

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

БУКИН

Сергей Викторович

**МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ
В ЗОНЕ ВЫХОДА УГЛЕВОДОРОДНЫХ ГАЗОВ НА ПОДНЯТИИ
ПОСОЛЬСКАЯ БАНКА И ИХ РОЛЬ В ДЕСТРУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО
ВЕЩЕСТВА**

03.02.08 – экология
(биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
О. Н. Павлова

Иркутск, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Описание геологического строения и экологических особенностей выхода древних пород в районе поднятия Посольская Банка	10
1.2 Конвективная флюидная петля и ее влияние на химический состав поровых вод и потоки газосодержащих флюидов в районе Посольского разлома.....	13
1.3 Метанобразующие археи, основные аспекты физиологии, экологии и таксономии. Исследования процессов цикла метана в донных осадках озера Байкал.	16
1.3.1 Основные аспекты физиологии метаногенных архей.....	19
1.3.2 Основные аспекты экологии метаногенных архей.....	24
1.3.3 Молекулярно-биологические исследования процессов цикла метана в донных осадках озера Байкал.....	29
1.4 Глубинная биосфера: исследования микробных сообществ глубинных слоёв осадочных отложений и магматических пород; процессы ранней генерации углеводов.....	31
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Объекты исследования и метод отбора проб	36
2.2 Методы исследования.....	40
2.2.1 Микробиологические методы.....	40
2.2.2 Молекулярные методы	42
2.2.3 Физико-химические методы	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1 Таксономическая структура микробного сообщества донных отложений в зоне разгрузки термогенных газов поднятия Посольская Банка.....	50
3.2 Образование метана микробным сообществом донных осадков сипа «Посольская Банка» в эксперименте с различными субстратами	62
3.3 Биогенное образование этана микробным сообществом донных отложений сипа «Посольская Банка»	70
3.4 Деструкция органического вещества микробным сообществом донных осадков сипа «Посольская Банка» в условиях протокатагенеза.....	74

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	85
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	90
ПРИЛОЖЕНИЕ	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Донные отложения морских и пресноводных водоёмов представляют собой крупнейший резервуар органического углерода на Земле ($\sim 15000 \times 10^{18}$ г, Hedges and Keil, 1995; Tranvik et al., 2009) и в то же время являются одной из уникальных экологических ниш, изобилующей некультивируемыми, недавно открытыми или слабоизученными микроорганизмами (Teske et al., 2013). Исследование состава, структуры и метаболических возможностей микробных сообществ, населяющих донные отложения с различными физико-химическими условиями, представляет собой одну из актуальных задач экологии и фундаментальной микробиологии, поскольку является ключом к пониманию механизмов функционирования биогеохимических циклов и эволюции биосферы.

Основная масса донных отложений как место обитания микробных сообществ характеризуется отсутствием кислорода, низкими температурами, высоким гидростатическим давлением, дефицитом доноров и акцепторов электронов, а также нехваткой легкодоступных органических источников углерода, обусловленной активными процессами деструкции органического вещества в водной толще и поверхностном слое осадков (Parkes et al., 2014). Как показали исследования последних лет, столь экстремальные условия приводят к тому, что с глубиной осадка численность микроорганизмов стремительно снижается (Kallmeyer et al., 2012), а микроорганизмы, населяющие глубинные слои, обладают необычайно низким уровнем метаболической активности (Hoehler and Jorgensen, 2013). Однако в районах геологических аномалий, где в донных отложениях наблюдаются повышенные концентрации органического вещества и/или неорганических доноров и акцепторов электронов, численность и активность микробных популяций значительно выше (Parkes et al., 2014). К таким аномалиям относят поля гидротермальных источников, грязевые вулканы, залежи газовых гидратов, разгрузки нефте- и газонасыщенных флюидов, захороненные слои сапропелей и др. (Пименов и др., 2004; Parkes et al., 2000; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Horsfield et al., 2006; Bennett et al., 2013; Anderson et al., 2014; Ruff et al., 2015). В этих зонах дополнительные источники углерода и энергии поступают с потоками газов и флюидов, идущих из базальтового слоя земной коры или образующихся в результате температурной активации и деградации захороненного органического вещества в глубинных слоях осадка (Cowen et al., 2003; Parkes et al., 2005; Horsfield et al., 2006; Parkes et al., 2007; Engelen et al., 2008; Boetius and Wenzhöfer, 2013). Помимо питательных субстратов восходящие потоки флюидов могут выносить в поверхностные слои донных отложений представителей глубинных термофильных микробных сообществ (Hubert et al., 2009). Метаболические возможности данных микроорганизмов, как и их роль в биогеохимических циклах, в настоящее время являются объектами интенсивных

исследований (Biddle et al., 2012; Edwards et al., 2012; Orsi et al., 2013; Parkes et al., 2014; Orcutt et al., 2015).

Одним из перспективных мест изучения микробных сообществ, ассоциированных с геологическими аномалиями, является озеро Байкал, одно из самых древних (25-30 млн лет) и глубоких (максимальная глубина 1642 м) озер на Земле. Расположение в тектонически активной зоне обуславливает различные экологические особенности функционирования экосистемы озера, а также наличие подводных грязевых вулканов, разгрузок нефте- и газонасыщенных флюидов, залежей газовых гидратов (Кузьмин и др., 1998; Конторович и др., 2007; Khlystov et al., 2013). В некоторых из таких зон миграция нефти и газа к поверхности осадочной толщи может осуществляться с глубин до 7 км (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007) и выражается в аномально высоких концентрациях отдельных ионов в поровых водах поверхностных донных отложений, свидетельствующих о поступлении в них глубинных высокоминерализованных флюидов (Гранина и др., 2001; Погодаева и др., 2007). Одним из мест концентрации геологических аномалий является район Посольского разлома, и в частности, граничащая с ним подводная возвышенность Посольская Банка, расположенная на границе Южной и Центральной котловин озера (Naudts et al., 2012). Анализ аномалий теплового потока, сейсмические и гидроакустические исследования (Klerkx et al., 2006; Naudts et al., 2012), а также исследования изотопного состава углерода газа, разгружающегося в сипах Посольского разлома (Калмычков и др., 2006; Pimenov et al., 2014), позволяют предположить не только о наличии здесь подтока глубинных флюидов, но и о функционировании в донных отложениях конвективной флюидной петли (Vanneste et al., 2002).

Анализ структуры бактериального сообщества восстановленного поверхностного слоя иловых отложений в зоне предполагаемого поступления восходящих потоков флюидов на Посольской Банке не выявил значительных отличий в составе крупных таксонов от сообществ фоновых районов (Zemskaya et al., 2015). Однако изучение процессов сульфат-редукции и метаноокисления позволило установить их значительную активность, как в поверхностных, так и глубинных слоях осадков данного района (Пименов и др., 2014; Pimenov et al., 2014). Вместе с тем, влияние флюидных потоков на состав и функционирование микробных популяций, осуществляющих процесс образования углеводородов в глубинах осадка, изучено недостаточно. Установлено, что биогенный метан, заключённый в структуре газовых гидратов Посольского разлома, образован в результате типичного для психрофильных экосистем процесса диспропорционирования ацетата (Nashikubo et al., 2010). В то же время, данные радиоизотопного анализа свидетельствуют, что в иловых отложениях глубоководных районов озера Байкал (Намсараев, 1995), в том числе в районе Посольской Банки (Pimenov et al., 2014), метан преимущественно образуется путём восстановления CO_2 , что не характерно для

холодных донных отложений стратифицированных озёр (Nozhevnikova et al., 2007). Принимая во внимание данное несогласие, а также то, что разгружающиеся и заключённые в структуре газовых гидратов углеводородные газы в зоне Посольского разлома имеют смешанное (термогенно-биогенное) происхождение (Калмычков и др., 2006; Nachikubo et al., 2010; Pimenov et al., 2014), актуальной задачей является исследование процессов биогенного образования метана и этана в зонах разгрузок этого района.

Ранее ряд исследователей высказывали предположения о том, что углеводородные и минерализованные флюиды могут мигрировать вдоль проницаемых зон и появляться в поверхностных осадках оз. Байкал, приуроченных к тектоническим нарушениям (Клеркс и др., 2003; Погодаева и др., 2007; De Batist et al., 2002). В дальнейшем было установлено, что вместе с газонасыщенными минерализованными флюидами из глубинных осадков к поверхности дна озера поступают и мелкоразмерные частицы. Например, в поверхностных осадках грязевого вулкана «Маленький» были обнаружены створки древних диатомовых водорослей рода *Tertiarius* (Клеркс и др., 2003), доминировавшие в плиоцене (2.8–2.7 млн лет до н.в.). С учетом скорости осадконакопления в Южном Байкале они должны были располагаться на глубине осадка около 300 м (Bradbury et al., 1994). Очевидно, что вместе с углеводородами в поверхностные осадки из глубинной зоны могут поступать и микроорганизмы.

Процессы преобразования органического вещества микробным сообществом глубинных донных осадков и возможность их поступления в приповерхностные осадки озера Байкал ранее не изучались, несмотря на то, что ранний диагенез органического вещества в донных осадках оз. Байкал является предметом многочисленных исследований (Мизандронцев, 1978; Гранина, 2008; Och et al., 2012), т.к. озеро является одним из немногих мест образования углеводородов в пресноводных условиях. В связи с этим представляется актуальным изучение особенностей процессов деструкции органического вещества глубинными микробными сообществами и определения их роли в ранней генерации углеводородов.

Таким образом, поступление из глубинной части осадков вместе с газосодержащим флюидом жизнеспособных термофильных микроорганизмов в поверхностные слои осадочной толщи позволяет одновременно изучать как низкотемпературные, так и термофильные процессы преобразования органического вещества микробными сообществами в донных отложениях озера Байкал.

Цель работы: Изучить разнообразие природных микробных сообществ, осуществляющих заключительные этапы деструкции органического вещества в донных осадках глубоководного метанового сипа «Посольская Банка» в различных экологических условиях как при низких положительных температурах (4 °С), характерных для абиссали оз. Байкал, так и в термобарических условиях, характерных для зоны генерации углеводородов.

Задачи:

1. Исследовать таксономическое разнообразие микробных сообществ в донных осадках поднятия «Посольская Банка» в зоне разгрузки углеводородных газов.
2. В условиях низкотемпературного эксперимента изучить процессы метангенерации микробными сообществами донных осадков метанового сипа «Посольская Банка» в присутствии различных субстратов.
3. Изучить процессы биогенного образования этана в донных отложениях метанового сипа «Посольская Банка».
4. В модельном эксперименте, в условиях протокатагенеза (80 °С, 5 МПа), изучить процессы преобразования органического вещества микроорганизмами, поступающими вместе с газонасыщенными флюидами из зоны генерации углеводородов.

Научная новизна работы. Впервые проведен комплексный анализ природных микробных сообществ, осуществляющих заключительные этапы деструкции органического вещества в донных осадках глубоководной разгрузки углеводородных газов «Посольская Банка» как при низких положительных температурах (4 °С), характерных для оз. Байкал, так и в термобарических условиях, характерных для зоны генерации углеводородов. С помощью пиросеквенирования ампликонов фрагментов генов 16S рРНК установлено, что по структуре и составу микробные сообщества донных осадков сипа «Посольская Банка» значительно отличаются от сообществ донных отложений других районов разгрузки углеводородов оз. Байкал, что определяется геологической структурой изучаемого района. Впервые методами культивирования в психрофильных условиях (4 °С) на средах с различными субстратами исследована способность микробных сообществ донных отложений озера Байкал образовывать углеводородные газы. Обнаружены взаимосвязи между литологической характеристикой донных отложений и активностью процессов генерации метана при использовании различных субстратов метаногенеза. Впервые, в накопительных культурах микробных сообществ донных отложений озера Байкал при росте на средах с углекислым газом и ацетатом натрия в качестве источников углерода отмечено образование не только метана, но и более тяжелого углеводородного газа – этана. В этаногенном сообществе на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК выявлены представители порядков *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Thermoplasmatales* и филума *Bathyarchaeota*. В серии экспериментов по культивированию донных отложений метанового сипа «Посольская Банка» при температуре 80 °С и давлении 5 МПа впервые установлена способность населяющих их микробных популяций осуществлять трансформацию органического вещества в термобарических условиях с образованием биомаркеров нефти (ретена и гаммацерена).

Практическая и теоретическая значимость работы. Полученные данные расширяют знания о разнообразии микроорганизмов, населяющих донные отложения озера Байкал с различной литологической структурой, а также помогают понять закономерности изменения структуры микробных сообществ в различных экологических условиях при смене физико-химических характеристик и увеличении глубины донных отложений. В работе получены 199 метаногенных накопительных культур микроорганизмов, которые в дальнейшем могут быть использованы для выделения новых видов архей – продуцентов метана в технологическом процессе получения биогаза в психрофильных условиях. Наличие накопительных культур микроорганизмов продуцирующих этан, позволяет провести дальнейшее исследование процесса биогенного этанообразования, выделить чистые культуры этаногенных микроорганизмов и исследовать механизмы их метаболизма. Результаты термобарического эксперимента показывают, что ретен является не только биомаркером хвойных растений, как считалось ранее, но и образуется при деструкции диатомовых водорослей, что необходимо учитывать при интерпретации палеоклиматических данных. Полученные в работе массивы данных пиросеквенирования (SRR2912888, SRR2912890) зарегистрированы в базе данных NCBI, и находятся в открытом доступе и могут быть использованы для сравнения с последовательностями микроорганизмов из других холодноводных экосистем и глубинной биосферы.

Защищаемые положения:

1. По структуре и составу микробные сообщества донных осадков глубоководного сипа «Посольская Банка» значительно отличаются от сообществ донных отложений других районов разгрузки углеводородов оз. Байкал, что определяется геологической структурой изучаемого района.

2. Экологические особенности: температурные условия, интенсивность поступления глубинных флюидов и концентрации органических субстратов определяют состав углеводородов, образуемых микробными сообществами на заключительных этапах деструкции органического вещества в донных осадках зоны глубоководной разгрузки углеводородных газов «Посольская Банка».

Апробация работы. Полученные в диссертации результаты были представлены на следующих международных и российских конференциях: VI Всероссийском Конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием Симбиоз-Россия 2013 (Иркутск, 2013), Российской конференции «Газовые гидраты в экосистеме Земли» (Новосибирск, 2014), 10th International Congress on Extremophiles (Россия, Санкт-Петербург, 2014), 6-ой Международной Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2015), 4-ом Байкальском

Микробиологическом симпозиуме с международным участием BSM-2015 (Иркутск, 2015), 13th International Conference on Gas in Marine Sediments (GIMS 13) (Норвегия, Тромсё, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ из них 4 статьи в изданиях из перечня ВАК РФ и 7 тезисов конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 119 страницах, содержит 23 рисунка и 8 таблиц. Список литературы включает 284 наименования, из которых 32 отечественных и 252 зарубежных.

Место проведения работы и благодарности. Основная часть работы была выполнена в лаборатории микробиологии углеводов Лимнологического института СО РАН.

Автор выражает искреннюю благодарность заведующему лабораторией клатратных соединений ИНХ СО РАН д.х.н. А. Ю. Манакову за предоставление оборудования и всестороннее содействие в проведении термобарического культивирования, сотрудникам ИНГТ СО РАН д.г.-м.н. Москвину В. И. и к.г.-м.н. Костыревой Е. А. за проведение анализа состава и содержания органического вещества донных отложений, сотруднику ЦКП «Геномика» СО РАН к.б.н. Морозову И. В. за выполнение секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК по Сенгеру, к.х.н. Калмычкову Г. В. и к.г.н. Иванову В. П. за предоставление данных о концентрациях метана в донных отложениях и проведение газовой-хроматографического анализа, сотрудникам отдела Ультраструктуры клетки ЛИИ СО РАН к.б.н. Галачанц Ю. П. и к.б.н. Петровой Д. П. за проведение пиросеквенирования, ценные советы и помощь в обработке результатов, к.г.-м.н. Т. В. Погодаевой за предоставление данных химического анализа поровых вод, профессору А. Хачикубо (Технологический Институт, г. Китами) за проведение анализа изотопного состава метана, сотрудникам ЦКП «Электронная микроскопия» ЛИИ СО РАН за содействие в проведении электронной микроскопии, сотрудникам Пресноводного аквариумного комплекса ЛИИ СО РАН за предоставление холодильных камер для проведения культивирования в психрофильных условиях.

Особую благодарность и признательность автор выражает научному руководителю к.б.н. Павловой О. Н. за постановку задач, всестороннюю помощь в проведении исследований и ценные практические советы, д.б.н. Земской. Т. И. за содействие в работе, помощь в интерпретации результатов и поддержку, всем сотрудникам лабораторий микробиологии углеводов и геологии оз. Байкал ЛИИ СО РАН за предоставление данных, практическую помощь, интересные идеи и ценные советы на всех этапах работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Описание геологического строения и экологических особенностей выхода древних пород в районе поднятия Посольская Банка

Посольская банка является выраженной подводной возвышенностью, расположенной в аккомодационной зоне реки Селенга на границе между Южной и Центральной котловинами озера Байкал (рис. 1) (Scholz and Hutchinson, 2000).

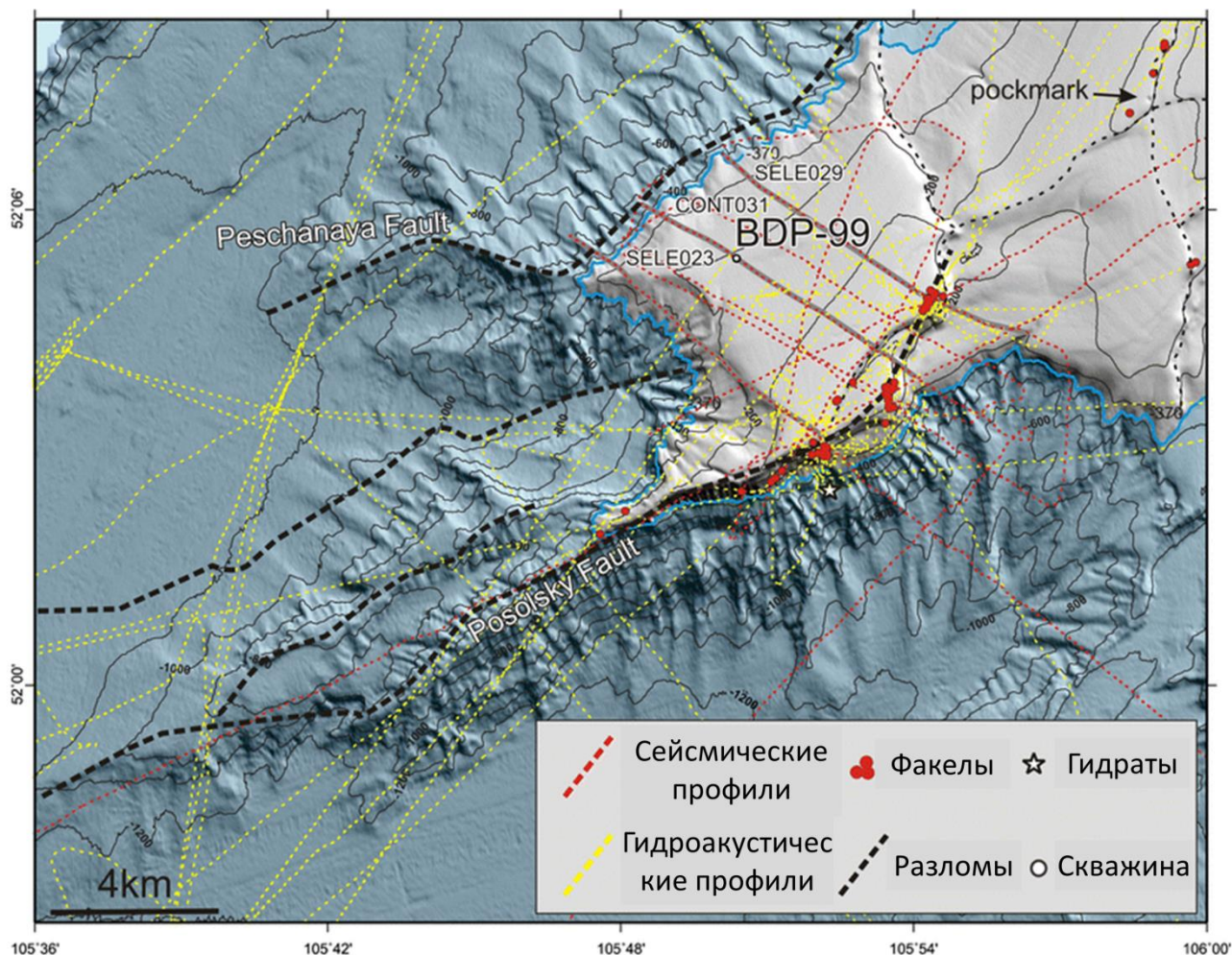


Рис.1. Батиметрическая карта района Посольской Банки (по Naudts et al., 2012). Голубым контуром на глубине 370 м очерчена верхняя теоретическая граница зоны стабильности газовых гидратов для чистых гидратов метана. На карте отмечена скважина глубинного бурения (проект «Байкал-бурение», 1999 г.) и место обнаружения газовых гидратов в ходе погружения глубоководных аппаратов МИР (2009 г.).

