5 месяцев было проведено с использованием двух методов. Анализ фрагментов гена 16S рРНК клональных библиотек бактериального сообщества в термофильных накопительных культурах выявил представителей филумов *Bacillota*, порядка *Thermoanaerobacterales*, *Symbiobacteriales*, *Desulfotomaculales*, *Thermosediminibacteriales*, *Lutisporaceae*, *Moorellales* (рис. 61).



**Рисунок 61.** Состав клональных библиотек гена 16S рРНК бактерий в термофильных накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки. Цифрами указано количество клонов. Название семейств приведено по LPSN и GTDB.

Большинство последовательностей принадлежало некультивируемым бактериям из термофильных метаногенных и сульфатредуцирующих консорциумов (KM819481, EU638517, HF562211, LM643761), а также термофильным бактериям, изолированным из горячих источников (NR044504, AF489534, NR108870), геотермически активной подземной шахты (NR116290) и нефтяного месторождения Даган (HM228395).

Схожие результаты получены при метагеномном анализе этих же термофильных накопительных культур, который показал, что доминирующее положение в них занимают представители филума *Bacillota* (97%) (рис. 62).



**Рисунок 62.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне рода в библиотеках из термофильных накопительных культур. Таксономия приведена по LPSN.

В числе доминирующих ОТЕ выявлены последовательности бактерий родов *Thermosediminibacter* (до 96% от общего числа всех выявленных последовательностей в библиотеке генов 16S рРНК *Bacteria* в культуре T2\_HCO<sub>3</sub>) и *Desulfofundulus* (до 22% в культуре T1\_SO<sub>4</sub>). Последовательность, отнесенная к роду *Desulfofundulus* имела 97.9% сходства с геном 16S рРНК термофильной бактерии *Desulfofundulus kuznetsovii* DSM 6115 (NR075068). Бактерия изолирована из подземного минерального источника, использует широкий спектр органических субстратов в сочетании с восстановлением сульфата и тиосульфата (Назина и др., 1988). *Desulfofundulus* spp. выявлены в подземных термальных минеральных водах, пластовых водах нефтяных резервуаров, горячих источниках, метаногенных реакторах, а также в горячих угольных пластах (Karnachuk et al., 2023; Nazina et al., 2024).

Последовательность, отнесенная к *Thermosediminibacter*, имела 96% сходства с геном 16S рРНК бактерии *Thermosediminibacter oceani*, изолированной из термофильных (52–76°C) накопительных культур, содержащих отложения глубоководной окраины Перу, полученных во время Международной комплексной программы глубоководного бурения в океане (Lee et al., 2005). *Thermosediminibacter oceani* – анаэробный, барофильный, хемоорганотрофный термофил, способен использовать тиосульфат, элементарную серу и MnO<sub>2</sub> как акцепторы электронов для роста.

Инкубация подповерхностного и глубинного осадков в присутствии сульфат-иона приводило к увеличению доли неклассифицируемых бактерий, последовательности которых были гомологичны представителям классов-кандидатов D8A-2 и Incertae\_Sedis, выявленных в термофильных, анаэробных метаногенных реакторах. В культурах T1\_HCO<sub>3</sub> и T2\_HCO<sub>3</sub> определены последовательности бактерий рода *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* (*Pseudomonadota*); в культурах T1\_SO<sub>4</sub> и T2\_SO<sub>4</sub> – последовательности класса-кандидата JS1 (*Atribacterota*).

Создание термофильных условий (60°C), характерных для верхней границы зоны генерации углеводов, привело к прорастанию спор и доминированию хемогетеротрофных сульфат/тиосульфатредуцирующих бактерий семейств *Thermosediminibacteraceae*, *Desulfotomaculaceae*, *Thermoanaerobacteraceae*, *Moorellaceae*, *Symbiobacteriaceae*, *Caloramatoraceae*, обычно занимающих минорное положение в составе микробных сообществ осадочной толщи оз. Байкал или углеводородокисляющих анаэробных психрофильных накопительных культур. Полученные результаты коррелируют с данными эксперимента (Bell et al., 2022a), в котором показано, что количество ОТЕ эндоспорообразующих фирмикутов увеличилось в метагеноме после нагревания донных отложений, что указывает на прорастание популяций покоящихся эндоспор в отложениях, в результате чего их геномная ДНК может быть извлечена из вегетативных клеток при использовании стандартных протоколов. Инкубирование осадков при 80°C приводило к выявлению последовательностей, принадлежащих классам *Thermovenabulia*, *Symbiobacteriia*, *Thermoanaerobacteria* и *Clostridia* (Bell et al., 2022a). Согласно данным литературы, в геномах этих бактерий содержатся гены, ответственные за высокотемпературную деградацию осадочного органического углерода, включая сахараиды, аминокислоты и нуклеиновые кислоты (Bell et al., 2022a).

В настоящее время показано, что доминирующими генами в библиотеках метагеномного секвенирования, полученных из образцов нефтяных коллекторов, являются гены катаболизма углеводов, пептидов, липидов и фиксации углерода, но не гены анаэробной деградации нефтяных углеводородов (Gittins et al., 2023). Также показано отсутствие основного микробиома в нефтяных резервуарах, определяемого наличием общих видов во всех образцах.

Но вместе с тем показано, что библиотеки метагеномного секвенирования из 25 образцов нефтяных коллекторов имеют общие биогеохимические функции (Gittins et al., 2023). Гены, ответственные за ацетокластический и гидрогенотрофный метаногенез, смешанно-кислотную ферментацию, сульфид:хиноноксидоредуктаза (*sqr*), катализирующая окисление сульфида до элементарной серы, образование ацетата из пирувата наблюдается во всех метагеномах. Гены, необходимые для восстановления сульфата до сульфида (*sat*, *aprAB*, *dsrAB*) наблюдались в 24 из 25 метагеномов. Редуктазы, необходимые для восстановления нитрата до нитрита, диссимиляционного восстановления нитрата до аммиака (DNRA) или денитрификации до N<sub>2</sub> были обнаружены в 18, 15 и 8 метагеномах соответственно (Gittins et al., 2023). Во многих микробиомах обнаружены группы генов ответственные за метаболизм водорода, что свидетельствует о том, что процессы образования и потребления водорода широко распространены в биогеохимии нефтяных пластов (Gittins et al., 2023).

Гены активации углеводов *assA*, *bssA* и *nmsA* были обнаружены только в одной четверти нефтяных резервуаров, что указывает на наличие других механизмов анаэробной биодegradации углеводов или пока не установленных генов активации углеводов в бескислородных нефтяных резервуарах (Lack, Fuchs, 1994; Heider et al., 2016; Rabus et al., 2016a, б).

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, биодegradированным 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 нефтяного горба, высокий уровень зрелости *n*-алканов ( $CPI \leq 2$ ), снижение концентрации ПАУ и *n*-C<sub>35</sub>–*n*-C<sub>39</sub> с глубиной в образцах ГУ указывают на процессы биодegradации (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 углеводов в донных осадках способствуют развитию микробного сообщества, нацеленного на биодegradацию 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; Pogodaeva 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  $C_2H_6$  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, расположенных в южной и центральной котловине озера (Khlystov et al., 2022). Из 60 участков, в 21 выявлены газогидраты, содержащие микробный этан (Nachikubo et al., 2023). На эмпирической диаграмме, основанной на классификации Милкова и Этиопа (Milkov, Etiopa, 2018), газ из района Б. Зеленовская имеет  $\delta^{13}C-C_{1\dots} - 50\%$  и  $\delta^2H-C_{1\dots} - 308\%$  и находится за пределами термогенной зоны с соотношением  $C_1/(C_2+C_3)$  равным 274 и небольшим содержанием  $C_2$  и  $C_3$ , что указывает на влияние вторичного микробного газа, который образуется при анаэробной биodeградации более тяжелых углеводородов (Nachikubo et al., 2023). 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 (Nachikubo et al., 2023) за счет

добавления вторичного микробного газа к термогенному. Экспериментально доказано образование вторично-микробного газа при разложении углей Танхойской свиты олигоцен-плиоценового возраста, находящихся вдоль южного берега озера Байкал и погружающихся под его Южную котловину, в которой обнаружено несколько зон разгрузки углеводородных флюидов (Крылов и др., 2023).

Образование углеводородных газов в экспериментальных условиях установлено не только для осадков из районов нефтепроявлений (Pavlova et al., 2022; Павлова и др., 2024а, в). 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). Наибольшее содержание этого газа наблюдались в накопительных культурах с образцами осадков, отобранных над газовыми гидратами и из гидратвмещающих слоев донных отложений. Несмотря на значительные концентрации ацетат-иона в иловых водах исследуемого района, в накопительных культурах преобладал гидрогенотрофный метаногенез. Полученные результаты согласуются с гипотезой Кси С. с соавторами (Xie et al., 2013), о возможных предшественниках этана. Если бы таким предшественником в данном эксперименте являлась уксусная кислота ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), то образование этана более интенсивно происходило бы в средах, содержащих ацетат натрия. Но при культивировании микробных сообществ на средах с высокими концентрациями ацетата натрия и водорода отмечалось в основном образование метана. Согласно (Xie et al., 2013) при обогащении природных образцов донных осадков этиленом и этантиолом ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ ) происходит конверсия этилена до этана, причем данные процессы, по мнению авторов, могут осуществляться микроорганизмами, отличными от метаногенов. Образовавшийся этилен, в свою очередь уже при участии метаногенных микроорганизмов восстанавливается до этана (Xie et al., 2013). Накопление в значительных количествах этана в накопительных культурах метаногенов указывает на то, что и в природных местообитаниях присутствие в составе углеводородных газов гомологов метана может быть следствием микробных процессов.

### **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 также углеводородокисляющая активность микроорганизмов, осуществляющих биodeградацию компонентов нефти, 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.

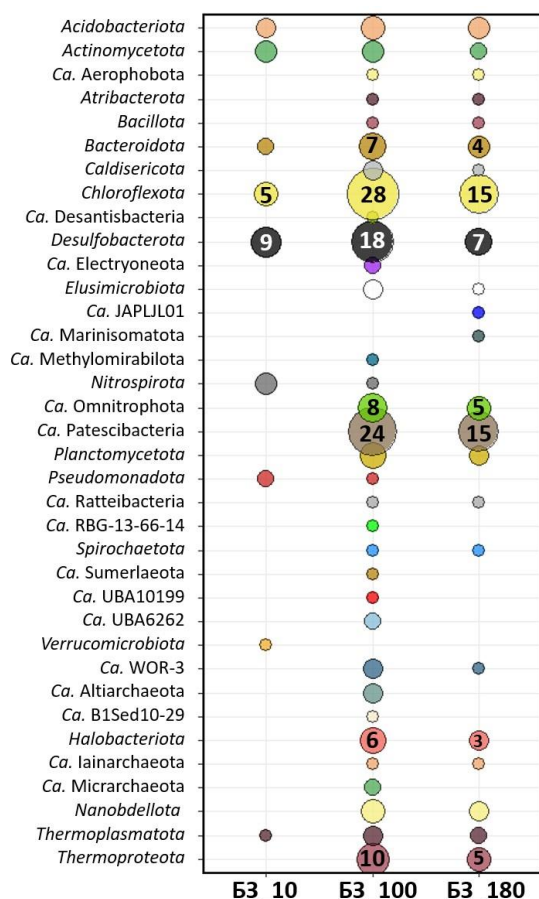


Анализ геномных данных, полученных из образца донного осадка, соответствующего глубине керна 10 см (БЗ\_10), позволил реконструировать 31 геном (30 геномов принадлежали бактериям и 1 – археям). По результатам классификации с использованием базы данных GTDB, последовательности отнесены к филуму *Desulfobacterota* (9 геномов), представленного классами *Syntrophia*, *Deferrimicrobia*, RBG-13-43-22, а также филумам *Chloroflexota* (5 геномов, классы *Anaerolineae*, *Dehalococcoidia*), *Actinomycetota* (4, *Acidimicrobiia*, *Thermoleophilia*), *Nitrospirota* (4, *Nitrospira*, *Thermodesulfovibrionia*), *Acidobacteriota* (3, *Aminicenantia*, UBA6911), *Bacteroidota* (2, *Bacteroidia*, *Ignavibacteria*), *Pseudomonadota* (2, семейства *Casimicrobiaceae*, *Methylophilaceae*) и *Verrucomicrobiota* (класс *Verrucomicrobiae*). В домене *Archaea*, последовательность 1 генома отнесена к филуму *Thermoplasmatota*, класс *Thermoplasmata*, семейство UBA10834 (рис. 63).

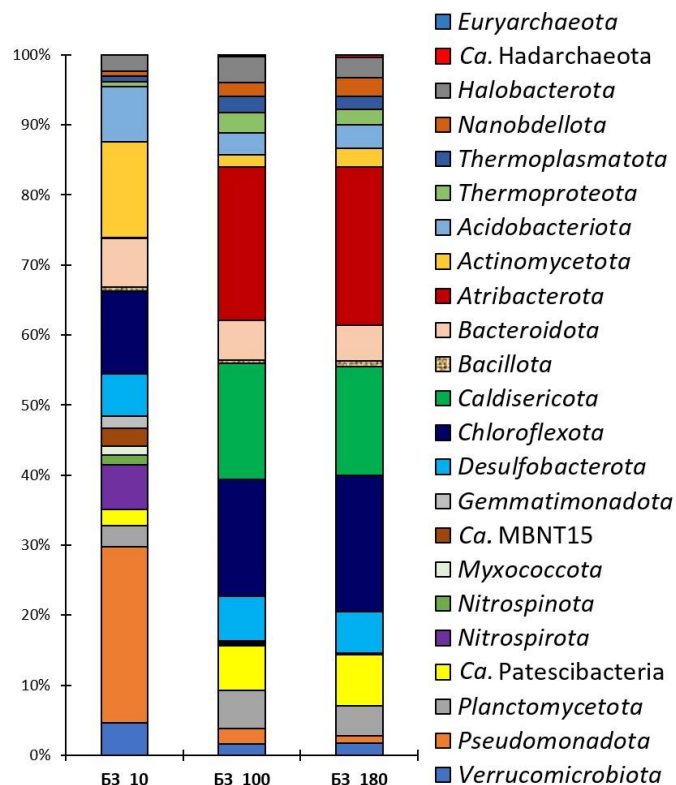
В образце осадка, соответствующего глубине керна 100 см (БЗ\_100) определены последовательности 156 геномов микроорганизмов. На уровне филума, 80% геномов принадлежали бактериям (125) и 20% (31) археям. Наибольшее количество собранных геномов относилось к филуму *Chloroflexota* (28), *Ca. Patescibacteria* *Ca. Patescibacteria* (24) и *Desulfobacterota* (16). Филум *Chloroflexota* представлен порядками *Anaerolineales* и *Dehalococcoidales*; *Ca. Patescibacteria* – классами *Microgenomatia* и *Paceibacteria*; *Desulfobacterota* – классами *Syntrophia*, *Deferrimicrobia*, *Syntrophorhabdia*, BSN033, SM23-61, UBA8473, WTBG01. Меньшее количество MAG отнесено к *Omnitrophota*, *Bacteroidota*, *Planctomycetota*, *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Caldisericota*, *Elusimicrobiota*, *Ca. Electryoneota* (класс AABM5-125-24), *Aerophobota*, *Atribacterota*, *Bacillota*, *Desantisbacteria*, *Methylomirabilota* и *Nitrospirota*.

В домене *Archaea*, наибольшее количество собранных геномов относилось к филуму *Thermoproteota* (10) и *Halobacterota* (6). Геномы, отнесенные к *Nanoarchaeota*, *Thermoplasmatota*, *Altiarchaeota*, *Iainarchaeota* и B1Sed10-29 имели меньшее значение по количеству MAG (1–5). В образце осадка, соответствующего глубине керна 180 см (БЗ\_180) определены последовательности 80 геномов микроорганизмов. На уровне филума, 82.5% MAGs принадлежали бактериям (66) и 17.5% (14) археям. Как и в образце 100 см, наибольшее количество собранных геномов относилось к филумам *Ca. Patescibacteria* (16), *Chloroflexota* (15), и *Desulfobacterota* (7). Филумы *Omnitrophota*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Planctomycetota*, *Aerophobota*, *Atribacterota*, *Bacillota*, *Caldisericota*, *Elusimicrobiota*, *Marinisomatota*, *Ratteibacteria*, *Spirochaetota* и WOR-3 представлены 1–5 MAGs. Архейная компонента представлена филумами *Thermoproteota* (5), *Halobacterota* (3), *Thermoplasmatota* (2), *Nanoarchaeota* (3) и *Iainarchaeota* (1).

Таксономическая классификация MAG выявила те же самые закономерности распределения основных бактериальных и архейных филумов по глубине исследуемого керна, которые были обнаружены с помощью профилирования 16S рРНК (рис. 64). В поверхностном осадке доминирующее положение занимали представители филумов *Halobacterota*, *Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Pseudomonadota*, *Nitrospirota*, *Verrucomicrobiota* и *Ca. MBNT15*, в глубинном – *Thermoproteota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Caldisericota* и *Ca. Patescibacteria*.



**Рисунок 63.** Количество аннотированных геномов на уровне филума из образцов донных осадков, соответствующих глубине керна 10, 100 и 180 см.

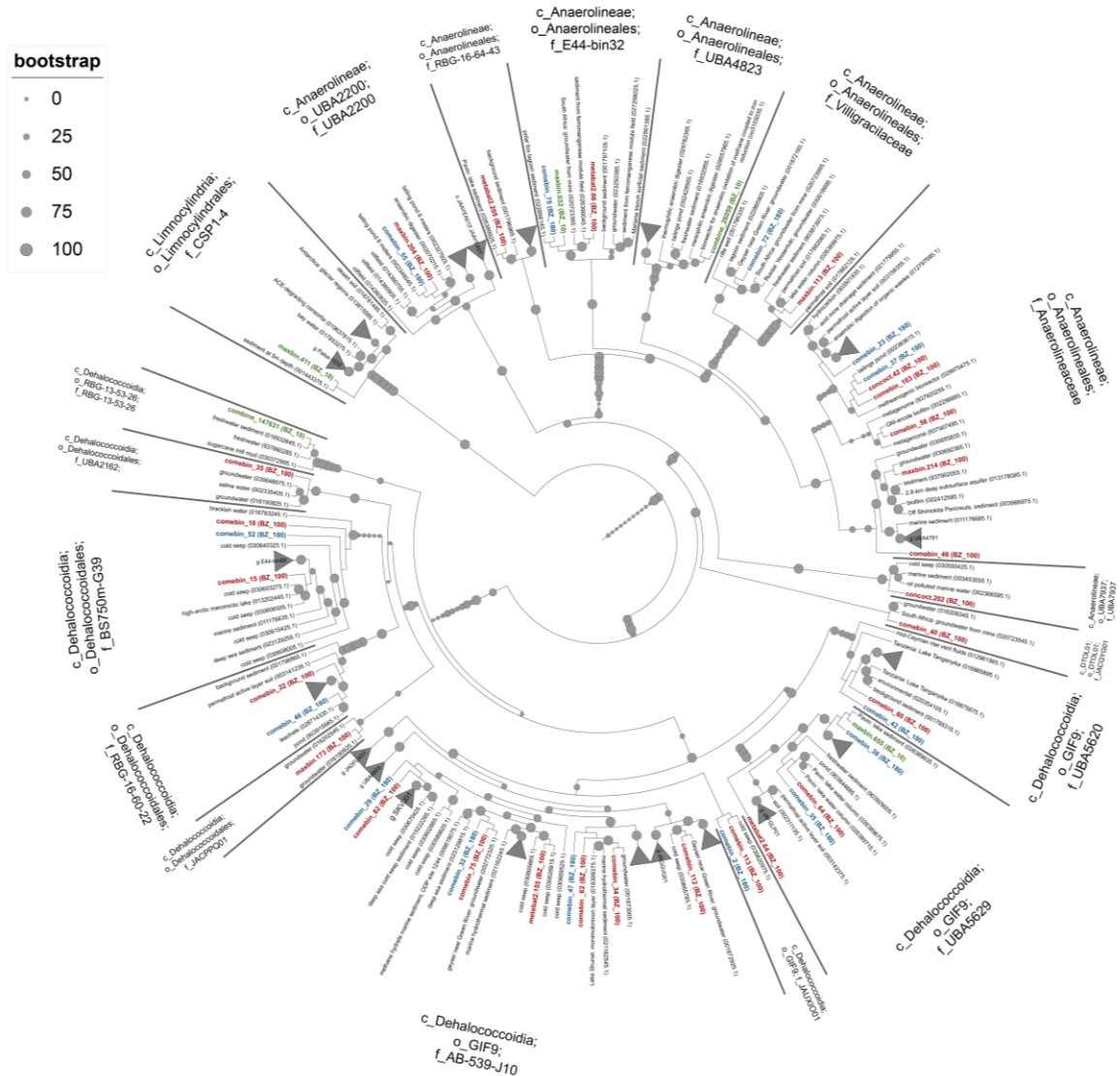


**Рисунок 64.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria* и *Archaea*, представленных на уровне филумов в библиотеках БЗ\_10, БЗ\_100 и БЗ\_180.

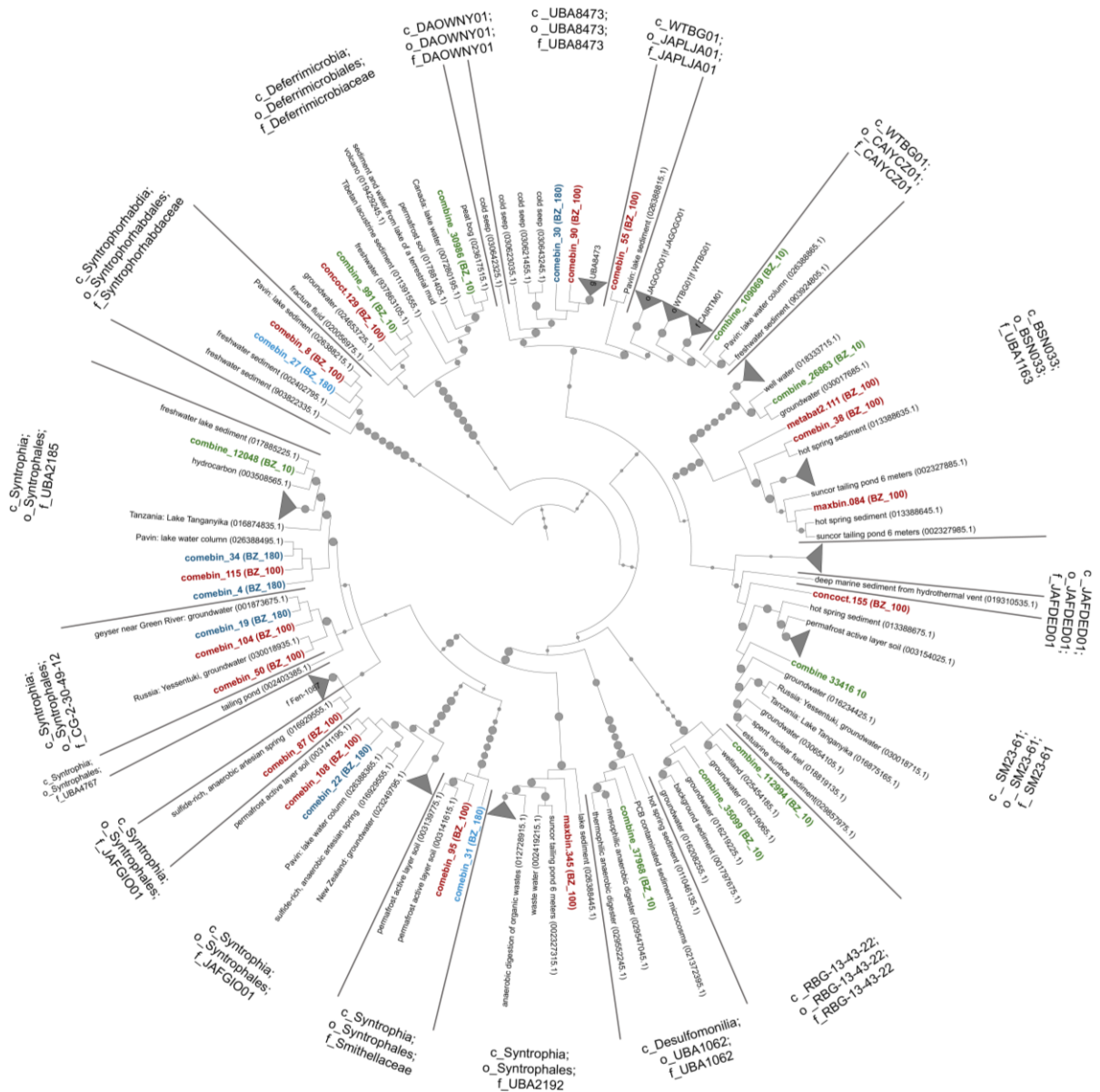
Реконструированные геномы из всех образцов представляли доминирующие таксоны, что согласуется с данными анализа фрагментов гена 16S рРНК. Аннотированные MAGs отражали метаболизм, характерный для осадков оз. Байкал, включая круговорот серы, азота и метана, разложение углеводов и фиксацию углерода (Zemskaya, 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. 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) (рис. 65), или *Desulfomonilia* (*Desulfobacterota*) – классу диссимиляционных сульфатредуцирующих прокариот с дыхательным, иногда ферментативным типом метаболизма, использующих метоксигруппы ароматических соединений (рис. 66).



**Рисунок 65.** Филогеномное дерево реконструированных геномов бактерий, отнесенных к филуму *Chloroflexota* из образцов БЗ\_10 (выделено зеленым), БЗ\_100 (выделено бордовым) и БЗ\_180 (выделено синим). Анализ проведен с помощью Interactive Tree Of Life (iTOL). Таксономия показана в соответствии с GTDB.



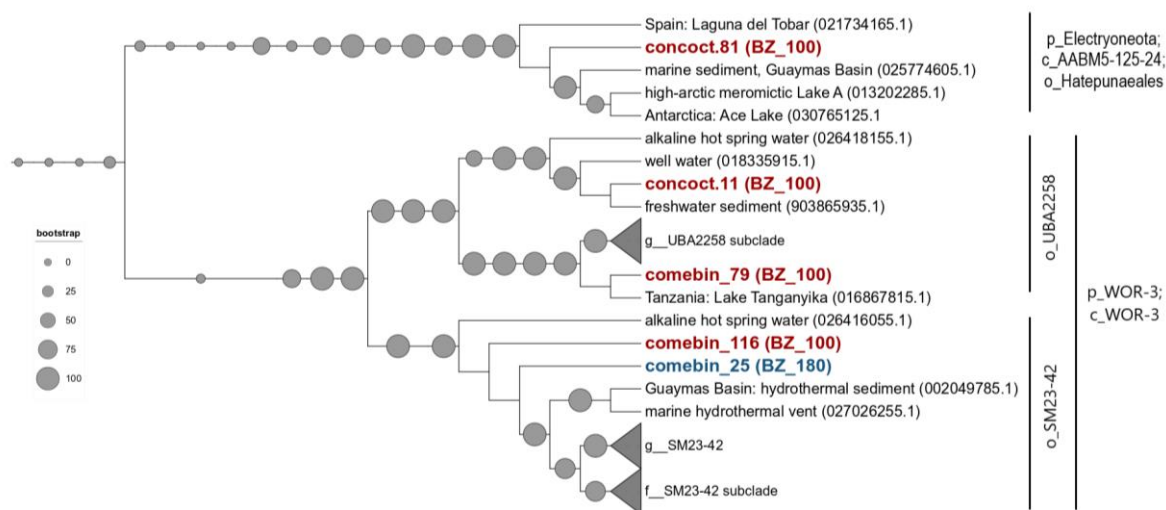
**Рисунок 66.** Филогенное дерево реконструированных геномов бактерий, отнесенных к филуму *Desulfobacterota* из образцов БЗ\_10 (выделено зеленым), БЗ\_100 (выделено бордовым) и БЗ\_180 (выделено синим). Анализ проведен с помощью Interactive Tree Of Life (iTOL). Таксономия показана в соответствии с GTDB.





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 (рис. 65–68). Реконструированные в настоящем исследовании MAGs, имеющие гомологов из осадков бассейна Гуаймас, были идентифицированы как представители *Ca. Pearchaeota*, *Ca. Woearchaeota* 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.

В микробиоме из осадка БЗ\_100 аннотирован геном *concoct.81*, идентифицированный как *Ca. Electryoneota*, класс AABM5-125-24. MAG *concoct.81* был гомологичен таковому из бассейна Гуаймас и образцов воды озера А (Арктика), одного из самых северных озер (Vigneron et al., 2023) (рис. 69).



**Рисунок 69.** Филогеномное древо реконструированных геномов бактерий, отнесенных к филумам-кандидатам *Electryoneota* и WOR-3 из образцов БЗ\_100 (выделено бордовым) и БЗ\_180 (выделено синим). Анализ проведен с помощью Interactive Tree Of Life (iTOL). Таксономия показана в соответствии с GTDB.

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). Кроме последовательностей, отнесенных к GIF9 (*Dehalococcoidia*), в микробиомах из ОТ и БЗ, выявлены представители порядков: *Methanomethylicales* (p\_Thermoproteota;

*c\_Methanomethylicia*), TCS64 (*p\_Thermoproteota*; *c\_Bathyarchaeia*), *Syntrophales* (*p\_Desulfobacterota*; *c\_Syntrophia*), SM23-61 (*p\_Desulfobacterota*; *c\_SM23-6*), UBA2258, SM23-42 (*p\_WOR-3*; *c\_WOR-3*) и UBA2199 (*p\_Acidobacteriota*; *c\_Aminicenantia*).

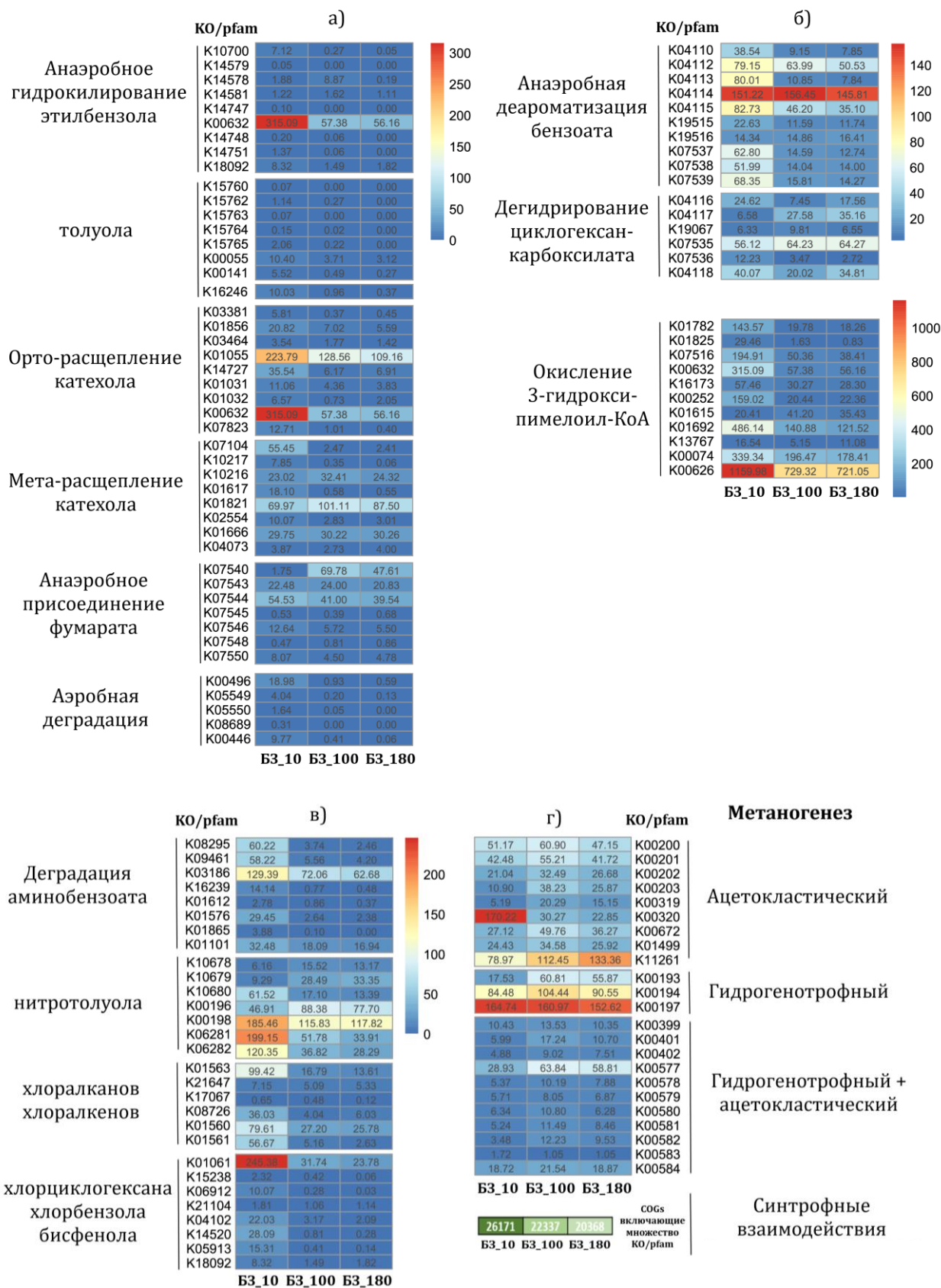
Необходимо отметить, что в озере Танганьика хранится более 23 Тг метана под оксиклином, в его отложениях – около 14000000 Тг углерода. Озеро является одним из трех пресноводных озер, в которых зарегистрированы естественные нефтепроявления (Simoneit et al., 2000). В то же время микробные сообщества в озере, которые во многом определяют продуктивность экосистемы озера, остаются в значительной степени неизученными (Tran et al., 2021).

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. 70а), гены, ответственные за метаболизм промежуточных ароматических продуктов (рис. 70б, в), гены метаногенеза и синтрофных взаимодействий (Sierra-Garcia et al., 2020). В метагеномах не обнаружены гены анаэробного карбоксилирования (*ppS*, K25936–K25938; *ppc*, K25932–K25935) 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.

Необходимо отметить, что гены аэробной дегградации углеводов и гены, кодирующие этилбензолдегидрогеназу, выявлены только в микробиомах в целом из всего образца, и не выявлены в реконструированных геномах.

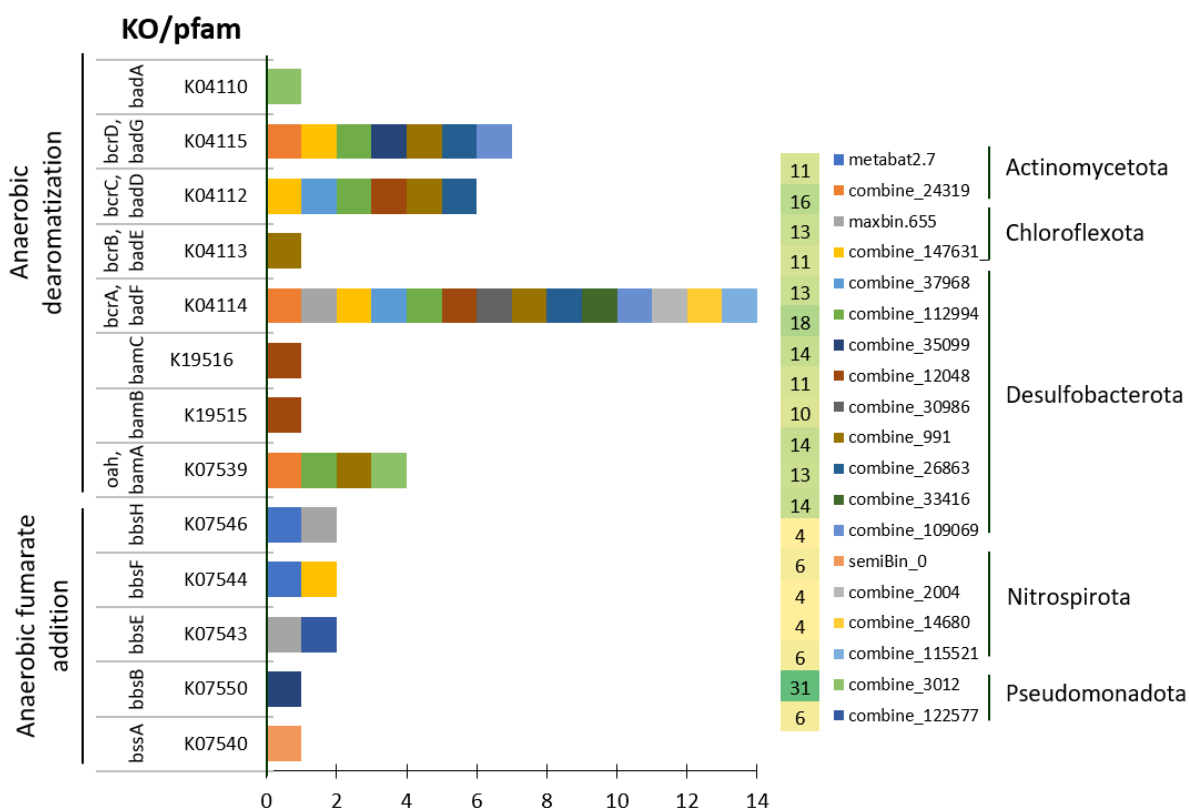




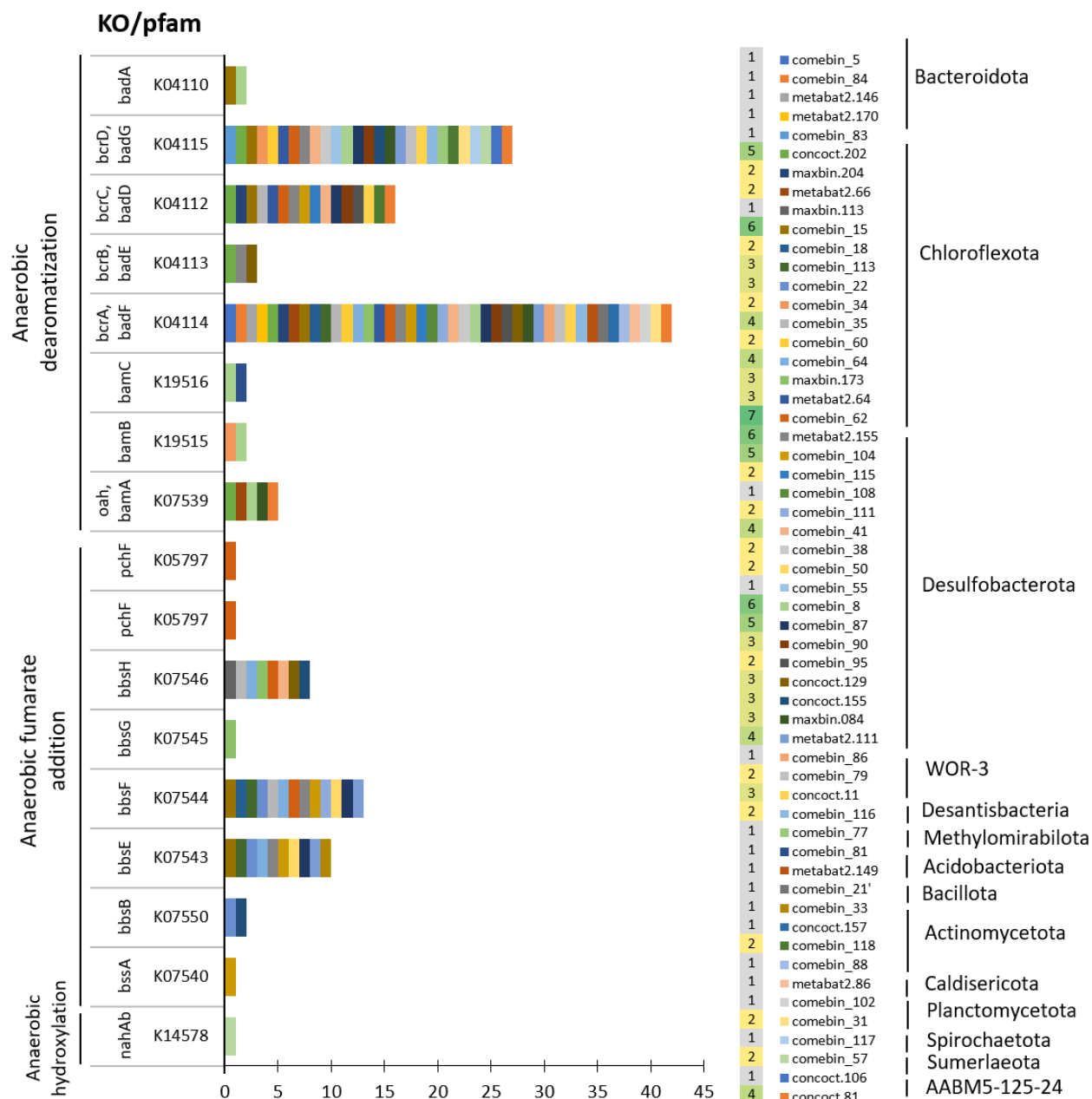
**Рисунок 70.** Тепловая карта (heat map) распределения нормализованной доли чтений, картируемых на функциональные гены (ТПМ, tpm transcript per million, имеющих идентификационный номер в базе данных KEGG (KO/pfam), отвечающих за: (а) активацию углеводов, (б, в) катализирующие метаболизм промежуточных ароматических продуктов, (г) гены метаногенеза и синтрофных взаимодействий (COGs – кластеры ортологичных генов) цитированы по Sierra-Garcia et al., 2020.

