

На правах рукописи



ЗАХАРЕНКО

Александра Сергеевна

**АЭРОБНЫЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ВОДНОЙ ТОЛЩИ
ОЗЕРА БАЙКАЛ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

Иркутск – 2020

Работа выполнена в лаборатории микробиологии углеводов в ФГБУН
Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук,
г. Иркутск

*Научный
руководитель:* **Земская Тамара Ивановна**
доктор биологических наук, заведующая лабораторией
микробиологии углеводов Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Лимнологического института
Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

*Официальные
оппоненты:* **Дедыш Светлана Николаевна**
доктор биологических наук, заведующая лабораторией
микробиологии болотных экосистем Федерального
государственного учреждения «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва
Лаврентьева Елена Владимировна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории микробиологии Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института общей и
экспериментальной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, г. Улан-Удэ

*Ведущая
организация:* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный
центр биологических исследований Российской академии
наук», обособленное подразделение – Институт биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, Пушкино

Защита диссертации состоится 18 декабря 2020 г. в 16.00 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский
государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
Байкальский музей им. профессора М. М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО
«ИГУ» им. В. Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124 и
на сайте Иркутского государственного университета:
<http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=177>.

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по
адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет
ИГУ. Тел./факс: (3952)24-18-55; e-mail: dissovet07@gmail.com

Автореферат разослан «___» октября 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Метан – один из основных парниковых газов, влияющих на изменение климата, особенно в современный период. Исследования цикла метана (CH_4) имеют общемировое значение и привлекают внимание ученых из разных стран. Эти исследования направлены на оценку потоков CH_4 из различных резервуаров: морских и пресноводных экосистем, рисовых чеков, торфяников, районов вечной мерзлоты, а также метановых сипов и газогидратных полей (Rudd, Taylor, 1980; Ivanov et al., 1993; Borowski, 2004; Malinverno, Goldberg, 2015; Zhang et al., 2016; Hoptcroft, 2017; Dean et al., 2018; Sanches et al., 2019). С применением комплекса методов исследованы биогеохимические циклы CH_4 в различных типах озер (Carini et al., 2005; Eller et al., 2005; Murase et al., 2005; Пименов и др., 2010; Crowe et al., 2011; Naeher et al., 2014; Thomas et al., 2019).

Озеро Байкал как самое глубокое и древнее озеро на планете в плане изучения цикла CH_4 представляет особый интерес. К настоящему времени в Байкале отмечены многочисленные районы, где из донных осадков в водную толщу поступают жидкие и газообразные углеводороды (Кузьмин и др., 1998; Клеркс и др., 2003; Хлыстов и др., 2007; Granin et al., 2010; Khlystov et al., 2013; Zemskaya et al., 2015). Количество сипов в Байкале на единицу площади аналогично количеству в Мировом океане (Хлыстов и др., 2014), а потенциальные источники метановых гидратов в байкальских отложениях сопоставимы с крупнейшим в мире накоплением газовых гидратов (ГГ) в Блейк Ридж (Blake Ridge, Атлантический океан, США) (Borowski, 2004).

Первые работы по измерению концентраций CH_4 в водной толще озера Байкал свидетельствовали о том, что метан, высвобождающийся из донных осадков с глубины 1400 м, в основном растворяется и окисляется в толще воды (Schmid et al., 2007). Более поздние исследования поверхностных вод прибрежной зоны и устьев рек во время весеннего периода показали поступление CH_4 в атмосферу (Pestunov et al., 2015). Высокие концентрации CH_4 были отмечены в глубинных слоях пелагиали озера вблизи метановых сипов и грязевых вулканов (Гранин и др., 2013). В ряде публикаций была рассмотрена проблема увеличения содержания CH_4 в воде озера Байкал и возможные причины этого явления (Гранин и др., 2013, 2014; Mizandrontsev et al., 2019; Мизандронцев и др., 2020). Основная гипотеза – изменение уровня воды в Байкале после строительства Иркутской ГЭС, что могло привести к разложению гидратов CH_4 и формированию аномально высоких концентраций метана в глубинных водах и эмиссии в атмосферу.

Исследования микроорганизмов, участвующих в цикле CH_4 , в глубоководном и олиготрофном озере Байкал в основном касались сообществ донных отложений (Намсараев, Земская, 2000; Гайнутдинова и др., 2005; Намсараев и др., 2006;

Дагурова и др., 2007; Шубенкова и др., 2007, 2011; Земская и др., 2008). Есть несколько работ, в которых приведены данные о численности метаноокисляющих бактерий (МОБ) в придонной воде районов разгрузки углеводородов оз. Байкал (Намсараев и др., 2002; Шубенкова, 2006) и о скоростях окисления метана (Гайнутдинова, 2005; Намсараев и др., 2006). Наличие бактерий этой группы в различных слоях водной толщи фоновых районов озера отмечено рядом исследователей при анализе разнообразия сообществ с помощью молекулярных методов (Денисова и др., 1999; Белькова и др., 2003; Kurilkina et al., 2016). Состав бактериальных сообществ в водной толще озера Байкал вблизи выходов жидких и газообразных углеводородов ранее не исследован. Учитывая современные климатические изменения и большие запасы метана в виде ГГ в оз. Байкал, изучение метанотрофных бактерий, основной функциональной группы, участвующей в окислении CH_4 в аэробных условиях (Hanson, Hanson, 1996), весьма актуально.

Цель работы: установить филогенетическое разнообразие, численность и физиологические особенности метанотрофных бактерий, а также определить скорости окисления метана в водной толще озера Байкал в районах с различными экологическими условиями.

Задачи:

1. Определить филогенетическое разнообразие и численность метанотрофных бактерий с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК, *pmoA* и *mxaF* и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в различные гидрологические сезоны.
2. Определить метаноокисляющую активность бактерий в водной толще вблизи районов выхода жидких и газообразных углеводородов с помощью радиоизотопного метода.
3. Провести сравнительный анализ метаноокисляющих сообществ бактерий водной толщи в различные гидрологические сезоны и выявить взаимосвязь с условиями среды обитания.
4. Выявить гены, характеризующие метаболизм углерода и азота в геномах метанотрофов, полученных с помощью глубокого метагеномного анализа (MAG);
5. Оценить в эксперименте влияние различных источников азота на развитие метаноокисляющих бактерий.

Научная новизна работы. Впервые с использованием комплекса методов, включая эпифлуоресцентную микроскопию, радиоизотопный метод, культивирование и высокопроизводительное секвенирование, проанализирована структура метанотрофных сообществ бактерий водной толщи оз. Байкал в экологических зонах, где отмечена разгрузка углеводородов. В различные

гидрологические сезоны в трех районах озера Байкал определена численность метанооксиляющих бактерий и выявлено наличие метанового биофильтра в зонах с повышенными концентрациями CH_4 . Установлено, что таксономический состав бактериальных сообществ водной толщи в зонах разгрузок различается в зависимости от глубины, температуры воды и типов поступающих углеводов (с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК). В глубинных слоях водной толщи районов разгрузки углеводов установлена активная роль метанотрофов в окислении CH_4 . Получены структуры последовательностей байкальских линий метанотрофов, образующих на филогенетическом дереве отдельные кластеры, не имеющие культивируемых гомологов. Впервые аннотировано три генома метанооксиляющих бактерий из водной толщи оз. Байкал. При культивировании в психрофильных условиях впервые исследовано влияние различных источников азота на развитие МОБ оз. Байкал.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволили установить активную роль метанооксиляющих бактерий в водной толще различных экологических зон оз. Байкал и выявить эндемичных представителей этой группы микроорганизмов. Понимание их метаболизма в ультрапресном и глубоководном водоеме позволит установить отклик метанооксиляющих бактерий на изменения окружающей среды. Результаты исследования могут быть использованы при расчете потоков метана из водной толщи в атмосферу, а также при оценке вклада оз. Байкал в региональный бюджет метана в условиях современных климатических изменений.