Подводное бурение, осуществлённое в 1999 г. на северо-западном склоне Посольской Банки (Bezrukova et al., 2005), а также масштабные геофизические исследования (Богданов и Зоненшайн, 1991; Зоненшайн и др., 1992; Hutchinson et al., 1992; Scholz and Hutchinson, 2000; Chartel et al., 2005; Naudts et al., 2012) позволили получить достаточно подробные данные о геологическом строении данного поднятия. Установлено, что Посольская Банка представляет собой крупный односторонний горст, южная часть которого приподнята по отношению к

северному. Крутой южный склон банки, граничащий с Посольским разломом, сформирован высокоамплитудным нормальным сбросом, имеющим южное падение. Северный склон банки более пологий и ограничен разломом «Песчаная». Морфоструктура Посольской Банки имеет северо-восточное простирание и выражена в рельефе Южной котловины более чем на 40 км. Вершина Посольской Банки выходит на глубины 35-55 м от поверхности воды, в то время как у её основания глубины достигают 800-900 м (рис. 1) (Bezrukova et al., 2005).

В 1991 г., в ходе наблюдения с подводных обитаемых аппаратов «Пайсис» у подножия южного склона Посольской Банки на глубинах 650-800 м были обнаружены обнажения древнего кристаллического фундамента. Было установлено, что в основании банки лежат плотные алевропесчаники и мелкозернистые песчаники, сцементированные карбонатами, возраст которых определён как нижний миоцен (15-20 млн лет). В свою очередь, перекрывающая осадочная толща представлена слабо уплотнёнными кавернозными бескарбонатными глинами, сложенными продуктами разрушения кор выветривания. Возраст глин определён как средний – верхний миоцен (5-15 млн. лет) (Богданов и Зоненшайн, 1991). Кавернозные глины покрывают кристаллическое основание тектонических блоков в центральной котловине озера и на Академическом хребте, позволяя говорить о том, что данное сложение отражает основную стадию тектонической трансгрессии Байкальского рифта в позднем миоцене (Зоненшайн и др., 1992). Поверхностный слой осадков на Посольской Банке представлен алевропелитовыми или пелитово-алевритовыми илами с примесью створок диатомовых, которые подстилаются на глубине 0,9–1,5 м тонкими плотными ледниково-озёрными глинами. Тонкие современные отложения отсутствуют лишь на самой вершине банки, на глубинах около 35 м, где на поверхности наблюдаются ледниково-озёрные глины, на которых залегают хорошо отмытые песчано-гравийные отложения мощностью от 3 до 20 см. Толщина поверхностного окисленного слоя на пологом склоне банки составляет 1–2 см. В большом количестве на вершине Посольской Банки отмечаются железомарганцевые конкреции (Bezrukova et al., 2005).

Полученный в ходе подводного бурения осадочный разрез мощностью около 350 м, охватывающий возрастной интервал до 1,2–1,3 млн лет, позволил оценить условия осадконакопления и тектоническую реорганизацию района Посольской Банки в этот период. Установлено что вся толща осадков в разрезе формировалась в субаквальных условиях. Начало формирования рельефа Посольской Банки и последующий её подъём со скоростью приблизительно 4,5 мм в год, вероятно, происходили в интервале от 1 млн до 820 тыс. лет назад. До этого периода скорости осадконакопления в точке бурения превышали 1,7 м в тысячу лет, что говорит о том, что до начала поднятия склон Посольской Банки был склоном дельты реки Селенга. Последние 820 тыс. лет седиментационная обстановка на Посольской Банке была

близка к современной, а скорость седиментации, снизившаяся в 10 раз, составила 16,16 см в тысячу лет. В настоящее время мощность осадочного чехла на северо-западном склоне банки превышает 1000 м (Bezrukova et al., 2005).

Первые геофизические сведения о возможной газоносности осадков Посольской Банки, были получены в начале 1990-х годов в результате многоканального сейсмического профилирования, предшествующего проведению буровых операций на Байкале (Hutchinson et al., 1992). На сейсмических разрезах, проходящих через структуру Посольской Банки, был зарегистрирован чёткий отражённый сигнал от зоны BSR (Bottom Simulating Reflector - кажущаяся отражающая граница), отождествляемой с нижней границей газогидратного слоя (Golmshtok et al., 1997). В конце 1990-х годов обнаружение в осадках Байкала газовых гидратов (Кузьмин и др., 1998), а также получение сейсмоакустических данных о наличии разгрузок газа со дна Южной котловины в районе Посольского разлома (Van Rensbergen et al. 2002; DeBatist et al., 2002), положили начало активной фазе изучения газопроявлений в озере. В результате масштабных гидроакустических исследований в период с 2006 по 2013 гг. в районе южного склона Посольской Банки на глубинах от 35 до 713 м было зарегистрировано, по меньшей мере, 98 точек разгрузки газа различной интенсивности (Макаров, 2016; Granin et al., 2010). Кроме того, в 2009 г. на южном склоне банки, в ходе погружения глубоководных обитаемых аппаратов «МИР», на глубине 500 м были обнаружены обширные залежи газовых гидратов (рис. 1), покрытые тонким слоем бактериальных матов (Naudts et al., 2012; Khlystov et al., 2013).

В результате анализа аномалий теплового потока, сейсмических и гидроакустических исследований было установлено, что природа образования большинства выходов газа на Посольской Банке, располагающихся в мелководной зоне, отличается от модели образования сипов в глубоководной части озера Байкал (Naudts et al., 2012). В глубоководных районах озера, поступление газа в водную толщу, как полагают, связано с дестабилизацией газовых гидратов, вызванной потоками восходящих геотермальных флюидов, мигрирующими по зонам тектонических разломов в моменты сдвигов земной коры (De Batist et al., 2002; Van Rensbergen et al., 2002; Vanneste et al., 2002). В то же время, газонасыщенные флюиды, разгружающиеся в мелководных сипах Посольской Банки, расположенных выше верхней теоретической границы зоны стабильности гидратов метана (глубина 370 м), образуются не в результате разложения газовых гидратов. Газовые гидраты окольцовывают основание банки, создавая условный газонепроницаемый «щит». Из-за этого газ и газонасыщенные флюиды, поступающие из осадочной толщи в районе разлома «Песчаная», проходят сквозь тело банки по высокопроницаемым слоям донных отложений, залегающим под зоной стабильности газовых гидратов, и поступают в водную толщу у вершины банки, там, где эти слои отрезаются Посольским разломом (рис. 2) (Naudts et al., 2012).

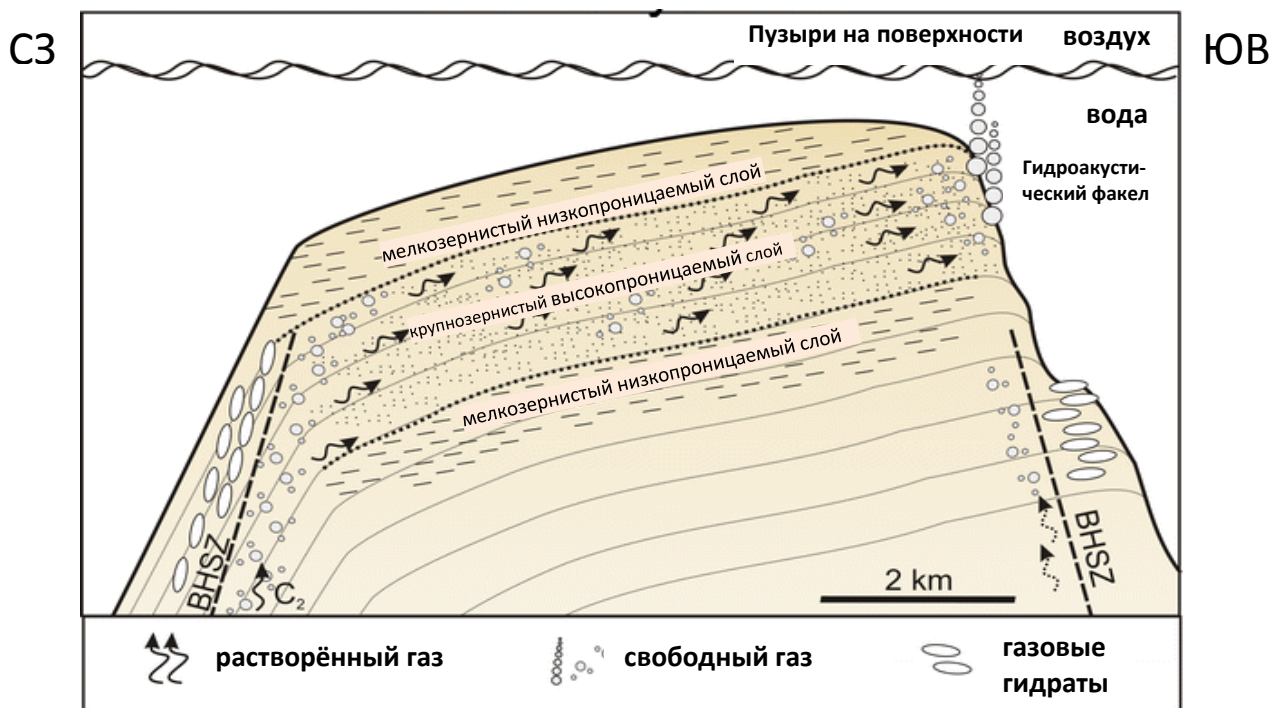


Рис. 2. Модель образования мелководных сипов на вершине Посольской Банки (по Naudts et al., 2012).

Исследования изотопного состава углерода газа, позволяет говорить о том, что газ, разгружающийся в глубоководных и мелководных сипах Посольской Банки, поступает из различных источников, и частично имеет глубинное термогенное происхождение (Калмычков и др., 2006; Пименов и др., 2014). Поступление глубинных флюидов находит отражение в химическом составе поровых вод донных отложений и предлагаемых моделях движения флюидов в районе Посольского разлома.

1.2 Конвективная флюидная петля и ее влияние на химический состав поровых вод и потоки газосодержащих флюидов в районе Посольского разлома

Обнаружение газовых гидратов (Кузьмин и др., 1998) и последующие геофизические исследования, направленные на поиск на дне озера Байкал геологических структур, связанных с разгрузками свободного газа или газонасыщенных флюидов, привели к открытию в 1999 г. первых четырех точек глубоководной разгрузки газа расположенных в Южной котловине озера (De Batist et al., 2002; Van Rensbergen et al., 2002). В донных отложениях, ассоциированных с тремя из открытых разгрузок, локализованных в некотором отдалении от Посольской Банки, но приуроченных к Посольскому разлому, были обнаружены приповерхностные залежи газовых гидратов (Klerkx et al., 2003; Matveeva et al., 2003). Сами структуры в последующем были охарактеризованы как грязевые вулканы «Маленький», «Большой» и «Малютка» (Хлыстов и др., 2003; Хлыстов, 2006). В это же время, для данных структур была предложена схема образования выбросов газа в водную толщу, связанная с дестабилизацией газовых гидратов, вызванной их нагреванием восходящими потоками глубинных гидротермальных флюидов (De

Batist et al. 2002; Van Rensbergen et al. 2002; Vanneste et al. 2002). Клеркс с соавторами (Klerkx et al., 2006) пришли к выводу, что восходящее движение флюидов может вызываться работой «сейсмической помпы». По предложенной ими модели, тектонические сжатия Посольского разлома приводят к образованию потока флюидов движущихся вдоль разлома в направлении с юго-востока на северо-запад, а фундамент Посольской Банки формирует барьер на пути потока, что приводит к резкому увеличению объема флюидов у нижней границы зоны стабильности газовых гидратов в месте будущей разгрузки (рис. 3). В дальнейшем повышенная температура флюидов вызывает дестабилизацию и локальный прорыв слоя газовых гидратов с выбросом газонасыщенной жидкости и грязевых потоков в водную толщу.

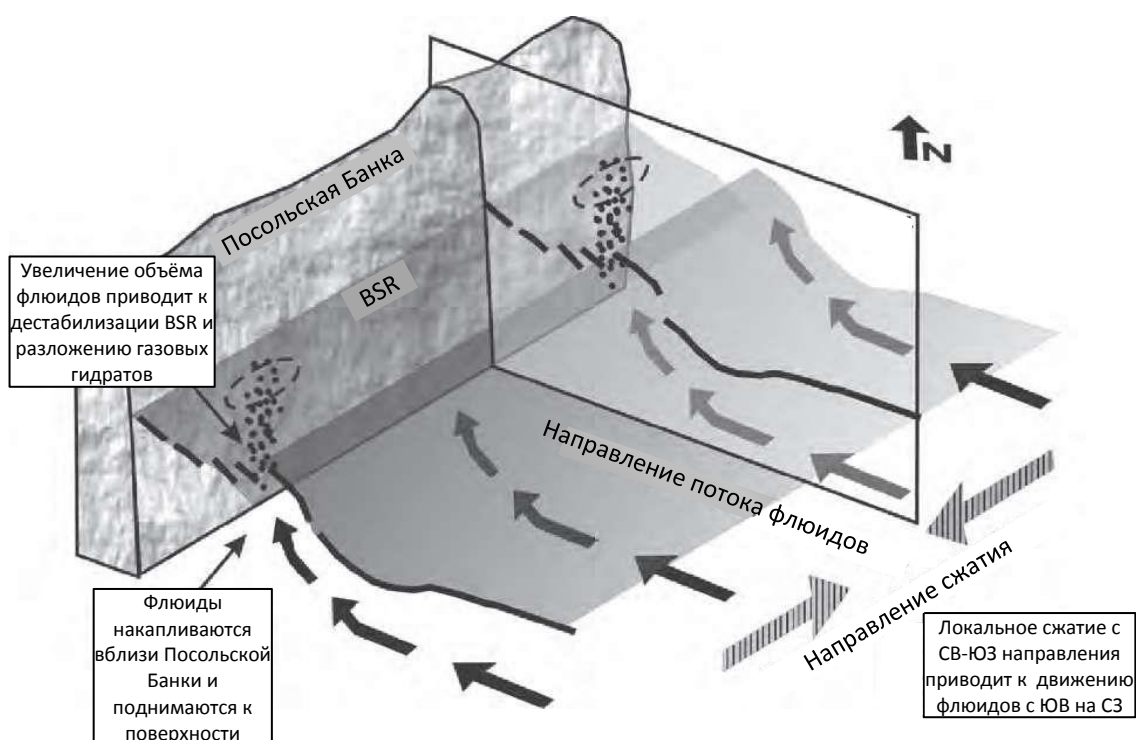


Рис. 3. Предполагаемая модель движения флюидных потоков в районе Посольского разлома (по Klerkx et al., 2006).

Однако импульсные выбросы глубинных флюидов не постоянны. Предположительно первоначальный выход газа обуславливает освобождение порового пространства в донных отложениях под зоной стабильности газовых гидратов, что может приводить к его заполнению водой, всасывающейся из водной толщи по соседним разломам или через каналы в донных отложениях, в районах, соседствующих с зонами разгрузок. Попав в слои осадка под зоной стабильности газовых гидратов, вода нагревается, что вновь приводит к формированию восходящего потока жидкости и его выходу в водную толщу в месте разгрузки. Тем самым образуется конвективная «флюидная петля» (рис. 4) (Vanneste et al. 2002; Klerkx et al., 2006). Данная модель объясняет схему распределения тепловых потоков в районе грязевых вулканов Посольского разлома, где места разгрузок с высокими положительными значениями тепловых



Рис. 4. Модель предполагаемой флюидной петли объясняющей характер распределения тепловых потоков в районе Посольского разлома (по Vanneste et al. 2002; Klerkx et al., 2006).

потоков, соседствуют с областями с аномально низкими, отрицательными тепловыми потоками где, предположительно формируется нисходящая ветвь петли (Vanneste et al. 2002).

Принимая во внимание схему распределения тепловых потоков непосредственно в районе структуры Посольская Банка (Naudts et al., 2012), можно предположить, что по вышеописанной конвективной модели движения флюидных потоков функционируют сипы, обнаруженные в районе залегания газовых гидратов (глубины около 500 м) на южном склоне банки (Макаров, 2016; Khlystov et al., 2013).

С периодическим поступлением глубинных высокоминерализованных флюидов связывают аномалии химического состава поровых вод в донных отложениях Посольского разлома. Химическая композиция поровых вод осадков в районах со спокойным осадконакоплением соответствует составу гидрокарбонатно-кальциевых вод озера Байкал, обладающих исключительным постоянством содержания главных ионов как в разных котловинах, так и по глубине. Многолетние исследования показали, что в большинстве случаев химический состав поровых вод в донных отложениях рассматриваемых грязевых вулканов сходен с таковым в фоновых районах (Погодаева и др., 2007). Однако в различные годы из кратера грязевого вулкана «Маленький» были подняты осадки, содержавшие высокоминерализованные (до 1200 мг/л) хлоридно-кальциевые (Клеркс и др., 2003) и сульфатно-кальциевые (Погодаева и др., 2007) поровые воды. Предполагается, что в эти годы через канал разгрузки происходили выбросы глубинных высокоминерализованных флюидов, поскольку каждый выброс грязевого вулкана в пределах одного и того же кратерного поля может выносить воды разного класса и типа (Холодов, 2012). В то же время нельзя исключать, что уровень минерализации напрямую зависит от близости отбираемых осадков к каналу разгрузки флюида (Погодаева и др., 2007). Еще одним свидетельством того, что флюиды, разгружающиеся в зоне вулканов Посольского разлома, поступают со значительных глубин,

является присутствие мантийного гелия в образцах газовых гидратов, отобранных в данном районе (Клеркс и др., 2003).