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 гетеротетрамерного 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). Наибольшее количество генов (KO/pfam), ответственных 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. 70г). В то время как гены, ответственные за осуществление ацетокластического и гидрогенотрофного метаногенеза (суммарно), с наибольшей частотой выявлены в образце, соответствующем глубине керна 100 см (рис. 70г).

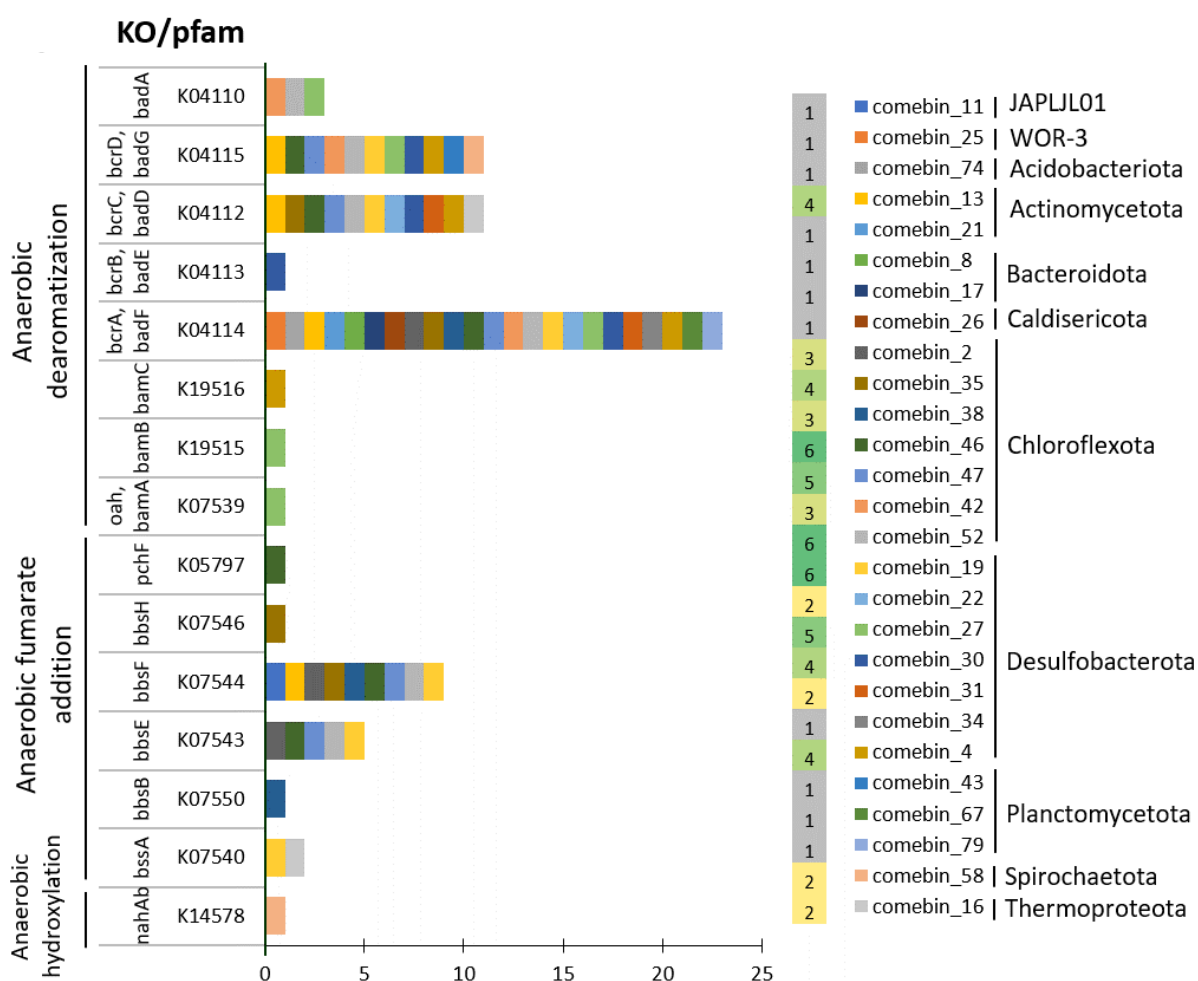
Гены анаэробного окисления промежуточных продуктов, наиболее часто обнаруживались в геномах, отнесенных к *Chloroflexota*, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota* и *Actinomycetota*, последовательности которых аннотированы во всех исследуемых образцах (рис. 71–73).



**Рисунок 71.** Количество идентификаторов KO/pfam, связанных с путями анаэробной активации углеводов, в аннотированных геномах из метагеномов образцов БЗ\_10. Цифрами 6 31 5 4 показано количество генов в каждом геноме в категориях, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY.



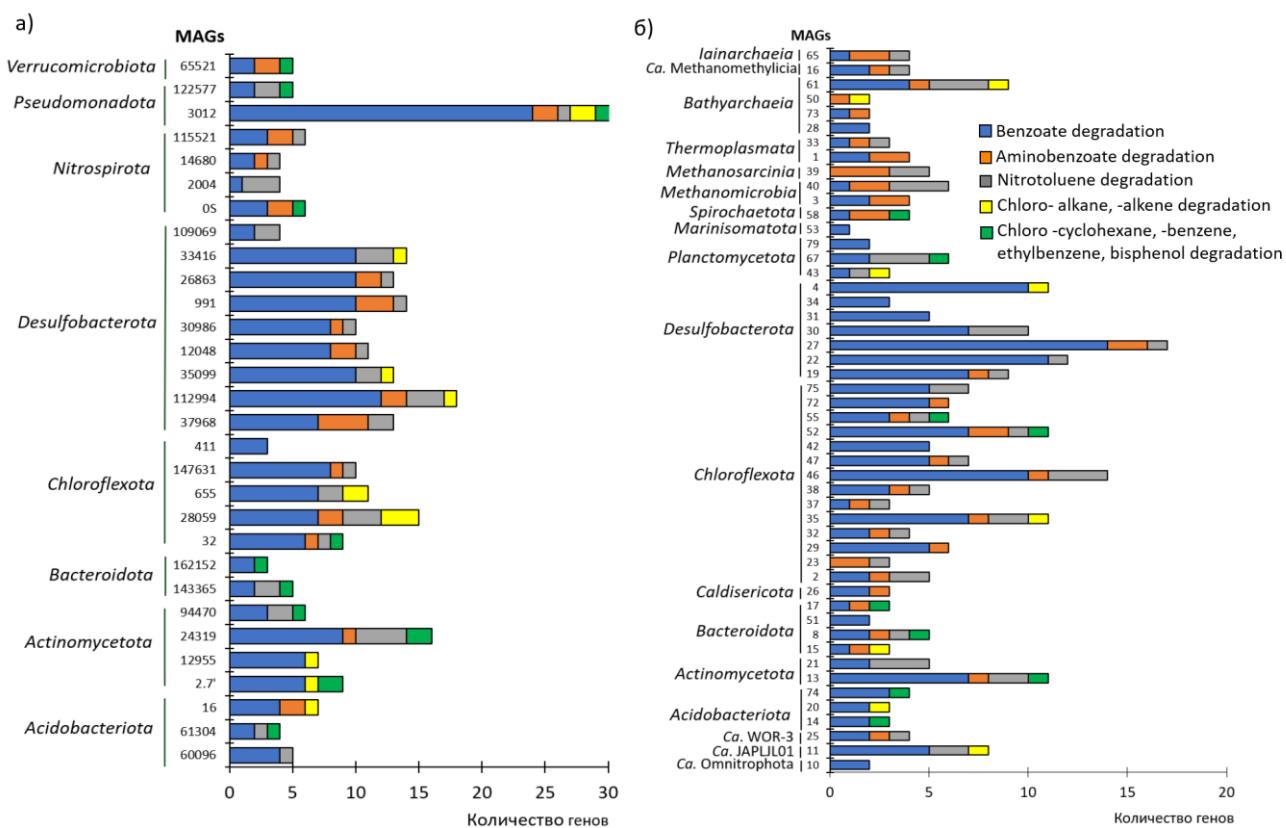
**Рисунок 72.** Количество идентификаторов KO/pfam, связанных с путями анаэробной активации углеводов, в аннотированных геномах из метагеномов образцов БЗ\_100. Цифрами 6 32 5 4 показано количество генов в каждом геноме в категориях, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY.



**Рисунок 73.** Количество идентификаторов KO/pfam, связанных с путями анаэробной активации углеводов, в аннотированных геномах из метагеномов образцов БЗ\_180 (б). Цифрами **6 31 5 4** показано количество генов в каждом геноме в категориях, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY.

Максимальное количество генов, кодирующих ферменты деградации бензоата, аминокислот, нитротолуола и других соединений выявлены в геноме combine3012, отнесенного к семейству *Casimicrobiaceae* (*Pseudomonadota*; *Gammaproteobacteria*; *Burkholderiales*), из образца БЗ\_10 (рис. 74а). Представители этого семейства являются обитателями, в том числе, активного ила, окисляют углеводы, ароматические соединения, короткоцепочечные жирные кислоты (Song et al., 2020). Геном combine3012 содержит ген бензоат-КоА-лигазы (EC:6.2.1.25) – фермента, инициирующего разложение бензоата микроорганизмами в аэробных и анаэробных условиях. А также почти полные пути анаэробного окисления бензоата через бензоил-КоА до ацетил-КоА и аэробного окисления бензоата с образованием сукцинил-КоА, за исключением бензоат-4-монооксигеназы (EC:1.14.14.92) и бензоил-КоА редуктазы субъединицы С (EC:1.3.7.8). Возможно, что гены EC:1.14.14.92, EC:1.3.7.8 не обнаружены в геноме combine3012 из-за полноты сборки, осуществленной на 84%.

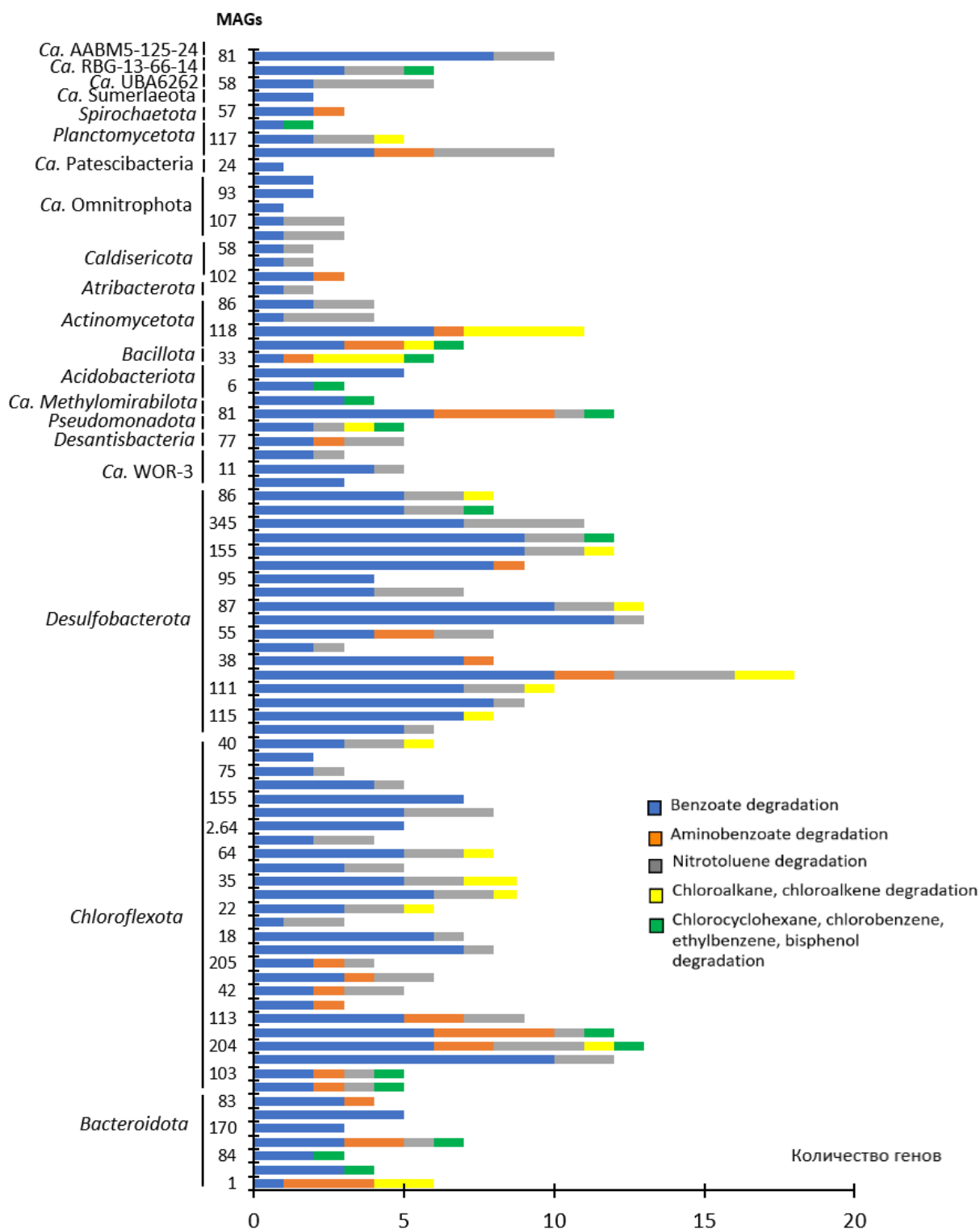
В метагеноме глубинных образцов наибольшее количество генов анаэробного окисления углеводов выявлено в MAGs, классифицированных как *Desulfobacterota* (*Dehalococcoidales*, *Anaerolineales*) и *Chloroflexota* (*Syntrophia*, *Deferrimicrobia*, *Syntrophorhabdia*) (рис. 74б, 75). Геномы, содержали от 5 до 12 генов, задействованных в деградации бензоата, и до 4-х генов в деградации нитротолуола. Также в геномах выявлены гены деградации фенола (4-гидроксибензоатдекарбоксилаза, EC:4.1.1.61), деградации бензоилфосфата (бензоилфосфатфосфогидролаза, EC:3.6.1.7) до бензоата, бензоат-КоА лигаза (EC:6.2.1.25) и не полный кластер генов окисления бензоата до ацетил-КоА. 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* (рис. 74б, 75).



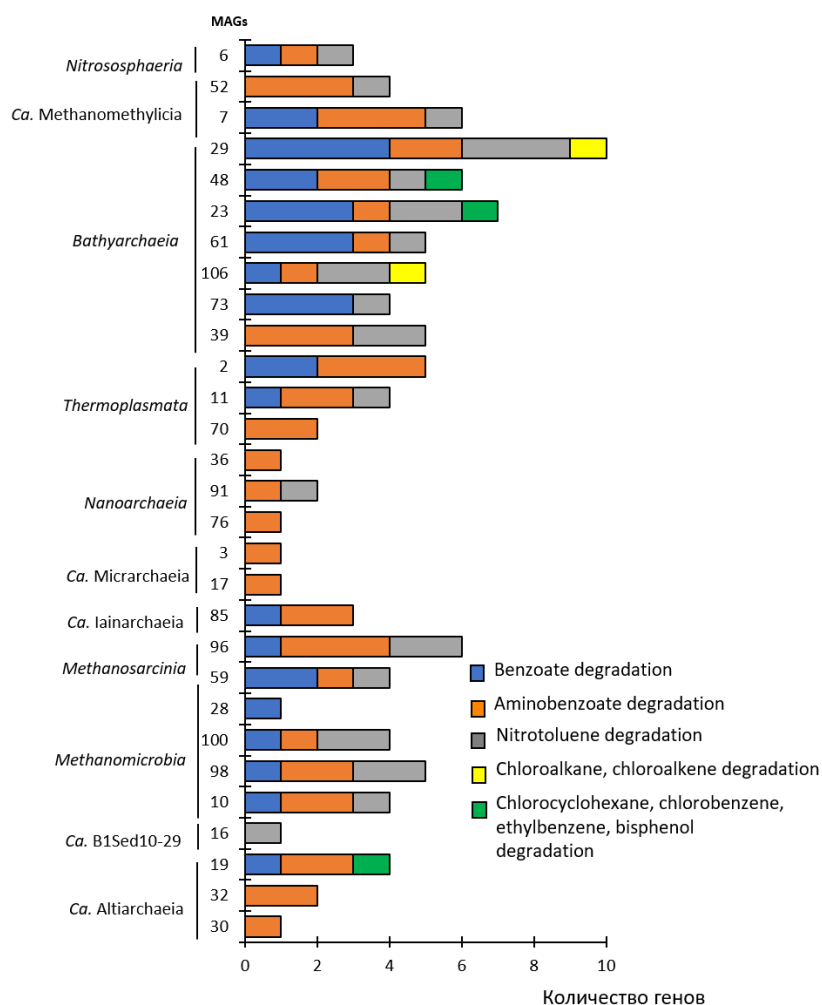
**Рисунок 74.** Количество генов в аннотированных геномах из метагеномов БЗ\_10 (а) и БЗ\_180 (б), в категориях, связанных с путями деградации промежуточных продуктов окисления углеводов, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY.

В геномах, принадлежащих домену *Archaea*, аннотированных из метагеномов БЗ\_100 и БЗ\_180, наибольшее количество генов, связанных с путями деградации промежуточных продуктов окисления углеводов, выявлены в реконструированных геномах *Bathyarchaeia* (рис. 74б, 76). В частности, гены, кодирующие субъединицы А, D бензоил-КоА-редуктазы I класса (*bcr*), ген N-этилмалеимид-редуктазы (EC:1.-.-.-), ответственной за превращение

тринитротолуола в 4-гидроксиламино-2,6-динитротолуол, ген деградации фенола (4-гидроксибензоатдекарбоксилаза, ЕС:4.1.1.61), ген превращения бензамида в бензоат (амидаза, ЕС:3.5.1.4) и восстановления трихлорэтена до дихлорэтена (тетрахлорэтиленредуктаза, ЕС:1.21.99.5). Эти же гены выявлены в геномах *Methanomethylales* (*Thermoproteota*), UBA10834 (*Thermoplasmatota*), *Methanotrichales*, *Methanomicrobiales* (*Halobacterota*).



**Рисунок 75.** Количество генов в аннотированных геномах бактерий из метагенома BZ\_100, в категориях, связанных с путями деградации промежуточных продуктов окисления углеводов, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY.



**Рисунок 76.** Количество генов в аннотированных геномах архей из метагенома БЗ\_100, в категориях, связанных с путями деградации промежуточных продуктов окисления углеводов, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY.

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.

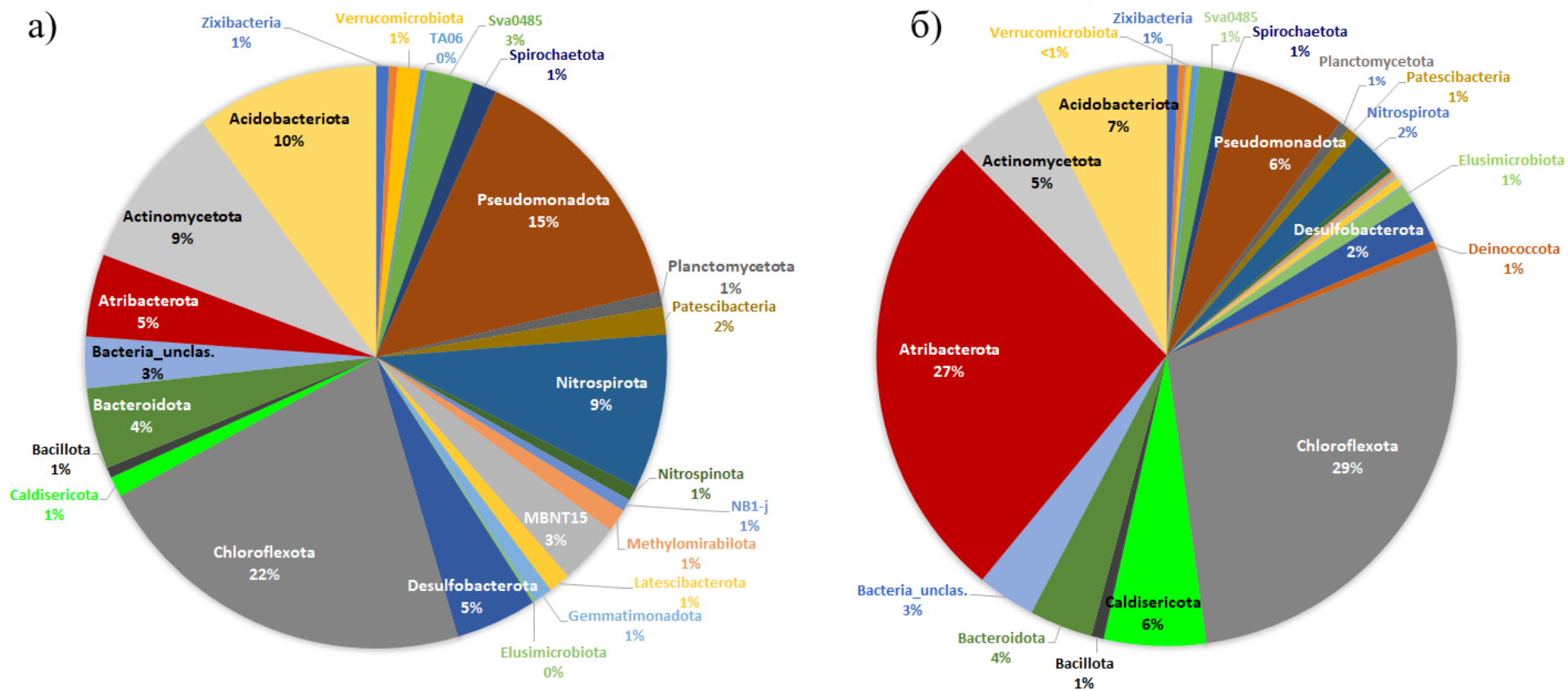
## ГЛАВА 6. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОСАДОЧНОЙ ТОЛЩИ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ

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 углеводородов, 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 углеводородов 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 углеводородов по глубине осадочной толщи.

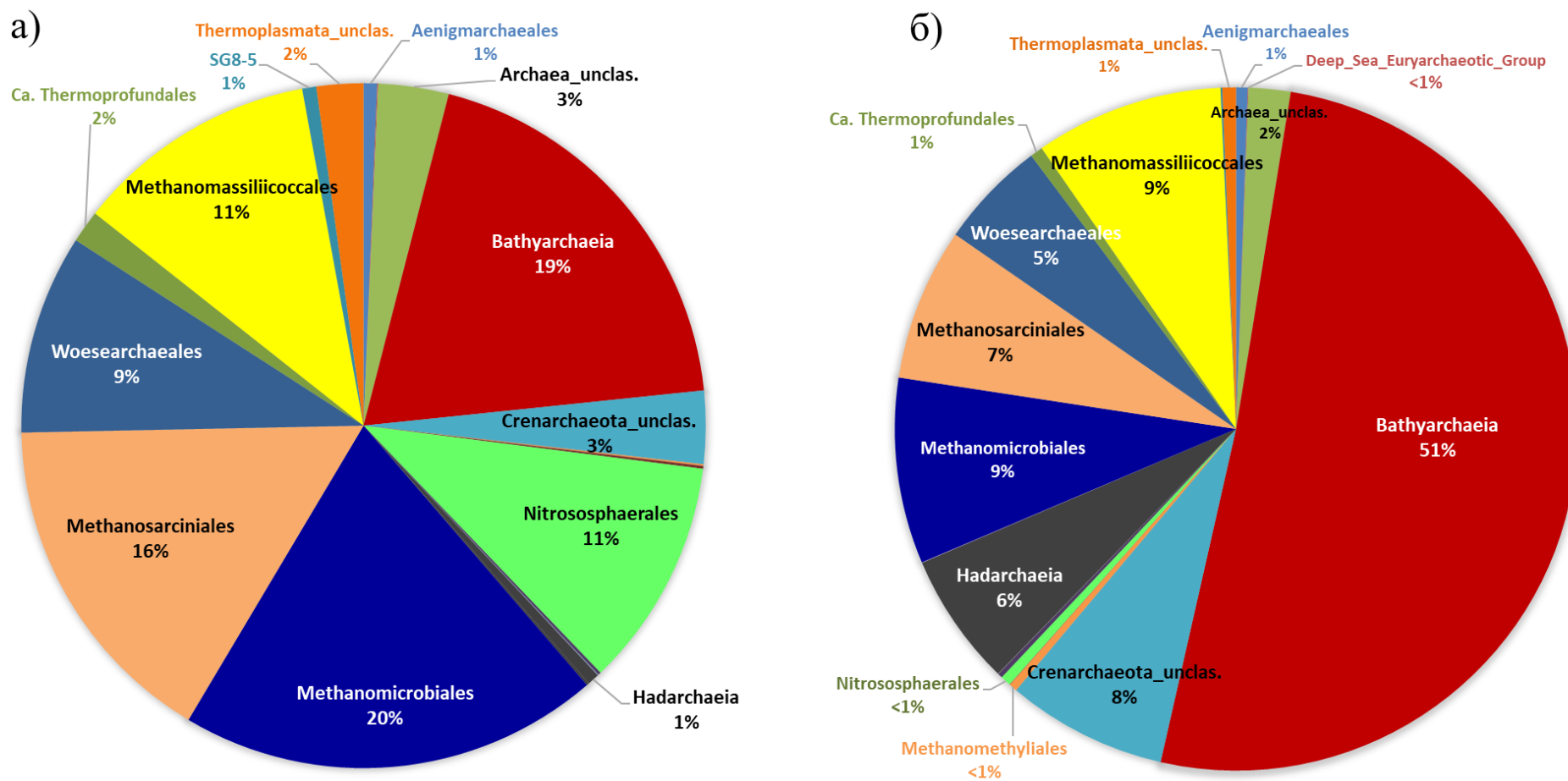
Основное различие в таксономическом составе микробных сообществ наблюдалось между подповерхностными и глубинными осадками (рис. 77, 78). Микробные сообщества подповерхностных осадков характеризуются бóльшим бактериальным разнообразием, чем глубинных. В них преобладали типичные для пресноводных озер органотрофные 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 *Caldisericota* (до 12%) и *Atribacterota* (до 42%) (рис. 77).

Структура архейной компоненты сообществ также варьировала между подповерхностными и глубинными слоями осадочной толщи (рис. 78). 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.





**Рисунок 77.** Доля последовательностей бактерий, отнесенных к различным таксонам на уровне филума, в процентах от всех последовательностей фрагментов гена 16S рНК *Bacteria* в подповерхностных (а) и глубинных (б) осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводов (нефте-метановые сипы, метановые сипы, грязевые вулканы).



**Рисунок 78.** Доля последовательностей архей, отнесенных к различным таксонам на уровне порядка, в процентах от всех последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Archaea* в подповерхностных (а) и глубоководных (б) осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводородов (нефте-метановые сипы, метановые сипы, грязевые вулканы).

В поверхностных илах *Thermoproteota* в бóльшей степени представлены аэробными *Nitrososphaerales* (до 11% суммарно в осадках районов разгрузки углеводородов), 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 *Methanomethyliales* (*Methanomethylicales*), 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).

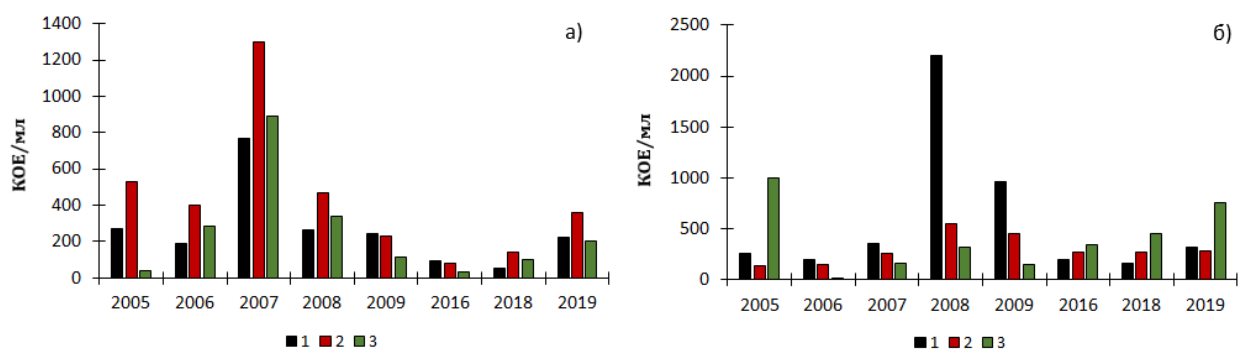
Микробное сообщество глубинных донных осадков в бóльшей части представлено последовательностями микроорганизмов, выявляемых в объектах, географически весьма отдаленных от оз. Байкал. В Мировом океане обнаружение одних и тех же филотипов бактерий в отдаленных друг от друга районах объясняется их распространением 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 ОЗ. БАЙКАЛ В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

### Характеристика микробных сообществ района нефтепроявления Горевой Утес.

Открытие в 2005 г. нового района естественного выхода углеводородов у м. Горевой Утес позволило в режиме онлайн наблюдать за качественными и количественными изменениями в составе нефти, структуре микробных сообществ и их адаптационными возможностями.

Первые исследования численности микроорганизмов в районе нефтепроявления у м. Горевой Утес, проведенные в июне 2005 г., показали неоднородность в их распределении. В поверхностных пробах, содержащих нефтяную пленку, культивируемое микробное сообщество было представлено микроорганизмами, окисляющими нефть (до  $270 \pm 32$  КОЕ/мл) и *n*-алканы (до  $350 \pm 29$  КОЕ/мл) (рис. 79), в то время как численность органотрофов не превышала  $40 \pm 5$  КОЕ/мл. В пробах, визуальнo не содержащих нефть, количество органотрофов и УВОМ не превышало  $70 \pm 8 - 150 \pm 12$  КОЕ/мл соответственно. В целом, УВОМ доминировали не только в поверхностных пробах, но и в водной толще, за исключением придонного слоя воды, где отмечен максимум органотрофов – до  $1000 \pm 93$  КОЕ/мл (Павлова и др., 2012).



**Рисунок 79.** Динамика численности микроорганизмов, окисляющих: 1 – нефть, 2 – *n*-алканы, 3 – легкодоступное органическое вещество в поверхностном (а) и придонном (б) слоях воды в районе нефтепроявления Горевой Утес.

В 2006 г. максимум микроорганизмов, окисляющих нефть (до  $190 \pm 16$  КОЕ/мл) и *n*-алканы (до  $400 \pm 36$  КОЕ/мл) выявлен в пробах, содержащих наибольшее количество *n*-алканов (8.3 мкг/л). В водной толще углеводородоокисляющие микроорганизмы доминировали на глубине 50 и 860 м, о чем свидетельствует соотношение их численности к численности органотрофов. Так, в поверхностных пробах соотношение УВОМ/органотрофы составляло 0.4, на глубине 50 м – 3.6, в придонных слоях – до 24. На станциях, удаленных от выхода нефти снижалась не только концентрация *n*-алканов до 0.8 мкг/л, но и численность УВОМ, которая не превышала 40 КОЕ/мл, с сохранением закономерности распределения – в поверхностных

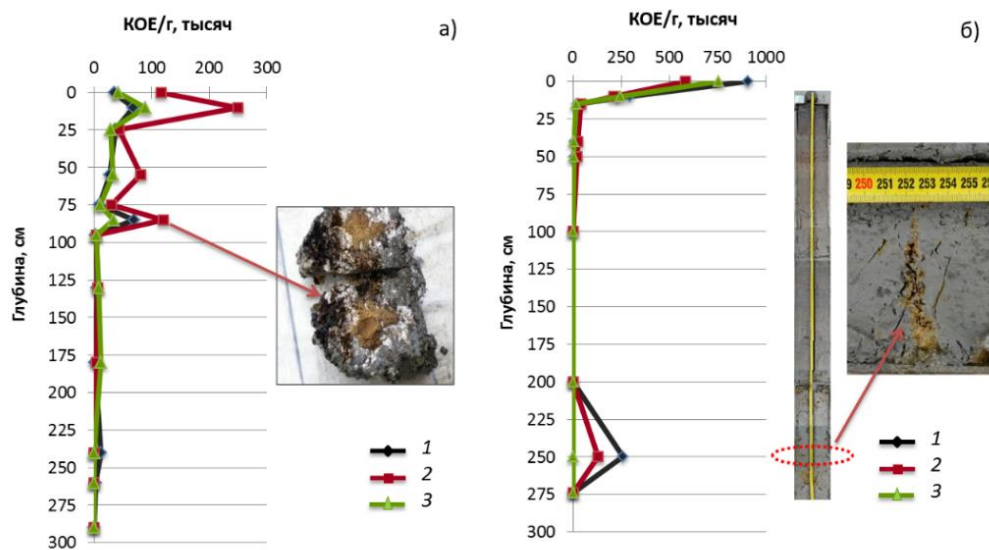
слоях воды соотношение УВОМ/органоотрофы составляло 0.12, на глубине 50 м – 1.2, в придонных слоях – 1.6.

Максимальное количество УВОМ в исследуемом районе отмечено в 2007 г. в поверхностных слоях воды. Наиболее многочисленными оказались микроорганизмы, окисляющие *n*-алканы ( $1300 \pm 110$  КОЕ/мл), в сравнении с окисляющими нефть ( $770 \pm 92$  КОЕ/мл). В то время как в пробах воды, отобранных на расстоянии около 800 м, культивируемое микробное сообщество в сопоставимых значениях представлено как углеводородокисляющими микроорганизмами ( $280 \pm 23$ – $410 \pm 39$  КОЕ/мл), так и органоотрофными ( $480 \pm 35$  КОЕ/мл) (Павлова и др., 2012). В 2008–2009 гг. в водной толще района м. Горевой Утес наблюдалось снижение численности УВОМ до значений, выявленных в 2005–2006 гг. Число данных бактерий не превышало  $265 \pm 26$  КОЕ/мл для бактерий, окисляющих нефть и  $470 \pm 52$  КОЕ/мл, для микроорганизмов, окисляющих *n*-алканы. Тем не менее сохранялась закономерность, отмеченная в предыдущие годы: в микробном сообществе этого района доминировали углеводородокисляющие микроорганизмы. В придонных пробах воды, отобранных в 2008 г., непосредственно над зоной выхода нефти с помощью батометров, закрепленных на ГОА «МИР», численность бактерий, окисляющих нефть, составляла до  $2200 \pm 175$  КОЕ/мл, *n*-алканы – до  $550 \pm 53$  КОЕ/мл. На станциях, удаленных от выходов нефти (около 15 км от м. Горевой Утес), численность углеводородокисляющих микроорганизмов была минимальной за весь период исследования и не превышала  $100 \pm 11$  КОЕ/мл. Данные значения сопоставимы со значениями, отмеченными для фоновых глубоководных районов оз. Байкал, находящихся за пределами участков нефтепроявлений. В настоящее время, значения численности УВОМ сопоставимы со значениями, зафиксированными в 2017–2019 гг.

В донных осадках, которые были представлены газонасыщенными глинистыми, реже песчано-алеврито-пелитовыми илами, пропитанными нефтью, в 2005 г. в окисленном слое доминировали микроорганизмы, окисляющие нефть и *n*-алканы от  $24 \pm 3$  тыс. КОЕ/г до  $44 \pm 5$  тыс. КОЕ/г соответственно, численность которых превышала количество органоотрофов ( $11 \pm 2$  тыс. КОЕ/г) в четыре раза. В восстановленных слоях осадка окисляющие нефть микроорганизмы ( $7 \pm 0.4$  тыс. КОЕ/г) преобладали не только над органоотрофами ( $200 \pm 18$  КОЕ/г), но и над микроорганизмами, окисляющими *n*-алканы ( $5 \pm 0.7$  тыс. КОЕ/г).