Существенно расширена база данных последовательностей генов 16S рРНК и *pmoA* метанооксиляющих бактерий, населяющих водную толщу оз. Байкал. Полученные массивы данных секвенирования зарегистрированы в базе данных NCBI для проведения сравнительного анализа с последовательностями из других сред обитания. Кроме того, полученные в работе геномы метанооксиляющих бактерий могут быть использованы для разработки молекулярных методов детекции этих микроорганизмов в холодноводных водоемах.

Защищаемые положения:

1. В пелагиали озера Байкал с различными экологическими условиями (температурный режим, тип разгружающихся углеводов, концентрации метана, минерализация, глубина) доминируют метанотрофные бактерии I типа. Метанооксиляющая активность выше в придонных слоях водной толщи с повышенными концентрациями метана;

2. Разнообразие и структура метанооксиляющих сообществ водной толщи различны, что определяется не только физико-химическими условиями среды, но и составом жидких и газообразных углеводородов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях, конгрессах и симпозиуме: VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 25-летию обнаружения струйных метановых газовыделений в Черном море «Метан в морских экосистемах» (Севастополь, 2014); Шестой Международной Верецагинской Байкальской конференции и Четвертом Байкальском Микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2015); I-ом Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017); II-ой Всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2017); Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий», посвященной 100-летию Иркутского государственного университета (Иркутск, 2018); 12th International Congress on Extremophiles (Ischia, Italy, 2018); Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019).

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, изложенных в диссертационной работе. Автор принимал участие в экспедиционных работах, результаты которых вошли в диссертацию. Все результаты получены автором лично либо при его непосредственном участии в ходе коллективных работ. Автор проанализировал и обобщил результаты исследований, которые были оформлены с соавторами в виде публикаций в рецензируемых журналах и научных докладов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 5 статей, индексируемых Web of Science, и 9 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 138 страницах, содержит 20 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 374 источника, из которых 46 отечественных и 328 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю зав. лаб. микробиологии углеводородов д.б.н. Т. И. Земской за постановку задач и полезные практические советы. Автор благодарит д.б.н. Н. В.

Пименова (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва), к.б.н. И. В. Морозова (ЦКП «Геномика» СО РАН, Новосибирск), к.х.н. Г. В. Калмычкова (Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН), Р. J. Cabello-Yeves (Университет им. Мигеля Эрнандеса, Испания), к.б.н. О. В. Шубенкову, к.г.н. В. Г. Иванова, к.б.н. Ю. П. Галачянц, к.б.н. А. А. Морозова, А. А. Краснопеева (ЛИН СО РАН) и всех сотрудников лаборатории микробиологии углеводородов за ценные советы и поддержку на всех этапах работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С использованием зарубежной и отечественной литературы приведены сведения о бюджете CH_4 в атмосфере, основных аспектах физиологии и экологии аэробных метанооксиляющих бактерий и методах их изучения.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

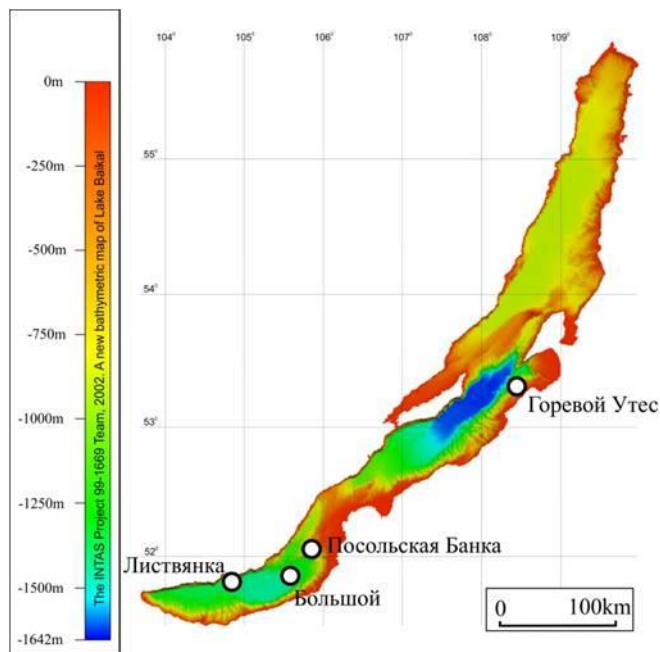


Рис. 1. Схема отбора природных образцов на озере Байкал

Объектами исследования являлись бактериальные сообщества водной толщи районов разгрузки углеводородсодержащих флюидов (нефте-метановый сип Горевой Утес – район I; грязевой вулкан Большой – район II) и фонового глубоководного района вблизи поселка Листвянка (район III). Для эксперимента использовали поверхностный осадок из района глубоководного метанового сипа Посольская Банка – район IV) (рис. 1). Исследования проводили с 2013 по 2018 год. Отбор водных проб проводили системой батометров *SBE 32 Carousel*

Water Sampler, донный осадок отбирали с помощью грейфера с борта НИС «Г. Ю. Верещагин». Одновременно с пробоотбором на этих же станциях проводили измерения профилей температуры и минерализации зондом *SBE 19Plus*.

Содержание CH_4 в водной толще определяли методом «Headspace» (Большаков, Егоров, 1987) на газовом хроматографе «Эхо-EW» с пламенно-ионизационным детектором (Новосибирск, Россия). Анализ CH_4 в газовой фазе экспериментальных флаконов проводили на хроматографе «ЭХО-ПИД».

Структуру метанотрофного сообщества определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием олигонуклеотидных зондов, меченных флуоресцентным красителем Cy3. Для исследования были использованы стандартные зонды на I и II типы метанотрофов (Eller et al., 2001). Фиксацию микроорганизмов проводили методом, разработанным ранее (Glöckner et al., 1996). Гибридизацию препаратов с зондами проводили в соответствии с методикой Stahl и Amann (1991). Для подсчета общей численности микроорганизмов (ОЧМ) пробы воды фиксировали 4% формалином и окрашивали флуорохромным красителем ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндол) (Porter, 1980). Подсчет клеток производили под эпифлуоресцентным микроскопом AxioImager.M1 с помощью программы Image Test.

Измерения активности окисления CH_4 в водной толще проводили радиоизотопным методом с ^{14}C -метаном по методике, подробно описанной ранее (Гальченко, 1994). При расчете скорости окисления метана учитывали как окисление ^{14}C - CH_4 до углекислоты, так и включение ^{14}C -углерода CH_4 в нелетучую при подкислении фракцию органического вещества.

Выделение ДНК из образцов проводили согласно модифицированной методике (Шубенкова и др., 2005) фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989).

Аmplификацию и секвенирование фрагментов генов 16S рРНК (V2-V3), *pmoA* и *mxaF* (образцы из районов разгрузок углеводородов) проводили на основе платформы Illumina MiSeq в ЦКП «Геномика» СО РАН, Новосибирск. Обработку последовательностей 16S рРНК и *pmoA* выполняли с использованием программного обеспечения Mothur v.1.34.4 (Kozich et al., 2013) в соответствии с рекомендациями MiSeq SOP (Schloss et al., 2009). Пакет CD-HIT (Fu et al., 2012) использовали при обработке последовательностей *mxaF* для создания кластеров на расстоянии 0.03 с последующим молекулярно-филогенетическим анализом полученных последовательностей, представляющих многочисленные группы. Последовательности 16S рРНК, *pmoA* и *mxaF* были депонированы в архив GenBank, секцию SRA (№№ PRJNA380525, PRJNA506297).

Секвенирование образцов из фонового района вблизи п. Листвянка (с глубин 5 м и 20 м) проводили с использованием Illumina HiSeq 3000/4000 (Oklahoma Medical Research Foundation), образцы ДНК с глубин 1250 м и 1350 м были секвенированы на платформе Illumina HiSeq XTenPE 2X150 bp («Novogene»). Аннотация контигов и геномов, собранных из метагеномов (MAGs), были оценены с помощью программ BLAST (Nr), COG (Tatusov et al., 2001), TIGFRAM (Haft et al., 2001), tRNAscan (Lowe, Eddy, 1997), ssu-align (Nawrocki, Eddy, 2010), RAST (Overbeek et al., 2013), Kegg-KO (Kanehisa, Goto, 2000), CDD-SPARCLE (Marchler-Bauer et al., 2016) и BLASTKoala

(Kanehisa et al., 2016). MAGs использовали только при контаминации <5% и >50% полноты, оцененные пакетом CheckM (Parks et al., 2015). Филогеномная классификация MAGs была проведена в соответствии с последней версией GTDB (Parks et al., 2018). Полученные данные зарегистрированы в NCBI под номерами PRJNA396997 и PRJNA521725. В Genbank MAGs метанотрофов имеют номера доступа SAMN10915757, SAMN10915758 и SAMN10915748.