Повышенные концентрации ионов сульфатов (до 30 мг/л при фоновых значениях 0,4-8,0 мг/л) и микроэлементов, связываемые с поступлением высокоминерализованных флюидов, отмечаются и в поровых водах донных отложений Посольской Банки (Погодаева и др., 2007), также находящейся в зоне активного Посольского разлома. Как уже было отмечено, о глубинном происхождении части флюидов, мигрирующих сквозь структуру банки, свидетельствует соотношение изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) метана и наличие примесей его гомологов (этан, пропан, бутан) в газе, разгружающемся в мелководных сипах. Метан биогенного происхождения в озере Байкал характеризуется достаточно лёгким изотопным составом ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ от -64,0 до -77,5 ‰) и не высокой примесью тяжёлых углеводородов ($\text{C}_1/\text{C}_2 = 790-65000$), тогда как значения данных характеристик для газа с вершины Посольской Банки ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} = 66,6$ ‰; $\text{C}_1/\text{C}_2 = 118$) свидетельствуют о его смешанной природе (Калмычков и др., 2006), по причине наличия в его составе метана биогенной природы и термогенного этана ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} = -27,4$) (Sakagami et al., 2012). Более того, анализ состава газа, разгружающегося в глубоководных сипах, ассоциированных с залежами газовых гидратов на южном склоне банки, указывает на присутствие в его составе не только этана, но и метана термогенного происхождения (Pimenov et al., 2014). Об активном поступлении глубинного флюида в данной зоне свидетельствует и наличие бактериальных матов на поверхности массива газовых гидратов (Naudts et al., 2012).

Принимая во внимание стимулирование развития сообществ бактериальных матов, можно предполагать, что поступление флюида влияет и на микробное сообщество донных отложений, осуществляющих различные этапы анаэробной деструкции органического вещества. Ранее было отмечено, что в отличие от осадков мелководных сипов Посольской Банки, в зоне залегания газовых гидратов до больших глубин сохраняется заметная активность сульфатредуцирующих бактерий (Пименов и др., 2014). Однако актуальным остаётся вопрос о влиянии флюидов на деятельность метаногенных сообществ, поскольку метан является основным конечным продуктом анаэробной деструкции органического вещества в донных отложениях озера Байкал (Намсараев и др., 1995).

1.3 Метанобразующие археи, основные аспекты физиологии, экологии и таксономии. Исследования процессов цикла метана в донных осадках озера Байкал

Метанобразующие археи – филогенетически разнообразная группа строго анаэробных микроорганизмов, способных образовывать метан как конечный продукт анаэробного дыхания (Liu, Whitman, 2008). Ежегодно в атмосферу Земли поступает порядка 1 Гт метана, около 74 % которого имеет биогенное происхождение. Это означает что около 2 % CO_2 , связываемого в

биомассе в процессе фотосинтеза (70 Гт углерода в год) в конечном итоге метаболизируется до метана (Thauer et al., 2008). Таким образом, метанобразующие археи играют важную роль в глобальном цикле углерода (рис. 4).

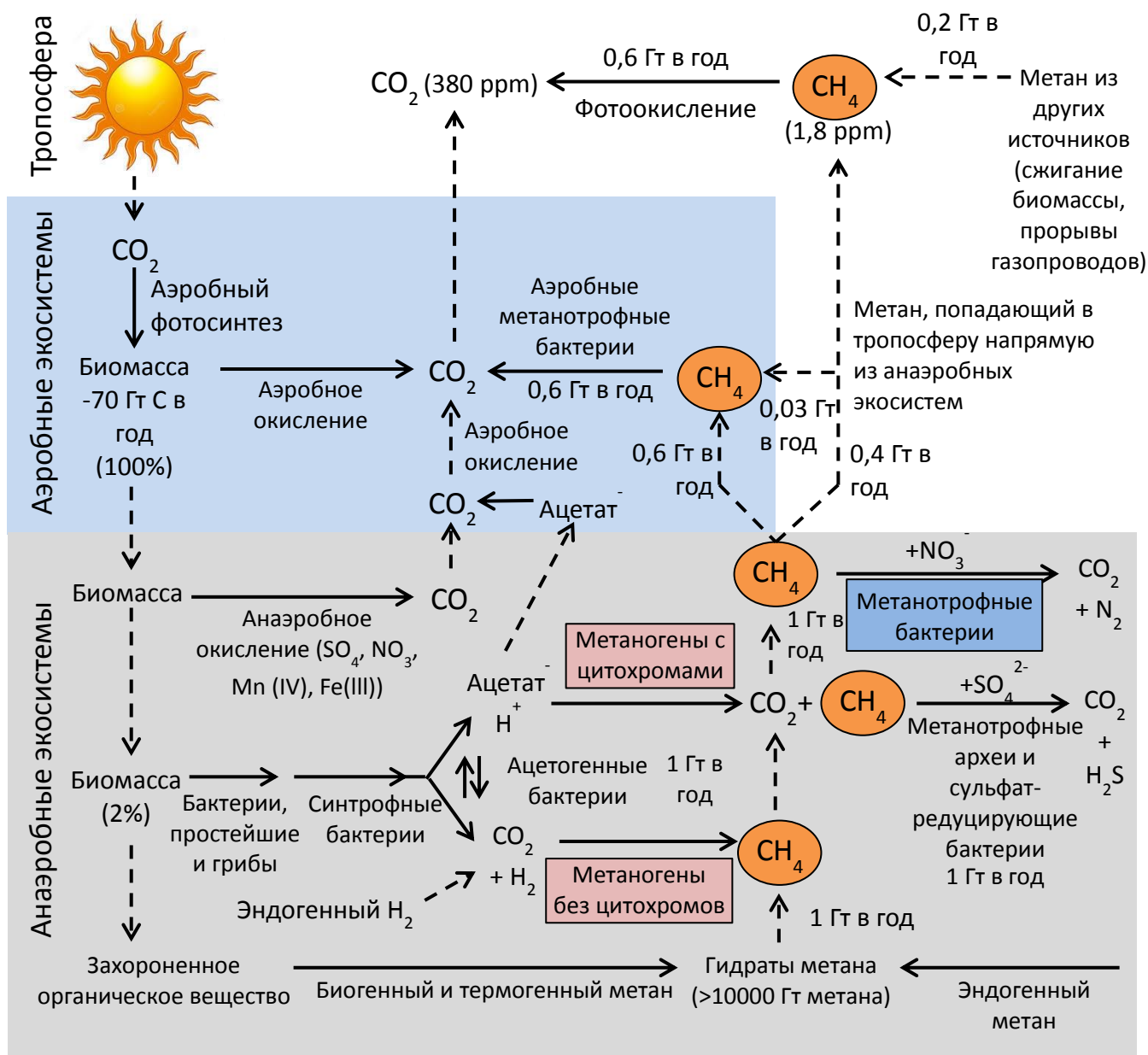


Рис. 4. Метан как промежуточное звено в глобальном цикле углерода (по Thauer et al., 2008).

Абсолютное большинство метаногенов относятся к типу *Euryarchaeota* и являются облигатными продуцентами метана, получающими всю энергию или большую ее часть в результате метаногенеза (Liu and Whitman, 2008). Культивируемые метанобразующие археи распределены между семью порядками *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, и *Methanomassiliicoccales* (рис. 5).

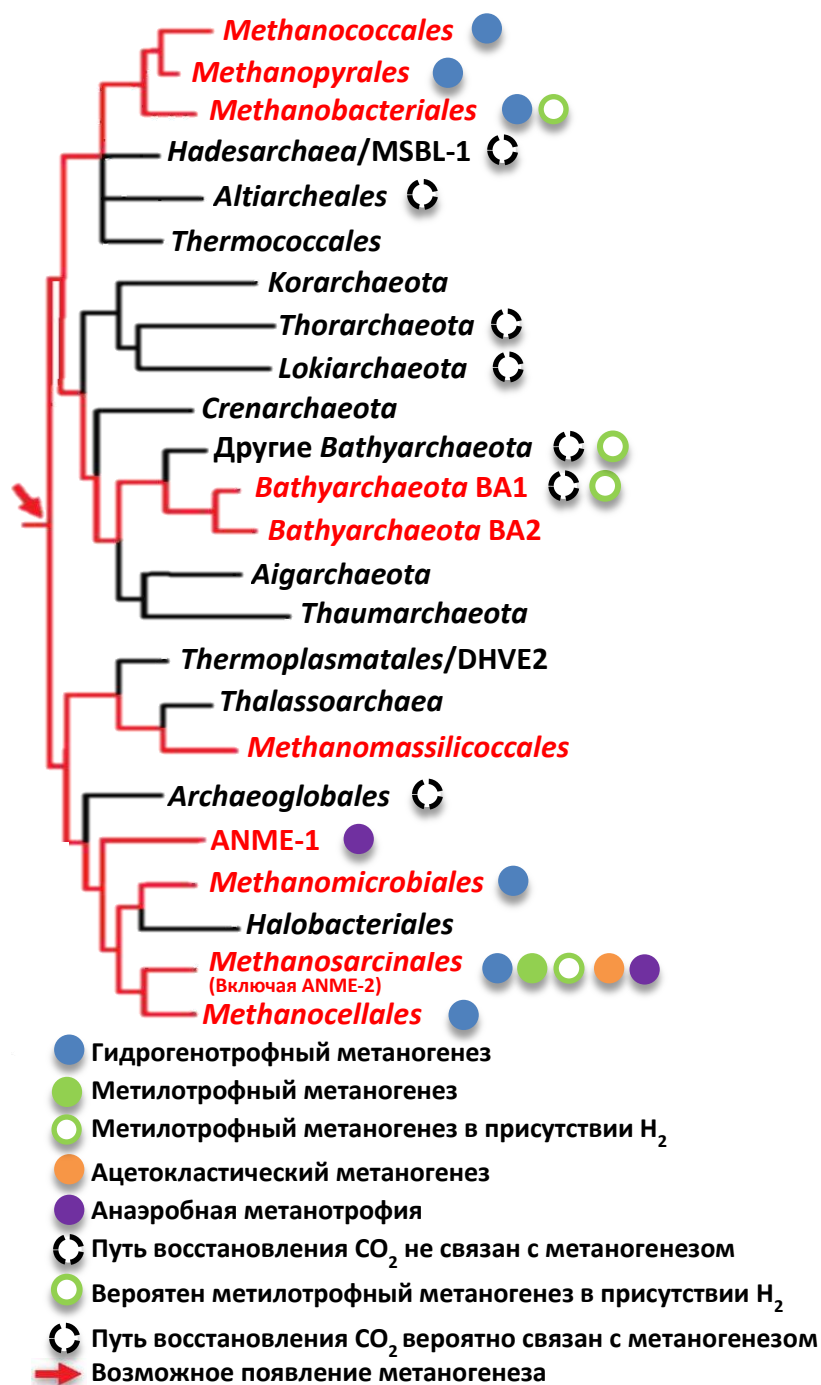


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая способность к образованию метана (выделено красным) среди представителей различных таксонов в царстве *Archaea* на основе наличия генов, кодирующих McrA (по Borrel et al., 2016).

Гены, кодирующие альфа субъединицу метил-кофермент M-редуктазы (McrA) – ключевого фермента метаногенеза, обнаружены также в ряде групп некультивируемых эуриархеот, которые могут быть объединены еще в пять и более порядков (Lever, Taske, 2015). Кроме того, последние достижения в области молекулярной биологии позволили установить наличие генов, кодирующих ферменты биохимического пути синтеза метана, в геномах двух некультивируемых архей, относимых к типу *Bathyarchaeota* (или Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG) – Смешанная Кренархеотная Группа). Помимо генерации метана данные

микроорганизмы вероятно способны получать энергию в результате сбраживания молочной и пировиноградной кислот, пептидов и моносахаридов (Evans et al., 2015).

Начальные реакции биохимического пути метаногенеза являются «частной», архейной, версией метильной ветви восстановительного пути ацетил-кофермента А, одного из наиболее важных путей получения энергии и фиксации углерода в природе. Результаты недавних исследований, имеющих своей целью реконструкцию геномов некультивируемых архей, указывают на то, что в типах *Altiarchaeales* (Probst et al., 2014), *Bathyarchaeota* (He et al., 2016), *Hadesarchaea*/MSBL-1 (Baker, et al., 2016), *Lokiarchaeota* (Sousa et al., 2016) присутствуют микроорганизмы, у которых способность восстанавливать CO₂ до метильного уровня не связана с метаногенезом. Анализ филогенетического положения микроорганизмов, в геномах которых закодированы ферменты, катализирующие ключевые реакции в биохимическом пути метаногенеза, позволяет предполагать, что способность к образованию метана была в той или иной степени утрачена различными группами архей в ходе эволюции от общего метаногенного предка (рис. 5) (Borrel et al., 2016).

1.3.1 Основные аспекты физиологии метаногенных архей

Несмотря на достаточно большое филогенетическое разнообразие метаногенных архей, круг основных субстратов используемых ими в качестве источников углерода и энергии ограничивается ацетатом, метилированными C₁ соединениями (метанол, метиламины, метилсульфиды), формиатом, СО и СО₂ (табл. 1).

Таблица 1

Энергетический выход и микроорганизмы, осуществляющие процессы образования метана из различных субстратов (по Liu, Whitman, 2008)

Реакция	$\Delta G^{\circ a}$ (кДж/моль CH ₄)	Организмы
I. CO₂-тип		
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-135	Большинство метаногенов
$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	-130	Многие гидрогенотрофные метаногены
$CO_2 + 4\text{изопропанол} \rightarrow CH_4 + 4\text{ацетон} + 2H_2O$	-37	Некоторые гидрогенотрофные метаногены
$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2$	-196	<i>Methanothermobacter</i> и <i>Methanosarcina</i>
II. Метилированные C₁ соединения		
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-105	<i>Methanosarcina</i> и др. метилотрофные метаногены
$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-113	<i>Methanosphera</i> и <i>Methanomicrococcus blatticola</i>
$2(CH_3)_2S + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2S$	-49	Некоторые метилотрофные метаногены
$4CH_3-NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_3$	-75	Некоторые метилотрофные метаногены
$2(CH_3)_2-NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$	-73	Некоторые метилотрофные метаногены
$4(CH_3)_3-N + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$	-74	Некоторые метилотрофные метаногены
$4CH_3NH_3Cl + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4Cl$	-74	Некоторые метилотрофные метаногены
III. Ацетат		
$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	-33	<i>Methanosaeta</i> и <i>Methanosarcina</i>

При восстановлении CO_2 до метана основным донором электронов выступает H_2 , но в некоторых случаях донорами могут являться вторичные спирты (2-пропанол, 2-бутанол и циклопропанол) (Widdel, 1986; Bleicher, 1989). В ходе ряда реакций CO_2 последовательно восстанавливается до метана через формил, метилен и метильный уровни. При этом переносчиками C-1 групп выступают специальные коферменты метанофуран (MFR), тетрагидрометаноптерин (H_4MPT) и кофермент М (КоМ) (рис. 6).

Первоначальная активация CO_2 и его связывание с MFR является эндэргонической реакцией, движимой хемоосмотическим градиентом, непосредственным донором электронов в которой выступает ферродоксин ($\text{Fd}_{\text{red}}^{2-}$), восстанавливаемый водородом при участии мембранно-связанных гидрогеназ (редуктаз) (Ech, Eha или Ehb) (Bott et al., 1987). Присутствия водорода в среде требуют и последующие две реакции восстановления формил- H_4MPT через метилен- H_4MPT до метил- H_4MPT . Донором электронов в этих реакциях выступает восстановленный кофермент F_{420} (F_{420}H_2). На уровне образования метил- H_4MPT у облигатно автотрофных метаногенов происходит разделение конструктивного и энергетического метаболизма.

В ходе конструктивного метаболизма метильная группа с помощью СО-дегидрогеназы/ацетил-кофермент А-синтазного комплекса связывается с карбоксильной группой (образована в результате восстановления CO_2) в реакциях трансметилирования и транскарбоксилирования с образованием ацетил-кофермента А (ацетил-КоА) (рис. 6). Ацетил-КоА в дальнейшем включается в не замкнутый восстановительный цикл трикарбоновых кислот.

В ходе энергетического метаболизма метильная группа с метил- H_4MPT переносится на кофермент М при участии мембранно-связанной метилтрансферазы (Mtr). Эта реакция сопряжена с переносом из клетки ионов Na^+ и созданием ионного градиента (Gottschalk et al., 2001).

На последнем этапе метил-КоМ восстанавливается до метана в реакции катализируемой метил-КоМ-редуктазой (Mcr). Этот этап является общим в биохимических путях образования метана из всех возможных субстратов у всех метаногенов. Донором электронов в реакции восстановления метил-КоМ до метана выступает кофермент Б (КоБ), окисленная форма которого формирует гетеросульфид с коферментом М (КоМ-S-S-КоБ). В конечной реакции гетеросульфид восстанавливается H_2 с образованием тиолов (КоМ-SH и HS-КоБ). Механизм реализации данной реакции различается у метаногенов в зависимости от наличия или отсутствия в их клетках цитохромов и метанофеназина (Thauer et al., 2008).

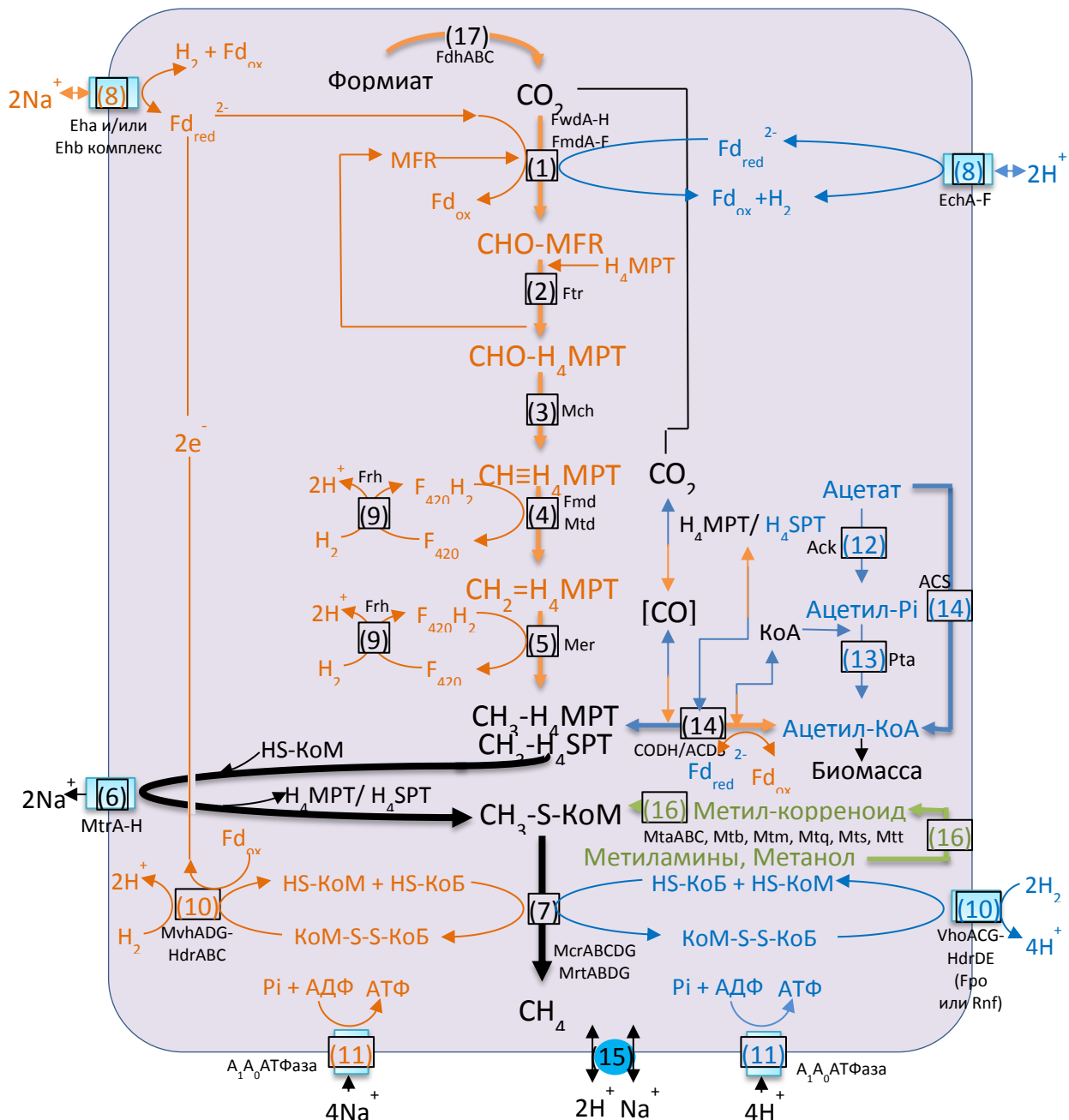


Рис. 6. Биохимический путь образования метана. Оранжевый: гидрогенотрофный метаногенез. Синий: ацетокластический метаногенез. Зелёный: метилотрофный метаногенез. (1) Формилметанофуран-дегидрогеназа, FwdA-F или FmdA-F; (2) Формилметанофуран:тетрагидрометаноптерин-формилтрансфераза, Ftr; (3) Метенилтетрогидрометаноптерин-циклогидролаза, Mch; (4) Метилтен-тетрогидрометаноптерин-дегидрогеназа, Hmd/Mtd; (5) Кофермент F₄₂₀-зависимая N₅,N₁₀-метилтен-тетрагидрометаноптерин-редуктаза, Mer; (6) Тетрагидрометаноптерин-S-метилтрансфераза, Mtr; (7) Метил-кофермент M-редуктаза, MrtABG или McrABG; (8) Мембранно-связанная гидрогеназа, Ech, Eha или Ehb, Rnf, Fpo; (9) Кофермент F₄₂₀- гидрогеназа, Frh; (10) F₄₂₀ невосстанавливающая гидрогеназа/гетеросульфид редуктазный комплекс MvhADG-HdrABC или VhoACG-HdrDE; (11) АТФаза, AhaA-K; (12) Ацетаткиназа, Ack; (13) Фосфотрансацетилаза, Pta; (14) СО-дегидрогеназа/ацетил-КоА-синтаза/декарбонилазный комплекс, CODH/ACDS; (15) Na⁺/H⁺ антипорт; (16) Метилкобамид: КоМ метилтрансфераза, MtaABC, Mtb, Mtm, Mtq, Mts, Mtt; (17) Формиат дегидрогеназа, Fdh (по Lu et al., 2013).