В 2006 г. донные осадки у м. Горевой Утес были отобраны на шести станциях. В этот период в поверхностных слоях осадка выявлено доминирование органоотрофных бактерий – от  $15 \pm 1.5$  до  $70 \pm 6$  тыс. КОЕ/г., в то время как численность микроорганизмов окисляющих нефть составляла от  $0.5 \pm 0.06$  тыс. КОЕ /г до  $8 \pm 0.78$  тыс. КОЕ/г, окисляющих *n*-алканы от  $0.3 \pm 0.02$  тыс. КОЕ/г до  $10 \pm 0.79$  тыс. КОЕ/г. В 2007 г. увеличение численности УВОМ отмечено не только в водной толще, но и в донных осадках. В некоторых исследованных кернах были

обнаружены гидраты метана, покрытые нефтью. В поверхностных слоях кернов количество микроорганизмов, окисляющих *n*-алканы варьировало от  $117 \pm 10$  до  $250 \pm 27$  тыс. КОЕ/г (рис. 80а).



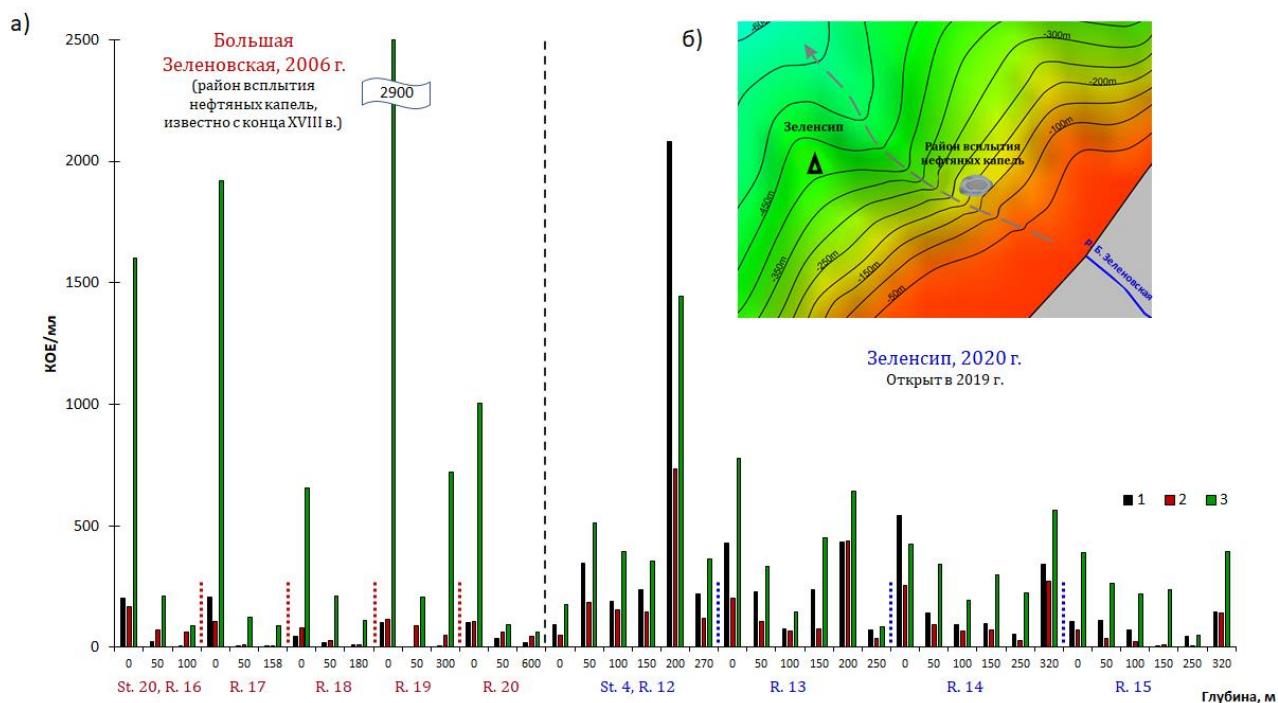
**Рисунок 80.** Распределение микроорганизмов, окисляющих нефть (1), *n*-алканы (2), легкодоступное органическое вещество (3) в донных осадках в 2007 (а) и 2016 (б) гг.

В слоях осадка, вмещающих газовые гидраты (85 см), численность микроорганизмов, окисляющих нефть и *n*-алканы превышала количество органотрофов в 2–3.5 раза соответственно. На глубине керна от 200 см, микроорганизмы, окисляющие нефть, преобладали не только над органотрофами, но и над бактериями, окисляющими нормальные углеводороды. Так, в слое 240 см, численность нефтеокисляющих микроорганизмов составляла  $13 \pm 1$  тыс. КОЕ/г, а органотрофы и другие бактерии, окисляющие *n*-алканы не обнаружены. В 2008–2009 гг. численность УВОМ в донных осадках варьировала от  $1.2 \pm 0.08$  до  $8 \pm 0.9$  тыс. КОЕ/г. Максимум микроорганизмов, окисляющих *n*-алканы и нефть, выявлен в пробах битумных построек –  $156 \pm 18$ – $170 \pm 13$  тыс. КОЕ/г соответственно.

В донных осадках, отобранных в 2016 г., которые были представлены газонасыщенными глинистыми алеврито-пелитовыми илами, пропитанными нефтью, в окисленном слое доминировали микроорганизмы, окисляющие нефть ( $900 \pm 90$  тыс. КОЕ/г), численность которых в 25 раз превышала значения, зафиксированные в 2007 г. В донных осадках 2007 г. по всей глубине керна доминировали микроорганизмы, окисляющие *n*-алканы, в то время как в осадках, отобранных в 2016 г. микроорганизмы, окисляющие нефть (рис. 80б). Второй максимум численности УВОМ выявлен на глубине 250 см. Слой осадка характеризовался трещиной дегазации и был насыщен нефтью. В целом, численность как УВОМ, так и микроорганизмов, окисляющих легкодоступное органическое вещество в разы, превышала таковую, выявленную в предыдущие годы исследования.

В целом, с момента открытия района нефтепроявления у м. Горевой Утес в 2005 г., в динамике развития нефтепроявления отмечены следующие особенности: снижение суммарного содержания нормальных углеводородов и полициклических ароматических углеводородов в нефтяных сликах и донных осадках; частичная деградация нефти, поступающей на водную поверхность; рост и последующее уменьшение численности микроорганизмов в воде и донных отложениях при сохранении структуры культивируемого микробного сообщества. За период с 2006 по 2016 г. отмечен низкий уровень суммарного содержания и узкий диапазон обнаруженных концентраций *n*-алканов и полициклических ароматических углеводородов в водной толще, свидетельствующих о сохранении чистоты вод озера в районе нефтепроявления (Павлова и др., 2020; Gorshkov, Pavlova et al., 2020a, б).

**Характеристика микробных сообществ района нефтепроявления, расположенного напротив устья р. Б. Зеленовская.** Наибольшее количество микроорганизмов обнаружено в пробах воды, отобранных с водной поверхности, покрытой нефтяной пленкой и в донных осадках из тех же районов. В поверхностном слое воды, на станции, которая находится непосредственно вблизи от выхода нефти, доминировали микроорганизмы, использующие в качестве субстрата нефть ( $2600 \pm 250$  КОЕ/мл) и *n*-алканы ( $1200 \pm 110$  КОЕ/мл –  $1800 \pm 200$  КОЕ/мл), высоко содержание олиготрофных бактерий, численность которых составляла  $1450 \pm 140$  КОЕ/мл (рис. 81a).



**Рисунок 81.** Распределение микроорганизмов, окисляющих нефть (1), *n*-алканы (2), легкодоступное органическое вещество (3) в донных осадках в районе устья р. Б. Зеленовская в 2006 (а) и 2016 (б) гг.



На станциях, удаленных от выхода нефти, численность микроорганизмов, окисляющих легкодоступное органическое вещество, варьировало от  $180 \pm 16$  КОЕ/мл до  $740 \pm 200$  КОЕ/мл. В придонных пробах воды было обнаружено меньшее количество бактерий, чем в поверхностных. Здесь преобладали гетеротрофные микроорганизмы, развивающиеся при различных температурных условиях, их численность превышала таковую для олиготрофных бактерий. Присутствие последних отмечено лишь на отдельных станциях. Количество УВОМ составляло не более  $200 \pm 20$  КОЕ/мл (Павлова и др., 2008а, б).

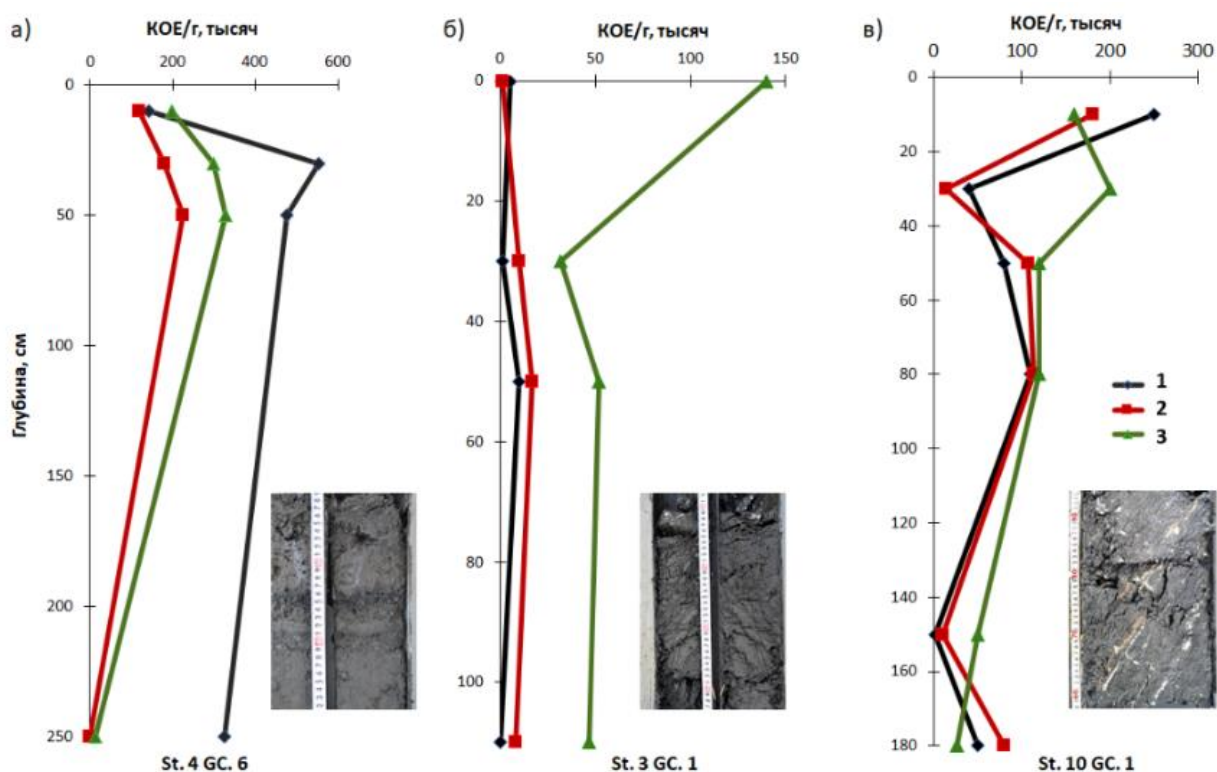
Такая же картина распределения углеводородокисляющих и органотрофных бактерий наблюдалась в районе нефте-метанового сипа Зеленсип в 2020 году, расположенного на глубине 420 м. Численность органотрофных бактерий составляла  $780 \pm 65$  –  $900 \pm 93$  КОЕ/мл в поверхностных слоях воды и до  $700 \pm 68$  КОЕ/мл – в придонных. Углеводородокисляющие микроорганизмы были распределены не равномерно, как по глубине водной толщи, так и по исследуемой площади. Наибольшая численность нефтеокисляющих бактерий (до  $2000 \pm 200$  КОЕ/мл) выявлена на глубине 200 м, на станции, близкорасположенной к зоне выхода нефтяных slicks на поверхность водной толщи (рис. 81б). В целом, численность микроорганизмов, окисляющих нефть варьировала от  $4 \pm 1$  до  $600 \pm 60$  КОЕ/мл, окисляющих *n*-алканы – от  $8 \pm 1$  до  $450 \pm 4$  КОЕ/мл.

В донных осадках нефте-метанового сипа Зеленсип в 2020–2021 гг. численность углеводородокисляющих микроорганизмов была сопоставима с численность бактерий в донных осадках ГУ, отобранных в 2016 г. Наибольшее количество микроорганизмов, окисляющих нефть ( $480 \pm 40$ – $560 \pm 50$  тыс. КОЕ/г) выявлено на глубине 30–50 см в керне St. 4 GC. 6 (рис. 82а).

Керн, отобранный непосредственно в нефте-метановом сипе, представлен восстановленными глинами, с песчаными прослоями со следами нефти на глубине 50 см. Численность бактерий, окисляющих *n*-алканы ( $230 \pm 20$  тыс. КОЕ/г) была меньше нефтеокисляющих и сопоставима с численностью органотрофных бактерий ( $330 \pm 30$  тыс. КОЕ/г). Максимум алкандеградирующих бактерий выявлен на глубине керна 50 см, слабо насыщенного нефтью. С глубиной керна количество алкандеградирующих и органотрофных бактерий снижается почти до нуля, в отличие от микроорганизмов, окисляющих нефть ( $330 \pm 30$  тыс. КОЕ/г) (рис. 82б).

В донных осадках из керна St. 3 GC. 1, отобранного за пределами нефте-метанового сипа и представленного восстановленными глинами, насыщенного газовыми гидратами без следов нефти, культивируемое анаэробное микробное сообщество представлено органотрофными бактериями, максимальная численность которых ( $140 \pm 12$  тыс. КОЕ/г) выявлена в

поверхностном слое осадка (рис. 82б). Численность углеводородокисляющих микроорганизмов варьировала от  $1 \pm 0.1$  тыс. до  $17 \pm 6$  тыс. КОЕ/г.



**Рисунок 82.** Распределение микроорганизмов, окисляющих нефть (1), *n*-алканы (2), легкодоступное органическое вещество (3) в донных осадках в районе нефте-метанового сипа Зеленсип в 2020 (а, б) и 2021 (в) гг.

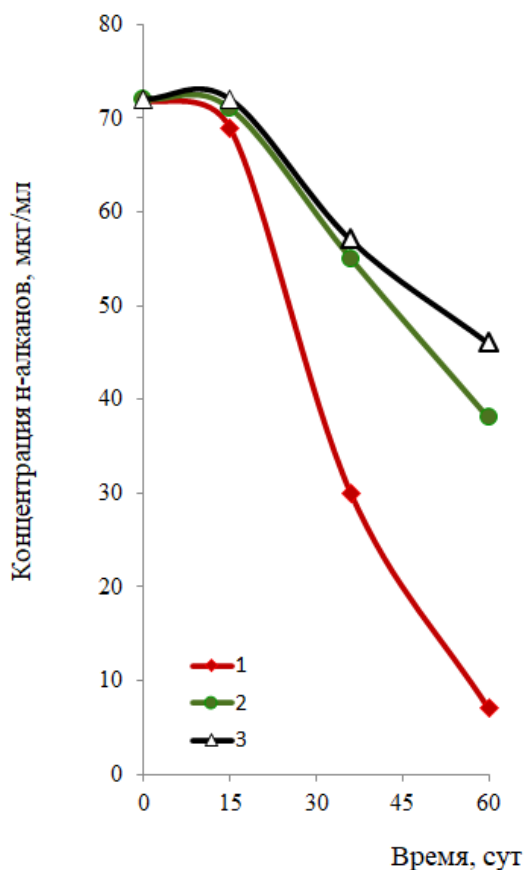
В донных осадках керна St. 10 GC. 1, отобранного в 2021 году, выявлено три пика численности углеводородокисляющих микроорганизмов (рис. 82в). Первый наблюдался в поверхностном слое осадка – до  $250 \pm 24$  тыс. КОЕ/г, второй – на глубине 80 см (до  $130 \pm 11$  тыс. КОЕ/г), где были локализованы газовые гидраты со следами нефти, третий – на глубине 180 см (до  $180 \pm 16$  тыс. КОЕ/г), где осадки также содержали следы нефти.

**Эксперимент по деградации *n*-алканов нефти с природным микробным сообществом**, отобранным в зоне нефтяного пятна, показал, что за первые 15 суток эксперимента, уменьшение концентрации *n*-алканов не превышало 2–3 мкг/мл (рис. 83; Павлова и др., 2012). В дальнейшем нефтеокисляющая способность микробного сообщества возрастает, и через 36–60 сут конверсия *n*-алканов достигала 84–90%, причем количество внесенных *n*-алканов нефти в начале эксперимента не влияло на способность микробного сообщества деградировать нефть.

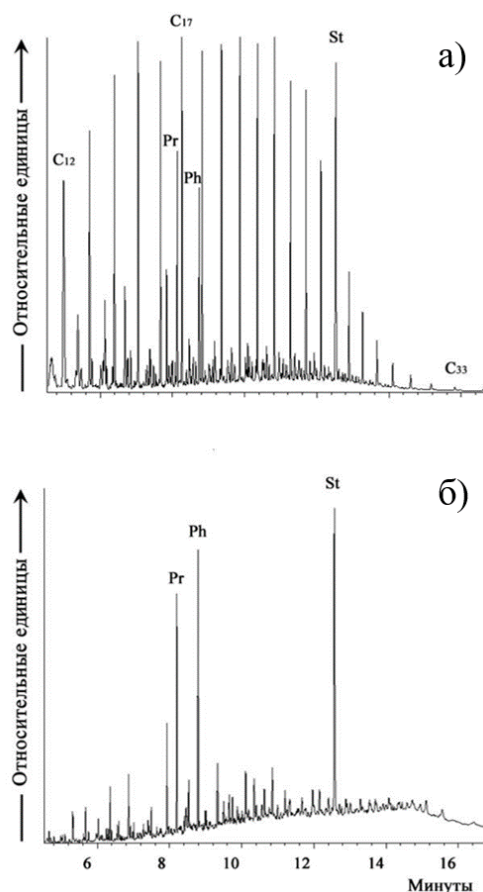
Качественный состав *n*-алканов в продуктах биodeградации подобен их составу в нефти, которая добавлялась в экспериментальные смеси (рис. 84а), и характеризуется монотонным уменьшением количества гомологов от  $C_{13}$  до  $C_{33}$  в ходе эксперимента. В случае максимальной конверсии *n*-алканов на хроматограммах экстрактов экспериментальной смеси

регистрируются пики изопреноидов (пристан, фитан) и неразрешенный нафто-ароматический горб, связанный с тяжелыми фракциями нефти (рис. 84б).

Более длительный период окисления нефти отмечен в экспериментах с использованием воды, отобранной в районе естественных нефтепроявлений, но за пределами нефтяного пятна. В последнем случае, через 15 сут эксперимента конверсия *n*-алканов нефти наблюдалось только в колбах, содержащих их максимальные концентрации – 55–72 мкг/мл и составляла 5.4–1.3% соответственно. Через 60 сут конверсия *n*-алканов не превышала 48%. Самый длительный латентный период отмечен в экспериментах с микробным сообществом фонового района. Значимое уменьшение концентрации *n*-алканов отмечено только через 36 сут эксперимента, конверсия *n*-алканов составляла 19%. Через два месяца конверсия *n*-алканов не превышала 34% (рис. 83).



**Рисунок 83.** Масса *n*-алканов в экспериментальных смесях в ходе культивирования сообщества байкальских микроорганизмов в различных водных средах: 1 – из района м. Горевой утес (в нефтяном пятне), 2 – из района м. Горевой утес (вне зоны нефтяного пятна), 3 – с фоновой станции Баргузинский залив. Цитировано по Павлова и др., 2012.



**Рисунок 84.** Хроматограммы: а – раствор нефти в хлористом метиле (7.4 мг/мл), использованной в качестве добавок в модельных экспериментах; б – экстракт модельной смеси после 60 сут эксперимента. Добавка нефти 5.5 мг, степень конверсии *n*-алканов 90%. Пики:  $C_n$  – *n*-алканы, Pr – пристан, Ph – фитан, St – внутренний стандарт сквалан. Цитировано по Павлова и др., 2012.

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

В чистую культуру получено 108 штаммов аэробных углеводородокисляющих микроорганизмов. На основе анализа последовательности гена 16S рРНК исследуемые организмы отнесены к бактериям рода: *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).

В геноме штамма *R. erythropolis* №4–08, изолированного из битумной постройки оз. Байкал, полностью расшифрованы и транслированы в аминокислотные последовательности структуры четырех *alkB*-генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназу (Likhoshvay et al., 2014). Показано, что, как и у других представителей рода *Rhodococcus*, у исследуемого микроорганизма имеются строго консервативные фрагменты, в одном из которых (EHNFGHH) обнаружена несинонимичная замена. Аналогичная структура найдена у *R. erythropolis* SK121 (04385381), выделенного из почвы, загрязненной нефтью и *R. erythropolis* PR4 (002768905) – из морской воды Тихого океана с глубины 1 км. Гомология аминокислотных последовательностей алкан-1-гидроксилаз штамма *R. erythropolis* с аналогичными последовательностями этих микроорганизмов составляет 94–97%. Также установлено, что в отличие от вышеупомянутого гомолога *R. erythropolis* PR4, штамм *R. erythropolis* №4–08 способен деградировать *n*-алканы более широкого гомологического ряда (C<sub>8</sub>–C<sub>20</sub> против C<sub>12</sub>–C<sub>29</sub>соответственно) (Likhoshvay et al., 2013).

У всех протестированных в данном исследовании штаммов, различающихся по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК, структура *alk* генов одинакова и наиболее сходна с *alk*-генами типа «*Rhodococcus*». Это может свидетельствовать о том, что *alk*-гены могли появиться в геноме различных родов бактерий в результате горизонтального межвидового переноса (van Beilen et al., 2001; Турова и др., 2008). Кроме того, известно, что *alk*-гены являются адаптивными, то есть связанные с приспособлением к изменяющимся условиям среды. Адаптивные гены не являются обязательными для всех представителей бактериальной популяции, они располагаются на плаزمиде, что значительно повышает

возможность их переноса между членами популяции, даже если эти члены не являются близкородственными (Турова, 2009).

Следствием горизонтального переноса генов (horizontal gene transfer, HGT) может быть наличие *alk*-генов у микроорганизмов разнообразных таксономических групп в батипелагиали оз. Байкал, где прямые выходы нефтяных углеводородов не зафиксированы. Так, гены, опосредующие окисление аммония и метана, разложение ароматических соединений или алкан/метансульфонатмонооксигеназы, были обнаружены в большем количестве в глубоководной части Южного Байкала по сравнению с их океаническими аналогами. *Alk*-гены выявлены в геномах *Chloroflexota*, *Ignavibacteria*, *Bacteroidetes*, *Limnohabitans*, *Methyloglobus*, *Mycococcales*, *Acidobacteria*, *Rhodospirillaceae* и неклассифицируемых *Proteobacteria* (Cabello-Yeves et al., 2020).

За последние 20 лет представлены доказательства, что HGT играет важную роль в горизонтальном распространении существующих катаболических путей, а также в естественном построении новых. Этот перенос позволяет бактериям быстро адаптироваться к новым ксенобиотическим соединениям, поступающим в их среду обитания. В частности, доказан перенос плазмид, несущих гены окисления алканов, фенола, соединений ВТЕХ (бензол, толуол, этилбензол, ксилол) и нафталина (Top, Springael, 2003; Boronin, Kosheleva, 2014; Shahi et al., 2017). Таким образом, вероятно, бактерии в районах естественных выходов нефти в средней котловине являются не только активными биодеструкторами углеводородов, но и донорами катаболических генов для горизонтального переноса микроорганизмам, обитающих в других районах оз. Байкал, напрямую не связанных с разгрузкой нефти.

**Изучение способности углеводородокисляющих микроорганизмов к синтезу внеклеточных ПАВ.** Одним из важнейших критериев оценки ПАВ при их практическом использовании является способность к эмульгированию углеводородов. Способность микроорганизмов использовать водонерастворимые гидрофобные субстраты обусловлена двумя механизмами (Bouchez-Naitali et al., 1999): поглощением субстрата в результате прямого взаимодействия клеток с каплями углеводорода и био-ПАВ-опосредованным взаимодействием клеток и субстрата. Необходимым условием прямого контакта клеток и углеводорода является высокая гидрофобность клеточной поверхности; в этом случае углеводороды проникают в клетку в виде субмикроскопических капель. При втором механизме синтезированные клеткой ПАВ солюбилизируют или эмульгируют гидрофобные субстраты, облегчая их поступление в клетку. Многие микроорганизмы, способные утилизировать углеводороды, реализуют оба механизма, т.е. характеризуются высокой гидрофобностью клеточной поверхности и обладают способностью к синтезу ПАВ (Bouchez-Naitali et al., 1999). Большинство известных продуцентов, в том числе и представители рода

*Rhodococcus*, синтезируют ПАВ при росте на гидрофобных субстратах (Rapp et al., 1979; Desai, Banat, 1997; Lang, Philp, 1998; Kuyukina, Ivshina, 2010; Ivshina et al., 2017; Kuyukina, Ivshina, 2019; Ившина и др., 1987, 2021). Согласно классификации (Rosenberg, Ron, 1999), ПАВ делятся на низко- и высокомолекулярные. К низкомолекулярным относятся гликолипиды (трегалозолипиды, софоролипиды, рамнолипиды), липопептиды (сурфактин, полимиксин, грамицидин S) фосфолипиды и нейтральные липиды. Высокомолекулярные ПАВ – это полисахориды, белки, липополисахариды, липопротеины или комплексы этих веществ. Низкомолекулярные ПАВ способны снижать поверхностное натяжение на границе раздела фаз, а высокомолекулярные являются высокоэффективными стабилизаторами эмульсий типа «масло в воде», т.е. эмульгаторами (Rozenberg, Ron, 1999; Toren et al., 2001; Walzer et al., 2006; Пирог и др., 2009).

На первом этапе исследований, способность синтезировать внеклеточные ПАВ тестировали у 36 штаммов микроорганизмов, отнесенных к родам *Rhodococcus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Novospingobium*, *Microbacterium*, *Micromonospora*. Способность синтезировать внеклеточные ПАВ оценивали по снижению уровня поверхностного натяжения ( $\sigma$ ) на границе жидкая среда – воздух и по проявлению эмульгирующей активности супернатантов культуральной жидкости (Павлова и др., 2010). Проведенные исследования показали, что супернатанты культуральной жидкости представителей родов *Rhodococcus* sp. (9 штаммов), *Paenibacillus* sp. (2), *Brevibacillus* sp. (1), *Microbacterium* sp. (1), *Pseudomonas* sp. (2) не проявляют эмульгирующую активность. Эмульгирующая активность 12 штаммов (33%) слабая,  $E_{24}$  не превышает 10.5%. Наибольшую активность проявил неидентифицированный штамм № 88–05 ( $E_{24} = 22.4\%$ ) и штаммы, отнесенные к р. *Pseudomonas* и *Arthrobacter* ( $E_{24} = 18.4\%$ ). В целом представители различных родов проявляют эмульгирующую активность в различной степени. Так, среди семи исследованных представителей рода *Brevibacillus*, шесть штаммов показали активность от 2.6 до 13.2%; в группе *Pseudomonas*, для трех из пяти штаммов  $E_{24}$  составляет 10.5–18.4%, что позволяет предположить, что способность стабилизировать гидрофобные эмульсии в большей степени определяется индивидуальными метаболическими особенностями штаммов, не зависящими от родовой принадлежности. Среди представителей рода *Rhodococcus* не выявлено штаммов, супернатанты культуральных жидкостей которых проявляют эмульгирующую активность. Биосурфактанты, образуемые родококками, преимущественно ассоциированы с клетками, и только незначительная их часть выделяется во внешнюю среду (Lang, Philp, 1998; Rosenberg, Ron, 1999). В целом, показано, что 58% исследованных штаммов обладают эмульгирующей активностью.

### Изучение способности микроорганизмов к синтезу клеточно-связанных ПАВ.

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<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> (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 № 2–08, было характерно потребление длинноцепочечных *n*-алканов (от C<sub>21</sub> и далее), концентрации которых уменьшились на 46–100%, при увеличении в 2–3 раза содержания короткоцепочечных алканов (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>) (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 (табл. 12).

**Таблица 12.** Значения поверхностного натяжения и эмульгирующая активность водных эмульсий экстрактов биомассы бактерий рода *Rhodococcus* и рода *Pseudomonas*

Род бактерий (номер штамма)	Поверхностное натяжение $\sigma$ , мН/м		Эмульгирующая активность, %
	$\sigma$	$\Delta\sigma$	
<i>Rhodococcus</i> sp. (№ 1–08)	47.56	16.83	0
<i>Rhodococcus</i> sp. (№ 2–08)	55.17	7.26	23.7
<i>Rhodococcus</i> sp. (№ 3–08)	50.49	13.9	0
<i>Rhodococcus</i> sp. (№ 4–08)	35.93	27.13	0
<i>Rhodococcus</i> sp. (№ 5–08)	51.95	11.71	0
<i>Pseudomonas</i> sp. (№ 5–05)	44.71	18.95	32.4

Стандартным признаком способности микроорганизмов продуцировать биоПАВ является снижение уровня поверхностного натяжения (ПН) на границе жидкая среда – воздух (Волченко, Карасева, 2006). Некоторые авторы (Соопер, 1986) считают перспективным в качестве продуцентов биоПАВ микроорганизмы, которые вызывают уменьшение ПН более чем на 40 мН/м, другие авторы (Willumsen, Karlson, 1997) полагали таковыми изоляты, снижающие ПН более чем на 20 мН/м.

Наиболее активными оказались штаммы, отнесенные к *Rhodococcus erythropolis* (№ 4–08), который снижает поверхностное натяжение на 27 мН/м и *Pseudomonas fluorescens* (№ 5–05), обладающий не только поверхностно-активными свойствами, но и эмульгирующими (Павлова и др., 2011). Сравнение величин ПН и ИЭ водных эмульсий экстрактов биомассы бактерий и их супернатантов свидетельствует о том, что у всех исследуемых изолятов как

поверхностно-активные, так и эмульгирующие свойства связаны с биомассой бактерий, а не с супернатантом культуральной жидкости. Также перспективным для дальнейших исследований является штамм *Rhodococcus globerulus* (№ 2–08), который обладает слабой поверхностной активностью (снижает поверхностное натяжение на 7.26 мН/м) и выраженной эмульгирующей активностью.

**Определение химического состава клеточно-связанных биоПАВ.** На основании проведенных исследований, направленных на поиск микроорганизмов, способных образовывать биоПАВ был выявлен наиболее активный штамм, отнесенный к роду *R. erythropolis* (№ 4–08), способный образовывать клеточно-связанные поверхностные вещества. При росте на среде с *n*-гексадеканом, показатель  $\sigma$  водной эмульсии экстракта биомассы *R. erythropolis* (№ 4–08) достигал значения 35.93 мН/м, таким образом, значение  $\Delta\sigma$  для этого штамма составляет 27.13 мН/м.

Для анализа структуры образуемых биоПАВ, биомассу исследуемого штамма наращивали на минеральной среде с *n*-гексадеканом. В процессе культивирования было отмечено, что в экспоненциальной фазе роста, в культуральной жидкости наблюдается процесс флоккуляции – образование хлопьев. Несмотря на то, что в настоящее время известно значительное количество микроорганизмов, деградирующих углеводороды, тем не менее только некоторая часть из известных микроорганизмов, способна осуществлять этот процесс, совмещая два механизма: биodeградацию и физическую сепарацию, к которой относится процесс флоккуляции (Chang et al., 2009). Процесс биофлоккуляции обусловлен воздействием экологических факторов, таких как химический или физический стресс, субстратный градиент или является жизненной стратегией. Биофлоккуляция важна и иногда очень выгодна для растущих клеток, в таких случаях как защита от выедания простейшими, устойчивость к токсинам и лучшая утилизация источников углерода и энергии. В работе (Liu et al., 2009) показано, что для улучшения извлечения гидрофобных углеводородов из гидрофильной среды, некоторые штаммы *Rhodococcus* образуют флоккулы.

В результате культивирования исследуемого штамма *R. erythropolis* (№ 4–08) в течение 456 ч., через 240 ч. в культуральной жидкости, под слоем *n*-гексадекана наблюдалось образование флоккул различного размера (рис. 85).



**Рисунок 85.** Образование флоккул штаммом *R. erythropolis* (№ 4–08) на минеральной среде *n*-гексадеканом



При остановке шейкера, спустя некоторое время, флоккулы слипались друг с другом, увеличиваясь в размере. Однако, при возобновлении работы шейкера, большие флоккулы разрушались, оставались более мелкие. Процесс образования флоккул был отмечен также при проведении микроскопических исследований. Для анализа структуры образуемых поверхностно-активных соединений штамма *R. erythropolis* потенциальные биосурфактанты извлекали из флоккул бактерий методом жидкостной экстракции хлороформом. Методом ТСХ показано, что фракция 3 (Rf=0.38) содержит 4 доминантных пика, соответствующих массам 763.5738, 797.5847, 802.54420 и 1341.9251 (табл. 13).

**Таблица 13.** Массы молекулярных ионов, присутствующих во фракции 3

МН+	МН+	МН+
391.2921	739.6056	846.4427
492.4096	764.5738	894.5417
579.2950	782.5708	943.9829
654.3329	790.3830	1342.9251
683.5442	798.5847	
689.5370	803.5442	

Известно, что для *R. erythropolis* при культивировании на *n*-гексадекане характерно образование трегалозодикориномиколоатов, представляющих собой трегалозу с двумя остатками миколовых кислот. Один из доминантных пиков, соответствующий массе 1341.9252, коррелирует с брутто-формулой  $C_{79}H_{152}O_{15}$ . Можно предположить, что эта масса соответствует трегалолипиду, содержащему 2 остатка жирных кислот, например  $C_{33}H_{64}O_3$  и  $C_{34}H_{66}O_3$ , каждая из которых имеет одну двойную связь.

## **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, Upasani, 2017). Кроме биологического компонента в состав препаратов обычно входят сорбенты, консерваторы, стабилизаторы (сахароза, борная кислота, бензойная кислота, малахитовый зеленый, полиэтиленгликоль, факторы роста (дрожжевой экстракт и биотрин) и азотно-фосфорно-калиевые компоненты, необходимые для развития микроорганизмов. Увеличение биодоступности малорастворимых

в воде и сорбированных органических загрязнений достигается введением поверхностно-активных веществ, которые либо вносятся на участки загрязнения, либо продуцируются микроорганизмами *in situ* (Decesaro et al., 2017). Вместе с тем, в состав созданных и запатентованных препаратов, предназначенных для ремедиации не входят синтетические химические соединения, обладающие физиологической активностью и влияющие на скорость роста углеводородокисляющих микроорганизмов.

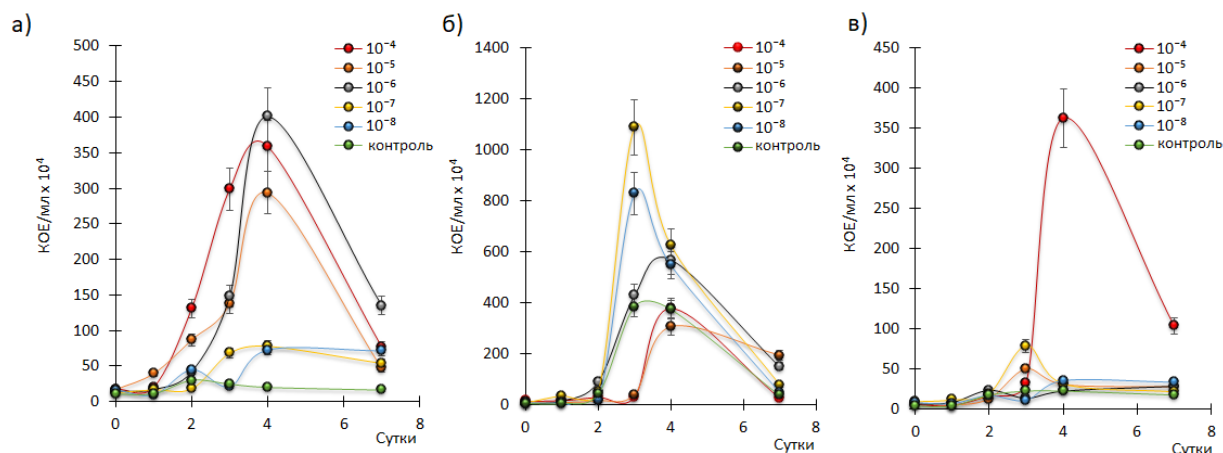
В естественных условиях процессы биодegradации протекают в течение длительного времени, особенно в регионах с пониженной температурой. Для активизации процессов жизнедеятельности углеводородокисляющих микроорганизмов при низких температурах возможно применение биологически активных соединений в качестве стимуляторов роста. В данном контексте перспективны синтетические химические соединения, синтезированные в Иркутском институте химии СО РАН. В частности, широкий ряд арилхалькогенил-ацетатов трис-(2-гидроксиэтил)аммония, названных протатранами. Соединения, имеющие «атрановое» строение представляют собой бесцветные низкоплавкие порошки или вязкие протонные алканоламмониевые ионные жидкости (ПАИЖ) (Niedermeyer et al., 2013), нетоксичные ( $LD_{50} = 1300-6000$  мг/кг), устойчивые при хранении и хорошо растворимые в воде, спирте и других органических растворителях (Mirskova et al., 2015; Adamovich et al., 2017).

Высказано предположение, что синтезированные биостимуляторы могут оказывать влияние на скорость роста углеводородокисляющих микроорганизмов и их активность. В качестве тест-объектов были использованы штаммы р. *Rhodococcus* (№ 4–08) и р. *Pseudomonas* (№ 5–05), описание углеводородокисляющих свойств которых приведено выше (Pavlova et al., 2019). В результате проведенных исследований выявлены различия влияния протатранов 1–3 на рост двух штаммов микроорганизмов, которые по своим физиолого-биохимическим свойствам значительно отличаются друг от друга.