Для оценки сходства сообществ бактерий образцы анализировали с использованием PCoA (метод главных координат) и группировали с использованием средневзвешенных показателей UniFrac, рассчитанных в Mothur. Результаты представлены на графиках PCoA и дендрограммах UPGMA, выполненных в программах Grapher 9 и FigTree, соответственно. Метод главных компонент был использован для определения взаимосвязей между сообществами и физико-химическими параметрами водной толщи.

Для оценки влияния источников азота на структуру и разнообразие накопительных культур байкальских МОБ был использован поверхностный слой донных отложений из района метанового сипа Посольская Банка, где отмечены высокие концентрации CH_4 . Окисленный слой осадка 0–2 см отбирали стерильным шприцом, затем 5 см³ осадка суспендировали в 25 мл стерильной воды, после чего по 1 см³ суспензии вносили в герметично закрытые стерильные стеклянные флаконы объемом 120 мл с 40 мл среды. Для посева использовали жидкую минеральную среду Виттенбери (Whittenbury et al., 1970) с различными источниками азота: одна содержала аммонийный азот (AMS), другая – нитратный (NMS), pH 6.8–7.0. Затем в пробы вводили природный байкальский метан из газовых гидратов до концентрации около 67200 мкл/л. Флаконы инкубировали при 10°C в стационарных условиях в течение 5 недель. Эксперименты проводили в трех повторностях.

ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ВОДНОЙ ТОЛЩИ ИССЛЕДУЕМЫХ РАЙОНОВ

Исследования проведены в водной толще трех районов озера Байкал с различными гидрологическими условиями. Распределение значений температуры и минерализации в водной толще было различным. Значения ионной минерализации в районах разгрузок углеводородов и фоновом районе соответствовали наблюдаемым в летний и зимний сезоны, соответственно (Блинов и др., 2017). В районе I температура варьировала от 3.3 до 3.8°C, что характерно для весенней гомотермии (Атлас Байкала, 1993). В районе II температура воды соответствовала периоду прямой стратификации и составляла 3.3–5.0°C. Так как пробоотбор в районе III проводили зимой, температура воды на поверхности варьировала от 0.45 до 0.68°C, а в придонных слоях – от 3.27 до 3.33°C (период обратной температурной

стратификации). Максимальные концентрации CH_4 выявлены в придонной зоне водной толщи районов разгрузки углеводородов: в районе I на глубинах 850 и 855 м они составляли 1.0 и 0.63 мкл/л, соответственно (рис. 2а); в то время как в районе II на глубинах 1300 и 1370 м концентрации CH_4 были равны 0.19 и 0.36 мкл/л, соответственно (рис. 2б). Содержание CH_4 в водной толще района III варьировало от 0.04 мкл/л до 0.43 мкл/л (рис. 2в), что соответствовало отмечаемым концентрациям в фоновых районах (Гранин и др., 2013; Мизандронцев и др., 2020). Кроме того, во всех районах отмечен «метановый парадокс» (повышенное содержание CH_4 в поверхностных насыщенных кислородом водах), отмечаемый во многих водоемах (Repeta et al., 2016), в том числе и в оз. Байкал (Мизандронцев и др., 2020).

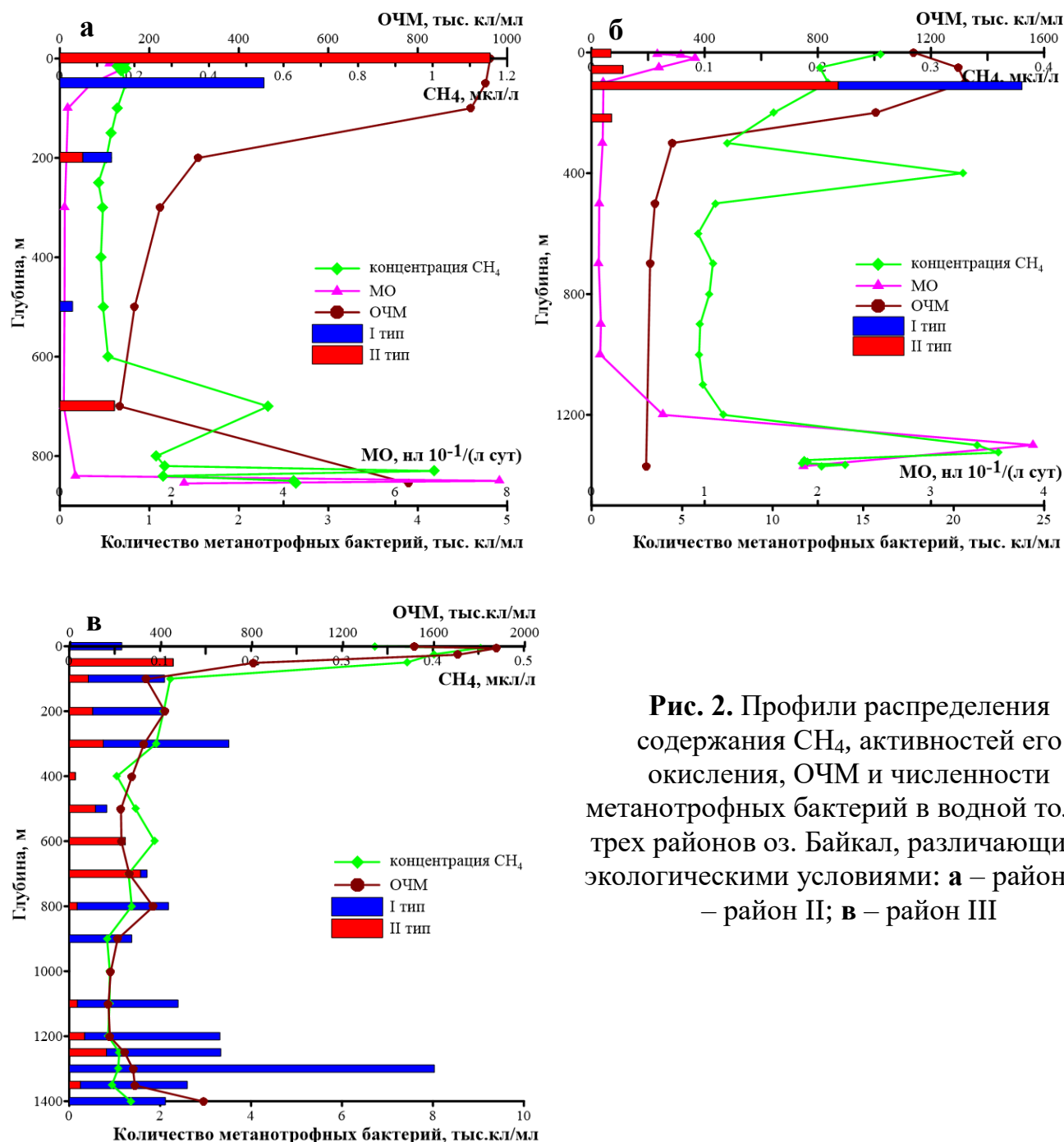


Рис. 2. Профили распределения содержания CH_4 , активностей его окисления, ОЧМ и численности метанотрофных бактерий в водной толще трех районов оз. Байкал, различающихся экологическими условиями: **а** – район I; **б** – район II; **в** – район III

ГЛАВА 4. ЧИСЛЕННОСТЬ И РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ МЕТАНОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В ВОДНОЙ ТОЛЩЕ БАЙКАЛА

В водной толще исследуемых районов распределение ОЧМ имело сходный характер: с увеличением глубины отмечено уменьшение численности микроорганизмов (рис. 2). Наиболее высокие значения ОЧМ были зарегистрированы в поверхностных слоях каждой станции. Такое распределение ОЧМ характерно для глубоких олиготрофных озер, в том числе и для озера Байкал (Максимова, Максимов, 1989).