У архей без цитохромов восстановление гетеросульфида происходит на цитоплазматическом мультиферментном комплексе, в состав которого входят F₄₂₀-невосстанавливающая [NiFe] гидрогеназа (Mvh) и гетеросульфид редуктаза (HdrABC). В ходе работы данных ферментов экзергоническая реакция восстановления гетеросульфида совмещается с эндэргонической реакцией восстановления Fd_{ox} (Herrmann et al., 2008; Li et al., 2008), который в дальнейшем может использоваться на первом этапе активации CO₂. По этой причине консервация энергии и работа АТФаз у этой группы метанобразующих архей связаны только с градиентом ионов Na⁺, создающимся в результате работы Mtr (Thauer et al., 2008). Большинство метаногенов без цитохромов являются облигатными автотрофами, способными также использовать формиат. В последнем случае четыре молекулы формиата окисляются до CO₂ в реакции, катализируемой формиат дегидрогеназой (Fdh), после чего одна молекула CO₂ восстанавливается до метана (Wood et al., 2003). К данной группе относят представителей порядков *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanomicrobiales*.

У метаногенных архей с цитохромами, к которым относятся все *Methanosarcinales*, в клетках присутствует метанофеназин зависимая гетеросульфид редуктаза (HdrDE), совместно с метанофеназин-восстанавливающей [NiFe] гидрогеназой (Vho) входящая в мембранно-связанный комплекс, работающий в качестве протонной помпы (Reinemann et al., 1990). Наличие такого комплекса обеспечивает возможность микроорганизмам запастись энергией не только в реакции переноса метильной группы с H₄MPT на CoM, сопряжённой с созданием градиента ионов натрия, но и в виде градиента H⁺ при восстановлении гетеросульфида. Работа АТФаз у метаногенов, обладающих мембран-связанной HdrDE, ассоциирована с переносом протонов через мембрану (Lewalter et al., 2006).

Исходя из биохимических особенностей, рост на CO₂ и H₂ у метаногенов с цитохромами более продуктивен (до 7 г на моль метана, против 3 г на моль у метаногенов без цитохромов), но при этом им требуется большее парциальное давление водорода в среде (pH₂>10 Па) (Thauer et al., 2008). В большинстве природных экосистем pH₂<10 Па (Hoehler et al., 1998; Conrad, 1999), это обуславливает невозможность конкурировать за H₂ с метаногенами без цитохромов, способными расти при минимальном pH₂ 1–10 Па. Невозможностью конкуренции, вероятно, можно объяснить полную потерю способности расти на CO₂ и H₂ у некоторых метанобразующих архей порядка *Methanosarcinales* (Galagan et al., 2002). Однако, помимо CO₂ и H₂, метаногены с цитохромами способны использовать в качестве субстратов ацетат и метилированные C₁-соединения, что помогает им занимать разнообразные экологические ниши.

При диспропорционировании ацетата, осуществляемого исключительно археями родов *Methanosarcina* и *Methanosaeta*, карбоксильная группа данного соединения окисляется до углекислоты, а метильная группа, включившись в биохимический путь метаногенеза на уровне

метил-Н₄МРТ, восстанавливается до метана (рис. 6) (Thauer, 1998). На этапе диспропорционирования ацетил-кофермента А электроны передаются на ферродоксин, ре-окисление которого может происходить на мембранных гидрогеназах Ech или Rnf с созданием градиента протонов или ионов Na⁺ соответственно. Археи рода *Methanosaeta* являются облигатными ацетокластическими метаногенами, обладающими способностью расти при низких концентрациях ацетата в среде (5-20 мкмоль), тогда как для *Methanosarcina* минимальная концентрация составляет примерно 1 ммоль (Jetten et al., 1992). Причиной этому служит различие в ферментных комплексах, осуществляющих трансформацию ацетата до ацетил-КоА. *Methanosarcina* используют ацетаткиназную (Ack) – фосфотрансацетилазную (Pta) систему, обладающую низким сродством к субстрату. В клетках *Methanosaeta* за данный этап отвечает высоко-аффинная аденозинмонофосфат формирующая ацетил-КоА-синтаза (ACS) (Smith and Ingram-Smith, 2007). Несмотря на ограниченное число видов метаногенов, способных утилизировать ацетат, порядка 70 % всего биогенного метана в мире продуцируется в ходе восстановления метильной группы ацетата до метана (Lessner, 2009).

В ходе метаногенеза из метилированных C₁-соединений метильная группа сначала переносится на корреноидный белок, а затем на КоМ при участии субстрат-специфичных метилкобамид: КоМ метилтрансфераз (MtaABC, Mtb, Mtm, Mtq, Mts, Mtt) (рис. 6). Метил-КоМ в дальнейшем восстанавливается до метана. У метилотрофных метаногенов, обладающих цитохромами, электроны, необходимые для восстановления метильной группы до метана, берутся из реакций окисления дополнительных метильных групп до углекислоты, представляющих собой обратный путь гидрогенотрофного метаногенеза (Burke and Krzytski, 1997; Sauer et al., 1997). Образующийся при этом восстановленный фактор F₄₂₀H₂ передаёт электроны на мембран-связанную гидрогеназу Fpo, что сопровождается созданием градиента протонов. На каждые три метильных группы восстановленных до метана одна метильная группа окисляется до CO₂. В то же время не обладающие цитохромами археи рода *Methanosphera*, а также *Methanomicrococcus blatticola*, способны восстанавливать метильные группы с помощью H₂ (Sprenger et al., 2005; Fricke et al., 2006). Консервация энергии при этом становится возможной за счёт создания градиента ионов Na⁺ при ре-окислении Fd_{red}²⁻, катализируемого мембранно-связанным ферродоксин гидрогеназным комплексом (Ehb).

По сходному пути восстанавливают метилированные соединения и представители *Bathyarchaeota* (Evans et al., 2015). Однако образующийся восстановленный ферродоксин они, вероятно, используют для активации CO₂ с его последующим восстановлением до уровня метил-Н₄МТР и образованием ацетил-КоА. Ацетил-КоА может в дальнейшем интегрироваться в биомассу или превращаться в ацетат с образованием АТФ в реакциях субстратного фосфорилирования (Lazar et al., 2015).

Восстанавливать метилированные соединения в присутствии водорода способны и представители *Methanomassiliicoccales*, однако, механизм этого пути у них иной. В клетках данных микроорганизмов обнаружены как мембранно-связанная, так и цитоплазматическая гетеросульфид редуктазы. В связи с этим ре-окисление Fd_{red}^{2-} , образованного в ходе восстановления гетеросульфида на цитоплазматическом комплексе (MvhADG-HdrABC), происходит в результате восстановления следующей молекулы гетеросульфида на мембранно-связанной редуктазе (HdrD и Fpo) (Kroninger et al., 2015). Следует отметить, что наличие двух типов гетеросульфид редуктаз характерно и для облигатно автотрофных представителей порядка *Methanocellales* (Sakai et al., 2011).

Источниками азота для группы метанобразующих архей могут служить большое количество различных соединений, однако на уровне вида их набор достаточно ограничен. Все метаногены могут использовать NH_4^+ , многие способны фиксировать азот в отсутствие аммония, некоторые способны деаминировать аминокислоты, гидролизовать мочевины, метаболизировать метиламины, деградировать пурины и пиримидины, использовать нитраты. Источником фосфора служат неорганические фосфаты и полифосфаты (DeMoll, 1993).

В качестве основного источника серы метаногенные археи используют сульфид, однако многие виды способны также использовать молекулярную серу. Некоторые штаммы (*Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanothermococcus thermolithotrophicus*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina barkeri*) ассимилируют сульфит и тиосульфат. В качестве дополнительного источника серы отдельные виды способны использовать сульфат, цистеин, метионин и меркаптаны. При низких концентрациях сульфида в среде *M. thermolithotrophicus*, *M. jannaschii* и *M. thermautotrophicus* ассимилируют метантиол, этантиол, н-пропантиол, н-бутантиол, метилсульфид, диметилсульфоксид, этилсульфид или CS_2 (Liu, Whitman, 2012).

Метаболические особенности тех или иных групп метанобразующих архей во многом являются адаптациями к условиям существования в экологических нишах, зачастую не доступных как для других архей, так и для бактерий.

1.3.2 Основные аспекты экологии метаногенных архей

Метаногенные микроорганизмы населяют множество анаэробных экосистем, характеризующихся как умеренными, так и экстремальными значениями температуры, солёности и pH (Lui and Whitman, 2008). Оптимальные температуры роста для большинства метанобразующих архей лежат в пределах 20-30 °C, что характерно и для видов, приспособленных к росту в условиях низких температур, истинными психрофилами среди которых на сегодняшний день являются только населяющий льды Антарктических озёр *Methanogenium frigidum* ($T_{opt} = 15$ °C) и обитатель мерзлотных почв *Methanolobus psychrophilus*

($T_{opt} = 18\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Dong and Chen, 2012). Среди экстремально термофильных штаммов можно выделить обитателей подводных гидротерм *Methanococcus jannaschii* ($T_{opt} = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) и наиболее термоустойчивого из всех известных гипертермофилов *Methanopyrus kandleri* ($T_{opt} = 98\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{max} = 122\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Jones et al., 1983; Kurr et al., 1991; Takai et al., 2008).

Нейтральные значения pH, характерные для многих анаэробных экосистем, являются оптимальными и для населяющих их метаногенов. Умеренное снижение pH среды в большей степени приводит к угнетению роста гидрогенотрофных метаногенов (Phelps, Zeikus, 1984). Тем не менее, именно для использующих CO_2 и H_2 представителей *Methanobacterium* характерна наибольшая приспособленность к значительному отклонению pH как в кислую (Kotsyurbenko et al., 2007), так и в щелочную стороны (Worakit et al., 1986; Kotelnikova et al., 1998). Археи рода *Methanohalophilus* способны сочетать устойчивость к высоким значениям pH среды (pH= 9,2) и высокой солёности (до 2,1 М NaCl) (Mathrani et al., 1988).

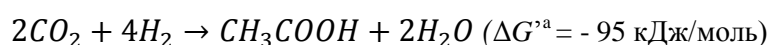
К основным местам обитания метанообразующих архей можно отнести морские и пресноводные донные отложения, болотные и тундровые почвы, геотермальные системы, желудочно-кишечный тракт млекопитающих и термитов, метантенки, полигоны твёрдых бытовых отходов и др. В данных экосистемах органическое вещество последовательно разлагается до метана при участии ряда групп анаэробных микроорганизмов (Тоerien and Hattingh, 1969). На начальном этапе группы специализированных микроорганизмов – гидролитиков, способных секретировать комплекс экзоферментов, осуществляют гидролиз органических полимерных соединений с образованием моно- и олигосахаридов, олигопептидов и аминокислот, простых ароматических соединений, глицерола и длинноцепочечных карбоновых кислот. Данные субстраты в дальнейшем сбрасываются до ацетата, и других летучих карбоновых кислот, спиртов, H_2 , CO_2 и др. как самими «гидролитиками», так и другими первичными анаэробами не способными гидролизовать полимеры, но также не требующими внешних акцепторов электронов. Для роста первичным анаэробам не требуется обязательное взаимодействие с дальнейшими деструкторами (вторичными анаэробами), однако при активном удалении из среды продуктов брожения (в частности водорода), стадия брожения смещается в сторону образования более восстановленных летучих карбоновых кислот, H_2 и CO_2 , нежели ацетата (Bryant et al., 1967; Wolin, 1979).

Восстановленные продукты брожения либо напрямую используются микроорганизмами с различными типами анаэробного дыхания, либо разлагаются синтрофным бактериями с образованием ацетата, формиата, H_2 и CO_2 , что является третьей стадией анаэробной деструкции органического вещества. Разложение ацетата и других летучих карбоновых кислот термодинамически выгодно лишь при низком парциальном давлении образуемого водорода ($<10^2$ Па) (Zinder, 1993), поэтому синтрофные бактерии развиваются в тесном контакте с

потребляющими водород гидрогенотрофными сульфат- и нитратредуцирующими бактериями и автотрофными метанобразующими археями. Данное взаимодействие называют межвидовым переносом водорода (Bryant et al., 1967; Wolin, 1979).

В зависимости от концентраций сульфата в среде и активности сульфатредуцирующих бактерий преимущественной терминальной реакцией анаэробного разложения органического вещества является образование CO_2 и CH_4 или H_2S . В то же время, для ряда экологических ниш протекание обоих процессов одновременно не исключено. Например, в присутствии сульфатов образование метана зафиксировано в морских донных отложениях в зонах, где процессы сульфатредукции связаны с активным анаэробным окислением метана (Wellsbury et al., 2002; Parkes et al., 2005). Однако в большинстве случаев метаногены доминируют в тех зонах, где отсутствуют либо ограничена доступность таких акцепторов электронов как O_2 , NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} и SO_4^{2-} , восстановление которых термодинамически более выгодно, чем восстановление CO_2 до метана (Liu and Whitman, 2008). Таким образом, метанобразующие археи выполняют важнейшую функцию, удаляя избыток водорода и других продуктов метаболизма, образующихся в результате жизнедеятельности анаэробного сообщества, там, где развитие других анаэробов сильно ограничено.

Следует отметить, что на последних этапах магистральными трофическими маршрутами в анаэробном деструктивном сообществе являются «ацетатный» и «водородный» пути в соответствии с наиболее важными продуктами ферментации (рис. 4). Ацетатный путь выбирают ацетокластические метаногены и гетеротрофные сульфатредуцирующие бактерии, в то время как водородный путь выбирают автотрофные метаногены и сульфатредукторы. Ацетатный и водородный пути не обособлены друг от друга, что связано с автотрофной жизнедеятельностью гомоацетогенных бактерий, передающих восстановленные эквиваленты с водородного пути на ацетатный, согласно уравнению реакции:



В стандартных условиях гомоацетогены сбрасывают мономеры и не могут конкурировать за водород с сульфатредукторами и метногенами, поскольку восстановление CO_2 до ацетата наименее энергетически выгодно. Однако при неограниченной доступности водорода, а также в условиях изменения режима осадконакопления, при низких температурах и высоких значениях pH автотрофный ацетогенез может играть важную роль в процессах утилизации водорода (Nozhevnikova, 1994; Hoehler et al., 1999; Meister et al., 2007).

Влияние физико-химических условий среды на конечные этапы анаэробной деструкции органического вещества наглядно прослеживается на примере пресноводных экосистем. В донных отложениях пресноводных водоёмов концентрации ионов сульфата обычно малы, и метан является основным конечным продуктом анаэробного разложения органического

вещества. В связи с низкой активностью сульфат-редуцирующих микроорганизмов, обуславливающей доступность образующегося в ходе брожения ацетата для метаногенных архей, вклад в общую продукцию метана ацетокластического и гидрогенотрофного путей метаногенеза в сбалансированной системе должен находиться на уровне 70 % и 30 % соответственно. Данное соотношение теоретически основано на том факте, что в результате разложения одной молекулы гексозы образуется четыре молекулы H_2 , по две молекулы ацетата и CO_2 . Для восстановления CO_2 до метана требуется $4H_2$. Таким образом, предполагаемое соотношение количества метана, который может образоваться из CO_2+H_2 и ацетата в результате расщепления гексозы составляет 1:2 (Conrad, 1999). Вклад метаногенеза из метилированных C_1 -соединений считается не значительным ввиду малых концентраций данных субстратов в пресноводных осадках (Carone, Kiene, 1988).

Для пресноводных экосистем вклад того или иного пути метаногенеза в общую продукцию метана сильно зависит от температуры, pH и парциального давления H_2 , изменения которых влияет на конкурентные отношения в микробных сообществах. Повышенные температуры обычно приводят к усилению роли гидрогенотрофного пути образования метана в связи с увеличением доступности H_2 . В мезофильных и термофильных условиях гидрогенотрофные метанобразующие археи эффективно конкурируют за водород с гомоацетогенными бактериями, а также обладают большей скоростью роста и активностью по отношению к ацетокластическим метаногенам (Glissmann et al., 2004; Nozhevnikova et al., 2007). Кроме того, при умеренных температурах смещать равновесия в сторону автотрофного пути образования метана может процесс синтрофного окисления ацетата и других летучих карбоновых кислот до H_2 и CO_2 . В донных отложениях субтропического озера Кинерет, имеющих температуру около $15\text{ }^\circ\text{C}$, активное развитие синтрофных ассоциаций ацетат-окисляющих бактерий и гидрогенотрофных метаногенов порядков *Methanomicrobiaceae* и *Methanobacteriaceae*, приводит к тому, что до 60 % метана образуется из CO_2 и H_2 (Nuesslein et al., 2001).