В отношении штамма *R. erythropolis* (№ 4–08) все три тестируемых соединения оказывали влияние на скорость роста микроорганизма. В условиях периодического культивирования в минеральной среде с нефтью без добавления соединений 1–3 (контроль) выявлено наличие довольно продолжительной (до 24 ч) лаг-фазы роста. Экспоненциальный рост *R. erythropolis* начинается после 24 часов, при этом удельная скорость роста возрастает на порядок с  $0.002$  ч<sup>-1</sup> до  $0.02$  ч<sup>-1</sup> (рис. 86а).

При внесении соединения 1 в концентрациях  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  мас. % на 1-е сутки культивирования лаг-фаза сокращается, скорость роста составляет от  $0.007$  до  $0.03$  ч<sup>-1</sup> соответственно. В дальнейшем, на 4 сутки культивирования, в присутствии соединения 1 в концентрации  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  мас. % при скорости роста  $0.03$  ч<sup>-1</sup> (время генерации – 20.6 ч) выявлено увеличение численности микроорганизмов в ~7–9 раз. В то время как в контроле на 4-е сутки

скорость роста составляет  $0.005 \text{ ч}^{-1}$ , время генерации – 138 ч. Внесение соединения 1 в более низких концентрациях ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  мас. %) значимого влияния на рост микроорганизма не оказывало (Pavlova et al., 2019).

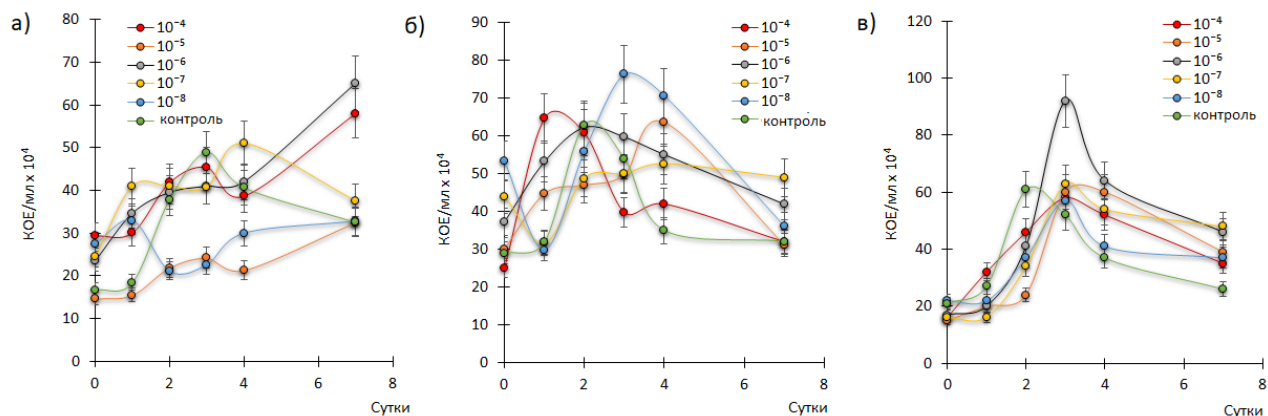


**Рисунок 86.** Влияние соединения 1 (а), 2 (б), 3 (в) на скорость роста *R. erythropolis* (4–08). Цитировано по Pavlova et al., 2019.

Влияние соединения 2 на скорость роста *R. erythropolis* отмечено на третьи сутки (рис. 86б). В данном случае наиболее эффективными оказались концентрации  $10^{-6}$ – $10^{-8}$  мас. %, при которых отмечалось увеличение численности в 2–2.8 раза. При этом скорость роста составляла  $0.06$ – $0.07 \text{ ч}^{-1}$ , что соответствует времени генерации равном 10 ч, в то время как в контроле  $\mu = 0.02 \text{ ч}^{-1}$ , время генерации – 35 ч. Более высокие концентрации  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  мас. % приводили к торможению роста в сравнении с контролем. Наиболее эффективным биостимулятором оказалось соединение 3 в концентрации  $10^{-4}$  мас. %, при добавлении которого наблюдалось значимое влияние на ростовые характеристики (рис. 86в). На 4-е сутки эксперимента численность бактерий увеличивалась в 16 раз. При этом скорость роста составляла  $0.04 \text{ ч}^{-1}$ , время генерации 16 ч. В то время как в контрольных образцах данные параметры составляли соответственно  $0.01 \text{ ч}^{-1}$  и 38 ч. Более низкие или высокие концентрации этого вещества влияния на рост микроорганизмов не оказывали.

Для штамма *P. fluorescens* (№ 5–05) внесение в культуральную среду соединений 1–3 оказалось менее значимым. В присутствии соединения 1 в концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  мас.%. на 1-е сутки культивирования наблюдается увеличение скорости роста до  $0.02 \text{ ч}^{-1}$  в сравнении с контролем ( $0.004 \text{ ч}^{-1}$ ). Повышение численности микроорганизмов отмечено лишь при концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$  мас. % и только на седьмые сутки культивирования (рис. 87а). Вместе с тем, несмотря на повышение численности по истечению 168 ч культивирования (концентрация соединения 1  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$  мас. %) скорость роста бактерий была низкой –  $0.004$ – $0.006 \text{ ч}^{-1}$  (время генерации 114–171 ч) и сопоставимой в контрольном образце ( $\mu = 0.004 \text{ ч}^{-1}$ , время генерации – 175 ч). При добавлении соединения 2 в концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$  мас. %

увеличение количества микроорганизмов отмечено только впервые 24 часа эксперимента. При внесении 2 в концентрации  $10^{-4}$  мас. % скорость роста увеличивалась на порядок и составляла  $0.04 \text{ ч}^{-1}$  в сравнении с контролем ( $0.004 \text{ ч}^{-1}$ ). По истечению семи суток эксперимента скорость роста в присутствии соединения 2 в различных концентрациях была сопоставима со скоростью роста в контроле (рис. 87б).



**Рисунок 87.** Влияние соединения 1 (а), 2 (б), 3 (в) на скорость роста *P. fluorescens* (№5–05). Цитировано по Pavlova et al., 2019.

Влияние соединения 3 на характеристики штамма *P. fluorescens* (№ 5–05) отмечено только при его использовании в концентрации  $10^{-6}$  мас. % (рис. 87в). В контрольных пробах, не содержащих тестируемое соединение, фаза ускорения роста выявлена 1-е сутки проведения эксперимента ( $\mu = 0.01 \text{ ч}^{-1}$ ). Через 48 ч удельная скорость роста возрастает в 2 раза и составляет  $0.02 \text{ ч}^{-1}$  (время генерации 31 ч). К 72 часам наблюдается уменьшение скорости роста, что свидетельствует о достижении стационарной фазы. При внесении соединения 3 в концентрации  $10^{-6}$  мас. % отмечено увеличение численности на 3-и сутки проведения эксперимента. Добавление в среду соединения 3 сдвигает фазу роста на сутки для данного штамма (рис. 87в).

Таким образом, проведенные исследования показали, что синтезированные соединения 1–3 из ряда протатранов А являются биостимуляторами роста углеводородокисляющих бактерий рода *Rhodococcus*, изолированных из района нефтепроявления в оз. Байкал (Pavlova et al., 2019). Добавление в культуральную среду соединений 1–3 при низкой температуре ( $10^\circ\text{C}$ ) 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* проявляется слабее. Вероятно, положительное влияние биологически активных протатранов 1–3 на *Rhodococcus* определяется особенностями строения клеточной стенки этих бактерий. Клеточная стенка бактерий данной группы в силу своей липофильности имеет высокое сродство к гидрофобным субстратам и представляет собой мощное липофильное образование,

подобного которому нет у других бактерий (Serebryakova et al., 2002; Aranda et al., 2007; Kuyukina, Ivshina, 2010). Помимо липидов клеточная стенка *Rhodococcus* sp. включает в себя миколовые кислоты (Bergey's Manual, 2012), которые дают преимущества углеводородокисляющим бактериям в процессе поглощения субстрата. Для бактерий рода *Pseudomonas* характерно образование биоэмульгаторов (Varjani, Urasani, 2017). Выделяя во внешнюю среду биоэмульгатор, бактерии снижают гидрофобность углеводов и способствуют их солюбилизации. Но более сложное строение клеточной стенки, отсутствие тейхоевых и миколовых кислот затрудняет поступление некоторых веществ в клетку. Вероятно, что степень влияния синтезированных протатранов 1–3 на скорость роста определяется именно особенностями строения клеточной стенки микроорганизмов двух различных систематических групп.

Как отмечено выше, протатраны 1–3 можно отнести к ПАИЖ (Bicak, 2005; Petkovic et al., 2011; Pinkert et al., 2011; Stoimenovski et al., 2011, 2012; Niedermeyer et al., 2013). Ранее показано, что, обладая необычными физико-химическими свойствами некоторые ПАИЖ, состоящие из биологически активных катионов аммония и анионов протонных кислот могут быстрее, чем другие соединения, преодолевать клеточные мембраны (Stoimenovski et al., 2012). Предполагается, что столь успешный транспорт ПАИЖ обуславливается тем, что они проникают через мембрану в форме водородосвязанных комплексов. Это делает ионные пары и их агрегаты «нейтральнее», облегчая проникновение через модельную мембрану. Вероятно, транспорт биостимуляторов 1–3 внутрь бактерий р. *Rhodococcus* протекает аналогично. Высокая специфическая биологическая активность протатранов А, в частности 1–3, объясняется благоприятным сочетанием в их молекулах нескольких факторов. Во-первых, проявляется синергический эффект «double action» (Seter, 2012) этаноламинов и арилхалькогенилуксусных кислот. Во-вторых, протатраны обладают необычной пространственной трициклической структурой, содержащей внутримолекулярную связь N→N. Такое строение приводит к высокому дипольному моменту молекулы и повышенной электроотрицательности экваториальных атомов кислорода протатранового остова. При этом положительным концом диполя является атом азота. Вероятно, что за счет водородных связей и диполь-дипольного взаимодействия с полярными группами белков и липидов происходит хемосорбция протатранов на поверхности биологических мембран и их дальнейшее проникновение в живую клетку. Полученные результаты показывают 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 ( $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-8}$  мас. %) концентрациях (Павлова О.Н., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Земская Т.И. Патент на изобретение 2694593, 2019).

Таким образом, проведенные исследования показали, что в районе нефтепроявлений обитает динамичное микробное сообщество, с повышенной численностью УВОМ в зонах, содержащих углеводороды. Обычно это поверхностные и придонные слои воды, а также поверхностные слои донных отложений. Как и в Мировом океане, в случаях техногенного разлива нефти (Atlas, Hazen 2011; King et al., 2015), впервые годы исследований отмечалось увеличение численности культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов (УВОМ) в водной толще. В зоне нефтяных slickов, образующихся на поверхности водной толщи, количество культивируемых УВОМ в 12 раз превышало значения в воде фоновых районов (Павлова и др., 2008а, б, 2012). Распределение УВОМ зависело от распределения углеводородов, плотность которых увеличивается в зоне разгрузки. Несмотря на постоянную эмиссию нефти, низкие температуры, а также длительный период полного замещения вод Байкала притоками (около 400 лет) (Weiss et al., 1991), выходы нефти локализованы на ограниченных участках в оз. Байкал, что свидетельствует о механизмах самоочищения от нефтяного «загрязнения», где основная роль принадлежит микроорганизмам. Установлено, что в условиях низкой температуры (4°C) оз. Байкал, деградация фракции *n*-алканов нефти природным микробным сообществом за 60 сут. достигала 90% (Павлова и др., 2012).

В результате проведенного поиска выявлены штаммы, синтезирующие гликолипидные биосурфактанты обладающие поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами при росте на углеводородсодержащих средах (Павлова и др., 2010а). Образование сурфактантов, способных значительно снижать поверхностное натяжение, выявлено у двух штаммов микроорганизмов, относящихся к *R. erythropolis* (№ 4–08) и *P. fluorescens* (№ 5–05) (Павлова и др., 2010б).

Способность деградировать углеводороды закреплена в геномах байкальских микроорганизмов (Ломакина и др., 2014; Likhoshvay et al., 2014). Анализ нуклеотидных последовательностей *alk*-генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназу, показал, что у большинства культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов (76%), выделенных из водной толщи и донных осадков в районах естественных выходов нефти в оз. Байкал, содержатся *alkB*-гены, идентичные в большинстве случаев *alkB*-генам, обнаруженным ранее у *R. erythropolis* (Ломакина и др., 2014). В геноме штамма *R. erythropolis*, изолированного из битумной постройки оз. Байкал, обнаружено четыре типа *alkB*-генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназу с несинонимичной заменой (Likhoshvay et al., 2013, 2014). Такая модификация *alk*-гена, вероятно, отвечает за синтез специфичной алкан-1-монооксигеназы, способной окислять тяжелые *n*-алканы, из которых состоит битумная постройка (C<sub>22</sub>-C<sub>34</sub>), в условиях

низкой температуры (4°C) и высокого давления (90 атм.) (Likhoshvay et al., 2013, 2014). С использованием данного штамма предложено применение арилхалькогенилацетатов трис(2-гидроксиэтил)аммония – «протатранов» 1–3 общей формулы  $ArYCH_2CO_2^- \cdot HN^+(CH_2CH_2OH)_3$  (А), где Ar = арил; Y = O (1), S (2), SO<sub>2</sub> (3), в качестве биостимуляторов роста углеводородокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis*. Обнаруженный эффект положительного влияния «протатрановых» соединений на увеличение скорости роста углеводородокисляющих микроорганизмов при низких положительных температурах может быть использован при разработке экологически безопасных методов восстановления объектов окружающей среды после их загрязнения нефтью (Павлова и др., 2019в).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было 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 углеводов, 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 биодegradации 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 – биодegradации 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 углеводородокисляющих 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%.

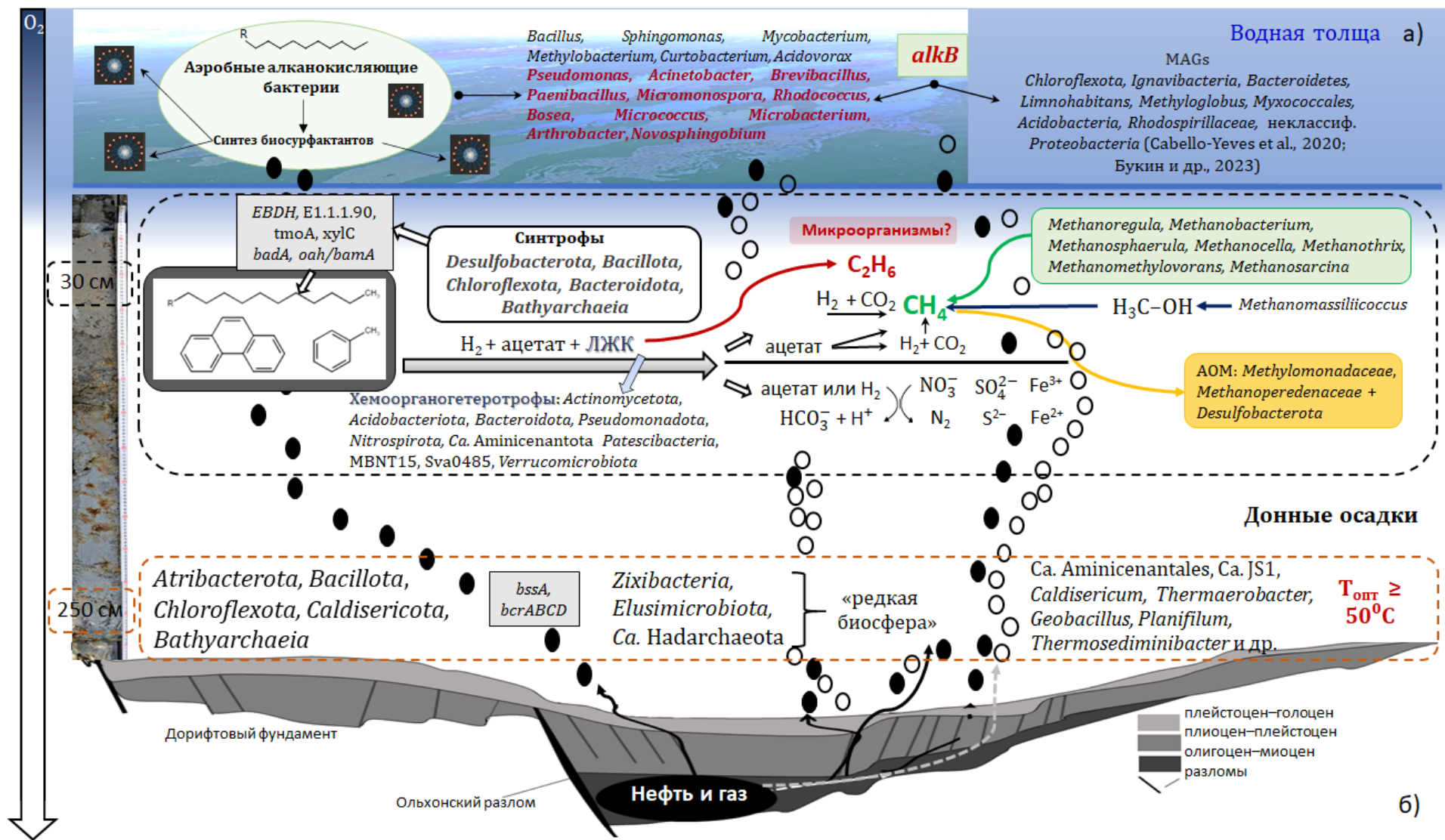
Как и в других нефтяных экосистемах, деградация нефти сопровождается образованием вторичного микробного газа (метан, этан). Генерация метана и этана при биодegradации нефти в экспериментальных условиях может объяснить нахождение газа в донных осадках районов нефтепроявлений за пределами термогенной зоны 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 (Thermoleophilia), 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. 88).



**Рисунок 88.** 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. Зеленевская, 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 ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Мирсков Р.Г. Способ получения 1-R-индол-3-илсульфанилацетатов (2-гидроксиэтил)аммония. Патент на изобретение № 2642778. 27.02.2013.
2. Афолина Т.Е., Карабанов Е.Б. Источники и особенности распределения органического вещества в плейстоцен-голоценовых осадках Северного Байкала (на примере биомаркеров *n*-алканов) // Геология и геофизика. – 2001. – Т. 1–2. – С. 241–253.
3. Багаева Т.В., Зинурова Е.Е. Сравнительная характеристика внутри- и внеклеточных углеводов *Clostridium pasteurianum* // Биохимия. – 2004. – Т. 69, №4. – С. 527–529.
4. Баженова О.К. Геология и геохимия нефти и газа. Москва: МГУ, 2004. 416 с.
5. Байкал. Атлас. / Ред. Галазий Г.И. Ломоносов И.С. – Москва: Роскартография, 1993. – 160 с.
6. Барам Г.И., Верещагин А.Л., Голобокова Л.П. Микроколonoчная высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием для определения анионов в объектах окружающей среды // Журнал аналит. химии. – 1999. – Т. 54, № 9. – С. 962–965.
7. Безрукова Е.В., Богданов Ю.А., Вильямс Д.Ф., Гранина Л.З., Грачев М.А., Игнатова Н.В., Карабанов Е.Б., Купцов В.М., Курылев А.В., Летунова П.П., Лихошвай Е.В., Черняева Г.П., Шимараева М.К., Якушин А.О. Глубокие изменения экосистемы Северного Байкала в голоцене // Докл. АН СССР. – 1991. – Т. 321, № 5. – С. 1032–1037.
8. Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н., Розанова Е.П., Глумов И.Ф., Ибатуллин Р.Р., Иванов М.В. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 5. – С. 687–697.
9. Большаков А.М., Егоров А.В. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях в акваториях // Океанология. – 1987. – Т. 37, № 5. – С. 861–862.
10. Борисенко И.М., Замана Л.В. Минеральные воды Бурятской АССР. Улан-Удэ: Бурятское книгоиздательство, 1978. 162 с.
11. Будников Г.К., Зиятдинова Г.К., Гармонов С. Ю. Химический анализ в медицинской диагностике / Под ред. Будников Г.К. – Москва: Наука, 2010. – 502 с.
12. 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.
13. Верболов В.И. Течения и водообмен в Байкале // Водные ресурсы. – 1996. – Т. 23. – С. 413–423.
14. Вологина Е.Г., Штурм М., Воробьева С.С., Гранина Л.З., Тошаков С.Ю. Особенности осадконакопления в озере Байкал в голоцене // Геология и геофизика. – 2003. – Т. 44. – С. 407–421.
15. Вологина Е.Г., Воробьева С.С., Калашников И.А., Филева Т.С. Источники сноса и состав донных осадков южной котловины оз. Байкал (предварительные результаты) // Известия ИГУ. Серия «Науки о Земле». – 2009. – Т. 2. – С. 53–64.
16. Вологина Е.Г., Федотов А.П. Хлоритоид в донных осадках Академического хребта озера Байкал – индикатор эолового переноса // Геология и геофизика. – 2013. – Т. 54. – С. 72–82.

17. Вологина Е.Г., Штурм М. Потоки осадочного вещества в Южном Байкале. Результаты экспериментов с седиментационными ловушками // Геология и геофизика. – 2017. – Т. 58, № 9. – С. 1314–1323.
18. Волченко Н.Н., Карасева Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий – продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама // Биотехнология. – 2006. – Т. 2. – С. 57–62.
19. Вотинцев К.К., Мещерякова А.И., Поповская Г.И. Круговорот органического вещества в озере Байкал / АН СССР. СО. Лимнол.ин-т. – Новосибирск: Наука, 1975. – 189 с.
20. Выхристюк Л.А. Органическое вещество донных осадков Байкала // Тр. Лимнол. ин-та АН СССР. – Новосибирск: Наука, 1980. – Т. 32. – 80 с.
21. Гинзург-Карагичева Т.Л. Микробиологическое исследование серно-соленых вод Апшерона. Азербайджан // Нефтяное хозяйство. – 1926. – № 6. – С. 30–35.
22. Гинзург-Карагичева Т.Л. Микробиологические очерки. М.-Л.: Гос. науч.-тех. Нефтяное изд-во, 1932. – 97 с.
23. Голубев В.А. Тепловой поток через впадину оз. Байкал // Докл.АН СССР. – 1979. – Т. 245, № 6. – С. 1333–1336.
24. Голубев В.А. Кондуктивный и конвективный вынос тепла в Байкальской рифтовой зоне / Ред. Ломоносов И.С. – Новосибирск: Издательство «Гео», 2007. – 223 с.
25. Гордадзе Г.Н., Пошибаева А.Р., Гируц М.В., Перевалова А.А., Кошелев В.Н. Образование углеводородов нефти из биомассы прокариот. Образование нефтяных углеводородов-биомаркеров из биомассы архей *Thermoplasma* sp. // Нефтехимия. – 2018. – Т. 58, № 2. – С. 137–141.
26. Гордадзе Г.Н., Пошибаева А.Р., Гируц М.В., Перевалова А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Козлова Е.В. К вопросу происхождения углеводородов кальдеры вулкана Узон (Кроноцкий заповедник, Камчатка). В сборнике: Новые идеи в геологии нефти и газа. Сборник научных трудов / Отв. редактор А.В. Ступакова, 2019. – С. 115–119.
27. Гранин Н.Г., Гранина Л.З. Газовые гидраты и выходы газов на Байкале // Геология и геофизика. – 2002. – Т. 43, № 7. – С. 629–637.
28. Гранина Л.З., Грачев М.А., Карабанов Е.Б., Купцов В.М., Шимараева М.К., Вильямс Д.Ф. Аккумуляция биогенного кремнезема в донных отложениях Байкала // Геология и геофизика. – 1993. – Т. 34, № 10-11. – С. 149–159.
29. Гранина Л.З. Ранний диагенез донных осадков озера Байкал. Акад. изд-во «ГЕО», 2008. – 159 с.
30. Грачев М.А., Лихошвай Е.В., Воробьева С.С., Хлыстов О.М., Безрукова Е.В. и др., Сигналы палеоклиматов верхнего плейстоцена в осадках озера Байкал // Геология и геофизика. – 1997. – Т. 38, № 5. – С. 957–980.
31. Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Козырева Л.П., Земская Т.И., Дулов Л.Е. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал // Микробиология. – 2004. – Т. 74, № 2. – С. 248–257.
32. Дучков А.Д., Лысак С.В., Голубев В.А., Дорофеев Р.П., Соколова Л.С. Тепловой поток и геотемпературное поле Байкальского региона // Геология и геофизика. – 1999. – Т. 40, № 3. – С. 287–303.
33. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Стероиды морских организмов. М. Наука, 1988. – 208 с.
34. Жамалетдинов А.А. Кольская Сверхглубокояя скважина СГ-3 – 50 лет // Геофизические процессы и биосфера. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 94–116.

35. Захарова Ю.В., Сухих А.С. Хроматографический анализ жирных кислот клеточных стенок бифидобактерий с различной гидрофобностью // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т. 15, № 6. – С. 776–783.
36. Звягинцева И.С., Суровцева Э.Г., Поглазова М.Н., Ивойлов В.С., Беляев С.С. Деградация нефтяных масел нокардиоподобными бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 321–328.
37. Земская Т.И., Намсараев Б.Б., Дульцева Н.М., Ханаева Т.А., Голобокова Л.П., Дулов Л.Е. Пространственное распределение бактерий различных физиологических групп в районе подводного термального источника в бухте Фролиха, Северный Байкал // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 429–431.
38. Земская Т.И., Хлыстов О.М., Егоров А.В., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Шубенкова О.В., Черницына С.М., Воробьева С.С., Грачев М.А. Комплексные исследования проявлений газовых гидратов в осадках озера Байкал // Изменение окружающей среды и климата. Т.4. Процессы в биосфере: изменения почвенно-растительного покрова и территориальных вод РФ, круговорот веществ под влиянием глобальных изменений климата и катастрофических процессов. ред. Заварзин Г.А., Кудеяров В.Н. – Москва: ИФХ и БПП РАН, 2008. – Т. 4. – С. 125–152.
39. Земская Т.И., Ломакина А.В., Мамаева Е.В., Захаренко А.С., Лихошвай Е.В., Галачянц Ю.П., Миллер Б. Состав микробных сообществ в осадках южного Байкала, содержащих Fe/Mn конкреции // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 3. – С. 291–302.
40. 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.
41. Земская Т.И., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Букин С.В., Колесников П.М., Шубенкова О.В., Хабуев А.В., Хлыстов О.М. Микробные сообщества в зоне миграции флюидопотоков в донных отложениях метанового сипа Красный Яр (Южный Байкал) // *Limnology and Freshwater Biology*. – 2024. – № 4. – С. 1155–1179.
42. Зоненшайн Л.П., Гольмшток А.Я., Хатчинсон Д. Структура Байкальского рифта // Геотектоника. – 1992. – № 5. – С. 63–78.
43. Ившина И.Б., Пшеничнов Р.А., Оборин А.А. Пропанокисляющие родококки. УНЦ АН СССР, 1987. – 126 с.
44. Исаев В.П., Коновалова Н.Г., Михеев П.В. Природные газы Байкала // Геология и геофизика. – 2002. – Т. 43. – С. 638–643.
45. Исаев В.П., Преснова Р.Н. Байкальская нефть // Нефть и газ в современном мире: Геолого-экономические и социально-культурные аспекты. Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та, 2003. – С. 44–51.
46. Исаев В.П., Примина С.П., Ширибон А.А. Проблема нефтегазоносности озера Байкал и Усть-Селенгинской впадины // Матер. науч.-практ. совещ. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2003. – С. 43–48.
47. Кадников В.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Франк Ю.А., Карначук О.В., Равин Н.В. Полный геном некультивируемой бактерии кандидатного филума *Bipolaricaulota* // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 4. – С. 470–478.
48. Кадников В.В., Франк Ю.А., Марданов А.В., Белецкий А.В., Ивасенко Д.А., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Вариабельность состава микробного сообщества резервуара подземных термальных вод в Западной Сибири // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 6. – С. 739–747.



49. Кадников В.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Метагеномный анализ микробного сообщества в районе подземного горения угля в кемеровской области выявил доминирование термофильных бактерий филумов *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae* и *Firmicutes* // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 5. – С. 543–552.
50. Калиновский А.И., Горшков А.Г., Пономаренко Л.П., Стоник В.А., Дмитренко П.С., Грачев М.А. Получение  $^{13}\text{C}$ -24-метилхолеста-5,24(28)-диен-3 $\beta$ -ола культивированием байкальской диатомеи *Synedra acus* в среде с  $\text{NaNH}_3\text{CO}_3$  // Известия РАН. Сер. химическая. – 2010, № 1. – С. 232–235.
51. Каллистова А.Ю. Меркель А.Ю. Тарновецкий И.Ю. Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 6. – С. 661–683.
52. Калмычков Г.В., Егоров А.В., Кузьмин М.И., Хлыстов О.М. Генетические типы метана озера Байкал // ДАН. 2006. – Т. 411, № 5. – С. 672–675.
53. Калмычков Г.В., Егоров А.В., Хачикубо А., Хлыстов О.М. Углеводородные газы подводного нефтегазового проявления Горевой утес (оз. Байкал, Россия) // Геология и геофизика. – 2019. – Т. 60. – С. 1488–1495.
54. Калмычков Г.В., Nachikubo А., Покровский Б.Г., Minami Н., Yamashita S., Хлыстов О.М. Метан с аномально высокими значениями  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{\text{D}}$  из прибрежных термальных источников озера Байкал // Литология и полезные ископаемые. – 2020. – № 6. – С. 515–521.
55. Карпенко Е.В., Вильданова-Марцишин Р.И., Щеглова Н.С., Пирог Т.П., Волошина И.Н. Перспективы использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 43, №2. – С. 175–179.
56. Каширцев В.А., Конторович А.Э., Филп Р.П., Чалая О.Н., Зуева И.Н., Меметова Н.П. Биомаркеры в нефтях восточных районов Сибирской платформы как индикаторы условий формирования нефтепроизводивших отложений // Геология и геофизика. – 1999. – Т.40. – С. 1700–1710.
57. Каширцев В.А., Конторович А.Э., Филп Р.П., Чалая О.Н., Зуева И.Н., Иванова И.К., Меметова Н.П. Биодegradация насыщенных циклических хемофоссилий // Геология и геофизика. – 2001. – Т.42, № 11–12. – С. 1792–1800.
58. Каширцев В.А., Конторович А.Э., Москвин В.И., Данилова В.П., Меленевский В.Н. Терпаны нефтей озера Байкал // Нефтехимия. – 2006. – Т. 46. – С. 1–9.
59. Каширцев В.А., Парфенова Т.М., Головки А.К., Никитенко Б.Л., Зуева И.Н., Чалая О.Н. Биомаркеры-фенантрены в органическом веществе докембрийских и фанерозойских отложений и в нефтях Сибирской платформы // Геология и геофизика. – 2018. – Т. 59. – С. 1720–1729.
60. Каширцев В.А., Фомин А.Н., Шевченко Н.П., Долженко К.В. Новые моноароматические стероиды в органическом веществе зоны апокатагенеза // ДАН. – 2016. – Т. 469. – С. 465–469.
61. Клеркс Я., Земская Т.И., Матвеева Т.В., Хлыстов О.М., Намсараев Б.Б., Дагурова О.П. и др. Гидраты метана в поверхностном слое глубоководных осадков озера Байкал // ДАН. – 2003. – Т. 393. – С. 822–826.
62. Кожов М. М. Биология озера Байкал. – М.: Изд-во АН СССР, 1962 – 315 с.
63. Колман С.М., Купцов В.М., Джойнс Г.А., Картер С.Дж. Радиоуглеродное датирование байкальских осадков // Геология и геофизика. – 1993. – Т. 34. – С. 68–77.
64. Кольская сверхглубокая. Научные результаты и опыт исследований / Под ред. Лаврова Н.П., Орлова В.П. – М: МФ Технонефтегаз, 1998. – 260 с.

65. Кольская сверхглубокая: научные результаты и опыт исследований / Ред. Орлов В.П., Лаверов Н.П., М.: МФ «Технонефтегаз», 1998. – 260 с.
66. Компанцева Е.И., Горленко В.М. Фототрофные сообщества в некоторых термальных источниках озера Байкал // Микробиология. – 1988. – Т. 57. – С. 841–846.
67. Конторович А.Э., Стасова О.Ф. Типы нефтей в осадочной оболочке Земли // Геология и геофизика. – 1978. – Т. 8. – С. 3–8.
68. Конторович А.Э. Осадочно-миграционная теория нафтидогенеза: состояние на рубеже XX и XXI вв., пути дальнейшего развития // Геология нефти и газа. – 1998. – Т. 10. – С. 8–16.
69. Конторович А.Э., Меленевский В.Н., Иванова Е.Н., Фомин А.Н. Фенантрены, ароматические стераны и дибензотиофены в юрских отложениях Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна и их значение для органической геохимии // Геология и геофизика. – 2004. – Т. 45, № 7. – С. 873–883.
70. Конторович А.Э., Каширцев В.А., Москвин В.И., Бурштейн Л.М., Земская Т.И., Калмычков Г.В., Костырева Е.А., Хлыстов О.М. Нефтегазоносность отложений оз. Байкал // Геология и геофизика. – 2007. – Т. 48. – С. 1346–1356.
71. Костырева Е.А., Каширцев В.А., Павлова О.Н., Сотнич И.С., Хабуев А.В. Геохимия битумоидов донных осадков в районе Среднего Байкала // Интерэкспо Гео-Сибирь. – 2022. – Т. 2, № 1. – С. 200–203.
72. Крылов А.А., Хлыстов О.М., Семенов П.Б., Сагидуллин А.К., Малышев С.А., Букин С.В., Видищева О.Н., Манаков А.Ю., Исмагилов З.Р. Источники углеводородных газов в грязевом вулкане кедр, южная котловина озера Байкал: результаты экспериментальных исследований // Литология и полезные ископаемые. – 2023. – Т. 6. – С. 542–553.
73. Кузьмин М.И., Карабанов Е.Б., Каваи Т., Вильямс Д.Ф., Бычинский В.А., Кербер Е.В. и др. Глубоководное бурение на Байкале – основные результаты // Геология и геофизика. – 2001. – Т. 42, № 1–2. – С. 8–34.
74. Кузьмин М.И., Хурсевич Г.К., Прокопенко А.А., Феденя С.А., Карабанов Е.Б. Центрические диатомовые водоросли позднего кайнозоя озера Байкал: морфология, систематика, стратиграфическое распространение, этапность развития (по материалам глубоководного бурения). – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2009. – 374 с.
75. Куюкина М.С. Биосурфактанты актинобактерий рода *Rhodococcus*: индуцированный биосинтез, свойства, применение. Дисс.... докт. биол. наук. 2006. Пермь. 243 с.
76. Лебединский А.В. Черных Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А. Геносистематика микроорганизмов термальных местообитаний // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 12. – С. 1594–1609.
77. Лихошвай Ал.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 и стендовых сообщений 5-ой Верещагинской Байкальской конференции. Иркутск, 2010. – С. 139–141.
78. Логачев Н.А. История и геодинамика Байкальского рифта // Геология и геофизика. – 2003. – Т. 44. – С. 391–406.
79. 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. – Т. 5. – С. 515–522.
80. Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Морозов И.В., Земская Т.И. Микробные сообщества зоны разгрузки газонефтедержащих флюидов ультрапресного озера Байкал // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 3. – С. 355–365.

81. Ломоносов И.С. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Наука, 1974. 166 с.
82. Лукина А.П., Карначук О.В. Новая среда для культивирования «*Desulforudis audaxviator*» // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 3. – С. 367–371.
83. Манаков А.Ю., Хлыстов О.М., Сагидуллин А.К., Адамова Т.П., Хабуев А., Родионова Т.В., Юношев А.С. Структура, морфология и состав природных газовых гидратов отобранных на грязевом вулкане Кедр-1 (оз. Байкал) // Журнал структурной химии. – 2021. – Т. 62, № 6. – С. 958–965.
84. Мизандронцев И.Б. Химический состав грунтовых растворов Байкала // Круговорот вещества и энергии в озерных водоемах / АН СССР.СО. Лимнол.ин-т. ред. Галазий Г.И., Вотинцев К.К. – Новосибирск. 1975. – С. 250–253.
85. Мизандронцев И.Б. Осадкообразование // Труды ЛИИ СО АН СССР. – Новосибирск. 1978. – Т. 16. – С. 33–46.
86. Моргунова И.П., Семенов П.Б., Крылов А.А., Куршева А.В., Литвиненко И.В., Малышев С.А., Минами Х., Хачикубо А., Земская Т.И., Хлыстов О.М. Углеводородные молекулярные маркеры в донных осадках зон фокусированной разгрузки флюидов озера Байкал // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2018. – Т. 13:40.
87. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Канчавели Л.П., Розанова Е.П. Новая спорообразующая термофильная метилотрофная сульфатредуцирующая бактерия, *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. // Микробиология. – 1988. – Т. 57, № 5. – С. 823–827.
88. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Григорьян А.А., Сюэ Я.-Ф., Беляев С.С., Иванов М.В. Образование нефтевытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин (КНР) // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 2. – С. 206–211.
89. Назина Т.Н., Шестакова Н.М., Григорьян А.А., Михайлова Е.М., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Фен Ц., Ни Ф., Беляев С.С. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 1. – С. 70–81.
90. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 6. – С. 748–761.
91. Намсараев Б.Б., Дулов Л.Е., Дубинина Г.А., Земская Т.И., Гранина Л.З., Карabanов Е.Б. Участие бактерий в процессах синтеза и деструкции органического вещества в микробных матах озера Байкал // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 2. – С. 345–351.
92. Намсараев Б.Б., Земская Т.И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал /Ред. Горленко В.М. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, «ГЕО», 2000. – 160 с.
93. Николаев В.Г. О времени заложения Байкальской впадины // Бюл. МОИП. Отд. геол. – 1998. – Т. 73. – С. 13–16.
94. Никонова А.А., Шишлянников С.М., Шишлянникова Т.А., Авезова Т.Н., Бабенко Т.А., Белых О.И., Глызина О.Ю., Оболкин В.А., Павлова О.Н., Смагунова А.Н., Суханова Е.В., Тихонова И.В., Ханаева Т.А., Хуторянский В.А. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в гидробионтах с различным содержанием полиненасыщенных кислот методом газожидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии. – 2020. – Т. 75, № 10. – С. 907–20.