Метанокисляющие бактерии обнаружены в водной толще всех исследуемых районов, но не на всех глубинах. В фотическом слое водной толщи района нефте-метанового сипа выявлены метанотрофные бактерии I и II типов. Метанотрофы I типа – на глубине 50 м в количестве 2.28 ± 0.26 тыс. кл/мл (0.23% от ОЧМ), метанотрофы II типа – в поверхностном слое воды, 4.81 ± 0.11 тыс. кл/мл (0.5% от ОЧМ). На глубине 700 м отмечено увеличение концентрации CH_4 до 0.56 мкл/л и численности метанотрофов II типа до 0.61 ± 0.054 тыс. кл/мл (0.45% от ОЧМ). На глубинах 100 м и 300 м метанотрофные бактерии не детектированы. В поверхностном слое водной толщи района грязевого вулкана на глубине 50 м обнаружены только метанотрофы II типа. Максимальное количество клеток МОБ II типа зафиксировано на глубине 100 м – 13.63 ± 0.48 тыс. кл/мл (1% от ОЧМ). Здесь же отмечена повышенная численность метанотрофов I типа – 10.15 ± 0.16 тыс. кл/мл (0.8% от ОЧМ). В фоновом районе численность МОБ не превышала 8.033 ± 0.134 тыс. кл/мл, что составляло 2.9% от ОЧМ. Максимальные значения отмечены в придонной области.

Для водной толщи районов разгрузки углеводородов оз. Байкал радиоизотопным методом установлено присутствие нескольких слоев с заметными различиями в интенсивности метанокисления (МО) (рис. 2а, б). В поверхностном фотическом слое до глубины 50 м отмечена повышенная активность МО, что согласуется с повышенными концентрациями метана. В целом, разброс значений МО для верхних 50 м водной толщи на исследованных станциях составил $0.58\text{--}1.14 \times 10^{-1}$ нл/(л сут). Глубже 50 м и практически до дна происходило резкое снижение интенсивности метанокисления, но в глубинных слоях водной толщи значения МО варьировали от 0.064 до 7.87×10^{-1} нл/(л сут). Придонные воды (до 100 м от дна) отличались крайне высоким разбросом значений содержания CH_4 и скоростями его окисления. По-видимому, это связано с месторасположением станций относительно действующих зон разгрузки CH_4 на дне. Наибольшая скорость МО, как и концентрация CH_4 (7.87×10^{-1} нл/(л сут) и 1 мкл/л, соответственно) отмечены в

районе I. Следует отметить, что пик МО и содержания CH_4 располагался на глубине 850 м, а не непосредственно у дна. Аналогичные результаты получены и для района II. Возможно, это связано с особенностями придонных течений и переносом обогащенных CH_4 и метанооксиляющими бактериями слоев водной толщи в горизонтальном и вертикальном направлении относительно зоны метановых высачиваний. Измерения интенсивности МО в водной толще фонового района не проводили.

В районах разгрузок жидких и газообразных углеводородов отмечена положительная корреляция между ОЧМ и температурой ($r=0.86$), в фоновом районе в подледный период значимая корреляционная связь найдена между ОЧМ, Σi и концентраций CH_4 ($r=0.94, 0.97$). Достоверной корреляции между численностью МОБ и содержанием CH_4 не обнаружено.

Анализ полученных данных показал, что концентрации CH_4 и скорости его окисления в водной толще оз. Байкал значительно ниже (на 3 и более порядков), чем в меромиктических озерах с различным трофическим статусом и температурным режимом. В водной толще перемешиваемых озер, таких как Констанц (Constance) (Bornemann et al., 2016), Вашингтон (Washington) (Lidstrom, Somers, 1984), Штехлин (Stechlin) (Grossart et al., 2011), Экольн (Ekoln) и Рамсен (Ramsen) (Samad, Bertilsson, 2017) концентрации CH_4 и МО выше, чем в оз. Байкал, на 1–2 порядка. Кроме того, метанооксиляющая активность оказалась значительно ниже, чем было показано ранее (Гайнутдинова, 2005; Намсараев и др., 2006). Вклад метанотрофных бактерий ($\leq 2.9\%$), определенный методом FISH, в общий бактериопланктон озера Байкал сопоставим с отмечаемым в оз. Киву (Kivu) (Zigah et al., 2015), оз. Констанц (Bornemann et al., 2016) и оз. Ротзее (Rotsee) (Oswald et al., 2015), но ниже, чем в оз. Танганьика (Tanganyika) (Durisch-Kaiser et al., 2011) и оз. Цуг (Zug) (Oswald et al., 2016). Возможно, низкая численность метанотрофов обусловлена недостатками метода флуоресцентной *in situ* гибридизации. Используемые нами зонды, хотя и были разработаны для детекции метанотрофных бактерий в холодноводных экосистемах, могли выявить не всех МОБ (Eller et al., 2001). Видимо, этим можно объяснить и отсутствие метанотрофов в придонных горизонтах, где отмечены повышенные концентрации CH_4 и скорости его окисления.

После секвенирования фрагментов, кодирующих область V2–V3 гена 16S рРНК с последующим выравниванием, кластеризацией и удалением химер, было получено в общей сложности 61 870 последовательностей из 8 образцов района I и 47 448 последовательностей из 5 образцов района II, средняя длина – 392 п.н. Последовательности были сгруппированы в 2176 ОТЕ_{0.03}. Количество ОТЕ в образцах варьировало от 102 до 353 в районе I и от 307 до 641 в районе II.

В период весенней гомотермии в бактериальных сообществах водной толщи района I были идентифицированы представители 21 филы. В трофогенном слое доминировали цианобактерии (до 43%) и протеобактерии, с глубиной доля протеобактерий в сообществах возрастала (до 81%) (рис. 3). Преобладание цианобактерий в байкальской пелагической зоне в течение периода наблюдения, скорее всего, было связано с началом их цветения (Belykh et al., 2003, 2006, 2011). Самая распространенная операционная таксономическая единица (ОТЕ) рода *Synechococcus* имела ближайших гомологов из сообщества байкальских губок (Kaluzhnaya, Itskovich, 2015). Отмечено, что цианобактерии, в том числе рода *Synechococcus*, могут продуцировать CH_4 в кислородных условиях за счет преобразования фиксированного неорганического углерода (Bižić-Ionescu et al., 2019). Это может объяснить «метановый парадокс», выявленный в исследуемых районах.

В сообществах глубже 200 м доля *Proteobacteria* составляла более чем 60% последовательностей (рис. 3), причем большинство из них принадлежало классам *Alpha*- и *Betaproteobacteria*. Наиболее многочисленными (до 43%) были последовательности рода *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*). Представители данного рода обладают уникальной способностью разлагать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (Zhuang et al., 2003; Liu et al., 2004; Chaudhary, Kim, 2016; Zhou et al., 2016). По данным А. Г. Горшкова с соавторами (2011), в этом районе озера Байкал отмечены экстремальные концентрации нефтепродуктов, в том числе ПАУ, поступающих из донных осадков в водную толщу. Вклад последовательностей классов *Gamma*- и *Deltaproteobacteria* был незначительным (до 3.6% и 1.4%, соответственно). Единичные последовательности метанотрофных бактерий II типа выявлены на глубинах 100 и 200 м, ближайшими гомологами выявленной ОТЕ являлись представители рода *Methylocella* и *Unc. bacterium*. Метанотрофы I типа были представлены более разнообразно. Ближайшими гомологами наиболее обильной ОТЕ являлись некультивируемые представители семейства *Methylococcaceae*. Вклад метанотрофов в бактериальные сообщества водной толщи нефте-метанового района в период весенней гомотермии составлял не более 3%.