Снижение температуры в большинстве случаев влечёт за собой увеличение вклада ацетокластического метаногенеза в общую продукцию метана. При низких температурах селективное преимущество для роста получают гомоацетогенные микроорганизмы, которые способны как восстанавливать CO_2 до ацетата с использованием водорода, так и сбраживать мономеры до ацетата, тем самым подавляя стадию синтрофного разложения летучих карбоновых кислот и спиртов. В ходе изучения влияния пониженных температур на развитие психрофильных штаммов гомоацетогенов, а также психротолерантных и мезофильных гидрогенотрофных метаногенных архей было установлено, что при температурах $<15\text{ }^\circ\text{C}$ мезофильные метаногены требуют больших пороговых концентраций водорода и обладают

меньшей скоростью роста в сравнении с гомоацетогенами и при любых концентрациях H_2 в среде не могут оказывать им серьёзную конкуренцию за данный субстрат. В свою очередь, психротолерантные автотрофные метаногены обладают большим сродством к водороду, но меньшей скоростью роста по отношению к гомоацетогенам, поэтому при парциальном давлении водорода 1-10 Па он будет исключительно ассимилироваться метаногенами, тогда как при более высоком давлении преимущество получают гомоацетогенные бактерии (Kotsyurbenko, 2005). Эффективно конкурируя с гидрогенотрофными метаногенами за общие субстраты, гомоацетогены способны одновременно поставлять ацетат для развития ацетокластического метаногенного сообщества. Данный эффект подтверждается рядом исследований, показывающих, что ацетат является основным предшественником метана в холодных донных отложениях стратифицированных озёр (Kuivila et al., 1989; Thebrath et al., 1993; Schulz, Conrad, 1996; Nozhevnikova et al., 1997, 2007; Zepp-Falz et al., 1999; Glissmann et al., 2004) и почвах рисовых полей (Fey, Conrad, 2001). В то же время в отдельных психрофильных экосистемах, накопление биомассы медленно растущих ацетокластических метанобразующих архей, развитие которых дополнительно угнетается высокими концентрациями ацетата и значительным снижением pH, становится фактором, приводящим к смене доминирующего пути образования метана с ацетокластического на гидрогенотрофный. Эффект перехода к гидрогенотрофному метаногенезу при снижении pH наблюдается в кислых почвах торфяных болот, в которых были обнаружены ацидофильные представители *Methanobacterium* (Kotsyurbenko et al., 2007). Критическое значение в различиях скоростей роста характерно для несбалансированных систем, где при резком увеличении количества поступающего водорода (внесение большого количества органического вещества) за счёт быстрого развития популяции автотрофных метаногенов на начальных этапах метан в основном синтезируется из H_2 и CO_2 (Conrad, 1999).

Психрофильное анаэробное микробное сообщество, в котором метан преимущественно образовывался по гидрогенотрофному пути, было получено и в долгосрочном эксперименте по анаэробной очистке сточных вод (Lettinga et al., 1999). Сообщество развивалось на смеси пропионовой и масляной кислот, что привело к доминированию микробных консорциумов бактерий и автотрофных архей, синтрофно разлагающих данные субстраты с образованием ацетата, H_2 и CO_2 . Образующийся ацетат медленно потреблялся ацетокластическими метаногенами, но доля метана образованного из H_2 и CO_2 была до пяти раз выше. Активность автотрофных гомоацетогенов была подавлена из-за поддержания концентраций H_2 на стабильно низком уровне. Кроме того, в холодных экосистемах образование метана преимущественно по гидрогенотрофному пути теоретически может происходить при активном удалении из системы ацетата в обход метаногенеза, а также наличии не биогенного источника

водорода (Conrad, 1999). Тем не менее, не объяснённым остаётся более чем 30 % вклад гидрогенотрофного пути в общую продукцию метана в холодных донных отложениях ряда пресноводных озёр (Jones et al., 1982; Murase, Sugimoto, 2001), включая озеро Байкал (Намсараев и др., 1995; Zemskaya et al., 2010).

1.3.3 Молекулярно-биологические исследования процессов цикла метана в донных осадках озера Байкал

В настоящее время, для донных отложений озера Байкал, выполнен значительный объём исследований, направленных на изучение скоростей образования и окисления метана (Намсараев и др., 1995; Клеркс и др., 2003; Дагурова и др., 2004; Zemskaya et al., 2010; Pimenov et al., 2014), определения численности метаногенных и метанотрофных микроорганизмов (Намсараев и др., 1995; Намсараев, Земская, 2000; Дагурова и др., 2004), а также установления их филогенетического разнообразия с применением методов иммунофлуоресцентного окрашивания (Намсараев и др., 1995; Намсараев, Земская, 2000) и секвенирования последовательностей генов малой субъединицы 16S рибосомной РНК (16S рРНК) (Шубенкова и др., 2005; Черницына и др., 2007; Zemskaya et al., 2010; Kadnikov et al., 2012, 2013; Ломакина и др., 2014).

Установлено, что скорости образования метана в осадках озера варьируют от 0,0004 до 33,9 мкмоль $\text{CH}_4/\text{дм}^3$ в сутки. Наибольшие значения зафиксированы в иловых отложениях (слой 1–5 см) вблизи низкотемпературного гидротермального источника в бухте Фролиха (Северный Байкал). Также высоки скорости образования метана в осадках Посольского разлома у подножия Посольской Банки («кратер Новый»; до 15,4 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$) и в районе кратера грязевого вулкана «Маленький» (до 13,4 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$), где максимальная интенсивность метаногенеза приурочена к слоям, залегающим на глубинах 7-10 см и 25–30 см соответственно (Дагурова и др., 2004). В донных отложениях глубоководных фоновых станций Южной и Северной котловин озера наибольшая интенсивность образования метана зарегистрирована в поверхностном слое и находится в пределах 0,11-0,12 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$. В толще отложений Центральной котловины озера, вблизи острова Ольхон, зафиксировано два максимума: в поверхностном слое (0,35 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$) и на глубине 65–75 см ниже поверхности ила (0,86 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$) (Намсараев, Земская, 2000; Дагурова и др., 2004).

По данным радиоизотопного анализа потребления ^{14}C меченых бикарбоната, формиата и ацетата натрия, в донных отложениях бухты Фролиха и Хакусы, грязевого вулкана «Маленький», а также на глубоководных станциях трёх котловин озера вне зависимости от глубины осадка 75–100 % метана образуется из H_2 и CO_2 (Намсараев и др., 1995; Zemskaya et al.,

2010). В то же время в илах мелководных зон основным предшественником метана является ацетат (29-97,9 %) (Намсараев и др., 1995).

Подсчёт численности отдельных видов метаногенных микроорганизмов был проведён в осадках бухт Фролиха и Хакусы, Селенгинского мелководья, Бугульдейской перемычки, Южной и Средней котловин, Академического хребта, прибрежных районов вблизи г. Байкальска и п. Большие Коты. Концентрация клеток *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium thermoautotropicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanosarcina mazei* и *Methanosarcina barkeri* на этих станциях варьировала от 5500 до 1550000 кл./мл. Наиболее часто (12 % проб) встречались клетки *M. formicicum* (Намсараев и др., 1995). Следует отметить, что в осадках бухты Хакусы, где 99,9 % метана образовывалось из CO₂ и H₂, были многочисленны клетки миксотрофного метаногена *Methanosarcina barkeri*, что может говорить о преимущественно автотрофном росте этого микроорганизма в данной экосистеме, что может стимулироваться высокими концентрациями водорода.

По результатам секвенирования генов 16S рРНК установлено присутствие в донных отложениях озера, приуроченных к разгрузкам газо- и нефтенасыщенных флюидов, метаногенных архей порядков *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, а также потенциально метаногенных представителей MCG (Zemskaya et al., 2010; Kadnikov et al., 2012, 2013; Ломакина и др., 2014). Установлено, что в поверхностных осадках метанового сипа «Санкт-Петербург» (Центральная котловина) последовательности метаногенных микроорганизмов, среди которых представители родов *Methanosphaerula* (*Methanomicrobiales*; 17,4 %) и *Methanosaeta* (*Methanosarcinales*; 16,8 %), наиболее многочисленны среди *Archaea*. В слоях осадка глубиной 85–90 см суммарная доля *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales* сокращается до 10,3 %, а более представленными становятся последовательности *Methanomicrobiales* (8,4 %). В противоположность этому доля потенциально метаногенных архей класса MCG с глубиной возрастает с 11,4 % до 22,4 % (Kadnikov et al., 2012). В районе разгрузки нефти напротив мыса Горевой Утёс, в донных отложениях также обнаружены только последовательности представителей *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales* (Ломакина и др., 2014), в то время как битумные постройки, образующиеся на дне в местах высачивания нефти, населены, в том числе, и археями порядка *Methanobacteriales* (Kadnikov et al., 2013). В донных отложениях грязевого вулкана «Маленький» удалось обнаружить последовательности 16S рРНК сходные с таковыми у метаногенов из рода *Methanosaeta* (Zemskaya et al., 2010).

В результате исследования интенсивности окисления метана (ОМ) в донных отложениях Байкала установлено, что в районах глубоководных фоновых станций трёх котловин скорости ОМ в поверхностных слоях варьируют от 0,42 до 8 мкмоль CH₄/(дм³ сут.) и в целом превышают скорости образования метана в данных слоях. В то же время баланс цикла метана,

рассчитанный на основе оценки скоростей образования и окисления метана в колонках длиной от 70 см, указывает на возможность эмиссии метана в водную толщу на станциях Центральной и Северной котловин (Дагурова и др., 2004). В районах метановых вентов, нефтяных разгрузок и приповерхностного залегания газовых гидратов скорости ОМ в осадках могут достигать 60 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$. Максимальные значения в большинстве случаев зафиксированы в поверхностном слое и вероятно ассоциированы с жизнедеятельностью аэробных метанотрофных бактерий. Значительная интенсивность ОМ в потенциально анаэробных слоях донных отложений (до 40 мкмоль $\text{CH}_4/(\text{дм}^3 \text{ сут.})$) обнаружена в районе нефтяной разгрузки станции Горевой утёс (Дагурова и др., 2004; Пименов и др., 2014). Тем не менее, на большинстве станций по глубине кернов фиксируются две зоны возрастания интенсивности ОМ – в поверхностном слое и на глубинах порядка 20-60 см, что может свидетельствовать о функционировании анаэробного метанотрофного сообщества (Пименов и др., 2014). Стоит отметить, что в районе залегания газовых гидратов на южном склоне Посольской Банки, в некоторых точках скорости ОМ в анаэробной зоне превышали таковые в поверхностном слое осадка (Пименов и др., 2014).

В морских донных отложениях, процессы анаэробного окисления метана (АОМ) осуществляются консорциумами анаэробных метанотрофных архей (ANME) и сульфатредуцирующих бактерий (Knittel, Voetius, 2009). В низко минерализованных донных отложениях Байкала сульфат-зависимое окисление метана теоретически может осуществляться лишь локально, в зоне поступления высокоминерализованных глубинных флюидов в кратере грязевого вулкана «Маленький» (Zemskaya et al., 2010). В отсутствие сульфатов анаэробное окисление метана может быть связано с восстановлением нитратов (Naroon et al., 2013), железа или марганца (Beal et al., 2009), концентрации которых в осадках Байкала также не велики (Погодаева и др., 2007). На данный момент нет однозначного ответа на то, какой из известных механизмов АОМ может преобладать в донных отложениях озера Байкал (Пименов и др., 2014).

1.4 Глубинная биосфера: исследования микробных сообществ глубинных слоёв осадочных отложений и магматических пород; процессы ранней генерации углеводов

Под глубинной биосферой понимают экосистему или набор экосистем, расположенных на глубине не менее 1 м ниже дна морских и пресноводных водоёмов или континентальной поверхности (Edwards et al., 2012). Уникальной особенностью глубинной биосферы является доминирование в ней микроорганизмов – бактерий, архей, эукариот и вирусов. Если принять за нижнюю границу глубинной биосферы слои земной коры, в которых температура достигает верхнего лимита (122 °C), при котором могут развиваться известные прокариоты (Takai et al., 2008), то её объём на два порядка превышает объём мирового океана (Edwards et al., 2012).

Началом исследований микробных сообществ глубинных слоёв донных отложений можно считать середину 20-го века, когда в образцах глин, отобранных в Тихом океане с глубины 7,47 м под поверхностью ила, методом культивирования на питательных средах были обнаружены жизнеспособные микроорганизмы (Morita, ZoBell, 1953). В последующем, реализация программ Глубоководного Морского Бурения (1968-1983 гг.) и Океанического Бурения (1985-2003 гг.) позволила оценить общую численность микроорганизмов, активность и разнообразие культивируемых прокариот в донных отложениях континентального склона на глубинах в сотни и даже тысячи метров ниже уровня дна (Parkes et al., 2000). Полученные данные позволили прийти к сенсационным выводам о том, что в глубинах осадков может находиться до 86 % всех прокариотических организмов на Земле и до 33 % всей биомассы планеты (Whitman et al., 1998). Данное открытие положило начало активному всестороннему изучению микробных сообществ иловых отложений и океанической коры и их взаимодействию с геосферой. Несмотря на результаты последующих исследований, указывающих на малую численности микроорганизмов в донных отложениях низко продуктивных олиготрофных районов открытого океана (D'Hondt et al., 2004), что уменьшило оценки по количеству биомассы в осадках до 3,6–10 % (Kallmeyer et al., 2012; Parkes et al., 2014), глубинная биосфера остаётся одной из наиболее активно изучаемых экосистем.

Первые исследования состава и структуры микробных сообществ глубинных осадков показали, что количество культивируемых микроорганизмов в них зачастую не превышает 0,1 % от общего числа обнаруживаемых клеток (D'Hondt et al., 2004). Микроорганизмы, изолируемые из глубин донных отложений, в большинстве случаев относятся к бактериям филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и археям родов *Methanoculleus* и *Methanococcus* (Barnes et al., 1998; Inagaki et al., 2003; Toffin et al., 2004; Lee et al., 2005; Takai et al., 2005; 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 (Fry et al., 2008; 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* и *Epsilonproteobacteria*, а также архей групп ANME и *Methanosarcinales*, 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 и *Bathyarchaeota*, тогда как в осадках, ассоциированных с газовыми гидратами, доминируют *Atribacteria* и археи группы MBG-B (Inagaki et al., 2006; Webster et al., 2006; Hamdan et al., 2012; Lee et al., 2013). В иловых отложениях олиготрофных районов океана многочисленны *Chloroflexi*, *Gammaproteobacteria*, *Bathyarchaeota* и MBG-B (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).

По мере обнаружения микроорганизмов в глубинной биосфере открытым оставался вопрос о природе источников углерода и энергии, стимулирующих их активность. Проведённые исследования показывают, что основными процессами, протекающими в глубинах осадков, являются сульфатредукция, метаногенез и ацетогенез, активность которых зависит от доступности H_2 (Newberry et al., 2004; Soffientino et al., 2009; Lever et al., 2010). Кроме того, важную роль в глубинной биосфере могут играть реакции биогенного этанобразования, пропанобразования и сульфатзависимого анаэробного окисления аммония (Hinrichs et al., 2006; Schrum et al., 2009). Установлено, что в отдельных случаях повышенная активность глубинных сообществ связана с доступностью не полностью деградированного органического вещества. К примеру, в Тихом океане биогенное восстановление марганца и сульфата зафиксировано в донных отложениях на глубине порядка 400 м ниже уровня дна, где отдельные слои осадка обогащены остатками диатомовых водорослей (D'Hondt et al., 2004; Parkes et al., 2005). Микробное сообщество, ассоциированное с прослоями бурых углей, в котором найдены последовательности 16S рРНК представителей *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, а также гидрогенотрофных метаногенных архей рода *Methanobacterium*, было обнаружено и в самых глубинных из изученных на сегодняшний день слоях донных отложений, залегающих на расстоянии 2,5 км ниже уровня дна (Inagaki et al., 2015). Авторы предполагают, что данное сообщество, существует за счёт деградации органического вещества на протяжении всего времени захоронения угольных слоёв, о чем свидетельствует его сходство с сообществами почвенных экосистем. В свою очередь, в осадках с низким содержанием органического вещества активность сообществ в глубинной биосфере может стимулироваться доступностью различных акцепторов электронов. Так, в олиготрофных районах океана, из-за медленной ассимиляции сульфатов в поверхностных слоях донных отложений зона сульфатредукции может распространяться до глубин 200 м ниже уровня дна (Wellsbury et al., 2002).

Активность микроорганизмов в глубинной биосфере может также поддерживаться за счёт H_2 , карбоновых кислот, CH_4 и других углеводородов, образующихся в процессе

температурной активации керогена (Wellsbury et al., 1997; Parkes et al., 2007). Экспериментальные данные показывают, что начальные этапы активации керогена, с образованием указанных соединений, а также нефти и тяжёлых алканов (от C₃ и выше) начинаются в слоях донных отложений с температурой около 60 °С. При достижении температуры 100 °С, активность нефтеобразования достигает максимума. В промежутке от 150 до 200 °С кероген и нефть подвергаются крекингу с образованием смеси газов преимущественно состоящей из метана, этана и пропана. В результате дальнейшего нагревания органические компоненты могут полностью удаляться из породы с образованием графита (Ollivier et al., 2014). Таким образом, термофильные и гипертермофильные микроорганизмы могут существовать в слоях осадка имеющих температурный диапазон, необходимый для образования нефти. Данное предположение подтверждается результатами исследований нефтяных залежей и сопутствующих пластовых вод, указывающих на богатство населяющих их микробных сообществ (Pham et al., 2009; Yamane et al., 2011; Kotlar et al., 2011; Kryachko et al., 2012; Li et al., 2012), численность микроорганизмов в которых может достигать 10⁷ кл./г (Bennett et al., 2013). В виду присутствия в нефтеносных пластах микроорганизмов, осуществляющих брожение, а также метаногенных архей и сульфатредуцирующих бактерий, существование микробных сообществ может основываться на анаэробной синтрофной метаногенной или сульфидогенной утилизации углеводов (Gray et al., 2010; Gieg et al., 2010; Wang et al., 2011; Mabadinga et al., 2012; Aitken et al., 2013). За счёт окисления термогенного метана и других углеводов, как полагают, выживают термофильные археи семейства *Thermococcales*, а также групп ANME, найденные в наиболее древних из изученных донных отложений возрастом около 110 млн лет (Roussel et al., 2008). Однако помимо потребления термогенных субстратов, микроорганизмы глубинной биосферы могут принимать непосредственное участие в их образовании, стимулируя разложение керогена на ранних стадиях катагенеза (Wellsbury et al., 1997). Влияние микроорганизмов на ускоренное созревание керогена с образованием H₂, ацетата, сульфатов, CH₄ и других углеводов было подтверждено экспериментально (Parkes et al., 2007).

Помимо органических источников, микробные сообщества могут использовать и субстраты, имеющие геологическое происхождение, что обуславливает возможность заселения магматических пород (Schrenk et al., 2010). Водород и кислород могут образовываться в результате гидролиза воды, происходящем при формировании свободных радикалов на «свежей» поверхности кристаллов (Saruwatari et al., 2004; Balk et al., 2009). Данный процесс активно происходит в момент землетрясений и других стрессовых воздействий на кристаллический фундамент (Ito et al., 1998; Balk et al., 2009). Высвобождающийся кислород может напрямую использоваться прокариотами как акцептор электронов, либо окислять

восстановленные неорганические компоненты с образованием таких акцепторов электронов, как CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} и S^0 (Parkes et al., 2014). В присутствии микроорганизмов образование водорода было зафиксировано в экспериментах по инкубации различных минералов и пород (включая базальт) в умеренно термофильных условиях (70-100 °C) (Parkes et al., 2011). Известен также процесс радиолитического разложения воды в присутствии природных радиоактивных элементов, который может покрывать более 10 % потребности в водороде для глубоководных сообществ с низкой активностью анаэробного дыхания (Blair et al., 2007). Ещё одним потенциальным источником субстратов для глубоководных сообществ, может быть процесс абиогенного формирования углеводородов в ходе реакции Фишера-Тропша в ультрамафических породах в присутствии воды и умеренного количества тепла (Proskurowski et al., 2008). Таким образом, в районах с высокой тектонической активностью, где в поднятиях магматической коры температуры не превышают допустимые для жизни пределы, существование микробных сообществ, может не зависеть от фотосинтезируемого органического вещества (Orcutt et al. 2011).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования и метод отбора проб

Материалом для диссертации послужили пробы донных отложений района глубоководной разгрузки метана, расположенной на южном склоне подводной возвышенности Посольская Банка (Южный Байкал) (рис. 7). Образцы осадков отобраны с использованием геологической ударной трубки (ГТ) в ходе экспедиций на научно-исследовательском судне «Г. Ю. Верещагин» в июле 2012, 2014 и 2015 годов (табл. 2).