95. 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. – 2008а. – Т. 3. – С. 333–340.
96. 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. – 2008б. – Т. 2, № 3. – С. 319–323.
97. Павлова О.Н., Федорова Г.А., Шишлянникова Т.А., Корнева Е.С., Лихошвай А.В., Букин С.В., Ломакина А.В., Земская Т.И. Первые результаты поиска углеводородокисляющих бактерий, изолированных из оз. Байкал – продуцентов поверхностно-активных веществ // Тезисы докладов и стендовых сообщений 5-ой Верещагинской Байкальской конференции. Иркутск, 2010а. – С. 149–150.
98. 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. – 2010б. – № 2. – С. 169-172. 2078–1520.
99. 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 с международным участием. Иркутск, 2011. – С. 94–96.
100. 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 Горевой Утес) // Изв. РАН. Сер. биол. – 2012. – Т. 5. – С. 540–545.
101. 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.
102. Павлова О.Н., Букин С.В., Костырева Е.А., Москвин В.И., Манаков 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. – 2019а. – Т. 60, № 8. – С. 1171–1184.
103. 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. – 2019б. – Т. 88, № 3. – С. 358–366.
104. 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. – 2019в.
105. 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 Горевой Утес (Средний Байкал) // Геология и геофизика. – 2020. – Т. 61, № 9. – С. 1231–1240.
106. 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. – 2024а. – Т. 93, № 5. – С. 548–561.

107. 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. – 2024б. – Т. 93, № 3. – С. 323–329.

108. 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*. – 2024в. – № 4. – Р. 1035–1049.

109. Петрова В.И., Мамонтова Л.М. Изменение численности бактерий в экспериментах с добавками нефти // Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ. Новосибирск, 1985, с. 144–150.

110. Пименов Н.В., Захарова Е.Е., Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Земская Т.И. Активность и структура сообщества сульфатредуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 2. – С. 180–190.

111. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 304 – 310.

112. Плюснин А.М., Замана Л.В., Шварцев С.Л., Токаренко О.Г., Чернявский М.К. Гидрогеохимические особенности состава азотных терм Байкальской рифтовой зоны // Геология и геофизика. – 2013. – Т. 54, № 5. – С. 647–664.

113. Погодаева Т.В., Земская Т.И., Голобокова Л.П., Хлыстов О.М., Минами Х., Сакагами Х. Особенности химического состава поровых вод донных отложений различных районов озера Байкал // Геология и геофизика. – 2007. – Т. 48, № 11. – С. 1144–1160.

114. Пошибаева А.Р. Биомасса бактерий как источник углеводов нефти. Дисс.... канд. хим. наук. 2015. Москва. 124 с.

115. Практикум по микробиологии / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

116. Рязанов В.Д. Месторождения озокерита и нефти в Прибайкалье // Материалы по геол. и полезным ископаемым Дальнего Востока. Владивосток: Изд-во Дальневосточного ун-та, 1928. – Т. 19. – С. 24–32.

117. Рябухин Г.Е. К изучению Байкальского месторождения нефти. Л.; М.: Гос. науч.-техн. горно-геол. нефт. изд-во, 1934. – 26 с.

118. Серебренникова О.В., Стрельникова Е.Б., Прейс Ю.И., Дучко М.А. Влияние источника и условий торфонакопления на индивидуальный состав битуминозных компонентов торфа на примере двух низинных болот Западной Сибири // Известия Том. политех. ун-та. Химия и химические технологии. – 2014. – Т. 325, № 3. – С. 80–91.

119. Ситникова Т.Я., Земская Т.И., Черницына С.М., Лихошвай А.В., Клименков И.В., Наумова Т.В. Структура биоценозов битумных построек глубоководной зоны оз. Байкал // Экология. 2015, № 3. – С. 229–236.

120. Слободкин А.И., Слободкина Г.Б. Термофильные прокариоты из глубинных подземных местообитаний // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 3. – С. 255–270.

121. Слободкин А.И., Слободкина Г.Б. Разнообразие микроорганизмов, диспрпорционирующих соединения серы // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 5. – С. 503–518.
122. Строева А.Р., Гируц М.В., Кошелев В.Н., Гордадзе Г.Н. Моделирование процессов образования нефтяных углеводородов-биомаркеров путем термоллиза и термокатализа биомассы бактерий // Нефтехимия. – 2014. – Т. 54, № 5. – С. 352–359.
123. Талиев С.Д., Кожова О.М., Моложавая О.А. Углеводородокисляющие микроорганизмы в биоценозах некоторых районах Байкала // Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ. Новосибирск, 1985, с. 64–74.
124. Турова Т.П., Назина Т.Н., Михайлова Е.М., Родионова Т.А., Екимов А.Н., Машукова А.В., Полтараус А.Б. Гомологи гена *alk* термофильных бактерий рода *Geobacillus* // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 247–257.
125. Турова Т.П. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот. Дисс.... докт. биол. наук. 2009. Москва.
126. Углеводородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экопеллютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН, 2021. – 140 с.
127. Филатов Д.А., Кривцов Е.Б., Свириденко Н.Н., Головкин А.К., Алтунина Л.К. Биогенное окисление высоковязкой нефти Ашальчинского месторождения и ее гетероорганических соединений // Нефтехимия. – 2017. – Т. 57, № 4. – С. 386–393.
128. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам: энциклопед. справ. – 3-е издание, переработанное и дополненное. – М.: Протектор, 2000. – 848 с.
129. Хабуев А.В., Ченский Д.А., Соловьева М.А., Белоусов О.В., Кононов Е.Е., Хлыстов О.М. Оценка ресурсов газовых гидратов геофизическими методами в зоне подводной разгрузки газа на сипе «Красный яр» озера Байкал. // Известия Сибирского отделения Секции наук о Земле РАН. – 2016. – № 1. – С. 67–74.
130. Ханаева Т.А., Земская Т.И., Белькова Н.Л., Хлыстов О.М., Намсараев Б.Б. Разнообразие культивируемых прокариот в донных осадках Академического хребта оз. Байкал // Биология внутренних вод. 2010. – № 1. – С. 42–48.
131. Хатчинсон Д.Р., Гольмшток А.Я., Зоненшайн Л.П., Мур Т.К., Шольц К.А., Клитгорд К.Д. Особенности строения осадочной толщи оз. Байкал по результатам многоканальной сейсмической съемки (1989г.) // Геология и геофизика. 1993. – Т. 34, № 10-11. – С. 25–36.
132. 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.
133. Хлыстов О.М., Земская Т.И., Ситникова Т.Я., Механикова И.В., Кайгородова И.А., Горшков А.Г. и др. Донные битумные постройки и населяющая их биота по данным обследования озера Байкал // ДАН. – 2009. – Т. 428, № 5. – С. 682–685.
134. Хлыстов О.М., Нишио Ш., Манаков А.Ю., Сугияма Х., Хабуев А.В., Белоусов О.В., Грачев М.А. Опыт картирования кровли приповерхностных газовых гидратов озера Байкал и извлечение газа из них // Геология и геофизика. – 2014. – Т. 55, № 9. – С. 1415–1425.
135. Хлыстов О.М., Минами Х., Хачикубо А., Ямашита С., де Батист М., Наудс Л., Хабуев А.В., Ченский А.Г., Губин Н.А., Воробьева С.С. Возраст грязевой брекчии грязевых вулканов Академического хребта озера Байкал // Геодинамика и тектонофизика. – 2017. – Т. 8, № 4. – С. 923–932.

136. Хлыстов О.М., Калмычков Г.В. Байкальские газовые гидраты: история открытия и основные результаты // 30 лет программе «Байкал-бурение» / Отв. ред. Кузьмин М.И., Безрукова Е.В. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2020. – С 278–294.
137. Хлыстов О.М., Вайнер-Кротов А.В., Китаев А.В., Погодаева Т.В. Находки углей Танхойского поля в донных отложениях Южного Байкала // Науки о Земле и недропользование. – 2021. – Т. 44, № 3. – С. 285–292.
138. Хлыстов О.М., Изосимова О.Н., Nachikubo A., Minami H., Макаров М.М., Горшков А.Г. Новый нефтегазовый сип озера байкал // Нефтехимия. – 2022. – Т. 62, № 3. – С. 328–335.
139. Черницына С.М., Земская Т.И., Воробьева С.С., Шубенкова О.В., Хлыстов О.М., Косторнова Т.Я. Сравнительный молекулярный анализ микробных сообществ в голоценовых и плейстоценовых осадках из района Посольской банки (озеро Байкал) // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 116–125.
140. Черницына С.М., Мамаева Е.В., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Галачянц Ю.П., Букин С.В., Пименов Н.В., Хлыстов О.М., Земская Т.И. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ в донных отложениях Посольской банки, оз. Байкал // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 6. – Р. 652–662.
141. Чудецкий М.Ю. Бактерии в нефтяных залежах, хемофоссилии и геохимические типы нефтей // Углеводородные формации в геологической истории. Петрозаводск, 1998. – С. 62–63.
142. Чудецкий М.Ю. Микробиальный генезис изопреноидных хемофоссилии – ключ красшифровке полигенности и вертикальной зональности нефтей // Сб. ИПНГ РАН «Дегазация Земли и генезис углеводородных флюидов и месторождений». – М.: «ГЕОС», 2002. – С.152–170.
143. Шубенкова О.В., Земская Т.И., Черницына С.М., Хлыстов О.М., Трибой Т.И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 370–377.
144. Юсупова А.А. Образование углеводородов-биомаркеров из прокариотов в свете проблемы происхождения нефти. Дисс.... канд. биол. наук. 2021. Москва.
145. Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – V. 176. – P. 670–699.
146. Abrams M.A. Evaluation of near-surface gases in marine sediments to assess subsurface petroleum gas generation and entrapment // Geosciences. – 2017. – V. 7:35.
147. Abu Laban N., Selesi D., Jobelius C., Meckenstock R.U. Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. – 2009. – V. 68. – P. 300–311.
148. Abu Laban N., Selesi D., Rattei T., Tischler P., Meckenstock R.U. Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture // Environ. Microbiol. – 2010. – V. 12. – P. 2783–2796.
149. Adamovich S.N., Ushakov I.A., Vashchenko A.V. Novel guanidinium salts of biologically active (het)arylchalcogenylacetic acids // Mendeleev. Comm. – 2017. – V.27. – P. 88–89.
150. Aeckersberg F., Bak F., Widdel F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium // Arch. Microbiol. – 1991. – V. 156. – P. 5–14.
151. Aeckersberg F., Rainey F.A., Widdel F. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions // Arch. Microbiol. – 1998. – V. 170. – P. 361–369.

152. Ahmed R.Z., Ahmed N., Gadd G.M. Isolation of two *Kocuria* species capable to growing on various polycyclic aromatic hydrocarbons // African Journal of Biotechnology. – 2015. – V. 9. – P. 3611–3617.
153. Albrecht A.G., Peuckert F., Landmann H., Miethke M., Seubert A., Marahiel M.A. Mechanistic characterization of sulfur transfer from cysteine desulfurase SufS to the iron-sulfur scaffold SufU in *Bacillus subtilis* // FEBS Lett. – 2011. – V. 585. – P. 465–470.
154. Alneberg J., Bjarnason B., de Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z. et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // Nat. Methods. – 2014. – V. 11. – P. 1144–1146.
155. Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J., Khabuev A.V., Kazakov A.V., Akhmanov G.G., Khlystov O.M. Biogeochemical processes at the Krasniy Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps // Geo-Marine Letters. – 2019. – V. 39. – P. 59–75.
156. Angiuoli S.V., Gussman A., Klimke W., Cochrane G., Field D., Garrity G.M. et al. Toward an online repository of standard operating procedures (SOPs) for (Meta)genomic annotation // OMICS. – 2008. – V. 12. – P. 137–141.
157. Apps J.A., van de Kamp P.C. Energy gases of abiogenic origin in the Earth's crust // US Geol. Surv. Prof. Paper. – 1993. – V. 1570. – P. 81–132.
158. Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa Á., Palacios-Lidon E., Ortiz A. Domain formation by a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid incorporated into phosphatidylcholine membranes // Biochem. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1768. – P. 2596–2604.
159. Asimakoula S., Marinakos O., Tsagogiannis E., Koukkou A.-I. Phenol degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 // Microorganisms. – 2023. – V. 11:524.
160. Assié A., Leisch N., Meier D.V., Gruber-Vodicka H., Tegetmeyer H.E., Meyerdierks A. et al. Horizontal acquisition of a patchwork Calvin cycle by symbiotic and free-living Campylobacterota (formerly *Epsilonproteobacteria*) // ISME J. – 2020. – V. 14. – P. 104–122.
161. Atlas R.M., Hazen T.C. Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. History // Environ. Sci. Technol. – 2011. – V. 45. – P. 6709–6715.
162. Baker B.J., Saw J.H., Lind A.E., Lazar C.S., Hinrichs K.-U., Teske A.P. et al. Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface Archaea, *Hadesarchaea* // Nat. Microbiol. – 2016. – V. 1. – P. 1–9.
163. Balch W.E., Wolfe R.S. Specificity and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) // J. Bacteriol. – 1979. – V. 137. – P. 256–263.
164. Balkwill D.L., Drake G.R., Reeves R.H., Fredricson J.K., White D.C., Ringelberg D.B. et al. Taxonomic study of aromaticdegrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1997. – V. 47. – P. 191–201.
165. Banks D., Frank Y.A., Kadnikov V.V., Karnachuk O.V., Watts M., Boyce A. et al. Hydrochemical data report from sampling of two deep abandoned hydrocarbon exploration wells: Byelii Yar and Parabel', Tomsk Oblast', Western Siberia, Russian Federation. In: NGU Report, 2014. – Trondheim, Geological Survey of Norway, 2014.
166. Barnes S.P., Bradbrook S.D., Cragg B.A., Marchesi J.R., Weightman A.J., Fry J.C., Parkes R.J. Isolation of sulfate-reducing bacteria from deep sediment layers of the Pacific Ocean // Geomicrobiol. J. – 1998. – V. 15. – P. 67–83.
167. Bar-On Y.M., Phillips R., Milo R. The biomass distribution on Earth // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2018. – V. 15. – P. 6505–6511.



168. Barth T. Organic-acids and inorganic-ions in waters from petroleum reservoirs, Norwegian continental-shelf: a multivariate statistical-analysis and comparison with American reservoir formation waters // *Appl Geochem.* – 1991. – V. 6. – P. 1–15.
169. Bassham J.A., Calvin M. The path of carbon in photosynthesis. In: *Encyclopedia of Plant Physiology* / Ed. Pirson A. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1960.
170. 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 // *Microbiol. Resour. Announc.* – 2018. – V. 20:e01178-18.
171. Batzke A., Engelen B., Sass H., Cypionka H. Phylogenetic and physiological diversity of cultured deep-biosphere bacteria from equatorial Pacific Ocean and Peru Margin sediments // *Geomicrobiol. J.* – 2007. – V. 24. – P. 261–273.
172. Belay N., Daniels L. Ethane production by *Methanosarcina barkeri* during growth in ethanol supplemented medium // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1988. – V. 54. – P. 113–125.
173. Bell E., Blake L.I., Sherry A., Head I.M., Hubert C.R.J. Distribution of thermophilic endospores in a temperate estuary indicate that dispersal history structures sediment microbial communities // *Environ. Microbiol.* – 2018. – V. 20. – P. 1134–1147.
174. Bell E.M., Heuer V.B. The Deep Biosphere: deep subterranean and seafloor habitats. In: *Life at Extremes: environments, organisms and strategies for survival* /Ed. Bell E.M. – CAB Intern., 2012. – P. 554.
175. Bell E., Rattray J.E., Sloan K., Sherry A., Piloni G., Hubert C.R.J. Hyperthermophilic endospores germinate and metabolize organic carbon in sediments heated to 80°C // *Environ. Microbiol.* – 2022a. – V. 24. – P. 5534–5545.
176. Bell E., Lamminmaki T., Alneberg J., Qian C., Xiong W., Hettich R.L., Fruttschi M., Bernier-Latmani R. Active anaerobic methane oxidation and sulfur disproportionation in the deep terrestrial subsurface // *ISME J.* – 2022b. – V. 16. – P. 1583–1593.
177. Beller H.R., Reinhard M., Grbić-Galić D. Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures // *Appl Environ Microbiol.* – 1992. – V. 58. – P. 3192–3195.
178. Beller H.R., Spormann A.M. Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180. – P. 5454–5457.
179. Beller H.R., Spormann A.M. Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – V. 178. – P. 147–153.
180. Berg H.C. The rotary motor of bacterial flagella // *Annu. Rev. Biochem.* – 2003. – V. 72. – P. 19–54.
181. Berg I.A., Kockelkorn D., Ramos-Vera W.H., Say R.F., Zarzycki J., Hügler M., Alber B.E., Fuchs G. Autotrophic carbon fixation in archaea // *Nature Rev. Microbiol.* – 2010. – V. 8. – P. 447–460.
182. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria.* In: Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K., Parte A. (Eds.), Springer-Verlag, New York, 2012. – 2083 p.
183. Berghuis B.A., Yu F.B., Schulz F., Blainey P.C., Woyke T., Quake S.R. Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum *Verstraetearchaeota* reveals the shared ancestry of all methanogens // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2019. – V. 116. – P. 5037–5044.
184. Bernard B.B., Brooks J.M., Sackett W.M. Light hydrocarbons in recent Texas continental shelf and slope sediments // *J. Geophys. Res. Oceans.* – 1978. – V. 83. – P. 4053–4061.

185. Bernard B.B., Brooks J.M., Sackett W.M. Natural gas seepage in the Gulf of Mexico // *Earth Planet. Sci. Lett.* – 1976. – V. 3. – P. 48–54.
186. Berner R.A. Burial of organic carbon and pyrite sulfur in the modern ocean // *American J. Sci.* – 1982. – V. 282. – P. 451–473.
187. Beulig F., Roy H., Glombitza C., Jorgensen B.B. Control on rate and pathway of anaerobic organic carbon degradation in the seabed // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2018. – V. 115. – P. 367–372.
188. Bezrukova E., Bukharov A., Bychinsky V., Fedenya S., Gelety V., Goreglyad A. et al. A new quaternary record of regional tectonic, sedimentation and paleoclimate changes from drill core BDP-99 at Posolskaya Bank, Lake Baikal // *Quat. Int.* – 2005. – V. 136. – P. 105–121.
189. Bicak N. A new ionic liquid: 2-hydroxyethylammonium formate // *J. Mol. Liquids.* – 2005. – V. 116. – P. 15–18.
190. Biddle J.F. Prospects for the study of evolution in the deep biosphere // *Front. Microbiol.* – 2012. – V. 2:285.
191. Biegert T., Fuchs G., Heider J. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – V. 238. – P. 661–668.
192. Blochl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H.W., Stetter K.O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C // *Extremophiles.* – 1997. – V. 1. – P. 14–21.
193. Blumenberg M., Oppermann B., Guyoneaud R. Michaelis W. Hopanoid-production by *Desulfovibrio bastinii* isolated from oilfield formation water // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – V. 293. – P. 73–78.
194. Boetius A.K., Ravenschlag C.J., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A. et al. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // *Nature.* – 2000. – V. 407. – P. 623–626.
195. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. – P. 2114–2120.
196. Boll M., Einsle O., Ermler U., Kroneck P.M., Ullmann G.M. Structure and function of the unusual tungsten enzymes acetylene hydratase and class II benzoyl-coenzyme A reductase // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 26. – P. 119–137.
197. Boll M., Estelmann S., Heider J. Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of hydrocarbon activation in the absence of oxygen. In: *Anaerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids* / Ed. Boll M. – Switzerland: Springer Nature, 2020. – P. 3–29.
198. Boll M., Fuchs G. Benzoyl-Coenzyme A Reductase (Dearomatizing), a Key Enzyme of Anaerobic Aromatic Metabolism. *European Journal of Biochemistry.* – 1995. – V. 234. – P. 921–933.
199. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu. P., Perov A. N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 6143–6151.
200. Bonis B.M., Gralnick J.A. *Marinobacter subterrani*, a genetically tractable neutrophilic Fe(II)-oxidizing strain isolated from the Soudan Iron Mine // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6:719.
201. Boopathy R. Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study // *Bioresour. Technol.* – 2004. – V. 94. – P. 143–151.

202. Boronin A.M., Filonov A.E., Kosheleva I.A., Shkidchenko A.N., Gafarov A.B., Sokolov S.L., Puntus I.F., Grishchenkov V.G., Dmitriev V.V., Arinbasarov M.U. Bioremediation of land oil spills: diversity of microorganisms degrading oil hydrocarbons. In: Brebbia, C.A. (Ed.), WIT Press, Boston, 2002. – P. 169–177.
203. Boronin A.M., Kosheleva I.A. The role of catabolic plasmids in biodegradation of petroleum hydrocarbons. In: G. Cao & R. Orrù (Eds.), *Current Environmental Issues and Challenges*. Springer, Dordrecht, 2014.
204. Borrel G., Adam P.S., Gribaldo S. Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway: An ancient, versatile, and fragile association // *Genome Biol. Evol.* – 2016. – V. 8. – P. 1706–1711.
205. Borrel G., O’Toole P.W., Harris H.M., Peyret P., Brugere J.F., Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis // *Genome Biol. Evol.* – 2013. – V. 5. – P. 1769–1780.
206. Borrel G., Adam P.S., McKay L.J., Chen L.-X., Sierra-García I.N., Sieber C.M.K. et al. Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea // *Nat. Microbiol.* – 2019. – V. 4. – P. 603–613.
207. Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.-Y., Vandecasteele J.-P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – V. 86. – P. 421–428.
208. Boyd E.S., Schut G.J., Shepard E.M., Broderick J.B., Adams M.W.W., Peters J.W. Origin and evolution of Fe-S proteins and enzymes. In: *Iron-sulfur clusters in chemistry and biology* / Ed. Rouault T. – Berlin: De Gruyter, 2014. – P. 619–636.
209. Boyd J.A., Jungbluth S.P., Leu A.O., Evans P.N., Woodcroft B.J., Chadwick G.L. et al. Divergent methyl-coenzyme M reductase genes in a deep-sea floor *Archaeoglobi* // *ISME J.* – 2019. – V. 13:1269.
210. Bradley J.A., Amend J.P., LaRowe D.E. Survival of the fewest: microbial dormancy and maintenance in marine sediments through deep time // *Geobiology.* – 2019. – V. 17. – P. 43–59.
211. Bradley P. History and ecology of chloroethene biodegradation: A review // *Bioremediat. J.* – 2003. – V. 7. – P. 81–109.
212. Brannen-Donnelly K., Engel A.S. Bacterial diversity differences along an epigenic cave stream reveal evidence of community dynamics, succession, and stability // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6:729.
213. Breuker A., Köweker G., Blazejak A., Schippers A. The deep biosphere in terrestrial sediments in the Chesapeake Bay area, Virginia, USA // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2:156.
214. Brodkorb D., Gottschall M., Marmulla R., Lüddecke F., Harder J. Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 30436–30442.
215. Buchfink B., Xie C., Huson D. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND // *Nat. Methods.* – 2015. – V. 12. – P. 59–60.
216. Bueche M., Wunderlin T., Roussel-Delif L., Junier T., Sauvain L., Jeanneret N. et al. Quantification of endospore-forming *Firmicutes* by quantitative PCR with the functional gene *spo0A* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79. – P. 5302–5312.
217. Bukin S.V., Pavlova O.N., Manakov A.Y., Kostyreva 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. – P. 1–18.

218. 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.
219. Bukin S.V., Lomakina A.V., Rusanov I.I., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Kolesnikov P.M., Shubenkova O.V., Zakharenko A.S., Bukin Yu.S., Rodriguez-Valera F., Zemskaya T.I. Structure and metabolic potential of the microbiome of Lake Baikal upper sediment layers determined by metagenome analysis // *Microbiology*. – 2023. – V. 96. – № Suppl.1. – P. 56–62.
220. Bushnell L.D., Haas H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms // *J. Bacteriol.* – 1941. – V. 41. – P. 653–673.
221. Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Zakharenko A.S., Sakirko M.V., Ivanov V.G., Ghai R., Rodriguez-Valera F. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat // *Limnology and Oceanography*. – 2020. – V. 65, № 7. – P. 1471–1488.
222. Cai C., Leu A. O., Xie G.-J., Guo J., Feng Y., Zhao J.-X., et al. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction // *ISME J.* – 2018. – V. 12. – P. 1929–1939.
223. Cai M., Liu Y., Yin X., Zhou Z., Friedrich M.W., Richter-Heitmann T. et al. Diverse Asgard archaea including the novel phylum *Gerdarchaeota* participate in organic matter degradation // *Sci. China Life Sci.* – 2020a. – V. 63. – P. 886–897.
224. Cai M., Richter-Heitmann T., Yin X., Huang W.-C., Yang Y., Zhang C. et al. Ecological features and global distribution of Asgard archaea // *Sci. Total. Environ.* – 2020b:143581.
225. Caldwell E.C., Suflita J.M. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions // *Environ. Sci. Technol.* – 2000. – V. 34. – P. 1216–1220.
226. Callaghan A.V., Gieg L.M., Kropp K.G., Suflita J.M., Young L.Y. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – P. 4274–4282.
227. Callaghan A.V., Warwik B., Chadain S.M.N., Young L.Y., Zylstra G.J. Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 366. – P. 142–148.
228. Carothers W.W., Kharaka Y.K. Aliphatic acid anions in oil-field waters—implications for the origin of natural gas // *Amer. Assoc. Pet. Geol. Bull.* – 1978. – V. 62. – P. 2441–2453.
229. Cesar J., Mayer B., Humez P. A novel isotopic approach to distinguish primary microbial and thermogenic gases in shallow subsurface environments // *Appl. Geochem.* – 2021a. – V. 131:105048.
230. Cesar J., Mayer B., Deblonde C., Mort A., Ardakani O.H. Alternative indicators to assess the distribution characteristics of methane, ethane, and propane derived from petroleum in the montney formation, Western Canada // *Fuel*. – 2021b. – V. 294:120524.
231. Chakraborty A., Ellefson E., Li C., Gittins D., Brooks J.M., Bernard B.B., Hubert C.R.J. Thermophilic endospores associated with migrated thermogenic hydrocarbons in deep Gulf of Mexico marine sediments // *ISME J.* – 2018. – V. 12. – P. 1895–1906.
232. Chakraborty A., Ruff S.E., Dong X., Ellefson E.D., Li C., Brooks J.M. et al. Hydrocarbon seepage in the deep seabed links subsurface and seafloor biospheres // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2020. – V. 117. – P. 11029–11037.
233. Chaney A.L., Marbach E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonium // *Clin. Chem.* – 1962. – V. 8. – P. 130–132.

234. Chang H.W., Bae J.W., Nam Y.D., Kwon H.Y., Park J.R., Shin K.S. et al. *Arthrobacter subterraneus* sp. nov., isolated from deep subsurface water of the South Coast of Korea // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 17. – P. 1875–1879.
235. Chang W.-N., Liu C.-W., Liu H.-S. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis* // Process Biochemistry. – 2009. – V. 44. – P. 955–962.
236. Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. – 2019. – V. 36. – P. 1925–1927.
237. Chen S.C., Musat N., Lechtenfeld O.J., Paschke H., Schmidt M., Said N. et al. Anaerobic oxidation of ethane by archaea from a marine hydrocarbon seep // Nature. – 2019. – V. 568. – P. 108–111.
238. Chernitsyna S., Elovskaya I., Pogodaeva T., Bukin S., Zakharenko A., Zemskaya T. Bacterial communities in a gradient of abiotic factors near a sulfide thermal spring in Northern Baikal // Diversity. – 2023. – V. 15, № 298. – P. 1–15.
239. Chi X., Zhao Z., Han Q., Yan H., Ji B., Chai Y., Li S., Liu K. Insights into autotrophic carbon fixation strategies through metagenomics in the sediments of seagrass beds // Mar. Environ. Res. – 2023. – V. 188:106002.
240. Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J., Culley D.E., Dehal P.S., DeSantis T.Z. et al. Environmental genomics revealed single-species ecosystem deep within Earth // Science. – 2008. – V. 322. – P. 275–278.
241. Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J., Tyson G.W. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning // Nat. Methods. – 2023. – V. 20. – P. 1203–1212.
242. Choi K.K., Park C.W., Kim S.Y., Lyoo W.S., Lee S. H., Lee J.W. Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater // J. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 14. – P. 1009–1013.
243. Choi Y.J., Lee S.Y. Microbial production of short-chain alkanes // Nature. – 2013. – V. 502. – P. 571–574.
244. Chuvochina M., Mussig A.J., Chaumeil P.-A., Skarszewski A., Rinke C., Parks D.H., Hugenholtz P. Proposal of names for 329 higher rank taxa defined in the Genome Taxonomy Database under two prokaryotic codes // FEMS Microbiol. Let. – 2023. – V. 370: fnad071.
245. Ciobanu M.-C., Burgaud G., Dufresne A., Breuker A., Rédou V., Ben Maamar S. et al. Microorganisms persist at record depths in the seafloor of the Canterbury Basin // ISME J. – 2014. – V. 8, № 7. – P. 2352–2352.
246. Cipollone R., Ascenzi P., Tomao P., Imperi F., Visca P. Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 15. – P. 199–211.
247. Claassens N.J., Satanowski A., Bysani V.R., Dronsella B., Orsi E., Rainaldi V., Yilmaz S., Wenk S., Lindner S.N. Engineering the reductive glycine pathway: a promising synthetic metabolism approach for C<sub>1</sub>-assimilation. In: Zeng AP, Claassens NJ (eds). One-carbon feedstocks for sustainable bioproduction. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Springer, 2022. Berlin, Heidelberg. P. 299–350.
248. Claypool G.E. Biogenic ethane-where does it come from? In: American Association of Petroleum Geologists Hedberg Research Conference: Natural Gas Formation and Occurrence, Durango, CO, 1999. – P. 27–29.
249. Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // Limnol. Oceanogr. – 1969. – V. 14. – P. 454–458.

250. Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philp P., Lovley D.R. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 3589–3593.
251. Cole J.K., Gieler B.A., Heisler D.L., Palisoc M.M., Williams A.J., Dohnalkova A.C. et al. *Kallotenuie papyrolyticum* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic and filamentous thermophile that represents a novel lineage (*Kallotenuales* ord. nov., *Kallotenuaceae* fam. nov.) within the class *Chloroflexia* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – V. 63. – P. 4675–4682.
252. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *Appl. Environment. Microbiol.* – 1986. – V. 53. – P. 224–229.
253. Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., von Herzen R.P., Ballard R.D. et al. Submarine thermal springs on the Galapagos Rift // *Science.* – 1979. – V. 203. – P. 1073–1083.
254. Coursolle D., Lian J., Shanklin J., Zhao H. Production of long chain alcohols and alkanes upon coexpression of an acyl-ACP reductase and aldehyde-deformylating oxygenase with a bacterial type-I fatty acid synthase in *E. coli* // *Mol. BioSyst.* – 2015. – V.11. – P.2464–2472.
255. Couto N., Fritt-Rasmussen J., Jensen P.E., Højrup M., Rodrigo A.P., Ribeiro A.B. Suitability of oil bioremediation in an Arctic soil using surplus heating from an incineration facility // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2014. – V. 21. – P. 6221–6227.
256. Cragg B.A., Parkes R.J., Fry J.C., Herbert R.A., Wimpenny J.W., Getliff J.M. Bacterial biomass and activity profiles within deep sediment layers // *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results.* – 1990. – V. 112. – P. 607–619.
257. Crocker F.H., Fredrickson J.K., White D.C., Ringelberg D.B., Balkwill D.L. Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments // *Microbiology.* – 2000. – V. 146. – P. 1295–1310.
258. Cui M., Ma A., Qi H., Zhuang X., Zhuang G. Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process // *Microbiology.* – 2015. – V. 4. – P. 1–11.
259. Cuylaerts M., Naudts L., Casier R., De Batist M., Khabuev A.V., Belousov O.V., Kononov E.E., Khlystov O.M. Distribution and morphology of mud volcanoes and other fluid flow-related lake-bed structures in Lake Baikal, Russia // *Geo-Marine Letters.* – 2012. – V.32. – P.383–394.
260. D’Angelo T., Goordial J., Lindsay M.R., McGonigle J., Booker A., Moser D., Stepanauskus R., Orcutt B.N. Replicated life-history patterns and subsurface origins of the bacterial sister phyla *Nitrospirota* and *Nitrospinota* // *ISME J.* – 2023. – V. 17. – P. 891–902.
261. D’Hondt S., Inagaki F., Zarikian C., Lewis J.A., Dubois N., Engelhardt T. et al. Presence of oxygen and aerobic communities from sea floor to basement in deep-sea sediments // *Nature Geosci.* – 2015. – V. 8. – P. 299–304.
262. D’Hondt S., Rutherford S., Spivack A.J. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments // *Science.* – 2002. – V. 295. – P. 2067–2070.
263. D’Hondt S., Wang G., Spivack A.J. The underground economy (energetic constraints of subseafloor life). In: *Earth and life processes discovered from subseafloor environments* / Eds. Stein R., Blackman D.K., Inagaki F., Larsen M.G. – Elsevier, New York, 2014. – V. 7. – P. 127–148.
264. D’Hondt S., Jørgensen B.B., Miller D.J., Batzke A., Blake R., Cragg B.A., Acosta J.L.S. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science.* – 2004. – V. 306. – P. 2216–2221.
265. D’Hondt S., Pockalny R., Fulfer V.M., Spivack A.J. Subseafloor life and its biogeochemical impacts // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – P. 1–13.
266. Daane L.L., Harjono I., Barns S.M., Launen L.A., Palleron N.J., Häggblom M. M. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a

naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 131–139.

267. Dahle H., Garshol F., Madsen M., Birkeland N.-K. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2007. – V. 93. – P. 37–49.

268. Davidova I.A., Gieg L.M., Nanny M., Kropp K.G., Suflita J. M. Stable isotopic studies of n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterial enrichment culture // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 8174–8182.

269. Davis J.B., Squires R.M. Detection of microbially produced gaseous hydrocarbons other than methane // *Science.* –1954. –V. 119. – P. 381–382.

270. De Anda V., Chen L.-X., Dombrowski N., Hua Z.-S., Jiang H.-C., Banfield J.F., Li W.-J., Baker B.J. *Brockarchaeota*, a novel archaeal phylum with unique and versatile carbon cycling pathways // *Nature Communications.* – 2021. – V. 12:2404.

271. de Rezende J.R., Kjeldsen K.U., Hubert C.R.J., Finster K., Loy A., Jørgensen B.B. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years // *ISME J.* – 2013. – V. 7. – P. 72–84.

272. Decesaro A., Machado T.S., Cappellaro A.C., Reinehr C.O., Thomé A., Colla L.M. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2017. – V. 24. – P. 20831–20843.

273. Dedysh S.N., Knief C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs. In: *Methane biocatalysis: paving the way to sustainability* / Eds. Kalyuzhnaya M.G., Xing X.-H. – Cham, Switzerland, Springer, 2018. – P. 17–42.

274. Dedysh S.N., Yilmaz P. Refining the taxonomic structure of the phylum *Acidobacteria* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2018. – V. 68. – P. 3796–3806.

275. Deep Carbon Observatory. Life in deep Earth totals 15 to 23 billion tons of carbon -- hundreds of times more than humans». 2018. <https://deepcarbon.science>

276. Dehmer J. Petrological and organic geochemical investigation of recent peats with known environments of deposition // *Int. J. Coal Geol.* – 1995. – V. 28. – P. 111–138.

277. DeLong E.F. Archaea in coastal marine environments // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – P. 5685–5689.

278. Dellagnezze B.M., de Vasconcellos S.P., de Melo I.S., de Santos Neto E.V., de Oliveira V.M. Evaluation of bacterial diversity recovered from petroleum samples using different physical matrices // *Braz. J. Microbiol.* – 2016. – V. 47. – P. 712–723.

279. Dembitsky V.M., Rezanka T. Metabolites by nitrogen-fixing *Nostoc* sp. // *Folia Microbiol.* – 2004. – V. 50. – P. 363–391.

280. Denkmann K., Grein F., Zigann R., Siemen A., Bergmann J., van Helmont S., Nicolai A., Pereira I.A.C., Dahl C. Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic c-type cytochrome // *Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 14. – P. 2673–2688.

281. Desai J.D., Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – V. 61. – P. 47–64.

282. Ding J., Ding Z.W., Fu L., Lu Y.Z., Cheng S.H., Zeng R.J. New primers for detecting and quantifying denitrifying anaerobic methane oxidation archaea in different ecological niches // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 99. – P. 9805–9812.

283. Dolfing J., Larter S.R., Head I.M. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation // *ISME J.* – 2008. – V. 2. – P. 442–452.

284. Dong X., Dröge J., von Toerne C., Marozava S., McHardy A.C., Meckenstock R.U. Reconstructing metabolic pathways of a member of the genus *Pelotomaculum* suggesting its potential to oxidize benzene to carbon dioxide with direct reduction of sulfate // FEMS Microbiol. Ecol. – 2016. – V. 62:fiw254.
285. Dong X.Y., Greening C., Rattray J.E., Chakraborty A., Chuvochina M., Mayumi D. et al. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments // Nat. Commun. – 2019. – V. 10:1816.
286. dos Santos Neto E., Hayes J.M., Takaki T. Isotopic biogeochemistry of the Neocomian lacustrine and Upper Aptian marine-evaporitic sediments of the Potiguar Basin, Northeastern Brazil // Org. Geochem. – 1998. – V. 28. – P. 361–381.
287. Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C., Langille M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions // Nat. Biotechnol. – 2020. – V. 38. – P. 685–688.
288. Dow W. Kerogen studies and geological interpretations // J. Geochem. Explor. – 1997. – V. 7. – P. 79–99.
289. Dowell F., Cardman Z., Dasarathy S., Kellermann M.Y., Lipp J.S., Ruff S.E. et al. Microbial communities in methane- and short chain alkane-rich hydrothermal sediments of Guaymas Basin // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7:17.
290. Drake H., Ivarsson M., Bengtson S., Heim C., Siljeström S., Whitehouse M.J., Broman C., Belivanova V., Astrom M.E. Anaerobic consortia of fungi and sulfate reducing bacteria in deep granite fractures // Nature Commun. – 2017. – V. 8:55.
291. Drake H., Roberts N.M.W., Heim C., Whitehouse M.J., Siljeström S., Kooijman E. et al. Timing and origin of natural gas accumulation in the Siljan impact structure, Sweden // Nat. Commun. – 2019. – V. 10:4736.
292. Du R., Gao D., Wang Y., Liu L., Cheng J., Liu J., Zhang X.-H., Yu M. Heterotrophic sulfur oxidation of *Halomonas titanicae* SOB56 and its habitat adaptation to the hydrothermal environment // Front Microbiol. – 2022. – V. 13:888833.
293. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // Bioinformatics. – 2011. – V. 27. – P. 2194–2200.
294. Edwards K.J., Becker K., Colwell F. The deep, dark energy biosphere: intraterrestrial life on Earth // Annu. Rev. Earth Pl. Sci. – 2012. – V. 40. – P. 551–568.
295. Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage // Science. – 2000. – V. 287. – P. 1796–1799.
296. Eiler A. Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – P. 7431–7437.
297. El-Naggar M.Y., Wanger G., Leung K.M., Yuzvinsky T.D., Southam G., Yang J. et al. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – P. 18127–18131.
298. Eschbach M., Möbitz H., Rompf A., Jahn D. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – V. 223. – P. 227–230.
299. Escudero C., Amils R. Hard rock dark biosphere and habitability // Front. Astron. Space Sci. – 2023. – V. 10:1203845.
300. Escudero C., Oggerin M., Amils R. The deep continental subsurface: the dark biosphere // Internat. Microbiol. – 2018. – V. 21. – P. 3–14.