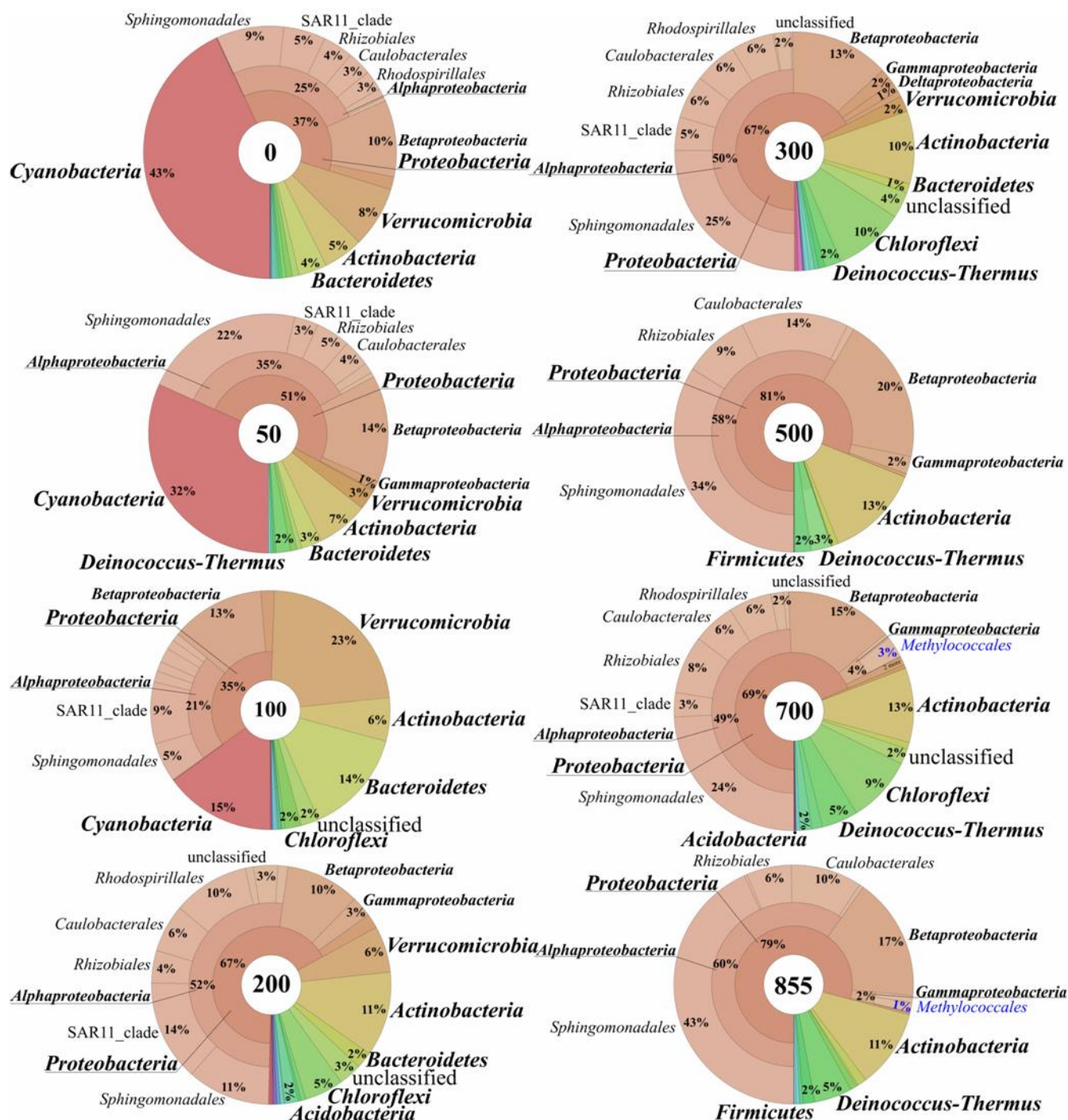


Рис. 3. Сравнение таксономического состава бактериальных сообществ из разных слоев водной толщи района I, основанное на данных метагеномного анализа фрагментов генов 16S рРНК (SILVA 123)

В период прямой температурной стратификации в сообществах водной толщи района II выявлены представители 24 бактериальных фил с доминированием в трофогенном слое цианобактерий (образцы II/0–II/100), в более глубоких слоях – протеобактерий (рис. 4). В этом районе температура воды была выше, чем в районе I, поэтому вклад автотрофного пикопланктона был более значимым (до 73%).

Большинство последовательностей *Proteobacteria* принадлежали классам *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria. В трофогенном слое (II/0–II/100) вклад представителей класса *Gamma*proteobacteria был небольшим (рис. 4). Последовательности ДНК

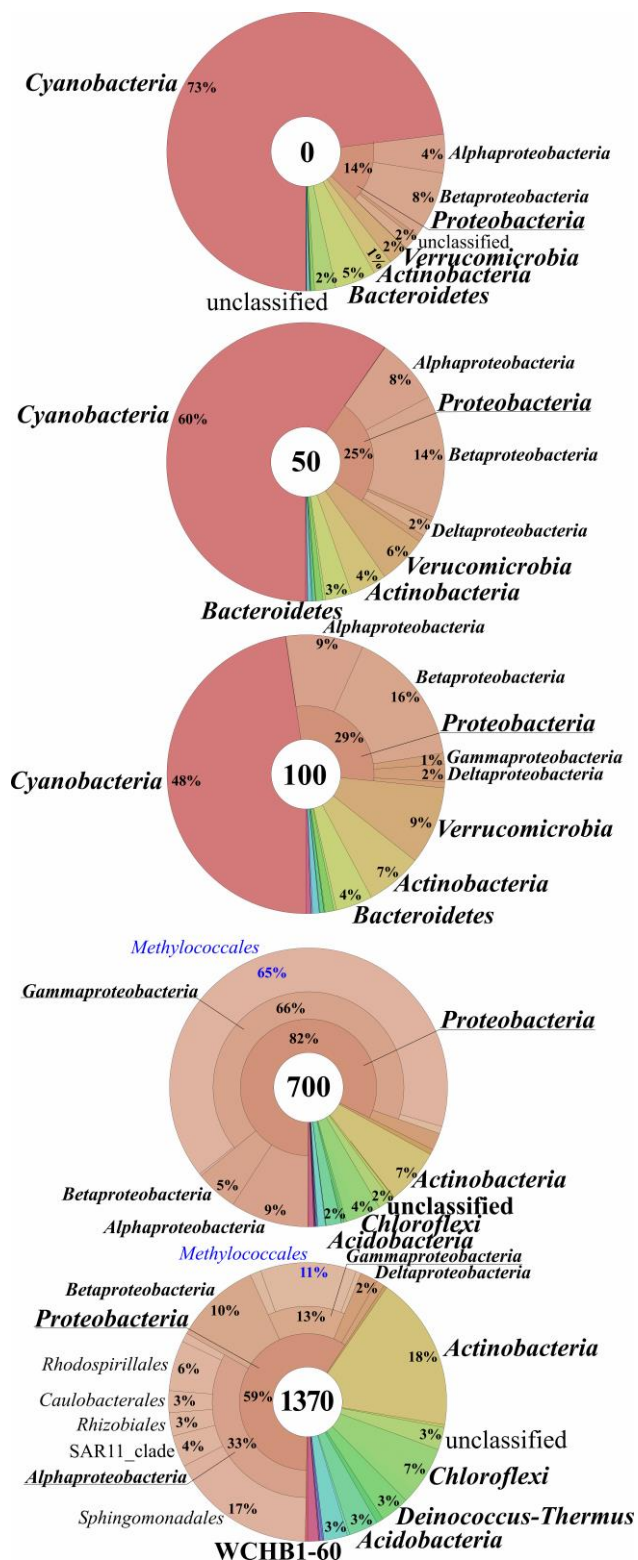


Рис. 4. Сравнение таксономического состава бактериальных сообществ из разных слоев водной толщи района II, основанное на данных метагеномного анализа фрагментов генов 16S рРНК (SILVA 123)

бактерий этого таксона преобладали в образцах из глубинных слоев (II/700, II/1370). В основном класс был представлен семейством *Methylococcaceae* (до 65% от общего числа последовательностей). Ближайшими гомологами многочисленной ОТЕ метанотрофов, которая на филогенетическом дереве образует отдельный кластер, являлись некультивируемые бактерии, выделенные из озера Байкал и Йеллоустон (Yellowstone). Наибольшее количество последовательностей этой ОТЕ отмечено в образцах из глубинной области водной толщи.