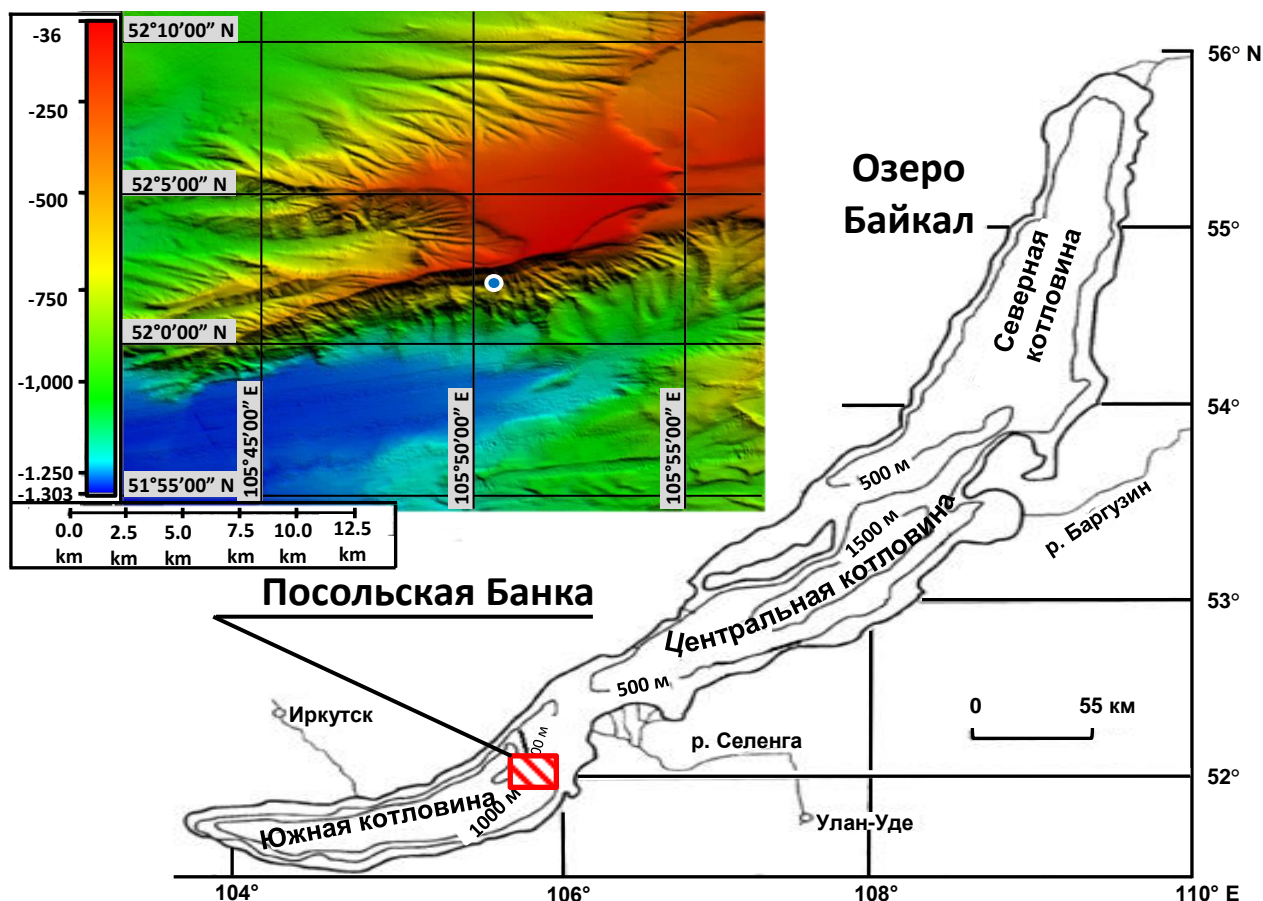
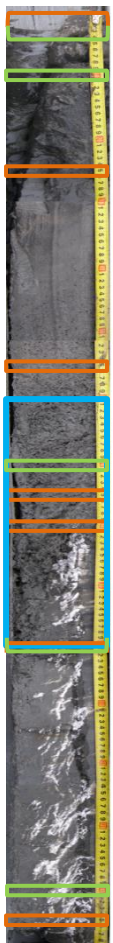


Рис. 7. Схема расположения района отбора проб. Синей точкой на батиметрической карте отмечено положение исследуемой разгрузки метана.


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 и экспериментального культивирования, после отбора гомогенизировали, упаковывали в стерильную фольгу и помещали в жидкий азот, до момента их анализа в лаборатории. Постановку накопительных культур на средах для метаногенных микроорганизмов и подготовку образцов к химическому анализу поровых вод выполняли на судне.


Таблица 2

Характеристика донных отложений района Посольская Банка, использованных в работе


Название керна; глубина отбора; координаты отбора		Солевой состав поровых вод, мг/л													
Ст-5 ГТ-4 (2012 г.) 500 м 52°02'10" N, 105°50'36" E		Слой, см	HCO ₃ ⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	NH ₄ ⁺	Сумма
 <p>0–2 см</p> <p>10 см</p> <p>25 см</p> <p>30 см</p> <p>40 см</p> <p>55 см</p> <p>60 см</p> <p>70 см</p> <p>75 см</p> <p>80 см</p> <p>100 см</p> <p>110 см</p> <p>120 см</p> <p>130 см</p> <p>140 см</p> <p>145 см</p>	0–30 см: восстановленный тёмно-серый диатомовый алевропелитовый ил с примесью алеврита и прослоями гидротролеита;	2,5	45,23	8,27	1,72	0,24	1,08	5,24	3,20	8,70	0,41	2,96	0,22	0,4	77,66
	30–150 см: серая газонасыщенная алевритистая глина;	10	63,65	8,88	0,59	0,00	0,18	4,36	2,87	12,60	0,43	3,03	0,20	1,9	98,65
	30–80 см: трещины дегазации;	20	68,29	9,36	0,60	0,00	0,00	4,45	2,65	13,40	0,51	2,46	0,17	1,7	103,64
	80–150 см: газовые гидраты (до 97 % объёмного содержания).	30	71,72	9,26	0,67	0,00	0,00	4,71	2,17	13,40	0,63	1,26	0,16	3,1	107,04
		40	76,42	9,48	1,79	0,17	1,51	9,14	3,53	15,40	0,61	1,76	0,16	3,5	123,46
		50	74,97	12,38	1,08	0,00	0,00	6,52	2,41	14,30	1,38	0,90	0,15	3,1	117,14
		60	75,91	13,59	1,91	0,00	0,00	6,20	2,70	16,30	2,37	0,70	0,18	3,2	123,06
		70	58,57	22,35	5,93	0,55	0,60	5,75	3,00	18,20	2,00	2,50	0,00	3,7	123,16
		80	90,67	15,55	0,82	0,00	0,00	7,00	2,50	19,30	2,75	0,75	0,00	3,5	142,83
		100	92,55	11,02	1,20	0,00	0,00	7,00	4,25	18,10	2,50	0,50	0,00	3,3	140,42
		110	86,67	12,55	1,32	0,00	0,00	7,75	4,50	16,70	2,50	0,75	0,00	3,2	135,93
		120	92,01	13,38	1,47	0,00	0,00	6,25	3,75	20,60	2,00	8,50	0,00	3,3	151,25
	130	64,76	15,05	0,51	0,00	0,00	4,45	4,75	13,50	2,50	2,50	0,00	3,4	111,42	
	140	83,54	8,22	24,26	0,00	0,00	20,75	4,25	17,10	1,00	7,50	0,00	3,2	169,83	

Продолжение таблицы 2

Ст-1 ГТ-3 (2014 г.) 505 м 52°02'09" N, 105°50'35" E		Слой, см	HCO ₃ ⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	NH ₄ ⁺	Сумма	
38	 <p>0-10 см: окисленный слой; 10-45 см: восстановленный серый диатомовый алевропелитовый ил с прослоями гидротролеита; 45-60 см: переходная зона; 60-178 см: серая алевритистая глина с плотными включениями тёмно-серой глины и прослоями гидротролеита.</p> <p>Отмечены слои осадка использованные для: <div style="border: 1px solid orange; display: inline-block; width: 20px; height: 10px; vertical-align: middle;"></div> постановки накопительных культур (H₂ + CO₂, ацетат Na + H₂, метанол).</p>	2,5	70,48	2,22	0,73	0,40	0,41	4,03	2,04	15,60	0,85	3,62	0,18	-	100,55	
		0-5 см	10	64,50	2,24	0,74	0,00	0,49	4,20	2,12	13,60	0,91	2,12	0,07	-	90,99
		15	66,29	1,39	0,79	0,00	0,40	4,53	2,32	13,90	1,48	1,61	0,03	-	92,74	
		25 см	20	50,69	3,43	0,86	0,00	0,43	5,12	2,44	9,50	1,63	0,55	0,04	-	74,70
		30 см	25	63,72	1,47	0,85	0,00	0,43	5,63	2,48	9,90	1,91	0,46	0,03	-	86,87
		40 см	30	74,68	2,67	0,90	0,00	0,33	5,23	2,65	15,70	2,36	0,65	0,03	-	105,20
		50 см	35	65,20	2,47	0,89	0,00	0,47	5,21	2,68	11,30	2,47	0,55	0,03	-	91,28
		70 см	40	85,25	2,20	0,85	0,00	0,98	5,24	2,66	15,40	2,61	0,70	0,03	-	115,92
		50	50	76,44	1,54	0,80	0,00	0,97	6,01	2,77	15,10	2,58	0,59	0,03	-	106,83
		60	60	75,52	2,78	0,81	0,00	0,60	6,21	3,04	15,10	2,54	0,63	0,03	-	107,26
		100 см	70	82,28	1,76	0,77	0,00	0,75	6,80	3,41	16,10	2,71	0,58	0,03	-	115,18
		80	80	96,29	2,25	0,89	0,00	0,55	7,31	3,66	16,90	2,86	0,55	0,03	-	131,28
		100	100	96,47	3,14	0,85	0,00	0,65	7,88	3,72	17,20	2,91	0,53	0,03	-	133,37
		140 см	120	94,66	2,89	0,80	0,00	1,12	10,00	4,64	16,20	3,02	0,87	0,03	-	134,23
		140	140	123,76	2,42	0,95	0,00	0,60	10,50	4,77	24,10	3,21	0,65	0,03	-	170,99
170	170	102,48	2,69	0,78	0,00	1,29	10,80	4,85	16,80	4,35	0,98	0,03	-	145,06		
170 см	177	52,76	3,61	0,88	0,00	0,78	11,30	3,15	4,80	1,41	0,07	0,11	-	78,88		

Ст-2 ГТ-3 (2015 г.) 502 м 52°02'09" N, 105°50'36" E		Слой, см	HCO ₃ ⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	NH ₄ ⁺	Сумма	
 <p>39</p>	0-5 см	2.5	50.83	0.00	1.11	0.00	0.20	3.61	1.83	11.90	0.70	0.06	0.09	-	70.33	
	15 см	10	62.09	0.00	1.19	0.00	0.18	4.20	2.84	13.00	1.00	-	0.20	-	84.71	
	50 см	15	72.50	0.00	1.17	0.00	0.19	4.85	2.69	14.30	1.40	1.40	0.20	-	98.71	
		20	81.21	0.00	1.16	0.00	0.12	5.26	2.54	16.60	1.80	0.00	0.20	-	108.89	
		30	82.36	0.00	1.15	0.00	0.15	5.75	2.97	16.10	1.80	0.04	0.20	-	110.53	
		40	84.90	0.00	1.10	0.00	0.20	5.97	3.08	16.20	2.00	0.64	0.11	-	114.21	
		79 см	50	83.27	0.00	1.43	0.00	0.23	6.25	2.90	16.10	2.10	-	0.12	-	112.40
		100 см	80	100.72	0.00	1.54	0.00	0.26	8.20	2.80	18.90	2.80	-	0.12	-	135.34
			100	108.44	0.00	1.63	0.00	0.00	9.10	3.30	19.60	2.80	-	-	-	144.87
			115	139.90	0.00	1.87	0.00	0.00	11.50	3.00	27.30	3.90	0.54	0.20	-	188.21
		130 см	124	76.70	0.00	1.52	0.00	0.00	8.65	2.30	12.90	1.70	0.14	0.03	-	103.94
			130	127.14	0.00	1.42	0.00	0.15	8.50	3.20	23.60	3.70	0.12	0.15	-	167.98

0-10 см: окисленный слой;
10-50 см: восстановленный
серый диатомовый ил с
прослоями гидротролеита
50-155 см: серая,
газонасыщенная
алевритистая глина с
прослоями гидротролеита;
122-126 см: одиночные
включения газовых
гидратов;
133-155 см: прослой
газовых гидратов.

Отмечены слои осадка
использованные для:

постановки накопительных
культур
(H₂ + CO₂, ацетат Na + H₂,
ацетат Na + CO₂, метанол).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Микробиологические методы

Для культивирования метанобразующих сообществ микроорганизмов использовали жидкую бикарбонатную среду следующего состава (г/л): NaCl – 0,03; NH₄Cl – 0,033; KH₂PO₄ – 0,033; MgCl₂ · 6H₂O – 0,033; CaCl₂ · 2H₂O – 0,033; NaHCO₃ – 1; резазурин – 0,001; Na₂S · 9H₂O – 0,5; 10 мл раствора витаминов (Widdel, Pfennig, 1982); 10 мл раствора микроэлементов (Pfennig, Lippert, 1966); вода дистиллированная – 980 мл. В качестве субстратов использовали CH₃COONa – 2 г/л, метанол – до 1 % или газовую смесь H₂ + CO₂ (80:20). При приготовлении среды соли, за исключением бикарбоната и сульфида натрия, растворяли в воде, среду кипятили в течение 10 мин и остужали до 40 °С в токе 100 % азота. После этого вносили резазурин, NaHCO₃, микроэлементы и метанол (в случае приготовления среды для метилотрофных метаногенов). Водородный показатель (рН) полученной среды доводили до 5,8, после чего её разливали в продутые азотом стеклянные флаконы объёмом 116 мл (2014, 2015 гг.) или в пенициллиновые флаконы объёмом 15 мл (2012 г.), которые закупоривали резиновыми крышками. При приготовлении сред для автотрофных метаногенов атмосферу флаконов заменяли смесью H₂ + CO₂ (80:20), в случае сред с ацетатом - смесью H₂ + N₂ (80:20) или H₂ + N₂ (20:80) (только в 2015 г.). Среды стерилизовали автоклавированием (1 атм., 40 мин), после чего вносили сульфид натрия и витамины из стерильных анаэробных растворов. Конечный объём среды 20 мл (10 мл в случае пенициллиновых флаконов), рН -7.3.

При постановке накопительных культур 10 г осадка суспендировали в 80 мл базовой минеральной среды, после чего шприцом переносили по 10 мл суспензии (1 мл в случае пенициллиновых флаконов) во флаконы со средой с внесёнными субстратами и флакон с базовой анаэробной средой и атмосферой азота, служащий контролем. Все культуры, за исключением контрольных, были продублированы в трёх проворностях. Культивирование проводили в темноте при температуре 4 °С.

В общей сложности в работе проанализированы данные для 199 метанобразующих накопительных культур микроорганизмов.

Модельные эксперименты, направленные на изучение процессов преобразования органического вещества микробным сообществом в условиях температур, характерных для зоны генерации углеводородов, проводили в специальных автоклавах, разработанных и собранных в Институте неорганической химии СО РАН им. А. В. Николаева. Инкубирование образцов донных осадков в автоклавах проводили при температуре 80 °С и давлении 5 МПа.

В автоклаве № 1 к образцу донных отложений был добавлен детрит байкальской диатомовой водоросли *Synedra acus* из чистой культуры, полученной в отделе Ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН (Shishlyannikov et al., 2011). Чистота культуры водоросли от бактерий

подтверждена методами фазово-контрастной и эпифлуорисцентной микроскопии, высевом на чашки с различными средами (LB, FPA/10, DA), а также амплификацией препарата тотальной ДНК из культуры с праймерами на последовательности генов бактериальной 16S рРНК (Shishlyannikov et al., 2011). Клетки диатомовых были собраны на стерильный поликарбонатный фильтр (Millipore, США) и хранились при -80°C , до момента их использования в эксперименте. Газовая фаза в автоклаве № 1 состояла из смеси газов $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$ (50 % : 40 % : 10 %). В автоклав № 2 были помещены осадки без дополнительных субстратов, тогда как автоклав № 3 содержал простерилизованный образец донных отложений (1 атм., 135°C , 40 мин) и выступал в качестве отрицательного контроля для определения того, какие из фиксируемых процессов могут происходить под воздействием микроорганизмов. Газовая фаза в автоклавах № 2 и № 3 состояла из метана.

Схема эксперимента была следующей: гомогенизированный образец донных отложений, разделённый на три части по 200 г каждая, размораживали при комнатной температуре. Одну часть (№ 1) перемешивали с 5 г детрита *S. acus*, ещё одну (№ 3) стерилизовали автоклавированием. Далее, все три образца разделяли на две половины, одну из которых замораживали в жидком азоте и в дальнейшем использовали для анализа содержания и состава органического вещества до культивирования. Вторые половины (по 100 г) помещали в 170 мл стеклянные стаканы и увлажняли стерильной байкальской водой в объёме равном 1/4 от объёма осадка, чтобы предотвратить их высыхание в ходе культивирования. Стаканы накрывали тефлоновыми крышками и помещали в 400 мл стальные автоклавы. Все компоненты системы для культивирования были стилиризованы автоклавированием (1 атм., 135°C , 40 мин). Далее автоклавы продували газовой смесью $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$ или 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.

Культивирование продолжалось в течение 17 месяцев. После вскрытия автоклавов, 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.

Методы световой и эпифлуоресцентной микроскопии использовали для детекции жизнеспособных микроорганизмов в образцах донных отложений после термобарического эксперимента и накопительных культурах метаногенных микроорганизмов. Препараты для эпифлуоресцентной микроскопии готовили, нанося на предметное стекло суспензию осадка

или культуральную жидкость, которые затем высушивали, фиксировали путём обработки спиртовыми растворами с повышающейся концентрацией этанола (50 % → 70 % → 96 %, 3 мин в каждом) и окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ) или 3-N,3-N,6-N,6-N-тетраметилакридин-3,6-диамином (акридин оранжевый, АО) (Porte, 1980). Микроскопию выполняли на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (ZEISS, Германия).

2.2.2 Молекулярные методы

Фиксацию препаратов для флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) проводили согласно методике предложенной ранее (Glockner et al., 1999). Пробы культуральной жидкости (20 мкл) наносили на предметное стекло с тефлоновым покрытием в окошки диаметром 0,8 см, высушивали и обрабатывали холодным раствором 4 % параформальдегида (PFA; Sigma, США) в фосфатном буфере (PBS, pH 7,62) в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого фиксатор отфильтровывали, а препараты последовательно промывали буфером PBS и дистиллированной водой, которые удаляли сразу после промывки. Гибридизацию проводили с олигонуклеотидными зондами, мечеными флуоресцентным красителем CY3 (Синтол, Россия). Для оценки разнообразия и соотношения различных филогенетических групп микроорганизмов в накопительных культурах использовали зонды, специфичные к участкам ДНК *Bacteria* (Amann et al., 1990), *Archaea* (Stahl, Amann, 1991), *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota* (Burggraf et al., 1994), и зонд, не имеющий комплиментарности с участками гена 16S рРНК (Wallner et al., 1993), служивший отрицательным контролем (табл. 3).