301. Etiope G. Natural emissions of methane from geological seepage in Europe // *Atmos. Environ.* – 2009. – V. 43. – P. 1430–1443.
302. Etiope G., Schoell M. Abiotic gas: atypical, but not rare // *Elements.* – 2014. – V. 10. – P. 291–296.
303. Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M., Schreiber F., Dutilh B.E. et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // *Nature.* – 2010. – V. 464. – P. 543–548.
304. Ettwig K.F., Shima S., van de Pas-Schoonen K.T., Kahnt J., Medema M.H., op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M., Strous M. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea // *Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 10. – P. 3164–3173.
305. Evans P.J., Ling W., Goldschmidt B., Ritter E.R., Young L.Y. Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58. – P. 496–501.
306. Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics // *Science.* – 2015. – V. 350. – P. 434–438.
307. Evans P.N., Boyd J.A., Leu A.O., Woodcroft B.J., Parks D.H., Hugenholtz P., Tyson G.W. An evolving view of methane metabolism in the Archaea // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2019. – V. 17. – P. 219–232.
308. Falkner K.K., Measures C.I., Herbelin S.E., Edmond J.M., Weiss R.F. The major and minor element geochemistry of Lake Baikal // *Limnol. Oceanogr.* – 1991. – V. 36. – P. 413–423.
309. Fan Q., Fan X., Fu P., Sun Y., Li Y., Long S., Guo T., Zheng L., Yang K., Hua D. (2022). Microbial community evolution, interaction, and functional genes prediction during anaerobic digestion in the presence of refractory organics // *J. Environ. Chem. Eng.* – 2022. – V. 10:107789.
310. Fang J., Kato C., Runko G.M., Nogi Y., Hori T., Li J., Morono Y., Inagaki F. Predominance of viable spore-forming piezophilic bacteria in high-pressure enrichment cultures from ~1.5 to 2.4 km-deep coal-bearing sediments below the ocean floor // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8:137.
311. Farag I.F., Biddle J.F., Zhao R., Martino A.J., House C.H., Leon-Zayas R.I. Metabolic potentials of archaeal lineages resolved from metagenomes of deep Costa Rica sediments // *ISME J.* – 2020. – V. 14. – P. 1345–1358.
312. Fardeau M.-L., Barsotti V., Cayol J.-L., Guasco S., Michotey V., Joseph M., Bonin P., Ollivier B. *Caldinitratiruptor microaerophilus*, gen. nov., sp. nov. isolated from a French hot spring (Chaudes-Aigues, Massif Central): a novel cultivated facultative microaerophilic anaerobic thermophile pertaining to the *Symbiobacterium* branch within the *Firmicutes* // *Extremophiles.* – 2010. – V. 14. – P. 241–247.
313. Fenchel T. Motility of bacteria in sediments // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2008. – V. 51. – P. 23–30.
314. Fincker M., Huber J.A., Orphan V.J., Rappé M.S., Teske A., Spormann A.M. Metabolic strategies of marine subseafloor *Chloroflexi* inferred from genome reconstructions // *Environ. Microbiol.* – 2020. – V. 32. – P. 3188–3204.
315. Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – P. D279–D285.
316. Fitch W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology // *Syst. Zool.* – 1971. – V. 20. – P. 406–416.

317. Florentino A.P., Pereira I.A.C., Boeren S., van den Born M., Stams A.J.M., Sánchez-Andrea I. Insight into the sulfur metabolism of *Desulfurella amilsii* by differential proteomics // Environ. Microbiol. – 2019. – V. 21. – P. 209–225.
318. Forschner S.R., Sheffer R., Rowley D.C., Smith D.C. Microbial diversity in Cenozoic sediments recovered from the Lomonosov Ridge in the Central Arctic Basin // Environ. Microbiol. – 2009. – V. 11, № 3. – P. 630–639.
319. Frank Y.A., Kadnikov V.V., Gavrillov S.N., Banks D., Gerasimchuk A.L., Podosokorskaya O.A. et al. Stable and variable parts of microbial community in siberian deep subsurface thermal aquifer system revealed in a long-term monitoring study // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7:2101.
320. Fredrickson J.K., McKinley J.P., Nierzwicki-Baue S.A., White D.C., Ringelberg D.B., Rawson S.A. et al. Microbial community structure and biogeochemistry of Miocene subsurface sediments: implications for long-term microbial survival // Mol. Ecol. – 1995. – V. 4. – P. 619–626.
321. Fredrickson J.K., Onstott T.C. Microbes deep inside the Earth // Sci. Am. – 1996. – V. 275. – P. 68–73.
322. Fredrickson J.K., McKinley J.P., Bjornstad B.N., Long P.E., Ringelberg D.B., White D.C. et al. Pore-size constraints on the activity and survival of subsurface bacteria in a late cretaceous shale-sandstone sequence, northwestern New Mexico // Geomicrobiol. J. – 1997. – V. 14. – P. 183–202.
323. Frias J.A., Richman J.E., Wackett L.P. C29 olefinic hydrocarbons biosynthesized by arthrobacter species // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75, № 6. – P. 1774.
324. Froelich P.N., Klinkhammer G.P., Bender M.L., Luedtke N.A., Heath G.R. et al. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis // Geochim. Cosmochim. Acta. – 1979. – V. 43, № 7. – P. 1075–1090.
325. Fry J.C., Parkes R.J., Cragg B.A., Weightman A.J., Webster G. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere // FEMS Microbiol. Ecol. – 2008. – V. 66, № 2. – P. 181–196.
326. Fuchs G., Boll M., Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four // Nat. Rev. Microbiol. – 2011. – V. 9. – P. 803–816.
327. Fukuda H., Ogawa T., Tranase S. Ethylene production by microorganisms // Adv. Microbial Physiology. – 1993. – V. 35. – P. 275–306.
328. Fukuda E., Wakagi T. Substrate recognition by 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from *Sulfolobus* sp. strain 7 // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – V. 1597. – P. 74–80.
329. Fulton P.M., Brodsky E.E., Kano Y., Mori J., Chester F., Ishikawa T. et al. Expedition 343, 343T, and KR13-08 Scientists. Low coseismic friction on the Tohoku-Oki fault determined from temperature measurements // Science. – 2013. – V. 342. – P. 1214–1217.
330. Funk M.A., Marsh E.N., Drennan C.L. Substrate-bound structures of benzylsuccinate synthase reveal how toluene is activated in anaerobic hydrocarbon degradation // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – P. 22398–22408.
331. Galushko A., Kuever J. *Desulfobacca*. In: Bergey's Manual of Systematics of *Archaea* and *Bacteria*. Eds.: Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. 2019.
332. Gavrillov S., Podosokorskaya O., Alexeev D., Merkel A., Khomyakova M., Muntyan M. et al. Respiratory pathways reconstructed by multi-omics analysis in *Melioribacter roseus*, residing in a deep thermal aquifer of the West-Siberian Megabasin // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8:1228.

333. Giovannelli D., Sievert S.M., Hügler M., Dorte S.M., Schweder B.T., Vetriani C. Insight into the evolution of microbial metabolism from the deep-branching bacterium, *Thermovibrio ammonificans* // eLife. – 2017.
334. Gittel A., Sørensen K.B., Skovhus T.L., Ingvorsen K., Schramm A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – P.7086–7096.
335. Gittins D.A., Desiage P. A., Morrison N., Rattray J.E., Bhatnagar S., Chakraborty A., Zorz J., Li C., Horanszky O., Cramm M.A., Bisiach F., Bennett R., Webb J., MacDonald A., Fowler M., Campbell D.C., Hubert C.R.J. Geological processes mediate a microbial dispersal loop in the deep biosphere // Sci. Adv. – 2022. – V. 8:3485.
336. Gittins D.A., Bhatnagar S., Huber, C.R.J. Environmental selection and biogeography shape the microbiome of subsurface petroleum reservoirs // MSystems. – 2023. – V. 8:00884-22.
337. Gößner A.S., Devereux R., Ohnemüller N., Acker G., Stackebrandt E., Drake H.L. *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica* // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 5124–5133.
338. Gold T. The deep, hot biosphere // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 6045–6049.
339. Goldblatt C., Zahnle K.J. Faint young Sun paradox remains // Nature. – 2011. – V. 474:E1.
340. Golubev V.A. Conductive and convective heat flow in the bottom of Lake Baikal and in the surrounding mountains // Bulletin des Centres de Recherches Exploration Production Elf Aquitaine. – 1998. – P. 323–340.
341. Gonnella G., Böhnke S., Indenbirken D., Garbe-Schönberg D., Seifert R., Mertens C., Kurtz S., Perner M. Endemic hydrothermal vent species identified in the open ocean seed bank // Nature Microbiol. – 2016. – V. 1:8.
342. Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities // Int J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57. – P. 81–91.
343. Gorshkov A.G., Grachev M.A., Zemskaya T.I., Khlystov O.M., Moskvina V.I. Oil in Lake Baikal, paradox or regularity? // International Congress on Analytical Science. – 2006. – V. 1. – P. 375–376.
344. 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. – P. 115–122.
345. 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.
346. Gottschalk G., Thauer R.K. The Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea // BBA-Bioenergetics. – 2001. – V. 1505. – P. 28–36.
347. Govil T., Rathinam N.K., Salem D.R., Sani R.K. Taxonomical diversity of extremophiles in the deep biosphere. In: Microbial diversity in the genomic era / Eds. Das S., Dash H.R. – Academic Press, 2019. – P. 631–656.
348. Grachev M.A., Vorobyova S.S., Likhoshway E.V., Goldberg E.L., Ziborova G.A., Levina O.V., Khlystov O.M. A high-resolution diatom record of the palaeoclimates of East Siberia for the last 2.5 my from Lake Baikal // Quaternary Sci. Rev. – 1998. – № 17. – P. 1101–1106.

349. Granin N.G., Makarov M.M., Kucher K.M., Gnatovsky R.Y. Gas seeps in Lake Baikal – detection, distribution, and implications for water column mixing // *Geo-Mar. Lett.* – 2010. – V. 30. – P. 399–409.
350. Granina L.Z. Ferromanganese formation in Lake Baikal: formation conditions, composition, distribution // *International Project on Paleolimnology and Late Cenozoic Climate. IPPCCE Newsletter.* – 1992. – V. 6. – P. 39–47.
351. Granina L.Z., Karabanov E.B., Shimaraeva M.K., Williams D.F., Kuptsov V.M. Biogenic silica of Baikal bottom sediments used for paleoreconstructions // *International Project on Paleolimnology and Late Cenozoic Climate. IPPCCE Newsletter.* – 1992. – V. 6. – P. 52–59.
352. Gray N.D., Sherry A., Grant R.J., Rowan A.K., Hubert C.R.J., Callbeck C.M. The quantitative significance of Syntrophaceae and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes // *Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 13. – P. 2957–2975.
353. Grundmann O., Behrends A., Rabus R., Amann J., Halder T., Heider J., Widdel F. Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1 // *Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 10. – P. 376–385.
354. Gunsalus R.P., Romesser J.A., Wolfe R.S. Preparation of coenzyme M analogues and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum* // *Biochemistry.* – 1978. – V. 17. – P. 2374–2377.
355. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics.* – 2013. – V. 29. – P. 1072–1075.
356. Hachikubo A., Minami H., Yamashita S., Khabuev A., Krylov A., Kalmychkov G., Poort J., De Batist M., Chenskiy A., Manakov A., Khlystov O. Characteristics of hydrate-bound gas retrieved at the Kedr mud volcano (southern Lake Baikal) // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10. – P. 1–2.
357. Hachikubo A., Minami H., Sakagami H., Yamashita S., Krylov A., Kalmychkov G., Poort J., Batist M., Manakov A., Khlystov O. Characteristics and varieties of gases enclathrated in natural gas hydrates retrieved at Lake Baikal // *Sci. Rep.* – 2023. – V. 13:4440.
358. Hahn C.J., Laso-Pérez R., Vulcano F., Vaziourakis K.M., Stokke R., Steen I.H. et al. *Candidatus Ethanoperedens*, a thermophilic genus of Archaea mediating the anaerobic oxidation of ethane // *mBio.* – 2020. – V. 11:e00600-20.
359. Hallbeck L., Pedersen K. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield // *Appl. Geochem.* – 2008. – V. 23. – P. 1796–1819.
360. Hamada Y., Hirose T., Ijiri A., Yamada Y., Sanada Y., Saito S. et al. In-situ mechanical weakness of subducting sediments beneath a plate boundary décollement in the Nankai Trough // *Prog. Earth Planet. Sci.* – 2018. – V. 5:70.
361. Hamdan L.J., Sikaroodi M., Gillevet P.M. Bacterial community composition and diversity in methane charged sediments revealed by multitag pyrosequencing // *Geomicrobiol. J.* – 2012. – V. 29. – P. 340–351.
362. Han C., Gu W., Zhang X., Lapidus A., Nolan M., Copeland A., Lucas S., Del Rio T.G. et al. Complete genome sequence of *Thermaerobacter marianensis* type strain (7p75a) // *Stand. Genom. Sci.* – 2010. – V. 3. – P. 337–345.
363. Harayama S., Kok M., Neidle E.L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1992. – V. 46. – P. 565–601.
364. Harger M., Zheng L., Moon A., Ager C., An J.H., Choe C. et al. Expanding the product profile of a microbial alkane biosynthetic pathway // *ACSSynthBiol.* – 2013. – V.2. – P. 59–62.

365. Haro Moreno J.M., Cabello Yeves P.J., Garcillán Barcia M.P., Zakharenko A., Zemskaya T.I., Rodriguez Valera F. A novel and diverse group of *Candidatus* Patescibacteria from bathypelagic Lake Baikal revealed through long-read metagenomics // *Environ. Microbiome.* – 2023. – V. 18:12.
366. Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // *Nature.* – 2013. – V. 500. – P. 567–570.
367. Harris J.K., Kelley S.T., Pace N.R. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. – P. 845–849.
368. Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway // *FEMS Microbiol Rev.* – 1998. – V. 22. – P. 439–458.
369. Hautevelle Y., Michels R., Malartre F., Trouiller A. Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France) // *Org. Geochem.* – 2006. – V. 37. – P. 610–625.
370. Head I.M., Jones D.M., Larter S.R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil // *Nature.* – 2003. – V. 426. – P. 344–352.
371. Head I.M., Larter S.R., Gray N.D., Sherry A., Adams J.J., Aitken C.M., Jones D.M., Rowan A.K., Huang H., Roling W.F.M. Hydrocarbon degradation in petroleum reservoirs. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* / Ed. Timmis K.N. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – P. 3097–3109.
372. Hedges J.I., Keil R.G. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis // *Mar. Chem.* – 1995. – V. 49. – P. 81–115.
373. Heidelberg J., Seshadri R., Haveman S., Hemme C.L., Paulsen I.T., Kolonay J.F. et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – P. 554–559.
374. Heider J. Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2007. – V. 11. – P. 188–194.
375. Heider J., Schühle K. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. In: *The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry* / Eds. Rosenberg E., Delong E., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. – Springer, Heidelberg, 2013. – P. 601–630.
376. Heider J., Szaleniec M., Sünwolfdt K., Boll M. Ethylbenzene dehydrogenase and related molybdenum enzymes involved in oxygen-independent alkyl chain hydroxylation // *J. Mol. Microbiol.* – 2016a. – V. 26. – P. 45–62.
377. Heider J., Szaleniec M., Martins B.M., Seyhan D., Buckel W., Golding B.T. Structure and function of benzylsuccinate synthase and related fumarate-adding glycyl radical enzymes // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2016b. – V. 26. – P. 29–44.
378. Helz G.R., Miller C.V., Charnock J.M., Mosselmans J.F.W., Patrick R.A.D., Garner C.D., Vaughan D.J. Mechanism of molybdenum removal from the sea and its concentration in black shales: EXAFS evidence // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 1996. – V. 60. – P. 3631–3642.
379. Hentati D., Cheffi M., Hadrich F., Makhloufi N., Rabanal F., Manresa A., Sayadi S., Chamkha M. Investigation of halotolerant marine *Staphylococcus* sp. CO100, as a promising hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacterium, under saline conditions // *J. Environ. Management.* – 2021. – V. 277:111480.
380. Herath A., Wawrik B., Qin Y., Zhou J., Callaghan A.V. Transcriptional response of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 to growth on alkanes: insights from RT-qPCR and microarray analyses // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2016. – V. 92:fiw062.

381. Heuer V.B., Pohlman J.W., Torres M.E., Elvert M., Hinrichs K.-U. The stable carbon isotope biogeochemistry of acetate and other dissolved carbon species in deep subseafloor sediments at the northern Cascadia Margin // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 2009. – V. 73. – P. 3323–3336.
382. Heuer V.B., Inagaki F., Morono Y., Kubo Y., Spivack A.J., Viehweger B., Treude T. et al. Temperature limits to deep subseafloor life in the Nankai Trough subduction zone // *Science.* – 2020. – V. 370, №. 6512. – P. 1230–1234.
383. Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Zafra G., de Oliveira V.M. Genome-resolved meta-analysis of the microbiome in oil reservoirs worldwide // *Microorganisms.* – 2021. – V. 9:1812.
384. Hilberg M., Pierik A.J., Bill E., Friedrich T., Lippert M., Heider J. Identification of FeS clusters in the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase via EPR and Mossbauer spectroscopy // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2012. – V. 17. – P. 49–56.
385. Hinrichs K.-U., Hayes J.M., Sylva S.P., Brewer P.G., DeLong E.F. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments // *Nature.* – 1999. – V. 398. – P. 802–805.
386. Hinrichs K.-U., Hayes J.M., Bach W., Spivack A.J., Hmelo L.R., Holms N.G., Johnson C.G., Sylva S.P. Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface // *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* – 2006. – V. 103. – P. 14684–14689.
387. Hodges C.F., Campbell D.A. Gaseous hydrocarbons associated with black layer induced by the interaction of cyanobacteria and *Desulfovibrio desulfuricans* // *Plant and Soil.* – 1998. – V. 205. – P. 77–83.
388. Hoehler T.M. Biological energy requirements as quantitative boundary conditions for life in the subsurface // *Geobiology.* – 2004. – V. 2. – P. 205–215.
389. Hoehler T.M., Alperin M.J., Albert D.B., Martens C.S. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments // *Geochim Cosmochim Acta.* – 1998. – V. 62. – P. 1745–1756.
390. Hoehler T.M., Jørgensen B.B. Microbial life under extreme energy limitation // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11, № 2. – P. 83–94.
391. Holler T., Widdel F., Knittel K., Amann R., Kellermann M.Y., Hinrichs K.-U., Teske A., Boetius A., Wegener G. Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia // *ISME J.* – 2011. – V. 5. – P. 1946–1956.
392. Hong H., Kim S.J., Min U.G., Lee Y.J., Kim S.G., Roh S.W., Kim J.G., Na J.G., Rhee S.K. *Anaerosolibacter carboniphilus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic iron-reducing bacterium isolated from coal-contaminated soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2015. – V. 65. – P. 1480–1485.
393. Horsfield B., Schenk H., Zink K., Ondrak R., Dieckman V.N, Kallmeyer J. et al. Living microbial ecosystems within the active zone of catagenesis: implications for feeding the deep biosphere // *Earth Planet. Sci. Lett.* – 2006. – V. 246, 1–2. – P. 55–69.
394. Hoshino T., Inagaki F. Abundance and distribution of Archaea in the subseafloor sedimentary biosphere // *ISME J.* – 2019. – V. 13. – P. 227–231.
395. Hoshino T., Morono Y., Terada T., Imachi H., Ferdelman T.G., Inagaki F. Comparative study of subseafloor microbial community structures in deeply buried coral fossils and sediment matrices from the Challenger Mound in the Porcupine Seabight // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2:160.
396. Hoshino T., Toki T., Ijiri A., Morono Y., Machiyama H., Ashi J., Okamura K., Inagaki F. Atribacteria from the subseafloor sedimentary biosphere disperse to the hydrosphere through submarine mud volcanoes // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8:1135.

397. Hoshino T., Doi H., Uramoto G.-I., Wormer L., Adhikari R.R., Xiao N. et al. Global diversity of microbial communities in marine sediment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2020. – V. 117, № 44. – P. 27587–27597.
398. Hou J., Wang Y., Zhu P., Yang N., Liang L., Yu T., Niu M., Konhauser K., Woodcroft B. J., Wang, F. Taxonomic and carbon metabolic diversification of *Bathymarchaeia* during its coevolution history with early Earth surface environment // Sci. Adv. – 2023. – V. 9:eadf5069.
399. Howard T.P., Middelhaufe S., Moore K., Edner C., Kolak D.M., Taylor G.N. Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2013. – V.110. – P.7636–7641.
400. Hu P., Tom L., Singh A., Thomas B.C., Baker B.J., Piceno Y.M. et al. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs //mBio. – 2016. – V.7:e01669–15.
401. Hua Z.S., Qu Y.N., Zhu Q., Zhou E.M., Qi Y.L., Yin Y.R., Rao Y.Z., Tian Y., Li Y.X., Liu L., Castelle C.J., Hedlund B.P., Shu W.S., Knight R., Li W.J. Genomic inference of the metabolism and evolution of the archaeal phylum Aigarchaeota // Nat. Commun. – 2018. V. 9: 2832.
402. Hua Z.S., Wang Y.L., Evans P.N., Qu Y.N., Goh K.M., Rao Y.Z. et al. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring *Archaea* // Nat. Commun. – 2019. – V.10. – P. 4574.
403. Huang W.C., Liu Y., Zhang X., Zhang C.J., Zou D., Zheng S., Xu W., Luo Z., Liu F., Li M. Comparative genomic analysis reveals metabolic flexibility of *Woesearchaeota* // Nat. Commun. – 2021. – V. 6:5281.
404. Huber R., Stetter K.O. The Procaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer-Verlag New York. 2004.
405. Hubert C., Loy A., Nickel M., Arnosti C., Baranyi C., Brüchert V. et al. A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold Arctic seabed // Science. – 2009. – V. 325. – P. 1541–1544.
406. Hubert C., Arnosti C., Brüchert V., Loy A., Vandieken V., Jørgensen B.B. Thermophilic anaerobes in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. Environ Microbiol. – 2010. – V. 12. – P. 1089–10104.
407. Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L., Pace N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180. – P. 366–376.
408. Hungate R.E. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes // Methods in Microbiology / Eds. Norris J.L., Ribbons D.W. – New York, Academic Press, 1969. –V. 3b. – P. 117–132.
409. Hunt J.M., Freeman W.H. Petroleum geochemistry and geology. – New York, W.H. Freeman and Company, 1996. – 743 pp.
410. Hutchinson D.R., Golmshtok A.J., Scholz C.A., Moore T.C., Lee M.W., Kuzmin M.I. Bottom simulating reflector in Lake Baikal // Eos Trans. AGU: Spring Meeting. – 1991. – V. 72(17.42C-10.1600h). – P. 307.
411. Hutchinson D., Golmshtok A., Zonenshain L., Moore T., Scholz C., Klitgord K. Depositional and tectonic framework of the rift basin of Lake Baikal from multichannel seismic data // Geology. – 1992. – V. 20:589.
412. Hyatt D., Chen G.L., LoCascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification // BMC Bioinform. – 2010. – V. 11:119.

413. Ijiri A., Inagaki F., Kubo Y., Adhikari R.R., Hattori S., Hoshino T., Imachi H. et al. Deep-biosphere methane production stimulated by geofluids in the Nankai accretionary complex // *Sci. Adv.* – 2018. – V. 4:eaao4631.
414. Illades-Aguilar B., Setlow P. Studies of the processing of the protease which initiates degradation of small, acid-soluble proteins during germination of spores of *Bacillus* species // *J. Bacteriol.* – 1994. – V. 176. – P. 2788–2795.
415. Imachi H., Sakai S., Lipp J.S., Miyazaki M., Satio Y., Yamanaka Y., Hinrichs K.U., Inagaki F., Takai K. *Pelolinea submarina* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, filamentous bacterium of the phylum *Chloroflexi* isolated from subseafloor sediment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2014. – V. 64. – P. 812–818.
416. Inagaki F., Suzuki M., Takai K., Oida H., Sakamoto T., Aoki K., Neelson K.H., Horikoshi K. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, № 12. – P. 7224–7235.
417. Inagaki F., Nunoura T., Nakagawa S., Teske A., Lever M., Lauer A. et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103, № 8. – P. 2815–2820.
418. Inagaki F., Hinrichs K.-U., Kubo Y., Bowles M.W., Heuer V.B., Hong W.-L. et al. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to 2.5 km below the ocean floor // *Science.* – 2015. – V. 349. – P. 420–424.
419. Inan K., Belduz A.O., Canakci S. *Anoxybacillus kaynarcensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylanase producing bacterium. *J. Bas. Microbiol.* – 2012. – V. 52. – P. 1–10.
420. Isaksen M.F., Bak F., Jørgensen B.B. Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediments // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1994. – V. 14. – P. 1–8.
421. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation. In: *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications* / Ed. Kurtböke I. Elsevier, New York. – 2017. – P. 121–148.
422. Jaekel U., Musat N., Adam B., Kuypers M., Grundmann O., Musat F. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps // *ISME J.* – 2013. – V. 7. – P. 885–895.
423. Jaenicke R., Böhm G. The stability of proteins in extreme environments // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – V. 8, № 6. – P. 738–748.
424. Jakobsen R. Redox microniches in groundwater: a model study on the geometric and kinetic conditions required for concomitant Fe oxide reduction, sulfate reduction, and methanogenesis // *Water Res.* – 2007. – V. 43.
425. Jannasch H.W., Eimhjellen K., Farmanfarmaian A. Microbial degradation of organic matter in the deep sea // *Science.* – 1971. – V. 171. – P. 672–675.
426. Jansen S., Walpersdorf E., Werner U. et al. Functioning of intertidal flats inferred from temporal and spatial dynamics of O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S and pH in their surface sediment // *Ocean Dynamics.* – 2009. – V. 59. – P. 317–332.
427. Jiao J.Y., Liu L., Hua Z.S., Fang B.Z., Zhou E.M., Salam N., Hedlund B.P., Li W.J. Microbial dark matter coming to light: challenges and opportunities // *Natl. Sci. Rev.* – 2021. – V. 8:nwaa280.
428. Jones A.A., Bennett P.C. Mineral ecology: surface specific colonization and geochemical drivers of biofilm accumulation, composition, and phylogeny // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8.



429. Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F.J., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs // *Nature*. – 2008. – V. 451. – P. 176–180.
430. Jorgensen B.B. *Bacteria and Marine Biogeochemistry*. In: *Marine Geochemistry* / Eds. Schulz H.D., Zabel M. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. – P. 173–207.
431. Jorgensen B.B., Boetius A. Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 5. – P. 770–783.
432. Jorgensen B.B., Marshall I.P. Slow microbial life in the seabed // *Annu. Rev. Mar. Sci.* – 2016. – V. 8. – P. 311–332.
433. Jorgensen S.L., Hannisdal B., Lanzen A., Baumberger T., Flesland K., Fonseca R. et al. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – V. 109. – P. 2846–2855.
434. Joye S.B. The geology and biogeochemistry of hydrocarbon seeps // *Annu. Rev. Mar. Sci.* – 2020. – V. 48. – P. 205–231.
435. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2012. – V. 79. – P. 348–358.
436. Kadnikov V.V., Lomakina A.V., Likhoshvai A.V., Gorshkov A.G., Pogodaeva T.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V. Composition of the microbial communities of bituminous constructions at natural oil seeps at the bottom of Lake Baikal // *Microbiology*. – 2013. – V. 82. – P. 373–382.
437. Kadnikov V.V., Frank Y.A., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Metagenome of the Siberian underground water reservoir // *Genome Announc.* – 2017. – V. 5:e01317-17.
438. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle // *Extremophiles*. – 2019. – V. 23. – P. 189–200.
439. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Banks D., Pimenov N.V., Frank Y.A., Karnachuk O.V., Ravin N.V. A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2018. – V. 94.
440. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Prokaryotic life associated with coal-fire gas vents revealed by metagenomics // *Biology (Basel)*. – 2023. – V. 12:723.
441. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Microbial life in the deep subsurface aquifer illuminated by metagenomics // *Front. Microbiol.* – 2020a. – V. 11.
442. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Complete genome of a member of a new bacterial lineage in the Microgenomates group reveals an unusual nucleotide composition disparity between two strands of DNA and limited metabolic potential // *Microorganisms*. – 2020b. – V. 8:320.
443. Kageyama H., Waditee-Sirisattha R., Sirisattha S., Tanaka Y., Mahakhant A., Takabe T. Improved alkane production in nitrogen-fixing and halotolerant cyanobacteria via abiotic stresses and genetic manipulation of alkane synthetic genes // *Curr. Microbiol.* – 2015. – V. 71. – P. 115–120.

444. Kallmeyer J., Pockalny R., Adhikari R.R., Smith D.C., D'Hondt S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. – P. 16213–16216.
445. Kampmann K., Ratering S., Kramer I., Schmidt M., Zerr W., Schnell S. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78. – P. 2106–2119.
446. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucleic Acids Res. 2000. – V. 28. – P. 27–30.
447. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. – 2016. – V. 428. – P. 726–731.
448. Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. MetaBAT 2: An adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies // Peer J. – 2019. – V.7:e7359.
449. Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME J. – 2019. – V. 13. – P. 1947–1959.
450. Karnachuk O., Lukina A., Kadnikov V., Sherbakova V., Beletsky A., Mardanov A., Ravin N. Targeted isolation based on metagenome-assembled genomes reveals a phylogenetically distinct group of thermophilic spirochetes from deep biosphere // Environ. Microbiol. – 2021. – V. 23.
451. Karnachuk O.V., Rusanov I.I., Panova I.A., Kadnikov V.V., Avakyan M.R., Ikkert O.P., Lukina A.P., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Knyazev Y.V., Volochaev M.N., Pimenov N.V., Ravin N.V. The low-temperature germinating spores of the thermophilic *Desulfofundulus* contribute to an extremely high sulfate reduction in burning coal seams // Front. Microbiol. – 2023. – V.14:1204102.
452. Karnachuk O.V., Lukina A.P., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Begmatov S., Beletsky A.V., Vlasova K.G., Novikov A.A., Shcherbakova V.A., Mardanov A.V., Ravin N.V. Novel thermophilic genera *Geochorda* gen. nov. and *Carboxydochorda* gen. nov. from the deep terrestrial subsurface reveal the ecophysiological diversity in the class *Limnochordia* // Front Microbiol. – 2024. – V. 15:1441865.
453. Kasting J.F., Siefert J.L. Life and the evolution of Earth's atmosphere // Science. – 2002. – V. 296. – P. 1066–1068.
454. Kelly D.P., Rainey F.A., Wood A.P. The Genus *Paracoccus*. In: The Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. – NY: Springer, New York, 2006.
455. Kendall M.M. *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – V. 56, № 7. – P. 1525–1529.
456. Khlystov O., De Batist M., Shoji H., Hachikubo A., Nishio S., Naudts L., Poort J., Khabuev A., Belousov O., Manakov A., Kalmychkov G. Gas hydrate of Lake Baikal: discovery and varieties // J. Asian Earth Sci. – 2013. – V. 62, № 1. – P. 162–166.
457. Khlystov O.M., Khabuev A.V., Minami H., Hachikubo A., Krylov A.A. Gas hydrates in Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. – 2018. – V.1. – P. 66–70.
458. Khlystov O.M., Poort J., Mazzini A., Akhmanov G.G., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A.B., Kazakov A.V., De Batist M., Naudts L., Chenskiy A.G., Vorobeva S.S. Shallow-rooted mud volcanism in Lake Baikal // Mar. Pet Geol. – 2019. – V. 102. – P. 580–589.

459. Khlystov O.M., Batist M., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A.V., Kazakov A.V. The position of gas hydrates in the sedimentary strata and in the geological structure of Lake Baikal // World atlas of submarine gas hydrates in continental margins / Eds. Mienert J., Berndt C., Tréhu A.M., Camerlenghi A., Liu C.S. Cham: Springer, 2022. P. 465–515.
460. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Mamiy D.D., Klyukina A.A., Slobodkin A.I. Phenotypic and genomic characterization of *Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., a cultivated representative of the archaeal class *Bathyarchaeia* // Front. Microbiol. – 2023. – V. 14. Art. 1214631.
461. Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhтерева V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // Front. Microbiol. – 2022. – V. 13:1047580.
462. Khot V., Zorz J., Gittins D.A., Chakraborty A., Bell E., Bautista M.A. et al. CANT-HYD: a curated database of phylogeny-derived hidden Markov models for annotation of marker genes involved in hydrocarbon degradation // Front. Microbiol. – 2022. – V. 12.
463. Kieft T.L. Microbiology of the deep continental biosphere. In: Their world: a diversity of microbial environments. Advances in environmental microbiology / Ed. Hurst C. – Springer, Cham, 2016. – P. 225–249.
464. Kieft T.L., Fredrickson J.K., McKinley J.P., Bjornstad B.N., Rawson S.A., Phelps T.J. et al. Microbiological comparisons within and across contiguous lacustrine, paleosol, and fluvial subsurface sediments // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61. – P. 749–757.
465. Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Internat. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2014. – V. 64. – P. 1825–1825.
466. King G.M., Kostka J.E., Hazen T.C., Sobocky P. Microbial responses to the Deepwater Horizon Oil Spill: from coastal wetlands to the deep sSea // Annu. Rev. Mar. Sci. – 2015. – V. 7. – P. 377–401.
467. Kirkpatrick J.B., Walsh E.A., D'Hondt S. Microbial selection and survival in subseafloor sediment // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 956.
468. Klerkx J., De Batist M., Poort J., Hus R., Van Rensbergen P., Khlystov O.M. et al. Tectonically controlled methane escape in Lake Baikal. Advances in the geological storage of carbon dioxide // NATO Sci. Ser., IV. Earth and Environ. Sci. – 2006. – V. 65. – P. 203–219.
469. Klotz F., Kitzinger K., Ngugi D.K., Büsing P., Littmann S., Kuypers M.M.M., Schink B., Pester M. Quantification of archaea-driven freshwater nitrification from single cell to ecosystem levels // The ISME Journal. – 2022. – V. 16. – P. 1647–1656.
470. Knack D., Hagel C., Szaleniec M., Dudzik A., Salwinski A., Heider J. Substrate and inhibitor spectra of ethylbenzene dehydrogenase: perspectives on application potential and catalytic mechanism // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78. – P. 6475–6482.
471. Kniemeyer O., Heider J. Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276. – P. 21381–21386.
472. Kniemeyer O., Musat F., Sievert S.M., Knittel K., Wilkes H., Blumenberg M. et al. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria // Nature. – 2007. – V. 449. – P. 898–901.
473. Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // Annu. Rev. Microbiol. – 2009. – V. 63. – P. 311–334.

474. Kobayashi T., Koide O., Mori K., Shimamura S., Matsuura T., Miura T. et al. Phylogenetic and enzymatic diversity of deep seafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula // *Extremophiles*. – 2008. – V. 12. – P. 519–527.
475. Kodner R.B., Pearson A., Summons R.E., Knoll A.H. Sterols in red and green algae: quantification, phylogeny, and relevance for the interpretation of geologic steranes // *Geobiology*. – 2008. – V. 6. – P. 411–420.
476. Koene-Cottaar F.H.M., Schraa G. Anaerobic reduction of ethane to ethane in an enrichment culture // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1998. – V. 25. – P. 251–256.
477. Köhler J.M., Ehrhardt L., Günther P.M. Archaeal and extremophilic bacteria from different archaeological excavation sites // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24:5519.
478. Kojima H., Fukui M. *Sulfuricella denitrificans* gen. nov., sp. nov., a sulfur-oxidizing autotroph isolated from a freshwater lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – V. 60. – P. 2862–2866.
479. Konstantinidis K.T., Rosselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // *ISME J.* – 2017. – V. 11. – P. 2399–2406.
480. Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation // *Genome Res.* – 2017. – V. 27. – P. 722–736.
481. Kostenko V., John Martinuzzi R., Hareland G. Impact of oil-based drilling fluids emulsification on tolerance and hydrocarbon-degrading potential of *Ralstonia pickettii* and *Alcaligenes piechandii* // *J. Pet. Environ. Biotechnol.* – 2013. – V. 4:2.
482. Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform // *Appl. Environ. Microb.* – 2013. – V. 79. – P. 5112–5120.
483. Kretschmer A., Bock H., Wagner F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1982. – V. 44, № 4. – P. 864–870.
484. Krukenberg V., Harding K., Richter M., Glöckner F.O., Gruber-Vodicka H.R., Adam B. et al. *Desulfotomaculum auxilii*, a hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium involved in the thermophilic anaerobic oxidation of methane // *Environ. Microbiol.* – 2016. – V. 18. – P. 3073–3091.
485. Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – V. 35. – P. 1547–1549.
486. Kummel S., Kuntze K., Vogt C., Boll M., Heider J., Richnow H.H. Evidence for benzylsuccinate synthase subtypes obtained by using stable isotope tools // *J. Bacteriol.* – 2013. – V. 195. – P. 4660–4667.
487. Kunapuli U., Griebler C., Beller H.R., Meckenstock R.U. Identification of intermediates formed during anaerobic benzene degradation by an iron-reducing enrichment culture // *Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 10. – P. 1703–1712.
488. Kurr M., Huber R., König H., Jannasch H.W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J.K., Stetter K.O. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C // *Arch. Microbiol.* – 1991. – V. 156. – P. 239–247.
489. Kutvonen H., Rajala P., Carpen L., Bomberg M. Nitrate and ammonia as nitrogen sources for deep subsurface microorganisms // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6:1079.
490. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus*. In: *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs /Ed. Alvarez H.M. Springer Nature. Switzerland, 2019. – P. 271–298.

491. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J. Microbiol. Methods. – 2001. – V. 46. – P. 149–156.
492. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., *Rhodococcus biosurfactants: biosynthesis, properties and potential applications*. In: Alvarez H. (Ed.), *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – P. 291–313.
493. Kuz'min M.I., Kalmychkov G.V., Duchkov A.D., Geletii V.F., Golmshtok A.Y., Karabanov E.B. et al. Methane hydrate in sediments of Lake Baikal // Geology of ore Deposits. – 2000. – V. 42, № 1. – P. 20–32.
494. Kvenvolden K. A., Redden G.D. Hydrocarbon gas in sediment from the shelf, slope, and basin of the Bering Sea // Geochimica et Cosmochimica Acta. – 1980. – V. 44. – P. 1145–1150.
495. Kvenvolden K.A., Lorenson T.D. Methane and other hydrocarbon gases in sediment from the southeastern North American continental margin // Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results. – 2000. – V. 164. – P. 29–36.
496. Labonté J.M., Field E.K., Lau M., Chivian D., Van Heerden E., Wommack K.E. et al. Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6:349.
497. Lack A., Fuchs G. Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. // Arch. Microbiol. – 1994. – V. 161. – P. 132–139.
498. Laczi K., Kis A.E., Szilagyi A., Bounedjoum N., Bodor A., Vincze G.E. et al. New frontiers of anaerobic hydrocarbon biodegradation in the multi-omics era // Front. Microbiol. – 2020. – V. 11:590049.
499. Ladygina N., Dedyukhina E.G., Vainshtein M.B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons // Process Biochem. – 2016. – V. 41. № 5. – P. 1001–1014.
500. Lang S., Philp J.C. Surface-active lipids in rhodococci // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 74. – P. 59–70.
501. Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. – 2012. – V. 9. – P. 357–359.
502. LaRowe D.E., Amend J.P. Power limits for microbial life // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 718.
503. LaRowe D.E., Burwicz E., Arndt S., Dale A.W., Amend J.P. Temperature and volume of global marine sediments // Geology. – 2017. – V. 45. – P. 275–278.
504. Larter S., Head I., Huang H., Bennett B., Jones M., Aplin A. et al. Biodegradation, gas destruction and methane generation in deep subsurface petroleum reservoirs: an overview // Geol. Soc. Lond. Petrol. Geol. Conf. Ser. – 2005. – V. 6. – P. 633–639.
505. Larter S., Nigel M. Phase-controlled molecular fractionations in migrating petroleum charges // Geol. Soc. Lond. Petrol. Geol. Conf. Ser. – 1991. – V. 59. – P. 137–147.
506. Laso-Perez R., Hahn C., van Vliet D.M., Tegetmeyer H.E., Schubotz F., Smit N.T. et al. Anaerobic degradation of nonmethane alkanes by “Candidatus Methanoliparia” in hydrocarbon seeps of the Gulf of Mexico // mBio. – 2019. – V. 10:e01814-19.
507. Laso-Pérez R., Wegener G., Knittel K., Widdel F., Harding K.J., Krukenberg V. et al. Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation // Nature. – 2016. – V. 539:396.

508. Lee J.-W., Kwon K.K., Azizi A., Oh H.-M., Kim W., Bahk J.-J., Lee D.-H., Lee J.-H. Microbial community structures of methane hydrate-bearing sediments in the Ulleung Basin, East Sea of Korea // *Mar. Pet. Geol.* – 2013. – V. 47. – P. 136–146.
509. Lee Y.J., Wagner I.D., Brice M.E., Kevbrin V.V., Mills G.L., Romanek C.S., Wiegel J. *Thermosediminibacter oceani* gen. nov., sp. nov. and *Thermosediminibacter litoriperuensis* sp. nov., new anaerobic thermophilic bacteria isolated from Peru Margin // *Extremophiles.* – 2005. – V. 9. – P. 375–383.
510. Leng H., Wang Y., Zhao W., Sievert S.M., Xiao X. Identification of a deep-branching thermophilic clade sheds light on early bacterial evolution // *Nat. Commun.* – 2023. – V. 14:4354.
511. Lennon J.T., Jones S.E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – V. 9. – P. 119–130.
512. Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Bioinformatics.* – 2007. – V. 23. – P. 127–128.
513. Leu A.O., Cai C., McIlroy S.J., Southam G., Orphan V.J., Yuan Z., Hu S., Tyson G.W. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae* // *ISME J.* – 2020. – V. 14. – P. 1030–1041.
514. Leuthner B., Leutwein C., Schulz H., Horth P., Haehnel W., Schiltz E., Schagger H., Heider J. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 28. – P. 615–628.
515. Leutwein C., Heider J. Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and  $\beta$ -oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate // *Microbiology.* – 1999. – V. 145. – P. 3265–3271.
516. Lever M.A. Acetogenesis in the energy-starved deep biosphere—a paradox? // *Front Microbiol.* – 2011. – V. 2:284.
517. L'Haridon S., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Tindall B.J., Spring S., Schumann P., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Jeanthon C. *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – V. 56. – P. 1047–1053.
518. Li D., Liu C.-M., Luo R., Sadakane K., Lam T.-W. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph // *Bioinformatics.* – 2015. – V. 31. – P. 1674–1676.
519. Liang B., Wang L.-Y., Mbadinga S M., Liu J.-F., Yang S.-Z., Gu J.-D., Mu B.-Z. *Anaerolineaceae* and *Methanosaeta* turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation // *AMB Express.* – 2015. – V. 5:37.
520. Liesack W., Bak F., Kreft J.U., Stackebrandt E. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds // *Arch. Microbiol.* – 1994. – V. 162. – P. 85–90.
521. Likhoshvay A., Khanaeva T., Gorshkov A., Zemskaya T., Grachev M. Do oil-degrading Rhodococci contribute to the genesis of deep-water bitumen mounds in Lake Baikal? // *Geomicrobiol. J.* – 2013. – V. 30. – P. 209–213.
522. Likhoshvay A., Lomakina A., Grachev M. The complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* from Lake Baikal // *Springer Open J.* – 2014. – V. 621. – P. 1–5.
523. Lin Y.S., Heuer V.B., Goldhammer T., Kellermann M.Y., Zabel M., Hinrichs K.-U. Towards constraining H<sub>2</sub> concentration in seafloor sediment: a proposal for combined analysis by two distinct approaches // *Geochimica et Cosmochimica Acta.* – 2012. – V. 77. – P. 186–201.

524. Lindberg T., Granhall U., Berg B. Ethylene formation in some coniferous forest soils // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1979. – V. 11. – P. 637–643.
525. Lipman C.B. Living microorganisms in ancient rocks // *J. Bacteriol.* – 1931. – V. 122. – P. 183–198.
526. Liu C.W., Chang W.N., Liu H.S. Bioremediation of n-alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline conditions and sea water // *Biochem. Eng. J.* – 2009. – V. 45. – P. 69–75.
527. Liu L., Schubert D.M., Könneke M., Berg I.A. (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from the autotrophic 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate cycle in *Nitrosopumilus maritimus* // *Front. Microbiol.* – 2021. – V. 5:712030.
528. Liu Y.F., Qi Z.Z., Shou L.B., Liu J.F., Yang S.Z., Gu J.D., Mu B.Z. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum ‘Atribacteria’ (JS1) inferred from genomics // *ISME J.* – 2019. – V. 13. – P. 2377–2390.
529. Liu X., Wang Y., Gu J.-D. Ecological distribution and potential roles of *Woesearchaeota* in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis // *CSBJ*. – 2021. – V. 19. – P. 794–800.
530. Lloyd K.G., Lapham L., Teske A. An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – P. 7218–7230.
531. Locey K.J., Lennon J.T. Scaling laws predict global microbial diversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2016. – V. 24. – P. 5970–5975.
532. Löffler C., Kuntze K., Vazquez J.R., Rugor A., Kung J.W., Böttcher A., Boll M. Occurrence, genes and expression of the W/Se-containing class II benzoyl-coenzyme A reductases in anaerobic bacteria // *Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 13. – P. 696–709.
533. Löffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M., Adrian L., Edwards E.A., Konstantinidis K.T., Müller, J.A., Fullerton H., Zinder S.H., Spormann A.M. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2015. – V. 65:6.
534. Logan N.A., Berge O., Bishop A.H., Busse H.-J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kämpfer P., Rabinovitch L., Salkinoja-Salonen M.S., Seldin L., Ventosa A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria // *IJSEM*. – 2009. – V. 59. – P. 2114–2121.
535. Lomakina A., Bukin S., Shubenkova O., Pogodaeva, T., Ivanov V., Bukin Y., Zemskaya T. Microbial communities in ferromanganese sediments from the Northern Basin of Lake Baikal (Russia) // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11:1865.
536. Lomakina A., Pogodaeva T., Kalmychikov G., Chernitsyna S., Zemskaya T. Diversity of NC10 Bacteria and ANME-2d Archaea in sediments of fault zones at Lake Baikal // *Diversity*. – 2020. – V. 12, № 1. – P. 1–19.
537. Lomakina A.V., Bukin S.V., Pogodaeva T.V., Turchyn A.V., Khlystov O.M., Khabuev A.V., Ivanov V.G., Krylov A.A., Zemskaya T.I. Microbial diversity and authigenic siderite mediation in sediments surrounding the Kedr-1 mud volcano, Lake Baikal // *Geobiology*. – 2023. – P. 1–21.
538. 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) // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2009. – V. 73, № 13. P:A789.

539. Lorenson T.D., Collett T.S., Hunter R.B. Gas geochemistry of the Mount Elbert gas hydrate stratigraphic test well, Alaska North Slope: implications for gas hydrate exploration in the Arctic // *Mar. Pet. Geol.* – 2011. – V. 28. – P. 343–360.
540. Luddeke F., Dikfidan A., Harder J. Physiology of deletion mutants in the anaerobic  $\beta$ -myrcene degradation pathway in *Castellaniella defragrans* // *BMC Microbiol.* – 2012. – V. 12:192.
541. Luddeke F., Harder J. Enantiospecific (S)-(+)-linalool formation from  $\beta$ -myrcene by linalool dehydratase-isomerase // *Z. Naturforsch.* – 2011. – V. 66. – P.409–412.
542. Luo F., Devine C.E., Edwards E.A. Cultivating microbial dark matter in benzene-degrading methanogenic consortia // *Environ. Microbiol.* – 2015. – V. 18:2923.
543. Lynch M.D., Neufeld J.D. Ecology and exploration of the rare biosphere // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – V. 13. – P. 217–229.
544. Ma T.T., Liu L.Y., Rui J.P., Yuan Q., Feng D.S., Zhou Z., Dai L.R., Zeng W.Q., Zhang H., Cheng L. Coexistence and competition of sulfate-reducing and methanogenic populations in an anaerobic hexadecane-degrading culture // *Biotechnol. Biofuels.* – 2017. – V. 10:207.
545. MacDonald I.R., Bohrmann G., Escobar E., Abegg F., Blanchon P., Blinova V. et al. Asphalt volcanism and chemosynthetic life in the Campeche Knolls, Gulf of Mexico // *Science.* – 2004. – V. 304:999.
546. MacDonald I.R., Reilly Jr J.F., Best S.E., Venkataramaiah R., Sassen R., Guinasso N.L. et al. Remote sensing inventory of active oil seeps and chemosynthetic communities in the Northern Gulf of Mexico. In: Schumacher D, Abrams MA, editors. Hydrocarbon migration and its near-surface expression: AAPG memoir 66. Tulsa, Oklahoma, USA: The American Association of Petroleum Geologists, 1996. – P. 27–37.
547. Magnabosco C., Lin L.H., Dong H., Bomberg M., Ghiorse W., Stan-Lotter H., Pedersen K., Kieft T.L., van Heerden E., Onstott T.C. The biomass and biodiversity of the continental subsurface // *Nat. Geosci.* – 2018. – V. 11. – P. 707–717.
548. Magoon L.B., Dow W.G. The petroleum system – from source to trap // *Am. Assoc. Petroleum Geologists, Tulsa, Mem.* – 1994. – V. 60.
549. Mall A., Sobotta J., Huber C., Tschirner C., Kowarschik S., Bacnik K., Mergelsberg M., Boll M., Hugler M., Eisenreich W., Berg I.A. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium // *Science.* – 2018. – V. 359. – P.563–567.
550. Manakov A.Yu., Pavlova O.N., Bukin S.V., Kostyreva E.A., Moskvina V.I., Morozov I.V., Rodionova T.V., Zenskaya 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.
551. Mara P., Geller-McGrath D., Edgcomb V., Beaudoin D., Morono Y., Teske A. Metagenomic profiles of archaea and bacteria within thermal and geochemical gradients of the Guaymas Basin deep subsurface // *Nat. Commun.* – 2023. – V.14:1.
552. Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kadnikov V.V., Slobodkin A.I., Ravin N.V. Genome Analysis of *Thermosulfurimonas dismutans*, the first thermophilic sulfur-disproportionating bacterium of the phylum *Thermodesulfobacteria* // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 17:950.
553. Mardanov A.V., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Ravin N.V. Sulfur and methane-oxidizing microbial community in a terrestrial mud volcano revealed by metagenomics // *Microorganisms.* – 2020. – V. 8:1333.
554. Marmulla R., Cala E.P., Markert S., Schweder T., Harder J. The anaerobic linalool metabolism in *Thauera linaloolentis* 47 Lol // *BMC Microbiol.* – 2016a. – V. 16:76.



555. Marmulla R., Safaric B., Markert S., Schweder T., Harder J. Linalool isomerase, a membrane-anchored enzyme in the anaerobic monoterpene degradation in *Thauera linaloolentis* 47 Lol // BMC Biochem – 2016. – 17:6.
556. Martin V.J.J., Yu Z., Mohn W.W. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism // Arch. Microbiol. – 1999. – V. 172. – P. 131–138.
557. Martin W.F., Sousa F.L. Early microbial evolution: the age of anaerobes // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2016. – V. 8:a018127.
558. Mason O.U., Nakagawa T., Rosner M., Van Nostrand J.D., Zhou J., Maruyama A. et al. First investigation of the microbiology of the deepest layer of ocean crust // PLoS ONE. – 2010. – V. 5:e15399.
559. Massana R., Murray A.E., Preston C.M., DeLong E.F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 50–56.
560. McCollom T.M., Seewald J.S. A reassessment of the potential for reduction of dissolved CO<sub>2</sub> to hydrocarbons during serpentinization of olivine // Geochim. Cosmochim. Acta. – 2001. – V. 65. – P. 3769–3778.
561. McLeod M.P., Eltis L.D. Genomic insights into the aerobic pathways for degradation of organic pollutants. In: Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology / Ed. Eduardo Díaz. – Caister Academic Press, Norfolk, 2008.
562. Meckenstock R.U., Boll M., Mouttaki H., Kolschbach J.S., Cunha Tarouco P., Weyrauch P., Dong X., Himmelberg A.M. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – V. 26. – P. 92–118.
563. Meckenstock R.U., Mouttaki H. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons // Curr. Opin. Biotechnol. – 2011. – V. 22, № 3. – P. 406–414.
564. Mehrshad M., Salcher M.M., Okazaki Y., Nakano S., Šimek K., Andrei A.-S., Ghai R. Hidden in plain sight – highly abundant and diverse planktonic freshwater *Chloroflexi* // Microbiome. – 2018. – V. 6:1.
565. Meier-Kolthoff J.P., Carbasse J.S., Peinado-Olarte R.L., Goker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes // Nucleic Acids Research. – 2021. – V. 11:gkab902.
566. Merkel A.Y., Huber J.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V. Detection of putatively thermophilic anaerobic methanotrophs in diffuse hydrothermal vent fluids // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – V. 79. – P. 915–923.
567. Metzger P., Allard B., Casadevall E., Berkaloﬀ C., Coute A. Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* (*Chlorophyceae*) that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon // J. Phycol. – 1990. – V. 26. – P. 258–266.
568. Meyers P.A. Organic geochemical proxies. In: Gornitz V, editors. Encyclopedia of paleoclimatology and ancient environments. New York: Springer Science Press, 2009. – P. 659–652.
569. Miettinen H., Kietavainen R., Sohlberg E., Numminen M., Ahonen L., Itävaara M. Microbiome composition and geochemical characteristics of deep subsurface high-pressure environment, Pyhasalmi mine Finland // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6:1203.
570. Milkov A.V. Methanogenic biodegradation of petroleum in the West Siberian basin (Russia): significance for formation of giant Cenomanian gas pools // AAPG Bulletin. – 2010. – V. 94. – P. 1485–1541.

571. Milkov A.V. Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs // *Org. Geochem.* – 2011. – V. 42. – P. 184–207.
572. Milkov A.V., Claypool G.E., Lee Y.-J., Torres M.E., Borowski W.S., Tomaru H., Sassen R., Long P.E. ODP Leg 204 Scientific Party Ethane enrichment and propane depletion in subsurface gases indicate gas hydrate occurrence in marine sediments at southern Hydrate Ridge offshore Oregon // *Organic Geochemistry.* – 2004. – V. 35. – P. 1067–1080.
573. Milkov A.V., Etiope G. Revised genetic diagrams for natural gases based on a global dataset of & 20,000 samples // *Org. Geochem.* – 2018. – V. 125. – P. 109–120.
574. Milkov A.V., Faiz M., Etiope G. Geochemistry of shale gases from around the world: Composition, origins, isotope reversals and rollovers, and implications for the exploration of shale plays // *Org. Geochem.* – 2020. – V. 143:103997.
575. Miroschnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A. Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents // *Extremophiles.* – 2006. – V. 10. – P. 85–96.
576. Miroschnichenko M.L., Hippe H., Stackebrandt E., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Jeanthon C. et al. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir // *Extremophiles.* – 2001. – V. 5. – P. 85–91.
577. Miroschnichenko M.L., Kostrikina N.A., L'Haridon S., Jeanthon C., Hippe H., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 1299–1304.
578. Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Kolesnikova O.P., Schilde U. Immunoactive ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines and 1-R-indol-3-ylsulfanylacetic acids. Crystal and molecular structure of immunodepressant tris-(2-hydroxyethyl)ammonium indol-3-yl-sulfanylacetate // *Open. Chem.* – 2015. – V. 13. – P. 149–155.
579. Mnif S., Chamkha M., Sayadi S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – V. 107. – P. 785–794.
580. Momper L., Jungbluth S.P., Lee M.D., Amend J.P. Energy and carbon metabolisms in a deep terrestrial subsurface fluid microbial community // *ISME J.* – 2017. – V. 11. – P. 2319–2333.
581. Mondal N., Roy C., Chatterjee S., Sarkar J., Dutta S., Bhattacharya S., Chakraborty R., Ghosh W. Thermal endurance by a hot-spring-dwelling phylogenetic relative of the mesophilic *Paracoccus* // *Microbiol Spectr.* – 2022. – 10(6):e0160622.
582. Morgunova I., Semenov P., Kursheva A., Litvinenko I., Malyshev S., Bukin Yu.S., Khlystov O.M., Pavlova O.N., Zenskaya 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. – P. 72.
583. Mori K. *Caldiserica*. In: Bergey's manual of systematics of *Archaea* and *Bacteria*. Eds Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. 2018.
584. Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Urabe T., Suzuki K. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia classis* nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – V. 59. – P. 2894–2898.

585. Morono Y., Ito M., Hoshino T., Terada T., Hori T., Ikehara M., D'Hondt S., Inagaki F. et al. Aerobic microbial life persists in oxic marine sediment as old as 101.5 million years // *Nat. Commun.* – 2020. – V. 11. – P. 3626.
586. Morono Y., Terada T., Kallmeyer J., Inagaki F. An improved cell separation technique for marine subsurface sediments: applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting // *Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 15. – P. 2841–2849.
587. Mukhopadhyay P.K., Hagemann H.W., Hollerbach A., Welte D.H. The relation between organic geochemical and petrological parameters of coal in Indian coal basins // *Energ. Source.* – 1979. – V. 4. – P. 313–328.
588. Muller A.L., de Rezende J.R., Hubert C.R.J., Kjeldsen K.U., Lagkouvardos I., Berry D., Jorgensen B.B., Loy A. Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents // *ISME J.* – 2014. – V. 8. – P.1153–1165.
589. Musat F., Widdel F. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype // *Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 10. – P. 10–19.
590. Nagahama K., Ogawa T., Fujii T., Fukuda H. Classification of ethylene-producing bacteria in terms of biosynthetic pathways to ethylene // *J. Ferment. Bioeng.* – 1992. – V. 73. – P. 1–5.
591. Nakahara N., Nobu M.K., Takaki Y., Miyazaki M., Tasumi E., Sakai S. et al. *Aggregatilinea lenta* gen. nov., sp. nov., a slow-growing, facultatively anaerobic bacterium isolated from subseafloor sediment, and proposal of the new order Aggregatilineales ord. nov. within the class *Anaerolineae* of the phylum *Chloroflexi* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – V. 69. – P. 1185–1194.
592. Nam J.-H., Kim T.-U., Lee D.-H. Complete genome sequence of *Thermaerobacter* sp. FW80, an aerobic extremely thermophilic bacterium isolated from a food waste compost // *Korean J. Microbiol.* – 2019. – V. 55. – P. 462–464.
593. Naudts L., Khlystov O., Granin N., Chensky A., Poort J., De Batist M. Stratigraphic and structural control on the distribution of gas hydrates and active gas seeps on the Posolsky Bank, Lake Baikal // *Geo-Mar. Lett.* – 2012. – V. 32. – P. 395–406.
594. Nazina T.N., Abukova L.A., Tourova T.P., Babich T.L., Bidzhieva S.K., Loiko N.G., Filippova D.S. Safarova E.A. Biodiversity and potential activity of microorganisms in underground gas storage horizons // *Sustainability.* – 2023. – V. 15:9945.
595. Nazina T.N., Tourova T.P., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Poltarau A.B. A Novel view on the taxonomy of sulfate-reducing bacterium '*Desulfotomaculum salinum*' and a description of a new species *Desulfofundulus salinus* sp. nov. // *Microorganisms.* – 2024. – V. 12:1115.
596. Nealson K.H. Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* – 1997. – V. 25. – P. 403–434.
597. Nealson K.H., Inagaki F., Takai K. Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLiMEs): do they exist and why should we care? // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13. – P. 405–410.
598. Neifar M., Chouchane H., Najjari A., El Hidri D., Mahjoubi M., Ghedira K., Naili F., Soufi L., Raddadi N., Sghaier H., Ouzari H.I., Masmoudi A.S., Cherif A. Genome analysis provides insights into crude oil degradation and biosurfactant production by extremely halotolerant *Halomonas desertis* G11 isolated from Chott El-Djerid salt-lake in Tunisian desert // *Genomics.* – 2019. – V. 111. – P. 1802–1814.
599. Ni Y., Dai J. Geochemical characteristics of abiogenic alkane gases // *Petroleum Science.* – 2009. – V. 6. – P. 327–338.

600. Niedermeyer H., Ashworth C., Brandt A., Welton T., Hunt P.A. A step towards the a priori design of ionic liquids // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – V. 15. – P. 11566–11578.
601. Nobu M.K., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K., Rinke C., Gies E.A., Webster G. et al. Phylogeny and physiology of candidate phylum ‘Atribacteria’ (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics // *ISME J.* – 2016. – V. 10, № 2. – P. 273–286.
602. Nobu M.K., Narihiro T., Kuroda K., Mei R., Liu W.T. Chasing the elusive *Euryarchaeota* class WSA2: Genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen // *ISME J.* – 2016. – V. 10. – P. 2478–2487.
603. Nordin K., Unell M., Jansson J.K. Novel 4-Chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – V. 71. – P. 6538–6544.
604. Nunoura T., Chikaraishi Y., Izaki R., Suwa T., Sato T., Harada T., Mori K. et al. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile // *Science.* – 2018. – V. 359. – P. 559–563.
605. Nyssonen M., Bomberg M., Kapanen A., Nousiainen A., Pitkänen P., Itävaara M. Methanogenic and sulphate-reducing microbial communities in deep groundwater of crystalline rock fractures in Olkiluoto, Finland // *Geomicrobiol. J.* – 2012. – V. 29. – P. 863–878.
606. Och L.M., Muller B., Voegelin A., Ulrich A., Gottlicher J., Steiniger R. et al. New insights into the formation and burial of Fe/Mn accumulations in Lake Baikal sediments // *Chemical Geology.* – 2012. – V. 330–331. – P. 244–259.
607. Ohtomo Y., Ijiri A., Ikegaw, Y., Inagaki F. Biological CO<sub>2</sub> conversion to acetate in subsurface coal-sand formation using a high-pressure reactor system // *Front. Microbiol.* – 2013. – V. 34:361.
608. Ollivier B., Fardeau M.L., Cayol J.L., Magot M., Patel B.K., Prensier G., Garcia J.L. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1998. – V. 48. – P. 821–828.
609. Oppo D., Hurst A. Seepage rate of hydrothermally generated petroleum in East African Rift lakes: An example from Lake Tanganyika // *Mar. Petr. Geol.* – 2018. – V. 92. – P. 149–159.
610. Orcutt B.N., Joye S.B., Kleindienst S., Knittel K., Ramette A., Reitz A., Samarkin V., Treude T., Boetius A. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments // *Deep Sea Res. Part. 2 Top. Stud. Oceanogr.* – 2010. – V. 57. – P. 2008–2021.
611. Orcutt B.N., Sylvan J.B., Knab N.J., Edwards K.J. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2011. – V. 75. – P. 361–422.
612. Oremland R.S., Culbertson C., Simoneit B. Methanogenic activity in sediment from Leg 64, Gulf of California. In: Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project / Eds Curray J., Moore, D.G. et al. – US Government Printing, 1982. – P. 759–762.
613. Oremland R.S., M.J. Whiticar, F.E. Strohmaier, R.P. Kiene Bacterial ethane formation from reduced, ethylated sulfur compounds in anoxic sediments // *Geochimica et Cosmochimica Acta.* – 1988. – V. 52. – P. 1895–1904.
614. Oren A., Garrity G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2021. – V. 71. № 10.
615. Oren A., Goker M. Candidatus List. Lists of names of prokaryotic Candidatus phyla // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2023. – V. 73. № 5.
616. Oren A., Goker M. Validation list no. 215. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2024. – V. 74:6173.

617. Orsi W., Biddle J.F., Edgcomb V. Deep sequencing of subseafloor eukaryotic rRNA reveals active fungi across marine subsurface provinces // PLoS ONE. – 2013. – V. 8:e56335.
618. Otto A., Simoneit B.R.D. Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifers species and sediment from the Eocene Zeitz Formation, Saxony, Germany // Geochem. Cosmochim. Acta. – 2001. – V. 65. – P. 3505–3527.
619. Otto A., Walther H., Puttmann W. Sesqui- and diterpenoid biomarkers preserved in Taxodum-rich Oligocene oxbow lake clays, Weissensteiner basin, Germany // Org. Geochem. – 1997. – V. 26. – P. 105–115.
620. Pale-Grosdemange C., Merkofer T., Rohmer M., Poralla K. Production of bicyclic and tricyclic triterpenes by mutated squalene-hopene cyclase // Tetrahedron Letters. – 1999. – V. 40. – P. 6009–6012.
621. Pallerla S.R., Knebel S., Polen T., Klauth P., Hollender J., Wendisch V.F., Schoberth S.M. Formation of volutin granules in *Corynebacterium glutamicum* // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 243. – P. 133–140.
622. Parkes R.J., Cragg B., Roussel E., Webster G., Weightman A., Sass H. A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions // Mar. Geol. – 2014. – V. 352. – P. 409–425.
623. Parkes R.J., Cragg B.A., Bale S.J., Getliff J.M., Goodman K., Rochelle P.A., Fry J.C., Weightman A.J., Harvey S.M. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments // Nature. – 1994. – V. 371. – P. 410–413.
624. Parkes R.J., Cragg B.A., Fry J.C., Herbert R.A., Wimpenny J.W.T. Bacterial biomass and activity in deep sediment layers from the Peru margin // Philos. Trans. R. Soc. of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences. – 1990. – V. 331. – P. 139–153.
625. Parkes R.J., Cragg B.A., Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review // Hydrogeol. J. – 2000. – V. 8. – P. 11–28.
626. Parkes R.J., Linnane C.D., Webster G., Sass H., Weightman A.J., Hornibrook E.R.C. et al. Prokaryotes stimulate mineral H<sub>2</sub> formation for the deep biosphere and subsequent thermogenic activity // Geology. – 2011. – V. 39. – P. 219–222.
627. Parkes R.J., Sellek G., Webster G., Martin D., Anders E., Weightman A.J., Sass H. Culturable prokaryotic diversity of deep, gas hydrate sediments: first use of a continuous high-pressure, anaerobic, enrichment and isolation system for subseafloor sediments (DeepIsoBUG). // Environ. Microbiol. – 2009. – V. 11, № 12. – P. 3140–3153.
628. Parkes R.J., Wellsbury P., Mather I.D., Cobb S.J., Cragg B.A., Hornibrook E.R.C. et al. Temperature activation of organic matter and minerals during burial has the potential to sustain the deep biosphere over geological timescales. Org. Geochem. – 2007. – V. 38. – P. 845–852.
629. Parks D., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. – 2018. – V. 36. – P. 996–1004.
630. Pascoal F., Costa R., Magalhães C. The microbial rare biosphere: current concepts, methods and ecological principles // FEMS Microbiol. Ecol. – 2021. – V. 97:fiaa227.
631. 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. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia // Biotechnol. Rep. – 2019. – V. 24:e00371.
632. 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. – № 3. – P. 1006–1007.

633. 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 the Gorevoy Utes natural oil seep under methanogenic and sulfate-reducing conditions // *Microb. Ecol.* – 2022. – V. 83. – P. 899–915.
634. 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.
635. 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 a microbial community in sediments of Lake Baikal under experimental thermobaric conditions of protocatagenesis // *Geomicrobiol. J.* – 2016. – V. 33. – P. 599–606.
636. Pedersen K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives // *FEMS Microbiol Lett.* – 2000. – V. 185, № 1. – P. 9–16.
637. Peng M., Zi X., Wang Q. Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA genes // *Int. J. Environ. Res.* – 2015. – V. 12. – P. 12002–12015.
638. Petasch J., Disch E., Markert S., Becher D., Schweder T., Hüttel B., Reinhardt R., Harder J. The oxygen-independent metabolism of cyclic monoterpenes in *Castellaniella defragrans* 65Phen // *BMC Microbiol.* – 2014. – V. 14:164.
639. Peters F., Heintz D., Johannes J., van Dorsselaer A., Boll M. Genes, enzymes, and regulation of para-cresol metabolism in *Geobacter metallireducens* // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189. – P. 4729–4738.
640. Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S., Mulder D.W., Shepard E.M., Broderick J.B., King P.W., Adams M.W.W. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation // *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* – 2015. – V. 1853. – P. 1350–1369.
641. Peters K.E., Walters C.C., Moldowan J.M. *The biomarker guide.* – Cambridge University Press, 2005. – 1155 p.
642. Petkovic M., Seddon K.R., Rebelo L.P.N., Pereira C.S. Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – V. 40. – P. 1383–1403.
643. Pilson M.E.Q. *Introduction to Chemistry of the Sea.* – Cambridge University Press, 1998. – 67 p.
644. Pinkert A., Ang K.L., Marsh K.N., Pang S. Density, viscosity and electrical conductivity of protic alkanolammonium ionic liquids // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2011. – V. 13. – P. 5136–5143.
645. Pitluck S., Yasawong M., Munk C., Nolan M., Lapidus A., Lucas S., Glavina Del Rio T., Tice H. et al. Complete genome sequence of *Thermosediminibacter oceani* type strain (JW/IW-1228PT) // *Stand in Genomic Sci.* – 2010. – V. 3. – P. 108–116.
646. Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Godfroy A., Gavrilov S.N., Beskorovaynaya D.A., Sokolova T.G. *Thermosiphon activus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, hydrolytic bacterium isolated from a deep-sea sample // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2014. – V. 64. – P. 3307–3313.
647. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class Ignavibacteria, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // *Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 15. – P. 1759–1771.

648. Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M., Egorov A.V., Zemskaya T.I. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments // *J. Great Lakes Res.* – 2017. – V. 43. – № 6. – P. 1030–1043.
649. Pogodaeva T.V., Poort J., Aloisi G., Bataillard L., Makarov M.M., Khabuev A.V., Kazakov A.V., Chensky A.G., Khlystov O.M. Fluid migrations at the Krasny Yar methane seep of Lake Baikal according to geochemical data // *J. Great Lakes Res.* – 2020. – V. 46. – P. 123–131.
650. Ponomarenko L.P., Stonik I.V., Aizdaicher N.A., Orlova T.Yu., Popovskaya G.I., Pomazkina G.V., Stonik V.A. Sterols of marine microalgae *Pyramimonas cf. cordata* (Prasinophyta), *Attheya ussurensis* sp. nov. (Bacillariophyta) and a spring diatom bloom from Lake Baikal // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2004. – V. 138. – P. 65–70.
651. Poort J., Khlystov O.M., Naudts L., Duchkov A.D., Shoji H., Nishio S. et al. Thermal anomalies associated with shallow gas hydrates in the K-2 mud volcano, Lake Baikal // *Geo-Mar. Lett.* – 2012. – V. 32. – P. 407–417.
652. Poort J., Klerkx J. Absence of a regional surface thermal high in the Baikal Rift, new insights from detailed contouring of heat flow anomalies // *Tectonophysics.* – 2004. – V. 383. – P. 217–241.
653. Pop Ristova P., Wenzhöfer F., Ramette A., Felden J., Boetius A. Spatial scales of bacterial community diversity at cold seeps (Eastern Mediterranean Sea) // *ISME J.* – 2015. – V. 9. – P. 1306–1318.
654. Poser A., Lohmayer R., Vogt C., Knoeller K., Planer-Friedrich B., Sorokin D., Richnow, H.-H., Finster K. Disproportionation of elemental sulfur by haloalkaliphilic bacteria from soda lakes // *Extremophiles.* – 2013. – V. 17. – P. 1003–1012.
655. Prokofeva M.I., Kublanov I.V., Nercessian O., Tourova T.P., Kolganova T.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Spring S., Jeanthon C. Cultivated anaerobic acidophilic/acidotolerant thermophiles from terrestrial and deep-sea hydrothermal habitats // *Extremophiles.* – 2005. – V. 9. – P. 437–448.
656. Prokopenko A.A., Khursevich G.K., Bezrukova E.V., Kuzmin M.I., Boes, X., Williams D.F., Fedenya S.A., Kulagina N.V., Letunova P.P., Abzaeva A.A. Paleoenvironmental proxy records from Lake Hovsgol, Mongolia, and a synthesis of Holocene climate change in the Lake Baikal watershed // *Quat. Res.* – 2007. – V. 68. – P. 2–17.
657. Purkamo L., Bomberg M., Kietavainen R., Salavirta H., Nyysönen M., Nuppenen-Puputti M., Ahonen L., Kukkonen I., Itävaara M. Microbial co-occurrence patterns in deep Precambrian bedrock fracture fluids // *Biogeosciences.* – 2016. – V. 13. – P. 3091–3108.
658. Purkamo L., Bomberg M., Nyysönen M., Kukkonen I., Ahonen L., Itävaara M. Heterotrophic communities supplied by ancient organic carbon predominate in deep fennoscandian bedrock fluids // *Microb. Ecol.* – 2015. – V. 69. – P. 319–332.
659. Purkamo, L., Bomberg, M., Nyysönen, M., Kukkonen, I., Ahonen, L., Kietäväinen, R. et al. Dissecting the deep biosphere: retrieving authentic microbial communities from packer-isolated deep crystalline bedrock fracture zones // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2013. – V. 85. – P. 324–337.
660. Qin S.J., Sun Y.Z., Tang Y.G. Early hydrocarbon generation of algae and influences of inorganic environments during low temperature simulation // *Energy Explor. Exploit.* – 2008. – V. 26. – P. 377–396.
661. Qin S.J., Sun Y.Z., Zhao C.L. Long-term, low-temperature simulation of early diagenesis of organic matter from algae: significance for immature oil // *Petrol. Sci. Technol.* – 2013. – V. 31. – P. 1439–1446.

662. Qiu L., Williams D.F., Gvozdkov A., Karabanov E., Shimaraeva M. Biogenic silica accumulation and paleoproductivity in the northern basin of Lake Baikal during the Holocene // *Geology*. – 1993. – V. 21:25.
663. Quince C., Lanzen A., Davenport R. J., Turnbaugh P. J. Removing noise from pyrosequenced amplicons // *BMC Bioinf.* – 2011. – V. 12:38.
664. Rabus R., Boll M., Golding B., Wilkes H. Anaerobic degradation of p-alkylated benzoates and toluenes // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2016B. – V. 26. – P. 63–75.
665. Rabus R., Boll M., Heider J., Meckenstock R.U., Buckel W., Einsle O. et al. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2016a. – V. 26. – P. 5–28.
666. Rabus R., Boll M., Heider J., Meckenstock R.U., Buckel W., Einsle O. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2016b. – V. 26. – P. 5–28.
667. Rabus R., Wilkes H., Behrends A., Armstroff A., Fischer T., Pierik A.J., Widdel F. Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – P. 1707–1715.
668. Raghoebarsing A.A., Pol A., van de Pas-Schoonen K.T., Smolders A.J., Ettwig K.F., Rijpstra W.I., Schouten S., Damsté J. S., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // *Nature*. – 2006. – V. 440. – P. 918–921.
669. Rajala P., Carpen L., Vepsäläinen M., Raulio M., Sohlberg E., Bomberg M. Microbially induced corrosion of carbon steel in deep groundwater environment // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6:647.
670. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *J. Gen. Microbiol.* 1979. – V. 115. – P. 491–503.
671. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Industry. Microbiol.* – 1961. – V. 2. – P. 23–32.
672. Rempfert K.R., Miller H.M., Bompard N., Nothaft D., Matter J.M., Kelemen P., Fierer N., Templeton A.S. Geological and geochemical controls on subsurface microbial life in the Samail Ophiolite, Oman // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8:56.
673. Reyes-Sosa M.B., Apodaca-Hernández J.E., Arena-Ortiz M.L. Bioprospecting for microbes with potential hydrocarbon remediation activity on the northwest coast of the Yucatan Peninsula, Mexico, using DNA sequencing // *Sci. Total Environ.* – 2018. – V. 642. – P. 1060–1074.
674. Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106. – P. 19126–19131.
675. Rinke C., Chuvochina M., Mussig A.J., Chaumeil P.-A., Davín A.A., Waite D.W., Whitman W.B., Parks D.H., Hugenholtz P. A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database // *Nature Microbiol.* – 2021. – V. 6. – P. 946–959.
676. Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A., Ivanova N.N., Anderson I.J., Cheng J.F., Darling A., Malfatti S., Swan B.K., Gies E.A., et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter // *Nature*. – 2013. – V. 499. – P. 431–437.
677. Rissanen A.J., Peura S., Mpamah P.A., Taipale S., Tirola M., Biasi C., Mäki A., Nykänen H. Vertical stratification of bacteria and archaea in sediments of a small boreal humic lake // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2019. – V. 366:fzn044.