В водной толще районов разгрузки углеводов оз. Байкал в различные гидрологические сезоны выявлены незначительные различия в составе крупных таксонов, что характерно и для сообществ донных отложений озера Байкал (Zemskaya et al., 2015). В исследуемых районах отмечено наличие канонических протеобактериальных метанотрофов, принадлежащих классам *Gamma*- и *Alphaproteobacteria*. В пределах класса *Gammaproteobacteria* выявлены метанотрофы I типа, относящиеся к семействам *Crenotrichaceae* и *Methylococcaceae*. Метанотрофы II типа (семейство *Beijerinckiaceae*) представлены в сообществах меньшим количеством последовательностей.

Анализ библиотек генов 16S рРНК с

использованием многомерного шкалирования свидетельствовал о различии структур сообществ в районах разгрузок в зависимости от глубины. Достоверной корреляции между параметрами окружающей среды и структурой сообщества, кроме корреляции с глубиной водной толщи (p -значение <0.05) выявлено не было. Отсутствие надежной корреляции, скорее всего, обусловлено специфическими адвективными процессами в пелагической зоне озера Байкал в течение периода наблюдения. Чтобы сравнить сообщества из разных слоев водной толщи двух районов, была выполнена кластеризация сообществ на основе средневзвешенной дистанционной матрицы UniFrac (W-UniFrac). Выявлено наличие двух кластеров, один из которых включал сообщества из трофогенного слоя (0–100 м), а другой – сообщества с глубин 200–1350 м.

В различных слоях водной толщи исследуемых районов разница в составе МОБ была более очевидной при анализе функциональных генов, чем при анализе генов 16S рРНК. Все последовательности образцов района I (период весенней гомотермии) относились МОБ II типа, в то время как все последовательности района II (период прямой стратификации) принадлежали I типу. На филогенетическом дереве они образовывали несколько кластеров. Среди метанотрофов I типа последовательности, образующие отдельную ветвь с некультивируемыми представителями *Methylococcaceae*, были самыми многочисленными. Ближайшим культивируемым гомологом являлся вид *Methyloglobulus morosus* (92%), выделенный из озера Констанс. Данный организм растет преимущественно при низких концентрациях кислорода и способен использовать в качестве единственного источника углерода и энергии метан и метанол (Deutzmann et al., 2014). Последовательности этого кластера были выявлены в глубоководной зоне района II при повышенных концентрациях CH_4 . Представители второго менее многочисленного кластера были обнаружены только в образце II/700. Последовательность некультивируемой гаммапротеобактерии, выделенной из водной толщи озера Шё (Schöhsee), была их ближайшим гомологом (100%). Последовательности в этом кластере были только на 96% идентичны культивируемым *Methylobacter* sp. и *Methylovulum miyakonense*, а также последовательностям из микробных матов метанового сипа Санкт-Петербург (Zemskaya et al., 2015) Третий кластер включал небольшое количество последовательностей, для которых ближайшими гомологами были Unc. ammonia-oxidizing betaproteobacteria, выделенные из водной толщи пресноводных озер Шё и Плусс (Plußsee). Скорее всего, этот кластер объединяет последовательности, имеющие сходный по структуре с *pmoA* ген, кодирующий аммоний-монооксигеназу (Holmes et al., 1995).

В зоне конвективного перемешивания в образцах района I обнаружены последовательности метанотрофов II типа. На филогенетическом дереве они образовывали несколько ветвей с гомологами родов *Methylosinus* и *Methylocystis* (сходство 99–100%). Примечательно, что состав сообществ МОБ в одних и тех же образцах с помощью анализа библиотек генов *pmoA* и 16S рРНК не был полностью идентичен.

Ген *mxaF* традиционно используют в качестве генетического маркера для обнаружения метанооксидающих протеобактерий в пробах окружающей среды (McDonald, Murrell, 1997; Lau et al., 2013; Dumont, 2014). Несмотря на тот факт, что праймеры для амплификации *mxaF* были использованы на довольно широкий спектр метано- и метилотрофных бактерий (Neufeld et al., 2007), филогенетическое разнообразие в исследуемых образцах было незначительным. Все последовательности имели ближайших гомологов в пределах рода *Methylobacterium*.

Оценка разнообразия бактериальных сообществ с помощью анализа последовательностей генов 16S рРНК показала более широкий диапазон потенциальных метанотрофов, чем оценка, основанная на последовательностях генов *pmoA* и *mxaF*. Это может быть связано с узкой селективностью праймеров, используемых для амплификации локусов *pmoA* и *mxaF*; помимо этого, некоторые метанотрофы могут иметь аналоги ферментных систем окисления метана, для которых на данный момент нет специфичных праймеров.

В подледный период в водной толще фонового района оз. Байкал выявлено, что структура сообществ поверхностных (5 м, 20 м) и глубинных (1250 м, 1350 м) образцов различна (анализ гена 16S рРНК, MAG). В фотическом слое доминировали представители *Cyanobacteria* (отсутствовали в образце 1350 м и только 2% было обнаружено на глубине 1250 м, вероятно, из-за опускания клеток), *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Bacteroidetes*. В глубинных слоях более многочисленными таксонами (некоторые представители которых уникальны) являлись CPR/*Patescibacteria* (отсутствуют в поверхностных образцах), *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes*, классы *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Thaumarchaeota*. *Alpha*- и *Betaproteobacteria* были обнаружены в одинаковых количествах как в глубинных, так и в поверхностных образцах.

Метанотрофы были выявлены только в глубинных образцах в пределах класса *Gammaproteobacteria*. Было собрано два генома неклассифицированных метанотрофов порядка *Methylococcales* и один, тесно связанный с видом *Methyloglobulus morosus*, отличающийся небольшим геномом (менее 2.5 Мб). Кроме того, *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142 не был обнаружен ни в одном

общедоступном пресноводном метагеноме, что может говорить об эндемичности данного микроорганизма (рис. 5).