Таблица 3

Олигонуклеотидные флуоресцентно-меченые зонды, использованные в работе

Название	Структура 5'-3'	Детектируемые группы микроорганизмов	Концентрация формамида, %*	Концентрация NaCl, ммоль**
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	0	0,9
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	<i>Archaea</i>	35	0,08
EURY498	CTTGCCCRGCCCTT	<i>Euryarchaeota</i>	0	0,9
CREN499	CCAGRCTTGCCCCCGCT	<i>Crenarchaeota</i>	0	0,9
NON	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Отрицательный контроль	0	0,225

*- в гибридизационном буфере

** - в отмывочном буфере

Фиксированные препараты обрабатывали гибридизационным буфером (20 мкл на окошко), содержащем 0,9 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 % додецилсульфат натрия (SDS) и формамид, в концентрациях соответствующих выбранному зонду. Препараты выдерживали 30 мин во влажной камере при температуре 46 °С, а затем добавляли 2 мкл флуоресцентно-меченого зонда (50 нг/мкл) и инкубировали еще 90 мин при этой же температуре. Далее препараты отмывали от несвязанного зонда, помещая в отмывочный буфер,

содержащий 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) 0,01 % SDS и NaCl в концентрациях соответствующих выбранному зонду. Отмывку проводили в течение 15 мин, при температуре 48 °С. После отмывки препараты окрашивали ДАФИ (4',6-диамино-2-фенилиндол), промывали стерильной водой, высушивали в темноте и микроскопировали на эпифлуорисцентном микроскопе Axio Imager M1 (ZEISS, Германия).

Выделение препаратов суммарной ДНК из биомассы образцов донных отложений и накопительных культур микроорганизмов проводили методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989) в модифицированном варианте (Шубенкова и др., 2005).

В ходе подготовки к экстракции ДНК из биомассы донных отложений 5 г осадка растирали в агатовой ступке 5-10 мин, добавляли поливинилпирролидон (PVPP) 0.3 г на 1 г осадка и ТЕ-буфер (100 мМ трис-HCl, pH 8,0; 10 мМ EDTA). К получившейся суспензии добавляли лизоцим (конечная концентрация 15 мг/мл) и инкубировали 1 ч при 37 °С, перемешивая каждые 10 мин. К лизату добавляли 10 %-ный SDS до конечной концентрации 1 % в растворе и инкубировали 15 мин при температуре 37 °С. Затем проводили 3 последовательных цикла замораживания в жидком азоте и оттаивания при 56 °С (10 мин), центрифугировали при 14 000 g в течение 15 мин и отбирали супернатант для последующей экстракции. Выделения ДНК из каждого образца донных отложений выполняли в четырёх независимых повторностях.

При выделении ДНК из накопительных культур клетки микроорганизмов осаждали из культуральной жидкости путём центрифугирования при 10000 g в течение 10 мин и дважды промывали ТЕ-буфером, каждый раз повторяя осаждение центрифугированием. После этого осадок суспендировали в ТЕ-буфере, добавляли лизоцим и далее действовали по методике аналогичной той, которую применяли для осадка, за исключением добавления PVPP.

Для экстракции ДНК из образцов супернатанта к нему добавляли равный объем фенола, плавно перемешивали, центрифугировали в течение 10 мин при 14 000 g для разделения фаз и отбирали верхнюю водную фазу. После этого проводили экстракцию отобранной водной фазы равным объемом смеси 1:1 фенола и хлороформа и центрифугировали при аналогичных параметрах. Следующий этап заключался в центрифугировании водной фазы с равным объемом хлороформа. Осаждение ДНК из раствора проводили двойным объемом 96 %-го этанола и 1/10 объема 3 М ацетата натрия. Осадок дважды промывали 70 %-ным спиртом, подсушивали и растворяли в 100 мкл стерильной воды.

Параллельно с выделением ДНК из каждого образца, проводили выделение ДНК из отрицательного контроля (стерильный ТЕ-буфер), для обнаружения возможной контаминации амплификабельной ДНК на различных этапах процедуры. Концентрацию и качество экстрагированной ДНК определяли на спектрофотометре SmartSpec Plus (BioRad, США).

Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с универсальными эубактериальными и архейным праймерами (табл. 4). В соответствии с полученными концентрациями ДНК, экстракты из биомассы донных отложений разводили в 5, 10, 50 или 100 раз для уменьшения эффекта ингибирования гуминовыми кислотами. Для подтверждения отсутствия амплифакельной матрицы ДНК в отрицательных контролях экстракции, а также в отдельных экстрактах ДНК из образцов экспериментальных осадков, дополнительно проводили «вложенную» ПЦР реакцию, используя две пары праймеров, когда вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

Таблица 4

Олигонуклеотидные ПЦР праймеры, использованные в работе

Название	Структура 5'-3'	Источник
Праймеры на участки гена 16S рРНК эубактерий		
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Suzuki, Giovannoni, 1996
500L	CGT GCC AGC AGC CGC GGT AA	Denisova et al., 1999
1000R	CCT GGT AAG GTT CTT CGC GTT GC	
1350R	GAC GGG CGG TGT GTA CAA G	
U341F	CCT ACG GGR SGC AGC AG	Muyzer et al., 1993
U785R	TTA CCG CGG CKG CTG VCA C	Lee et al., 1993
Праймеры на участки гена 16S рРНК архей		
Arch-20F	TCC CGG TTG ATC CYG CCR G	Massana et al., 1997
Arch-958R	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	DeLong, 1992
A2Fa	TTC CGG TTG ATC CYG CCR GA	Reysenbach, Pace, 1995
A519R	GGT DTT ACC GCG GCK GCT G	Sørensen, Teske, 2006
Плазмидные праймеры		
Promega 1F	GTT TTC CCA GTC ACG AC	Promega, США
Promega 1R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	

ПЦР выполняли на амплификаторе MyCycler (BioRad, США) в 20 мкл стандартной смеси реактивов «АмплиСенс PCR» (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия), содержащей 10 мкл Redmix, 0.4 мкл dNTP, по 0.4 мкл соответствующих праймеров, 6,8 мкл H₂O и 0,2 мкл ДНК матрицы. Все манипуляции проводили в стерильном ПЦР боксе, обработанном бактерицидным ультрафиолетом. В работе использовали сертифицированные для ПЦР пробирки и стерильные наконечники для автоматических пипеток. Для контроля контаминации экзогенной амплифакельной ДНК каждая ПЦР-реакция сопровождалась отрицательным контролем (реакционной смесью, не содержащей ДНК матрицы).

Амплификацию участков ДНК с парами праймеров U341F/U785R и A2Fa/A519R (440-500 п.н.) проводили в режиме 96 °С– 2 мин (1 цикл), 96 °С – 30 сек., 58 °С – 45 сек., 72 °С – 40 сек. (30 циклов); 72 °С – 10 мин. В случае с праймерами Arch20F/Arch958R (около 900 п. н.) использовали следующую программу: 94 °С– 3 мин (1 цикл), 96 °С – 20 сек, 50 °С – 45 сек, 72 °С – 2 мин (30 циклов); 72 °С – 9 мин. В остальных случаях (500-1300 п.н.) использовали

режим постепенного повышения отжига праймеров: 94 °С– 4 мин (1 цикл), 94 °С – 1 мин, 48 °С – 1 мин, 72 °С – 1,3 мин (5 циклов); 92 °С – 1 мин, 50 °С – 1 мин, 72 °С – 1,3 мин (10 циклов); 92 °С – 1 мин, 52 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин (10 циклов); 92 °С – 1 мин, 54 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин 30 сек. (10 циклов); 72 °С – 10 мин.

Анализ чистоты и размера продуктов амплификации проводили путём электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле, окрашенном этидиумбромидом, с использованием маркера молекулярных масс GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas, Германия). Визуализацию продуктов проводили в ультрафиолетовом свете. Очистку ПЦР-продуктов выполняли методом вырезания фрагментов ожидаемой длины и элюцией нуклеотидного материала из геля.

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 °С 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-меркаптоэтанола, 5 мкл лигазной смеси и инкубировали во льду 30 мин. Затем проводили «тепловой шок» при 42 °С 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 °С. 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 °С. 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 °С, 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/1R (табл. 4) комплементарные концам плазмидного полилинкера, по 0,2 мкл каждого, 5 мкл Redmix, 0,2 мкл dNTP и 3,4 мкл H₂O. Условия амплификации: 94 °С – 5 мин; 94 °С – 1 мин, 57 °С – 1 мин 10 сек., 72 °С – 1 мин 30 сек. (30 циклов); 72 °С – 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 Сенгера**. 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 (табл. 4). Высушенные пробы передавали в центре коллективного пользования «Геномика», г. Новосибирск, где секвенирование полученных ампликонов по Сенгеру осуществлялось на капиллярном секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, США).

Филогенетический анализ проводили путем поиска гомологичных последовательностей в базе данных NCBI с помощью программы BLASTN со стандартными параметрами (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Первичную обработку, редактирование и объединение полученных нуклеотидных последовательностей проводили в программе BioEdit версии 7.1.9. (Hall, 1999). Наличие химерных последовательностей проверяли с помощью программы Pintail версии 1.1. Построение филогенетических деревьев выполняли в пакете программ MEGA 5.2, применяя кластерный метод присоединения соседей (neighbor-joining) и алгоритм Кимуры с двумя параметрами (Tamura et al., 2011). Статистическую достоверность ветвления филогенетических деревьев оценивали с помощью «bootstrap» анализа 100 альтернативных реплик.

Полученные с помощью молекулярного клонирования последовательности фрагментов гена 16S рРНК архей из накопительных культур депонированы в базе данных NCBI под номерами KJ736828-KJ736834, KJ922111-KJ922126, KY033152-KY033174.

При подготовке препаратов суммарной ДНК из биомассы донных отложений для пиросеквенирования на платформе 454 Roche применяли те же методы, что для секвенирования по Сенгеру. Для анализа использовали библиотеки ампликонов, полученные методом ПЦР-амплификации с праймерами U341F/U785R (табл. 4) на фрагмент гена 16S рРНК бактерий, включающий переменные участки V3-V4, и праймерами A2Fa/A519R (табл. 4) на фрагмент гена 16S рРНК архей, включающий переменные участки V1-V3.

Пиросеквенирование ампликонов проводили на платформе GS FLX 454 Roche (454 Life science, США) с использованием реагентов серии Titanium по протоколу «GS FLX Titanium Sequencing Method Manual» в соответствии с рекомендациями производителя.

Обработку данных пиросеквенирования проводили с помощью пакета программного обеспечения Mothur, версии v.1.31.2. (Schloss et al., 2009), находящегося в открытом доступе (<http://www.mothur.org>). Для минимизации последствий случайных ошибок секвенирования, использовали алгоритм Pyronoise (Quince et al., 2011), отбирая последовательности

протяженностью более 150 п.н. с длиной гомополимерных трактов менее 6 п.н. Последовательности очищали от бар-кодов и праймеров, подвергали стандартной для экологических данных фильтрации и выбирали теги, которые не содержали неоднозначных нуклеотидов. Отфильтрованные последовательности проверяли на наличие химер с помощью программы UCHIME (Edgar et al., 2011) со стандартными параметрами.

Для проведения таксономического и популяционного анализа сообществ полученные последовательности кластеризовали в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) при генетическом расстоянии от 0,1 до 1,0, что соответствует разным таксономическим уровням. Для последовательностей, объединённых в ОТЕ с генетической дистанцией 0,03 (97 % сходства), проводили таксономическую классификацию путём сравнения с последовательностями 16S рРНК бактерий и архей из референсной базы данных SILVA (http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files) при 80 % доверительном пороге. Кластерный анализ матриц расстояний проводился с использованием метода Thetayc (Schloss et al., 2009) и метода взвешенного юнифрака (weighted UniFrac), использующего филогенетическую информацию последовательностей (Lozupone, 2005). С использованием пакетов программы Mothur для каждого образца были получены кривые разрежения (Rarefaction) на основе выявленных ОТЕ для оценки таксономической сложности, индексы разнообразия (Шеннона), оценки богатства видов (Chao1 и ACE), покрытие (Chao1). В анализе были использованы диаграммы Венна чтобы подчеркнуть сходство и уникальность ОТЕ в каждом анализируемом образце.

Таксономическую идентификацию представляющих кластер репрезентативных последовательностей проводили в результате их сравнения с базой данных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в NCBI по протоколу BLASTN. При обнаружении последовательности 16S рРНК валидированного микроорганизма, гомологичной анализируемой более чем на 97 %, кластер относили к соответствующему роду. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма CLUSTAL W. Филогенетические деревья были построены с использованием метода объединения ближайших соседей (NJ) с Kimura two-parameters алгоритмом в программе MEGA версия 5.2 (Tamura et al, 2011). Данные секвенирования библиотек ампликонов из природных осадков (*Bacteria* и *Archaea*) были депонированы в архив GenBank, секцию (SRA) под следующими номерами доступа для каждого образца: SRR2912888, SRR2912890. Данные секвенирования для сообществ образцов экспериментальных осадков после термобарического культивирования депонированы под номером SRR2146995.

2.2.3 Физико-химические методы

Измерение концентраций углеводородных газов в донных отложениях и атмосфере флаконов с накопительными культурами проводили методом фазово-равновесной дегазации (Head-Space Technique) (Большаков и Егоров, 1987). Анализ выполняли на газовом хроматографе ЭХО-ПИД (КТИ ГЭП СО РАН, Россия) (пламенно-ионизационный детектор, 2-х метровая насадочная колонка с внутренним диаметром 2 мм; сорбент – Porapak, режим изотермический, $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Объем газа для анализа составлял 0,03–0,05 мл (объем иглы хроматографического шприца). Относительная погрешность измерений 2 %.

Расчёт 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/дм³; S_1 – площадь пика определяемого газа в пробе; C_{st} – концентрация определяемого газа в стандартной пробе, %; V_1 – объём газовой фазы во флаконе, дм³; ρ^* – плотность определяемого газа при 0 °С и атмосферном давлении 720 мм.рт.ст., г/дм³; S_{st} – площадь пика определяемого газа в стандартной пробе; M – молярная масса определяемого газа, г/ммоль; V_2 – объём жидкой среды во флаконе, дм³.

Изотопный состав углерода и водорода углеводородных газов определяли с помощью масс-спектрометра стабильных изотопов Thermo Finnigan DELTA plus XP (США) с капиллярной колонкой Supelco Carboxen-1006 PLOT (30 м × 0,32 мм внутренний диаметр; США). Объём газа для исследования составлял 2 мл. В случае накопительных культур газ отбирали из флакона шприцом, одновременно замещая равным объёмом жидкой анаэробной среды соответствующего состава.

Состав стабильных изотопов приведён в значениях δ (‰), определяемых как:

$$\delta_{\text{образца}} = \left(\frac{R_{\text{образца}} - R_{\text{стандарта}}}{R_{\text{стандарта}}} \right) \times 1,000, \quad (2)$$

где R – соотношение изотопов ¹³C/¹²C или D/H. Значения $\delta^{13}\text{C}$ и δD даны по отношению к V-PDB и V-SMOW стандартам соответственно. Используемыми стандартами были NIST RM8544 (NBS19) for $\delta^{13}\text{C}$ и NIST RM8561 (NGS3) для δD . Аналитическая погрешность измерений для $\delta^{13}\text{C}$ – 0,1 ‰, для δD – 0,6 ‰.

Общее содержание органического углерода ($C_{\text{орг.}}$) и состав растворимой (битумоидной) фракции органического вещества были исследованы в экспериментальных образцах донных отложений до (с учётом внесённых субстратов) и после их культивирования при 80 °С и 5 МПа.

При подготовке к исследованию $C_{\text{орг.}}$ образцы осадка высушивали, измельчали до состояния порошка с частицами, не превышающими в диаметре 0,25 мм, и обрабатывали 10 %

раствором соляной кислоты. Концентрацию $C_{\text{орг}}$ устанавливали с помощью экспресс анализатора углерода АН-7529 (ГЗИП, Беларусь) методом сжигания полученных проб в токе кислорода при температуре 1000–1100 °С.

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 путём осаждения асфальтенов избытком петролейного эфира и разделяли на хроматографических колонках на метаново-нафтеновые и нафтеново-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.

Пробы осадка для анализа химического состава поровых вод отбирались из кернов с шагом 5–30 см. Поровые воды отжимались путём последовательного центрифугирования образцов при 10000 g, а затем при 14000 g и хранились при 4 °С до момента анализа.

Измерения концентрации анионов в поровых водах проводили методом жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром А-02 (ЭКОНОВА, Россия). В качестве носителя использовали гидрофталат калия. Относительная погрешность измерений 5–7 % (до 10 % для хлоридов; Барам и др. 1999). Содержания катионов определяли методами атомной абсорбции (Ca^{2+} , Mg^{2+}) и атомной эмиссии (Na^{+} , K^{+}) с использованием атомно-абсорбционного спектрометра ААС-30 (ZEISS, Германия) (Фомин, 2000). Относительная погрешность измерений 3–5 %. Отклонение в ионном балансе не превышали 5–7 %.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Таксономическая структура микробного сообщества донных отложений в зоне разгрузки термогенных газов поднятия Посольская Банка

Для оценки биоразнообразия микроорганизмов в донных отложениях, ассоциированных с разгрузкой газов, использовали образцы осадка из керна, отобранного в 2012 г. (табл. 2), литологическая структура и высокая газонасыщенность которых свидетельствует о непосредственном прохождении через них потока газа в отличие от осадков других исследованных кернов.

Исследуемые донные отложения с поверхности до глубины 30 см были представлены восстановленным темно-серым увлажненным алевропелитовым диатомовым илом, в котором отмечены черные прослойки и пятна аморфных сульфидов железа (гидротролеита). Ил подстилался серой алевритовой глиной «творожистой» структуры с многочисленными трещинами дегазации, влажность которой с глубиной уменьшалась, а «творожистость» увеличивалась. В слоях 80–150 см присутствовали газовые гидраты (ГГ), расположенные как отдельными слойками и слоями в алевропелите, так и массивами, занимающими целые интервалы, практически без породы (97 % объемного гидратосодержания). Весь массив газовых гидратов имел косую направленность.

Осадки керна обладали высокой газонасыщенностью, на глубине 50 см содержание метана достигало 112 мл/л осадка. Гомологи метана в газе были представлены, в основном, этаном. Так, на глубине 60 см доля этана достигала 2,2 %, пропан и бутан присутствовали в следовых количествах. Значение $\delta^{13}\text{C}-\text{C}_1$ составляло -44,0 ‰, значение $\delta^{13}\text{C}-\text{C}_2 = -27,4$ ‰, что свидетельствует о термогенном генезисе газа.

Сумма ионов в поровых водах исследуемого керна была незначительно повышена (123,06–142,83 мг/л) в сравнении с уровнем минерализации поровых вод донных отложений фоновых районов, наследующих химический состав вод озера (Falkner et al., 1991; Погодаева и др., 2007). В целом в керне отмечены высокие концентрации ацетат-иона (до 22,3 мг/л), ионов аммония (до 3,7 мг/л) и железа (до 8,5 мг/л). Максимальные концентрации для большинства ионов отмечены в зоне залегания газовых гидратов, что может объясняться вытеснением солей из воды при формировании гидрата (табл. 2). Сходные аномалии отмечались в осадках других районов приповерхностного залегания газовых гидратов (Zemskaya et al., 2015).