678. Roadifer R.E. Size distribution of the World's largest known oil and tar accumulations. In Exploration of heavy crude oil and natural bitumen. Studies in geology / Ed. Meyer R.F. – Tulsa: American Association of Petroleum Geologists, 1987. – P. 3–23.
679. Robador A. The seafloor crustal biosphere: Ocean's hidden biogeochemical reactor // Front Microbiol. – 2024. – V.15:1495895.
680. Robbins S.J., Evans P.N., Parks D.H., Golding S.D., Tyson G.W. Genome-centric analysis of microbial populations enriched by hydraulic fracture fluid additives in a coal bed methane production well // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7:731.
681. Robertson L.A., Kuenen J.G. The Genus *Thiobacillus*. The Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer, 2006. P. 812–827.
682. Rochelle P. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – V. 100. – P. 59–65.
683. Rogers J., Bennett P., Choi W. Feldspars as a source of nutrients for microorganisms // Am. Mineral. – 1998. – V. 83. – P. 1532–1540.
684. Rohmer M., Bouvier P., Ourisson G. Non-specific lanosterol and hopanoid biosynthesis by a cell-free system from the bacterium *Methylococcus cupsulatus* // Eur. J. Biochem. – 1980. – V. 112. – 557–560.
685. Romero-Sarmiento M.F., Riboulleau A., Vecoli M., Versteegh G.J/M. Occurrence of retene in upper Silurian-lower Devonian sediments from North Africa: Origin and implications // Org. Geochem. – 2010. – V. 41. – P. 302–306.
686. Rosa A., Triguis J.A. Bioremediation process on Brazil Shoreline // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2007. – V. 14. – P. 470–476.
687. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 154–162.
688. Rossmassler K., Snow C.D., Taggart D., Brown C., De Long S.K. Advancing biomarkers for anaerobic o-xylene biodegradation via metagenomic analysis of a methanogenic consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – V. 103. – P. 4177–4192.
689. Roussel E.G., Bonavita M.-A.C., Querellou J., Cragg B.A., Webster G., Prieur D. et al. Extending the sub-sea-floor biosphere // Science. – 2008. – V. 320. – P. 1046–1046.
690. Roy H., Kallmeyer J., Adhikari R.R., Pockalny R., Jorgensen B.B., D'Hondt S. Aerobic microbial respiration in 86-million-year-old deep-sea red clay // Science. – 2012. – V. 336. – P. 922–925.
691. Ruff S.E., Felden J., Gruber-Vodicka H.R., Marcon Y., Knittel K., Ramette A., Boetius A. In situ development of a methanotrophic microbiome in deep-sea sediments // ISME J. – 2019. – V. 13. – P. 197–213.
692. Russell M.J., Hall A.J., Martin W. Serpentinization as a source of energy at the origin of life // Geobiology. – 2010. – V. 8. – P. 355–371.
693. Russell M.J., Martin W. The rocky roots of the acetyl-CoA pathway // Trends Biochem. Sci. – 2004. – V. 29. – P. 358–363.
694. Sahu L., Shrivastava R. Hydrocarbon biodegradation efficiency by four indigenous bacterial strains isolated from contaminated soils // IJSEM. – 2022. – V. 9. – P. 47–53.
695. Saitou N., Nei, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Bio. Evol. – 1987. – V. 4. – P. 406–425.
696. Sakai N., Kurisu F., Yagi O., Nakajima F., Yamamoto K. Identification of putative benzene-degrading bacteria in methanogenic enrichment cultures // J. Biosci. Bioeng. – 2009. – V. 108. – P. 501–507.

697. Sambrook J., Fritsch E.F. Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual / 2nd Edition*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
698. Sánchez-Andrea I., Guedes I.A., Hornung B., Boeren S., Lawson C.E., Sousa D.Z., Bar-Even A., Claassens N.J., Stams A.J.M. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* // *Nat. Commun.* – 2020. – V. 11:5090.
699. Sar P., Dutta A., Bose H., Mandal S., Kazy S.K. Deep Biosphere: Microbiome of the deep terrestrial subsurface. In: *Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications / Eds Satyanarayana T., Johri B., Das S.* – Springer, Singapore, 2019.
700. Schink B. Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. // *Arch. Microbiol.* – 1985. – V. 142. – P. 295–301.
701. Schippers A. Deep Biosphere. In: *Encyclopedia of marine geosciences. Encyclopedia of Earth Sciences Series / Eds. Harff J., Meschede M., Petersen S., Thiede J.* – Springer, Dordrecht, 2016.
702. Schirmer A., Rude M.A., Li X., Popova E., del Cardayre S.B. Microbial biosynthesis of alkanes // *Science.* – 2010. – V. 329. – P. 559–562.
703. Schloss P.D., Gevers D., Westcott S.L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies // *PloS ONE.* – 2011. – V. 6:e27310.
704. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75. – P. 7537–7541.
705. Schmid G., Auerbach H., Pierik A.J., Schünemann V., Boll M. ATP-dependent electron activation module of benzoyl-coenzyme A reductase from the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus* // *Biochemistry.* – 2016. – V. 55. – P. 5578–5586.
706. Scholz C.A., Hutchinson D.R. Stratigraphic and structural evolution of the Selenga Delta accommodation zone, Lake Baikal Rift, Siberia // *Int. J. Earth. Sci.* – 2000. – V. 89. – P. 212–228.
707. Schrenk M., Huber J., Edwards K. Microbial provinces in the seafloor // *Ann. Rev. Mar. Sci.* – 2010. – V. 2. – P. 279–304.
708. Schuhle K., Fuchs G. Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatic* // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186. – P. 4556–4567.
709. Schulz H.D. Quantification of early diagenesis: dissolved constituents in marine pore water. In: *Marine Geochemistry / Eds. Schulz H.D., Zabel M.* – Berlin, Heidelberg: Springer, 2000. – P. 85–128.
710. Schut G.J., Bridger S.L., Adams M.W. Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A-dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189. – P.4431–4441.
711. Scoma A., Yakimov M.M., Boon N. Challenging oil bioremediation at deep-sea hydrostatic pressure // *Front. Microbiol.* – 2016. – V.7:1203.
712. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. – P. 2068–2069.
713. Sei K., Mori K., Kohno T., Maki H. Development and application of PCR primers for monitoring alkane-degrading bacteria in seawater microcosm during crude oil degradation process // *J. Chem. Engineer. Japan.* – 2003. – V. 36. – P. 1185–1193.
714. Seitz K.W., Dombrowski N., Eme L., Spang A., Lombard J., Sieber J.R. et al. Asgard archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10:1822.

715. Seitz K.W., Lazar C.S., Hinrichs K.-U., Teske A.P., Baker B.J. Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction // ISME J. – 2016. – V. 10. – P. 1696–1705.
716. Selesi D., Jehmlich N., von Bergen M., Schmid, F., Rattei T., Tischler P., Lueders T., Meckenstock R.U. Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47 // J. Bacteriol. – 2009. – V. 192. – P. 295–306.
717. Selesi D., Meckenstock R.U. Anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon biphenyl by a sulfate-reducing enrichment culture // FEMS Microbiol. Ecol. – 2009. – V. 68. – P. 86–93.
718. Senftle J.T., Landis C.R. Vitrinite reflectance as a tool to assess thermal maturity. In: Source migration processes and evaluation techniques, AAPG treatise of petroleum geology / Merrill R.K. – AAPG, Tulsa, OK, 1991. – P. 119–126.
719. Senftle J.T., Landis C.R. Vitrinite reflectance as a tool to assess thermal maturity. In: Source migration processes and evaluation techniques, AAPG treatise of petroleum geology / Eds. Merrill R.K. – AAPG, Tulsa, OK, 1991. – P. 119–126.
720. Serebryakova E.V., Darmov I.V., Medvedev N.P., Alekseev S.M., Rybak S.I. Evaluation of the hydrophobicity of bacterial cells by measuring their adherence to chloroform drops // Microbiology. – 2002. – V. 71. – P. 202–204.
721. Seter M., Thomson M.J., Stoimenovski J., MacFarlane D.R., Forsyth M. Dual active ionic liquids and organic salts for inhibition of microbially influenced corrosion // Chem. Commun. – 2012. – V. 48. – P. 5983–5985.
722. Shahi A., Ince B., Aydin S., Ince O. Assessment of the horizontal transfer of functional genes as a suitable approach for evaluation of the bioremediation potential of petroleum-contaminated sites: a mini-review // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – V. 101 – P. 4341–4348.
723. Shelobolina E., Xu H., Konishi H., Kukkadapu R., Wu T., Blöthe M., Roden E. Microbial lithotrophic oxidation of structural Fe (II) in biotite // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78. – P. 5746–5752.
724. Sheppard M.J., Kunjapur A.M., Prather K.L. Modular and selective biosynthesis of gasoline-range alkanes // Metab. Eng. – 2016. – V. 33. – P. 28–40.
725. Shishlyannikov S.M., Zakharova Y.R., Volokitina N.A., Mikhailov I.S., Petrova D.P., Likhoshway Y.V. A procedure for establishing an axenic culture of the diatom *Synedra acus* subsp. *radians* (Kütz.) Skabibitsch. from Lake Baikal // Limnol. Oceanogr. Methods. – 2011. – V. 9. – P. 478–484.
726. Sieber C.M.K., Probst A.J., Sharrar A., Thomas B.C., Hess M., Tringe S.G., Banfield J.F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy // Nat. Microbiol. – 2018. – V. 3. – P. 836–843.
727. Sierra-Garcia I.N., Belgini D.R.B., Torres-Ballesteros A., Paez-Espino D., Capilla R., Santos Neto E.V., Gray N., de Oliveira V.M. In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs // Sci. Total Environ. – 2020. – V. 715:136646.
728. Sim M.S., Wang D.T., Zane G.M., Wall J.D., Bosak T., Ono S. Fractionation of sulfur isotopes by *Desulfovibrio vulgaris* mutants lacking hydrogenases or type I tetraheme cytochrome C<sub>3</sub> // Front. Microbiol. – 2013. – V. 4:171.
729. Simoneit B.R.T. Organic matter alteration and petroleum generation: Hydrothermal aspect // Ceochimiya. – 1986. – V. 11. – P. 236–254.

730. Simoneit B.R.T., Aboul-Kassim T.A.T., Tiercelin J.J. Hydrothermal petroleum from lacustrine sedimentary organic matter in the East African Rift // *Appl. Geochem.* – 2000. – V. 15. – P. 355–368.
731. Slesarev A.I., Mezhevaya K.V., Makarova K.S., Polushin N.N., Shcherbinina O.V., Shakhova V.V. et al. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens // *PNAS.* – 2002. – V. 99. – P. 4644–4649.
732. Slobodkin A., Wiegel J. Fe(III) as an electron acceptor for H<sub>2</sub> oxidation in thermophilic anaerobic enrichment cultures from geothermal areas // *Extremophiles.* – 1997. – V. 1. – P. 106–109.
733. Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating, deeply branching deltaproteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – V. 62. – P. 1976–1971.
734. Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – V. 59. – P. 1508–1512.
735. Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – V. 59. – P. 2880–2883.
736. Slobodkina G.B., Mardanov A.V., Ravin N.V., Frolova A.A., Chernyh N.A. Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Respiratory ammonification of nitrate coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur in deep-sea autotrophic thermophilic bacteria // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8:87.
737. Slobodkina G.B., Reysenbach A.L., Panteleeva A.N., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, dissimilatory iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in the *Deltaproteobacteria* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – V. 62. – P. 2463–2468.
738. So C.M., Phelps C.D., Young L.Y. Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 3892–3900.
739. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Mark Welch D., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – P. 12115–12120.
740. Sohlberg E., Bomberg M., Miettinen H., Nyysönen M., Salavirta H., Vikman M. et al. Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6:573.
741. Song Y., Jiang C.Y., Liang Z.L., Wang B.J., Jiang Y., Yin Y., Zhu H.Z., Qin Y.L., Cheng R.X., Liu Z.P. et al. *Casimicrobium huifangae* gen. nov., sp. nov., a ubiquitous "Most-Wanted" core bacterial taxon from municipal wastewater treatment plants // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2020. – P. 86:0.
742. Spanevello M.D., Patel B.K.C. *Thermaerobacter*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Chichester, John Wiley; Sons Ltd, 2015. – P. 1–6.
743. Spanevello M.D., Yamamoto H., Patel B.K.C. *Thermaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel aerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia, and emendation of the genus *Thermaerobacter* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 795–800.

744. Spring S., Rosenzweig F. The genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*: Taxonomy // The Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer, 2006. P. 771–786.
745. Stevens T.O., McKinley J.P. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers // Science. – 1995. – V. 270. – P. 450–455.
746. Stoimenovski J., Dean P.M., Izgorodina E.I., MacFarlane D.R. Protic pharmaceutical ionic liquids and solids: Aspects of protonics // Faraday Discuss. – 2012. – V. 154. – P. 335–352.
747. Stoimenovski J., MacFarlane D.R. Enhanced membrane transport of pharmaceutically active protic ionic liquids // Chem. Commun. – 2011. – V. 47. – P. 11429–11431.
748. Stolper D.A., Lawson M., Davis C.L., Ferreira A.A., Neto E.S., Ellis G.S. et al. Formation temperatures of thermogenic and biogenic methane // Science. – 2014. – V. 344. – P. 1500–1503.
749. Story S.P., Kline E.L., Hughes T.A., Riley M.B., Hayasaka S.S. Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505 // Arch. Environ. Con. Tox. – 2004. – V. 47. – P. 168–176.
750. Stothard P., Wishart D.S. Circular genome visualization and exploration using CGView // Bioinformatics. – 2005. – V. 21. – P. 537–539.
751. Strijkstra A., Trautwein K., Jarling R., Wohlbrand L., Dorries M., Reinhardt R., Anaerobic activation of p-cymene in denitrifying betaproteobacteria: methyl group hydroxylation versus addition to fumarate // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – P. 7592–7603.
752. Studier M.H., Hayatsu R., Anders E. Origin of organic matter in early solar system – I. Hydrocarbons // Geochim. Cosmochim. Acta. – 1968. – V. 32. – P. 175–190.
753. Sunagawa S., Coelho L.P., Chaffron S., Kultima J.R., Labadie K., Salazar G. Structure and function of the global ocean microbiome // Science. – 2015. – V. 348:6237.
754. Szalaniec M., Hagel C., Menke M., Nowak P., Witko M., Heider J. Kinetics and mechanism of oxygen-independent hydrocarbon hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase // Biochemistry. – 2007. – V. 46. – P. 7637–7646.
755. Takai K., Inoue A., Horikoshi K. *Thermaerobacter marianensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic extremely thermophilic marine bacterium from the 11000 m deep Mariana Trench // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49. – P. 619–628.
756. Takai K., Moyer C.L., Miyazaki M., Nogi Y., Hirayama H., Nealson K.H., Horikoshi K. *Marinobacter alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from seafloor alkaline serpentine mud from Ocean Drilling Program Site 1200 at South Chamorro Seamount, Mariana Forearc // Extremophiles. – 2004. – V. 9, № 1. – P. 17–27.
757. Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J. et al. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – P. 10949–10954.
758. Takai K., Suzuki M., Nakagawa S., Miyazaki M., Suzuki Y., Inagaki F., Horikoshi K. *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – V. 56, № 8. – P. 1725–1733.
759. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. – 2013. – V. 30. – P. 2725 – 2729.

760. Tan B., Nesbø C., Foght J. Re-analysis of omics data indicates *Smithella* may degrade alkanes by addition to fumarate under methanogenic conditions // *ISME J.* – 2014. – V. 887. – P. 2353–2356.
761. Tan B.F., Semple K., Foght J. Anaerobic alkane biodegradation by cultures enriched from oil sands tailings ponds involves multiple species capable of fumarate addition // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2015. – V. 91:fiv042.
762. Tenbrink F., Schink B., Kroneck P.M.H. Exploring the active site of the tungsten, iron-sulfur enzyme acetylene hydratase // *J. Bacteriol.* – 2011. – V. 193. – P. 1229–1236.
763. Teske A., Callaghan A.V., LaRowe D.E. Biosphere frontiers of subsurface life in the sedimented hydrothermal system of Guaymas Basin // *Front. Microbiol.* – 2014. – V. 5:362.
764. Thauer R.K. Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO<sub>2</sub> // *Curr. Opin. Microbiol.* 2011. – V. 14, № 3. – P. 292–299.
765. Thauer R.K. Methyl (alkyl)-coenzyme M reductases: Nickel F-430-containing enzymes involved in anaerobic methane formation and in anaerobic oxidation of methane or of short chain alkanes // *Biochemistry.* – 2019. – V. 58. – P. 5198–5220.
766. Thauer R.K., Kaster A.K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – V. 6. – P. 579–559.
767. Thiagarajan N., Xie H., Ponton C., Kitchen N., Peterson B., Lawson M. et al. Isotopic evidence for quasi-equilibrium chemistry in thermally mature natural gases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2020. – V. 117. – P. 3989–3995.
768. Thomé R., Gust A., Toci R., Mendel R., Bittner F., Magalon A., Walburger A. A sulfurtransferase is essential for activity of formate dehydrogenases in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – P. 4671–4678.
769. Thompson K.F.M. Classification and thermal history of petroleum based on light hydrocarbons // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 1983. – V. 47. – P. 303–316.
770. Tiedt O., Mergelsberg M., Boll K., Müller M., Adrian L., Jehmlich N., von Bergen M., Boll M. ATP-dependent C–F bond cleavage allows the complete degradation of 4-fluoroaromatics without oxygen // *mBio.* – 2016. - V 7:10.1128/mbio.00990-16.
771. Timmers P.H.A., Widjaja-Greefkes H.C.A., Ramiro-Garcia J., Plugge C.M., Stams A.J.M. Growth and activity of ANME clades with different sulfate and sulfide concentrations in the presence of methane // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6:988.
772. Tippelt A., Jahnke L., Poralla K. Squalene–hopene cyclase from *Methylococcus capsulatus*: a bacterium producing hopanoids and steroids // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. –V.1391. – P. – 223–232.
773. Tissot B.P., Welte D.H. Petroleum formation and occurrence. – Springer-Verlag, Berlin, 1984.
774. Toffin L., Webster G., Weightman A.J., Fry J.C., Prieur D. Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2004. – V. 48, № 3. – P. 357–367.
775. Top E.M., Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds // *Current Opinion Biotechnol.* – 2003. – V. 14. – P. 262–269.
776. Topcuoglu B.D., Stewart L.C., Morrison H.G., Butterfield D.A., Huber J.A., Holden J.F. Hydrogen limitation and syntrophic growth among natural assemblages of thermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7:1240.

777. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rozenberg E. Emulsifying activities of purified alasin proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67, № 3. – P. 1102–1106.
778. Torres M.E., Cox T., Hong W.-L., McManus J., Sample J.C., Destrigneville C., Gan H.M., Gan H.Y., Moreau J.W. Crustal fluid and ash alteration impacts on the biosphere of Shikoku Basin sediments, Nankai Trough, Japan // Geobiology. – 2015. – V. 13. – P. 562–580.
779. Tran P.Q., Bachand S.C., McIntyre P.B., Kraemer B.M., Vadeboncoeur Y., Kimirei I.A. et al. Depth-discrete metagenomics reveals the roles of microbes in biogeochemical cycling in the tropical freshwater Lake Tanganyika // ISME J. – 2021. – V. 15. – P. 1971–1986.
780. Trembath-Reichert E., Morono Y., Ijiri A., Hoshino T., Dawson K.S., Inagaki F., Orphan V.J. Methyl-compound use and slow growth characterize microbial life in 2-km-deep subseafloor coal and shale beds // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2017. – V. 114. – P. E9206–E9215.
781. Tsang M.-Y., Bowden S.A., Wang Z., Mohammed A., Tonai S., Muirhead D. et al. Hot fluids, burial metamorphism and thermal histories in the underthrust sediments at IODP 370 Site C0023, Nankai Accretionary Complex // Mar. Pet. Geol. – 2020. – V. 112. – P. 104080.
782. Ueno Y., Yamada K., Yoshida N., Maruyama S., Isozaki Y. Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era // Nature. – 2006. – V. 440. – P. 516–519.
783. Ulrich A.C., Beller H.R., Edwards E.A. Metabolites detected during biodegradation of 13C6-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures // Environ. Sci. Technol. – 2005. – V. 39. – P. 6681–6691.
784. Umezawa K., Kojima H., Kato Y., Fukui M. *Dissulfurispira thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic chemolithoautotroph growing by sulfur disproportionation, and proposal of novel taxa in the phylum *Nitrospirota* to reclassify the genus *Thermodesulfovibrio* // Syst. Appl. Microbiol. – 2021. – V. 44:126184.
785. Uzun M., Koziyeva V., Dziuba M., Alekseeva L., Krutkina M., Sukhacheva M., Baslerov R., Grouzdev D. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil // ISME J. – 2023. – V. 17. – P. 204–214.
786. Valentine D.L. Emerging topics in marine methane biogeochemistry // Ann. Rev. Mar. Sci. – 2011. – V. 3. – P. 147–171.
787. van Aarssen B., Alexander R., Kagi R. Higher plant biomarkers reflect palaeovegetation changes during Jurassic times // Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2000. – V. 64. – P. 1417–1424.
788. van Beilen J.B., Panke S., Lucchini S., Franchini A.G., Rothlisberger M., Witholt B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk-genes // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 1621–1630.
789. van Rensbergen P., De Batist M., Klerkx J., Hus R., Poort J., Vanneste M., Granin N., Khlystov O., Krinitsky P. Sublacustrine mud volcanoes and methane seeps caused by dissociation of gas hydrates in Lake Baikal // Geology. – 2002. – V. 30. – P. 631–634.
790. Van Verseveld H.W., Stouthamer A.H. The genus *Paracoccus* / Eds Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. – NY: Springer-Verlag New York, 1991. – P. 2321–2334.
791. Vanneste M., Poort J., De Batist M., Klerkx J. Atypical heat-flow near gas hydrate irregularities and cold seeps in the Baikal Rift Zone // Mar. Petrol. Geol. – 2002. – V. 19. – P. 1257–1274.

792. Vanwonterghem I., Evans P.N., Parks D.H., Jensen P.D., Woodcroft B.J., Hugenholtz P., Tyson G.W. Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota* // Nat. Microbiol. – 2016. – V. 1:16170
793. Varghese N.J., Mukherjee S., Ivanova N., Konstantinidis K.T., Mavrommatis K., Kyrpides N.C., Pati A. Microbial species delineation using whole genome sequences // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – P. 6761–6771.
794. Varjani S.J., Upasani V.N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant // Biores. Technol. – 2017. – V. 232. – P. 389–397.
795. Vera M., Schippers A., Sand W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation // Appl Microbiol Biotechnol. – 2013. – V. 97. – P. 7529–7541.
796. Vigneron A., Alsop E.B., Cruaud P., Philibert G., King B., Baksmaty L. et al. Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico // Sci. Rep. – 2017. – V. 7:16015.
797. Vigneron A., Vincent W.F., Lovejoy C. Discovery of a novel bacterial class with the capacity to drive sulfur cycling and microbiome structure in a paleo-ocean analog // ISME Commun. – 2023. – V. 18:82.
798. Vogel T.M., Oremland R.S., Kvenvolden K.A. Low-temperature formation of hydrocarbon gases in San Francisco Bay sediments (California, USA) // Chem. Geol. – 1982. – V. 37. – P. 289–298.
799. Vogt C., Richnow H.H. Bioremediation via in situ microbial degradation of organic pollutants // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2014. – V. 142. – P. 123–146.
800. Volkman J.K. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter // Org. Geochem. – 1986. – V. 9. – P. 83–99.
801. Volkman J.K., Banks M.R., Denwer K., Aquino Neto F.R. Biomarkers composition and deposition setting of Tasmanite oil shale from northern Meeting on Organic Geochemistry // Organic Geochemistry. – 1989. – V.9. – P.198.
802. Vologina E.G., Sturm M., Vorobyova S.S., Granina L.Z. New results of high resolution studies of surface sediments of Lake Baikal // Terra Nostra. – 2000. – № 9. – C. 115–131.
803. Volpi M., Lomstein B. A., Sichert A., Røy H., Jørgensen B.B., Kjeldsen K.U. Identity, abundance, and reactivation kinetics of thermophilic fermentative endospores in cold marine sediment and seawater // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8:131.
804. Walsh E.A., Kirkpatrick J.B., Rutherford S.D., Smith D.C., Sogin M., D'Hondt S. Bacterial diversity and community composition from seafloor to subsurface // ISME J. – 2016. – V. 10. – P. 979–989.
805. Walzer G., Rozenberg E., Ron E.Z. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier // Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8. – P. 1026–1032.
806. Wang B., Kuang S., Shao H., Wang L., Wang H. Anaerobic-petroleum degrading bacteria: Diversity and biotechnological applications for improving coastal soil // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2021. – V. 224: 112646.
807. Wang J., Guo X., Li H., Qi H., Qian J., Yan S., Shi J., Niu W. Hydrogen sulfide from cysteine desulfurase, not 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, contributes to sustaining cell growth and bioenergetics in *E. coli* under anaerobic conditions // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10:2357.
808. Wang L., Li X., Lai Q., Shao Z. *Kiloniella litopenaei* sp. nov., isolated from the gut microflora of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2015. – V. 108, № 25. – P.1293–1299.



809. Wang T.G. Biomarkers in bitumen sandstone of Longtangou – a study of Proterozoic reservoir bitumen. Approach to Biomarker Geochemistry (in Chinese). Wuhan: China Univ Geosci Press, 1990. – 146–154.
810. Wang V.C.C., Maji S., Chen P.P.Y., Lee H.K., Yu S.S.F., Chan S.I. Alkane oxidation: methane monooxygenases, related enzymes, and their biomimetics // Chem. Rev. – 2017. – V. 117. – P. 8574–8621.
811. Wang Y., Wegener G., Hou J., Wang F., Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of *Archaea* // Nat. Microbiol. – 2019. – V. 4. – P. 595–602.
812. Wang Y., Wegener G., Ruff S.E., Wang F. Methyl/alkyl-coenzyme M reductase-based anaerobic alkane oxidation in archaea // Environ. Microbiol. – 2021. – V. 23. – P. 530–541.
813. Wang Z., You R., Han H., Liu W., Sun F., Zhu S. Effective binning of metagenomic contigs using contrastive multi-view representation learning // Nat. Commun. – 2024. – V. 15:1.
814. Ward L.M., McGlynn S.E., Fischer W.W. Draft genome sequences of two basal members of the *Anaerolineae* class of *Chloroflexi* from a sulfidic hot spring // Genome Announc. – 2018. – V. 6:25.
815. Webster G., Blazejak A., Cragg B.A., Schippers A., Sass H., Rinna J. Subsurface microbiology and biogeochemistry of a deep, cold-water carbonate mound from the Porcupine Seabight (IODP Expedition 307) // Environ. Microbiol. – 2009. – V. 11, № 1. – P. 239–257.
816. Webster G., Parkes R.J., Cragg B.A., Newberry C.J., Weightman A.J., Fry J.C. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V. 58. – P. 65–85.
817. Wehrmann L.M., Riedinger N. The sedimentary deep seafloor biosphere. In: Encyclopedia of Ocean Sciences / Eds. Cochran J.K., Bokuniewicz H.J., Yager P.L. Academic Press, 2016. – P. 258–274.
818. Weiss R.F., Carmack E.C., Koropalov V.M. Deep-water renewal and biological production in Lake Baikal // Nature. – 1991. – V. 349. – P. 665–669.
819. Wellsbury P., Goodman K., Barth T., Cragg B.A., Barnes S.P., Parkes R.J. Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating // Nature. – 1997. – V. 388. – P. 573–576.
820. Welte C.U., Rasigraf O., Vaksmaa A., Versantvoort W., Arshad A., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Lüke C., Reimann J. Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane // Environ. Microbiol Rep. – 2016. – V. 8. – P. 941–955.
821. Wen Z., Ruiyong W., Radke M., Qingyu W., Guoying S., Zhili L. Retene in pyrolysates of algal and bacterial organic matter // Org. Geochem. – 2000. – V. 31. – P. 757–762.
822. Westall F., Hickman-Lewis K., Hinman N., Gautret P., Campbell K.A., Bréhéret J.G. A hydrothermal-sedimentary context for the origin of life // Astrobiology. – 2018. – V. 18. – P. 259–293.
823. Whelan J., Oremland R., Tarafa M., Smith R., Howarth R., Lee C. Evidence for sulfate-reducing and methane-producing microorganisms in sediments from sites 618, 619, and 622. In: Initial reports of the deep sea drilling project, 96. Washington, US Govt Printing Office. – 1986. – V. 98. – P. 767–775.
824. Whelan J.K., Blanchette M.A., Hunt J.M. Volatile C1–C7 organic compounds in an anoxic sediment core from the Pettaquamscutt River (Rhode Island, USA) // Org. Geochim. – 1983. – V. 5. – P. 29–33.
825. Whiticar M.J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // Chem. Geol. – 1999. – V. 161. – P. 291–314.

826. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: the unseen majority // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95. – P. 6578–6583.
827. Widdel F., Back F. The Prokaryotes. Ecophysiology and Biogeochemistry. – US: Springer, 1992.
828. Widdel F., Pfennig N. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov // Arch. Microbiol. – 1982. – V. 131. – P. 360–365.
829. Wilhelms A., Larter S.R., Head I., Farrimond P., di-Primio R., Zwach C. Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilization // Nature. – 2001. – V. 411. – P. 1034–1037.
830. Willumsen P.A., Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers // Biodegradation. – 1989. – V. 7. – P. 415–423.
831. Wischgoll S., Heintz D., Peters F., Erxleben A., Sarnighausen E., Reski R., Dorselaer A., Boll M. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens* // Mol. Microbiol. – 2006. – V. 58. – P. 1238–1252.
832. Wohlbrand L., Wilkes H., Halder T., Rabus R. Anaerobic degradation of p-ethylphenol by “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1: pathway, regulation, and involved proteins // J. Bacteriol. – 2008. – V. 190. – P. 5699–5709.
833. Wolfe J.M., Fournier G.P. Horizontal gene transfer constrains the timing of methanogen evolution // Nat. Ecol. Evol. – 2018. – V. 2. – P. 897–903.
834. Wormer L., Hoshino T., Bowles M.W., Viehweger B., Adhikari R.R., Xiao N. et al. Microbial dormancy in the marine subsurface: Global endospore abundance and response to burial // Sci. Adv. – 2019. – V. 5:eaav1024.
835. Wrighton K.C., Agbo P., Warnecke F., Weber K.A., Brodie E.L., DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Andersen G.L., Coates J.D. A novel ecological role of the *Firmicutes* identified in thermophilic microbial fuel cells // ISME J. – 2008. – V. 2. – P. 1146–1156.
836. Wu Y., Tan L., Liu W., Wang B., Wang J., Cai Y. et al. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6:244.
837. Wu Y.W., Simmons B.A., Singer S.W. MaxBin 2.0: An automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets // Bioinformatics. – 2016. – V. 32. – P. 605–607.
838. Wunderlin T., Junier T., Paul C., Jeanneret N., Junier P. Physical isolation of endospores from environmental samples by targeted lysis of vegetative cells // J. Vis. Exp. – 2016. – V. 21:e53411.
839. Xie S., Lazar C., Lin Y.-S., Teske A., Hinrichs K.-U. Ethane- and propane-producing potential and molecular characterization of an ethanogenic enrichment in an anoxic estuarine sediment // Org. Geochem. – 2013. – V. 59. – P. 37–48.
840. Xu S., Cai C., Guo J., Lu W., Yuan Z., Hu S. Different clusters of Candidatus ‘*Methanoperedens nitroreducens*’-like archaea as revealed by high-throughput sequencing with new primers // Sci. Rep. – 2018. – V. 8:7695.
841. Yanagawa K., Kouduka M., Nakamura Y., Hachikubo A., Tomaru H., Suzuki Y. Distinct microbial communities thriving in gas hydrate-associated sediments from the eastern Japan Sea // J. Asian Earth Sci. – 2014. – V. 90. – P. 243–249.
842. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2017. – V. 67. – P. 1613–1617.

843. Yu T., Wu W., Liang W., Lever M.A., Hinrichs K.-U., Wang F. Growth of sedimentary *Bathyarchaeota* on lignin as an energy source // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2018. – V. 115. – P. 6022–6027.
844. Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // Biotechnol. Bioeng. – 2005. – V. 89. – P. 670–679.
845. Yu Z., Wu C., Yang G.Q., Zhou S.G. *Planifilum caeni* sp. nov., a novel member of *Thermoactinomyces* isolated from sludge compost // Curr. Microbiol. – 2015. – V. 70. – P. 135–140.
846. Zakharova Y.R., Petrova D.P., Galachyants Y.P., Bashenkhaeva M.Y., Kurilkina M.I., Likhoshway Y.V. Bacterial and archaeal community structure in the surface diatom sediments of deep freshwater Lake Baikal (Eastern Siberia) // Geomicrobiol. J. – 2018. – V. 35. – P. 635–647.
847. Zarate-del Valle P.F., Rushdi A.I., Simoneit B.R.T. Hydrothermal petroleum of Lake Chapala, Citala Rift, western Mexico: Bitumen compositions from source sediments and application of hydrous pyrolysis // Appl. Geochem. – 2006. – V. 21. – P. 701–712.
848. Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Backstrom D., Juzokaite L., Vancaester E. et al. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // Nature. – 2017. – V. 541. – P. 353–358.
849. 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.
850. 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.
851. Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Zakharenko A.S., Pogodaeva T.V., Petrova D.P., Galachyants Yu.P. Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge // Aquatic. Microb. Ecol. – 2015. – V. 76. – P. 95–109.
852. Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V., Chernitsina S.M., Dagurova O.P., Buryukhaev S.P. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3 // Geo Mar. Lett. – 2010. – V. 30. – P. 411–425.
853. Zemskaya T.I., Sitnikova T.Y., Kiyashko S.I., Kalmychkov G.V., Pogodaeva T.V., Mekhanikova I.V., Naumova T.V., Shubenkova O.V., Chernitsina S.M., Kotsar O.V., Chernyaev E.S., Khlystov O.M. Faunal communities at sites of gas- and oil-bearing fluids in Lake Baikal // Geo-Marine Letters. – 2012. – V. 32. – P. 437–451.
854. Zhang C., Meckenstock R.U., Weng S., Wei G., Hubert C.R.J., Wang J.H., Dong X. Marine sediments harbor diverse archaea and bacteria with potential for anaerobic hydrocarbon degradation via fumarate addition // FEMS Microbiol. Ecol. – 2021. – V. 97:fiab045.
855. Zhang J., Liu R., Xi S., Cai R., Zhang X., Sun C. A novel bacterial thiosulfate oxidation pathway provides a new clue about the formation of zero-valent sulfur in deep sea // ISME J. – 2020. – V. 14. – P. 2261–2274.
856. Zhang J.W., Dong H.P., Hou L.J., Liu Y., Ou Y.-F., Zheng Y.-L. et al. Newly discovered Asgard archaea *Hermodarchaeota* potentially degrade alkanes and aromatics via alkyl/benzyl-succinate synthase and benzoyl-CoA pathway // ISME J. – 2021. – V. 15. – P. 1826–1843.

857. Zhang K., Hu Z., Zeng F.F., Yang X.Y., Wang J.J., Jing R., Zhang H.N., Li Y.T., Zhang Z. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and changes in microbial community structure in sediment under nitrate-, ferric-, sulfate-reducing and methanogenic conditions // *J. Environ. Manage.* – 2019. – V. 249:109425.
858. Zhang L., Huang D., Liao Z. High concentration retene and methylretene in Silurian carbonate of Michigan Basin // *Chin. Sci. Bull.* – 1999. – V. 44. – P. 2083–2086.
859. Zhang T., Bain T.S., Nevin K.P., Barlett M.A., Lovley D.R. Anaerobic benzene oxidation by *Geobacter* species // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78. – P. 8304–8310.
860. Zhang T., Tremblay P., Chaurasia A.K., Smith J.A., Bain T.S., Lovley D.R. Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79. – P. 7800–7806.
861. Zhang X., Sullivan E.R., Young L.Y. Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate-reducing consortium // *Biodegradation.* – 2000. – V. 11. – P. 117–124.
862. Zhang X., Young L.Y. Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 4759–4764.
863. Zhang Y., Yao P., Sun C., Li S., Shi X., Zhang X., Liu J. Vertical diversity and association pattern of total, abundant and rare microbial communities in deep-sea sediments // *Molec. Ecol.* – 2021. – V. 30. – P. 2800–2816.
864. Zhang Y., Yao P., Sun C., Li S., Shi X., Zhang X.-H., Liu J. Vertical diversity and association pattern of total, abundant and rare microbial communities in deep-sea sediments // *Mol. Ecol.* – 2021. – V. 30. – P. 2800–2816.
865. Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G., Pan J., Yang Y., Gu J.-D., Li M. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermopfundales* (MBG-D archaea) // *ISME J.* – 2019. – V. 13. – P. 885–901.
866. Zhou Z., Pan J., Wang F., Gu J.-D., Li M. *Bathymarchaeota*: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2018. – V. 42. – P. 639–655.
867. Zinger L., Amaral-Zettler L.A., Fuhrman J.A., Horner-Devine M.C., Huse S.M., Welch D. et al. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems // *PLoS One.* – 2011. – V. – P. 1–11.
868. Zobell C.E. Studies on the bacterial flora of marine bottom sediments // *J. Sediment Res.* – 1938. – V. 8. – P. 10–18.
869. ZoBell C.E., Anderson D.Q. Vertical distribution of bacteria in marine sediments // *AAPG Bull.* – 1936. – V. 20. – P. 258–269.
870. Zolitschka B., Anselmetti F., Ariztegui D., Corbella H., Francus P., Lücke A., Maidan, N.I., Ohlendorf C., Schäbitz F., Wastegård S. Environment and climate of the last 51,000 years – new insights from the Potrok Aike maar lake Sediment Archive Drilling prOject (PASADO) // *Quat. Sci. Rev.* – 2013. – V. 71. – P. 1–12.
871. Zumberge J., Ferworn K., Brown S. Isotopic reversal (‘rollover’) in shale gases produced from the mississippian barnett and fayetteville formations // *Mar. Petrol. Geol.* – 2012. – V. 31. – P. 43–52.