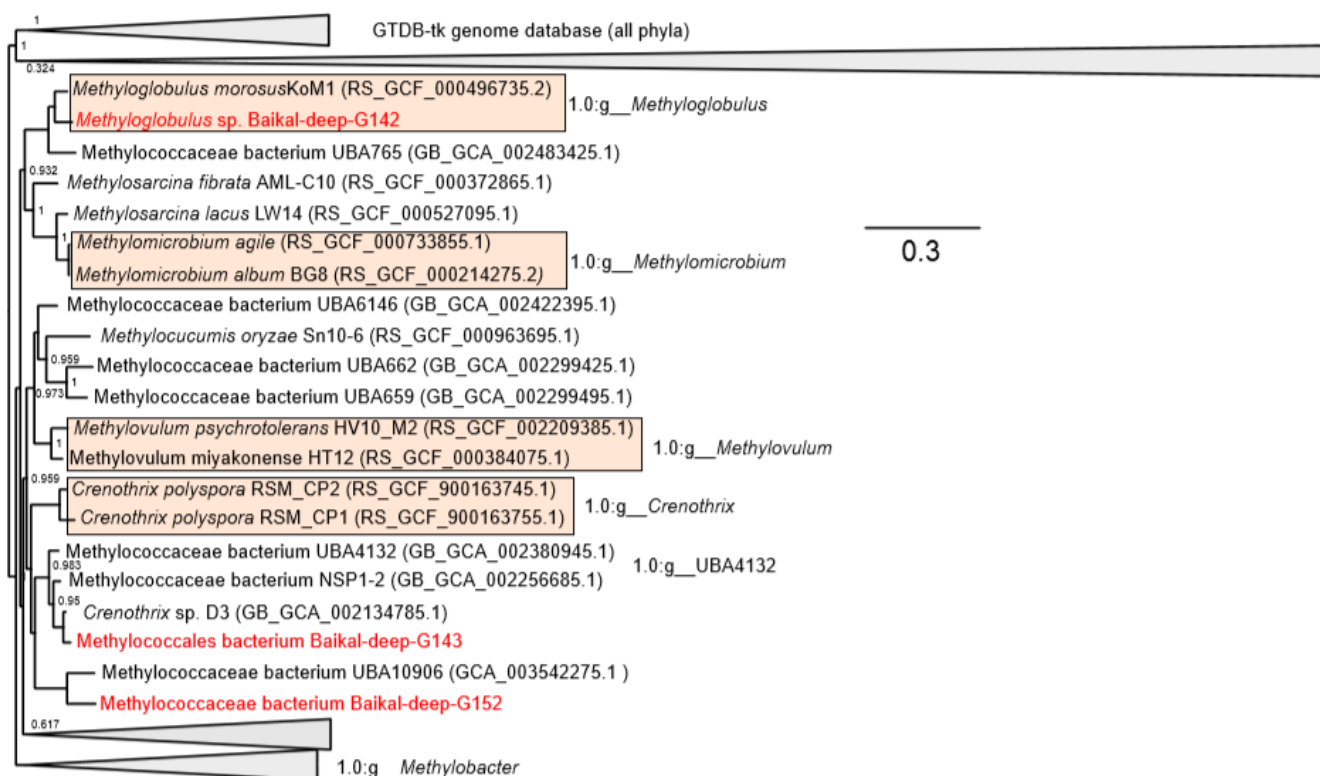


Рис. 5. Филогенетическое дерево MAGs метаноокисляющих бактерий

В геномах МОБ выявлены гены, обеспечивающие участие в циклах углерода, азота и серы. Геномы *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142, *Methylococcales* Baikal-deep-G143 и *Methylomonadaceae* bacterium Baikal-deep-G152 содержат предполагаемые гены метан- / аммониймонооксигеназы, диссимиляторной сульфитредуктазы (DsrC), а также ассимиляторной нитратредуктазы. Структурные гены кластера уреазы (ureABC) были обнаружены в геномах *Methyloglobulus* и *Methylomonadaceae*. Геномы метилотрофов порядка *Betaproteobacteriales* (*Methylothera*, *Methylophilus* и относящийся к семейству *Nitrosomonadaceae*), содержащие метанол- и формальдегиддегидрогеназу, были обнаружены в относительно высоких количествах. Метанолдегидрогеназы (*mdh1*, *mxaF*) были также обнаружены у *Betaproteobacteria* bacterium Baikal-deep-G93 / 97, *Gammaproteobacteria* Baikal-deep-G152, *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142 и *Gemmatimonadetes* bacterium Baikal-deep-G156.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА НА РАЗВИТИЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

Для понимания условий развития метанотрофных бактерий был проведен эксперимент с природным микробным сообществом из зоны высоких концентраций

нитратным азотом (NMS + CH₄) (29.6%). Также доля последовательностей, относящихся к облигатному метилотрофу рода *Methylotenera*, на среде с аммонийным азотом была выше (35.2%), чем на среде с нитратом (21.1%). Анализ также показал, что в сообществе, полученном на среде с NH₄⁺, 2.6% последовательностей принадлежит неклассифицированным представителям семейства *Methylomonaceae* и 1.8% – филуму *Firmicutes*. В данном исследовании представителей метанотрофов II типа не было обнаружено ни в нативном осадке, ни в экспериментальных культурах.

Таким образом, вклад последовательностей метанотрофных бактерий в сообщество заметно выше при культивировании на среде с аммонийным азотом, чем на среде с нитратом (рис. 7).

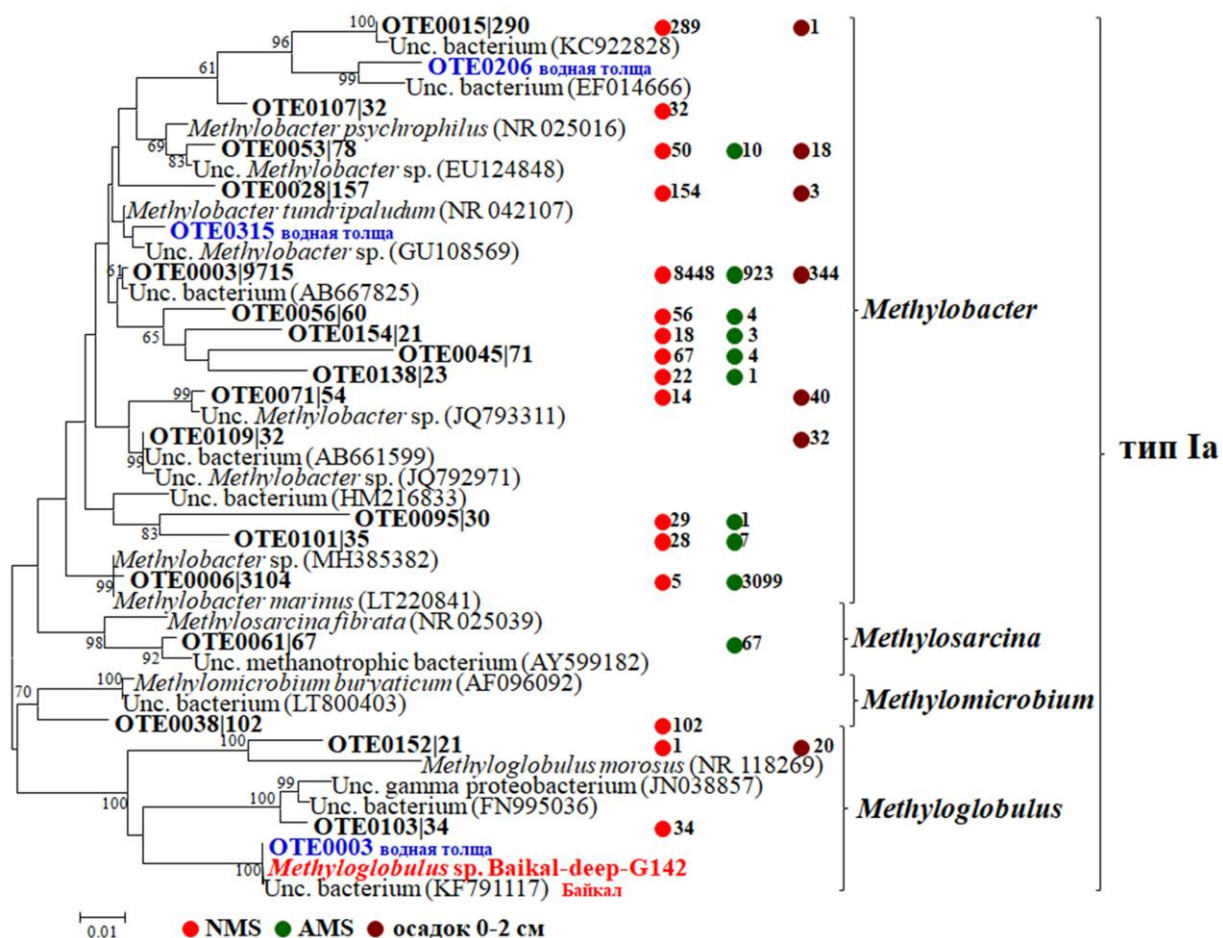


Рис. 7. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей региона V2–V3 фрагментов генов 16S рРНК, полученных из ДНК из поверхностного осадка района VI и водной толщи районов I и II и ДНК накопительных культур метанотрофных бактерий. Использованы ОТЕ, содержащие более 20 последовательностей. Применен метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных деревьев)

Последовательности метанотрофов, выявленные в водной толще, в накопительных культурах получены не были. Но на филогенетическом дереве видно, что многочисленная ОТЕ из водной толщи районов разгрузки углеводородов, образует отдельную кладу с последовательностью *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142, полученной в результате сборки геномов из водной толщи фонового района. Это свидетельствует о том, что данный микроорганизм обитает как в фоновых районах оз. Байкал, так и в местах разгрузки жидких и газообразных углеводородов.

ВЫВОДЫ

1. Филогенетический состав микробных сообществ водной толщи районов с различными экологическими условиями меняется в зависимости от глубины, температуры и типа разгружающегося углеводорода (по данным анализа библиотек генов 16S рРНК). В районе нефте-метанового сипа доминировали (до 60%) представители семейства *Sphingomonadales* (*Alphaproteobacteria*), ближайшие гомологи которых являются деструкторами полициклических ароматических углеводородов. В районе грязевого вулкана доминировали метанооксиляющие бактерии I типа (до 63.7%) семейства *Methylococcaceae*.

2. В поверхностных и глубинных слоях водной толщи районов разгрузки углеводородов таксономический состав метанооксиляющих бактерий различался, по данным анализа библиотек функциональных генов, ответственных за разные стадии окисления CH_4 . Ген *pmoA*, кодирующий мембранную метанмонооксигеназу, выявлен у метанотрофов II типа в сообществах нефте-метанового сипа (до глубины 300 м), а метанотрофы I типа отмечены в глубинных слоях водной толщи грязевого вулкана. Ген *mxaF*, кодирующий метанолдегидрогеназу, выявлен только у представителей рода *Methylobacterium* во всех сообществах.

3. Вклад метанотрофных бактерий в общий бактериопланктон озера Байкал в районах с различным гидрологическим режимом не превышал 3% от ОЧМ (при использовании метода FISH), что сопоставимо с отмечаемым в озерах Киву, Констанц и Ротзее.

4. В придонных слоях водной толщи районов разгрузки углеводородов оз. Байкал отмечены наиболее высокие скорости метаноокисления (до 7.87×10^{-1} нл/(л сут)) при максимальных концентрациях метана. Повышенное содержание метана в поверхностных слоях водной толщи может свидетельствовать о наличии в Байкале явления «метанового парадокса», отмечаемого во многих водоемах.

5. Из глубинных слоев водной толщи фонового района оз. Байкал на основе глубокого метагеномного анализа образцов ДНК аннотировано три генома метанотрофных бактерий, содержащих гены, обеспечивающие участие в циклах

метана и азота. Геном байкальского представителя *Methyloglobulus* sp. отличается от известного *Methyloglobulus morosus*, что может свидетельствовать об эндемичности данного микроорганизма.

6. При экспериментальном культивировании природного микробного сообщества при низких температурах в атмосфере метана показана способность культур использовать различные источники азота, с более активным развитием метанотрофных бактерий на среде с аммонийным азотом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из перечня ВАК (или индексируемых WoS):

1. **Захаренко А. С.** Окисление метана в водной толще районов газо- и нефтепроявлений Среднего и Южного Байкала / **А. С. Захаренко**, Н. В. Пименов, В. Г. Иванов, Т. И. Земская // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 1. – С. 98–106.

2. Cabello-Yeves P. J. Genomes of novel microbial lineages assembled from the sub-ice waters of Lake Baikal / P. J. Cabello-Yeves, T. I. Zemskaya, R. Rosselli, F. H. Coutinho, **A. S. Zakharenko**, V. V. Blinov, F. Rodriguez-Valera // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – V. 84, № 1. – Art. № e02132-17.

3. **Zakharenko A. S.** Bacterial communities in areas of oil and methane seeps in pelagic of Lake Baikal / A. S. Zakharenko, Yu. P. Galachyants, I. V. Morozov, O. V. Shubenkova, A. A. Morozov, V. G. Ivanov, N. V. Pimenov, A. Y. Krasnopeev, T. I. Zemskaya // Microb. Ecol. – 2019. – V. 78, № 2. – P. 269–285.

4. Bukin Y. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results / Y. Bukin, Y. Galachyants, I. Morozov, S. Bukin, **A. Zakharenko**, T. Zemskaya // Sci. Data. – 2019. – V. 6. – Art. № 190007.

5. Cabello-Yeves P. J. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat / P. J. Cabello-Yeves, T. I. Zemskaya, **A. S. Zakharenko**, M. V. Sakirko, V. G. Ivanov, R. Ghai, F. Rodriguez-Valera // Limnol. Oceanogr. – 2019. – V. 9999. – P. 1–18.

В материалах конференций:

1. **Захаренко А. С.** Метанотрофные бактерии водной толщи в районах разгрузки углеводородов (Южный Байкал) / **А. С. Захаренко**, С. Ю. Максименко, В. Г. Иванов, Т. И. Земская // Материалы VI Всеросс. с межд. участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». Иркутск, 2013. – С. 179–181.

2. Земская Т. И. Разнообразие микробных сообществ в осадках метановых сипов и грязевых вулканов озера Байкал / Т. И. Земская, А. В. Ломакина, Е. В. Мамаева, **А. С. Захаренко**, С. М. Черницына, Т. В. Погодаева, Д. П. Петрова, Ю. П. Галачянц // Всеросс. научно-практич. конф., посвященная 25-летию обнаружения струйных

метановых газовыделений в Черном море, «Метан в морских экосистемах». Севастополь, 2014. – С. 58–60.

3. **Захаренко А. С.** Биологические сообщества водной толщи в районе разгрузки грязевого вулкана «Большой» (Южный Байкал) / **А. С. Захаренко**, Ю. П. Галачянц, И. В. Морозов, А. А. Морозов, Н. В. Пименов, Т. И. Земская // Материалы образовательной школы шестой Междунар. Верещагинской Байкальской конф. и четвертого Байкальского Микробиологического симпозиума с междунар. участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах». Иркутск, 2015. – С. 228–230.

4. Земская Т. И. Метагеномный анализ микробных сообществ для исследования цикла метана в озере Байкал / Т. И. Земская, А. В. Ломакина, **А. С. Захаренко**, И. А. Хальзов, С. М. Черницына, О. В. Шубенкова, О. Н. Павлова, С. В. Букин, Ю. П. Галачянц, И. В. Морозов // II Всеросс. конф. с междунар. участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике». – Новосибирск, 2017. – С. 33.

5. Ломакина А. В. Разнообразие микробных сообществ в осадках озера Байкал, характеризующихся различным составом разгружающихся флюидов / А. В. Ломакина, С. М. Черницына, О. В. Шубенкова, **А. С. Захаренко**, Т. В. Погодаева, Ю. П. Галачянц, Т. И. Земская // Сборник тезисов 1-го Российского микробиол. конгресса. Пушино, 2017. – С. 58–59.

6. **Захаренко А. С.** Влияние источников связанного азота и углерода на состав байкальского метанотрофного сообщества в накопительных культурах / **А. С. Захаренко**, О. В. Шубенкова, Ю. П. Галачянц, И. В. Морозов, Г. В. Калмычков, Т. И. Земская // Междунар. научно-практич. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий», посвященная 100-летию ИГУ. Иркутск, 2018. – С. 69–70.

7. **Zakharenko A. S.** Bacterial communities in areas of oil and methane seeps in pelagic of Lake Baikal / A. S. Zakharenko, Yu. P. Galachyants, I. V. Morozov, O. V. Shubenkova, A. A. Morozov, V. G. Ivanov, N. V. Pimenov, A. Y. Krasnopeev, T. I. Zemskaya // 12th International Congress on Extremophiles. Ischia, Italy, 2018. – Art. № P96.

8. **Захаренко А. С.** Сравнительная характеристика бактериальных сообществ водной толщи в районах разгрузки углеводородов оз. Байкал / **А. С. Захаренко**, В. Г. Иванов, Т. И. Земская // Всеросс. конф. с междунар. участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». Иркутск, 2019. – С. 53–55.

9. Шубенкова О. В. Влияние источников связанного азота и углерода на состав Байкальского метанотрофного сообщества / О. В. Шубенкова, **А. С. Захаренко**, И. В. Морозов, Ю. П. Галачянц, Г. В. Калмычков, Т. В. Погодаева, Т. И. Земская // Всеросс. научная конф. с междунар. участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». Иркутск, 2019. – С. 101.

ЗАХАРЕНКО Александра Сергеевна

АЭРОБНЫЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ВОДНОЙ ТОЛЩИ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано к печати 08.10.2020 г.

Формат 60×84/16. Объем 1,4 п.л. Тираж 150 экз. Заказ № 902.

Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН.

664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1.