Для анализа структуры сообщества было выделено 5 образцов тотальной ДНК из слоёв 0–2, 10, 70, 100 и 140 см. По результатам обработки данных секвенирования ампликонов участков гена 16S рРНК получено 16320 бактериальных и 11006 архейных последовательностей средней длиной 275 – 300 п.н. (табл. 5).

Полученные кривые разряжения (rarefaction) (рис. 8) свидетельствуют о том, что на уровне рода (генетическая дистанция 0,03) достигнутый объем секвенирования удовлетворителен для полной характеристики разнообразия сообществ глубинных осадков (100 см и 140 см) и недостаточен для выявления всего разнообразия микроорганизмов в поверхностных слоях донных отложений. В последнем случае при увеличении числа анализируемых последовательностей кривые «rarefaction» не выходят на плато.

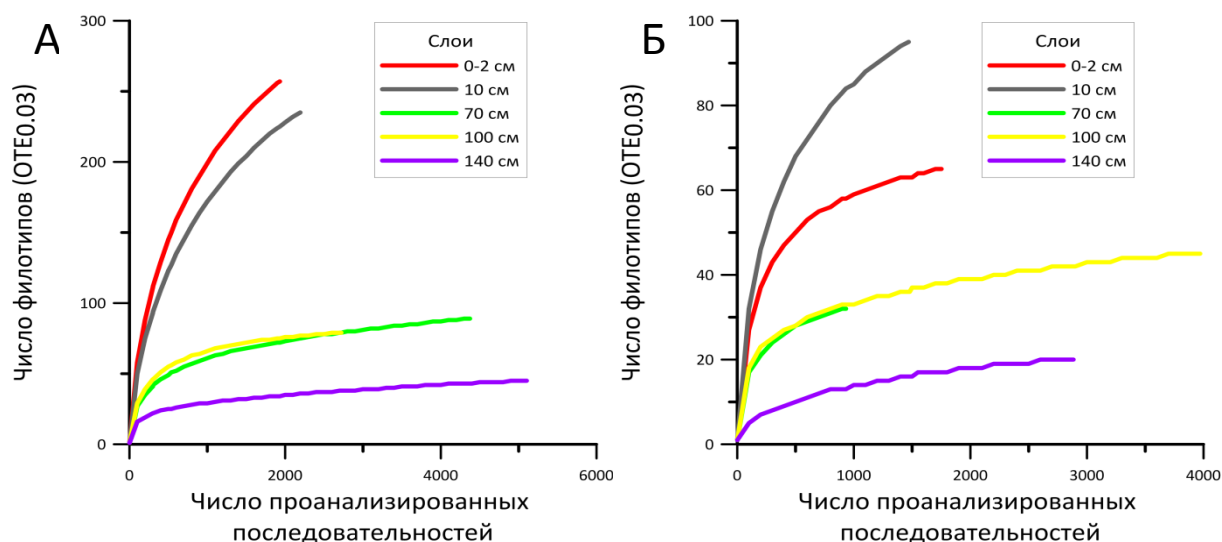


Рис. 8. Разнообразие микробного сообщества различных слоёв исследуемых донных отложений. Показана зависимость числа филотипов на уровне рода (генетическая дистанция 0.03) от количества полученных последовательностей региона гена 16S рРНК бактерий (А) и архей (Б).

Индексы богатства (Chao1) и разнообразия (Shannon) бактериальной компоненты максимальны для поверхностного слоя осадка и уменьшаются с глубиной. Для архей максимум разнообразия по индексам отмечен на глубине 10 см (табл. 5).

Таблица 5

Качество покрытия и индексы видового богатства и разнообразия при генетической дистанции 0,03 для микробных сообществ из различных слоёв исследуемого осадка

Слой керна, см	Количество чтений	Качество покрытия, %	Кол-во ОТЕ	Обратный индекс Симпсона	Индекс Шенона	ACE	Chao1
Бактерии							
0–2	1931	95,5	257	54,3	4,6	347,2	330,4
10	2194	96,4	235	39,6	4,3	318,9	289,6
70	4373	99,5	89	12,4	3,1	124,8	112,1
100	2720	99,6	79	16,4	3,2	84,6	86,9
140	5102	99,8	45	8,1	2,4	74,7	53,3
Археи							
0–2	1751	99,4	65	10,5	2,9	71,5	72,9
10	1470	98,4	95	12,2	3,2	116,6	112,3
70	932	99,4	32	7,7	2,4	36,4	34,1
100	3970	99,8	45	6,6	2,4	54,8	51,0
140	2883	99,8	20	1,3	0,6	24,8	21,7

В результате анализа библиотек ампликонов, полученных для всех исследуемых слоев осадка, выявлены последовательности генов 16S рРНК представителей девяти общих бактериальных типов: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Aminicenantes* (OP8) и *Atribacteria* (OP9), *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* (α , β и δ) (рис. 9).

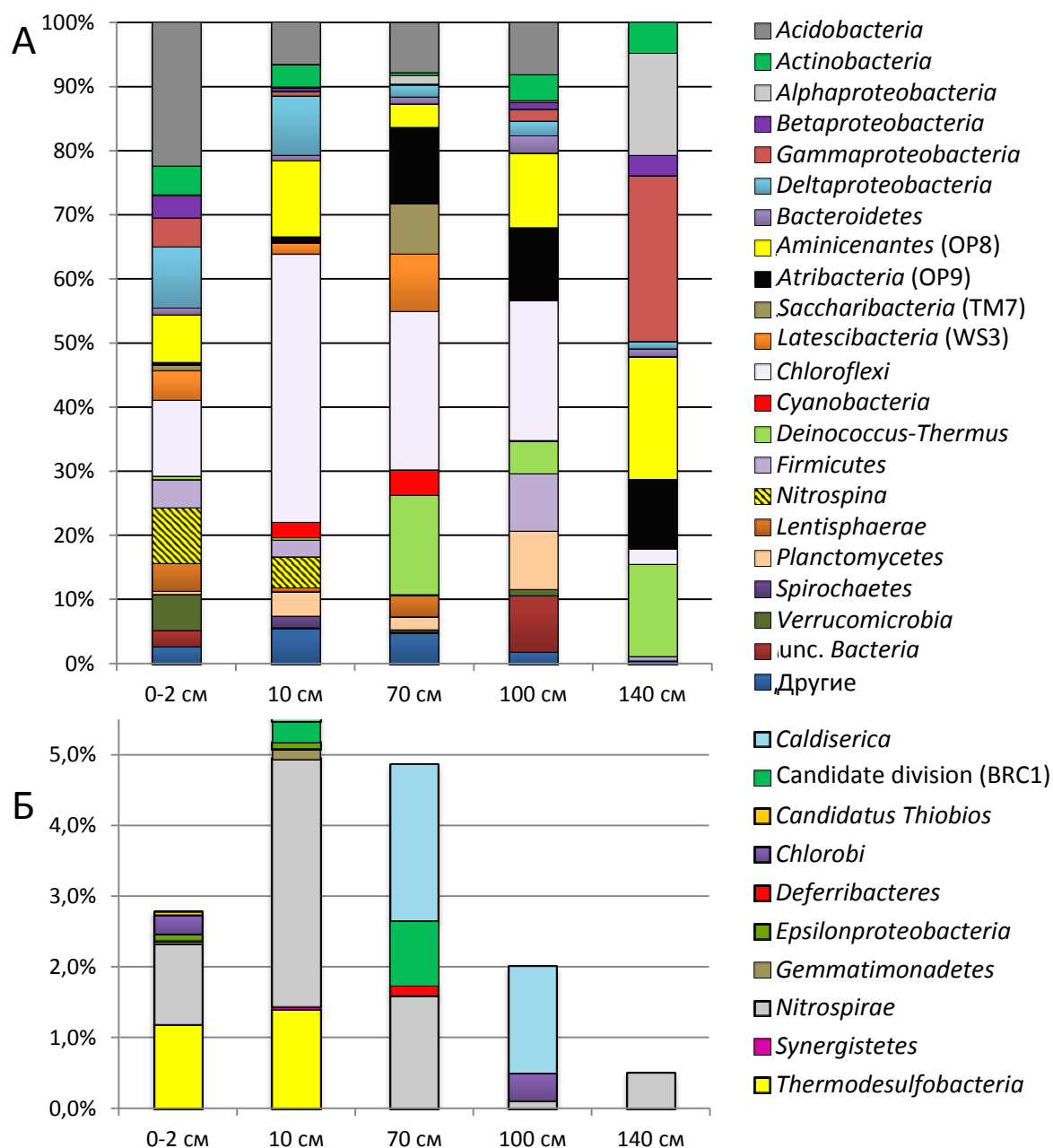


Рис. 9. Состав бактериального сообщества донных осадков в разных слоях керна из района холодного метанового сипа «Посольская Банка» по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК: А – доминирующие филумы (доля последовательностей >94,5 %); Б – минорные таксоны (доля последовательностей <5,5 %).

В сообществе поверхностного слоя наиболее широко представлены последовательности микроорганизмов типов *Acidobacteria* (22%), *Proteobacteria* (17,6%), *Chloroflexi* (12%). В значительном количестве выявлены последовательности микроорганизмов отнесённых к типам *Verrucomicrobia* (5,6%), *Nitrospirae* (4,9%), *Actinobacteria* (4,6%), *Lentisphaerae* (4,2%),

Firmicutes (4,2 %) и филумам-кандидатам *Aminicenantes* (OP8) (7,4 %) и *Latescibacteria* (WS3) (4,6 %). В минорных количествах (менее 2 %) представлены типы *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Deinococcus-Thermus*, *Planctomycetes*, *Chlorobi*, филумы-кандидаты *Atribacteria* и *Saccharibacteria* (TM7).

Последовательности *Acidobacteria* (22 %), принадлежали микроорганизмам классов *Acidobacteria* и *Holophagae*. В библиотеках нижерасположенных донных отложений доля этого типа не превышала 8 %. В большинстве исследованных слоёв класс *Acidobacteria* (53%–65 % от всей филы) преобладает над классом *Holophagae* (17,5–47 % от всей филы), и только в слое 100 см наблюдается обратная ситуация (*Acidobacteria* – 34 %, *Holophagae* – 66 %). Представительство *Acidobacteria* в осадках пресноводных озер Германии и Испании, а также осадков других приразломных районов Байкала не превышает 4–6 % от общего количества выявляемых последовательностей (Roske et al., 2012; Zimmermann et al., 2012; Zemskaia et al., 2015). Известно, что ацидобактерии являются одной из доминирующих групп в почвах, где участвуют в деструкции остатков высших организмов (Kielak et al., 2016), что может объяснять их многочисленность именно в поверхностном слое осадка.

Среди протеобактерий в библиотеке поверхностного слоя преобладают последовательности δ -*Proteobacteria* (9,5 % от всех чтений). Данный класс представлен родами *Syntrophus* (деградируют летучие карбоновые кислоты в синтрофной ассоциации с водород-окисляющими микроорганизмами), *Desulfobacca* (восстанавливают сульфат при окислении ацетата) и *Geothermobacter* (восстанавливают железо(III) при окислении органического вещества), а также родом сульфатредуцирующих бактерий *Desulfonauticus*. Следует отметить, что ранее из этого слоя осадка была выделена в чистую культуру сульфатредуцирующая бактерия, отнесенная к порядку *Desulfobacterales* (Пименов и др., 2014). Присутствие строгих анаэробов рода *Syntropus* в сообществе восстановленного поверхностного слоя, свидетельствует об активном протекании всех этапов анаэробной деструкции органического вещества уже в первых сантиметрах осадка. Ранее в оз. Байкал бактерии рода *Syntropus* в значительном количестве обнаруживались лишь при анализе микробного сообщества битумных построек, формирующихся на границе «донные осадки – вода» из нефти, поступающей из глубинных слоев осадочной толщи озера (Kadnikov et al., 2013).

Вторым по численности классом среди протеобактерий в данном образце были γ -*Proteobacteria* (4,6 %). Как и в сообществах из других зон разгрузки углеводородов на Байкале (Kadnikov et al., 2012; Zemskaia et al., 2015), внутри данного класса преобладали последовательности представителей порядков *Methylococcales* (3,8 %) и *Xanthomonadales* (0,7 %) (род *Methylobacter*), окисляющие метан и другие C₁-соединения. Только в сообществе данного образца были выявлены представители порядков *Alteromonadales* (0,05 %) и

Thiotrichales (0,05 %), участвующие в циклах азота и серы, а также представители рода *Steroidobacter* (*Xanthomonadales*), способные восстанавливать NO_3^- до N_2O и далее до N_2 без промежуточного аккумуляирования NO_2^- (Fahrbach et al., 2008).

Доля последовательностей β -*Proteobacteria* в библиотеке поверхностного слоя осадка составляла 3,5 %. Большинство из них принадлежало микроорганизмам родов *Azonexus* (дiazотрофы), *Denitratisoma* и *Methylophilus* (денитрификаторы). Последний окисляет метанол и использует в качестве источника азота соли нитрата и аммония. Здесь отмечены также аммоний-окисляющие литотрофные бактерии порядка *Nitrosomonadaceae*. Разнообразие β - и γ -*Proteobacteria* было выше по сравнению с отмечаемым в глубинных слоях исследуемого керна. Наименее представлены в сообществе поверхностного слоя α -*Proteobacteria*, относящиеся к порядкам *Rhodospirillales*.

Среди *Chloroflexi* (12 %) выявлены последовательности микроорганизмов классов *Anaerolineae*, *Caldilineae* (включая термофильных микроорганизмов рода *Caldilinea*), *Thermomicrobia*, а также ряда неклассифицированных групп (KD4-86, S085, SHA-26, TK-10). Молекулярных маркеров представителей класса *Dehalococcoida*, последовательности которых были многочисленны в библиотеках сообщества донных отложений метанового сипа «Санкт-Петербург» (Kadnikov et al., 2012), не было обнаружено ни в одном из исследуемых слоёв керна. Культивируемые *Chloroflexi* выявленных классов представлены анаэробными или факультативно анаэробными термофильными микроорганизмами с гетеротрофным метаболизмом, способными как гидролизовать биополимеры, так и разлагать летучие карбоновые кислоты (Hug et al., 2013).

Широко представлены в библиотеке поверхностного слоя последовательности бактерий филума *Verrucomicrobia* (5,6 %), некультивируемые представители которого зачастую ассоциированы с эукариотами (Cardman et al., 2014). В сообществе этого слоя отмечено присутствие бактерий трех классов: OPB35, *Spartobacteria* (род *Chthonibacter*) и *Verrucomicrobia* (род *Prostheco bacter*).

Также в сообществе поверхностного слоя осадка присутствовали молекулярные маркеры аэробных хемолитоавтотрофов семейства *Nitrospinaceae* (4,9 % от общего количества последовательностей), способные использовать в качестве источника углерода диоксид углерода, окисляя нитрит до нитратов (Ward et al., 1998). На основании результатов анализа генома и маркерных белков у штамма *Nitrospina gracilis*, эту группу бактерий выделили в отдельный тип *Nitrospinae* (Lucker et al., 2013).

Ранее при молекулярно-биологическом анализе осадков из других районов озера Байкал (Zemskaya et al., 2015), было отмечено значительное содержание последовательностей генов 16S рРНК бактерий филума *Actinobacteria*, тогда как в библиотеках из всех слоев исследуемого

керна их доля не превышала 4,6 %. Актинобактерии участвуют в цикле углерода, обеспечивая разложение сложных полимерных субстратов (хитин, лигнин, гумусоподобные вещества), и встречаются в озерах разного трофического уровня (Ghai et al., 2014).

В минорных количествах в поверхностном слое отмечены последовательности генов 16S рРНК *Chlorobi* (0,3 %), *Gemmatimonadetes* (0,1 %), *Thermodesulfobacteria* (1,2–1,4 %) и порядка *Campylobacterales* класса ϵ -*Proteobacteria* (0,1 %). Ближайший культивируемый представитель филума *Gemmatimonadetes* способен к аккумуляции полифосфатов и не способен восстанавливать нитрат (Zhang et al., 2003). Таксон *Thermodesulfobacteria* включает термофильных хемолитоавтотрофных сульфатвосстанавливающих бактерий.

Состав библиотек сообщества подповерхностного слоя (10 см) отличался от такового в выше- и нижерасположенных осадках, здесь численно доминировали последовательности генов 16S рРНК представителей филумов *Chloroflexi* (42 %), *Aminicenantes* (11,9 %) и δ -*Proteobacteria* (9,2 %), в минорных количествах обнаружены последовательности генов 16S рРНК филума *Verrucomicrobia*. В значительном количестве выявлены последовательности *Acidobacteria* (6,3 %), *Nitrospina* (4,8 %), *Actinobacteria* (3,5 %), *Nitrospirae* (3,5 %), *Firmicutes* (2,6 %), а также *Cyanobacteria* (2,4 %). Следует отметить, что цианобактерии были представлены в меньшей степени по сравнению с сообществами из других районов Байкала, тогда как представительство бактерий филумов *Chloroflexi* и *Nitrospirae* было более высоким (Zemskaya et al., 2015). В библиотеке подповерхностного слоя донных отложений в минорных количествах присутствовали последовательности представителей филумов *Bacteroidetes*, *Lentisphaerae*, *Caldiserica*, сульфатредуцирующих бактерии родов *Desulfobacca* (1 %) и *Desulfonauticus* (0,1 %) класса δ -*Proteobacteria*. Здесь же были обнаружены способные к хемоавтотрофному и гетеротрофному росту серные бактерии рода *Alcalilimnicola* (порядок *Chromatiales*), использующие нитрат и кислород в качестве акцепторов электронов. В этом сообществе доля β -*Proteobacteria* (0,5 %), принадлежащих в основном к семейству *Gallionellaceae*, была невелика, вероятно, вследствие дефицита ионов железа (Fe^{2+}) и оксида углерода.

В библиотеке генов 16S рРНК бактериального сообщества на глубине 70 см (над прослоем ГГ) численно доминировали последовательности представителей *Chloroflexi* (24,8 %), *Acidobacteria* (7,7 %) и *Deinococcus-Thermus* (15 %). Представительство последних было более высоким по сравнению с таковым, отмечаемым в библиотеках сообществ поверхностного и подповерхностных слоев осадка. Среди последовательностей филума *Deinococcus-Thermus* были наиболее представлены гены 16S рРНК бактерий рода *Deinococcus*, аэробные и хемоорганогетеротрофные представители которого встречаются повсеместно. В библиотеке также отмечено значительное присутствие последовательностей генов 16S рРНК филумов-кандидатов *Atribacteria*, *Saccharibacteria*, *Latescibacteria* (суммарно 33 %) и небольшая доля

представителей филумов *Proteobacteria* (3,3 %), *Caldiserica* (2,2 %) и *Actinobacteria* (до 0,4 %). *Atribacteria* объединяют микроорганизмов, ранее относимых к филумам OP9 и JS1, реконструкция геномов которых предполагает, что они являются анаэробами с ферментативным типом метаболизма, специализирующимися на деградации белков и полисахаридов (Nobu et al., 2016). *Saccharibacteria* – филогенетически разнородная группа, объединяющая микроорганизмы способные деградировать различные органические субстраты (преимущественно сахара), как в аэробных, так и в анаэробных условиях (Kindaichi et al., 2016). Для бактерий филума-кандидата *Latescibacteria* предложена модель метаболизма, предполагающая их участие в деградации полисахаридов и гликопротеинов, входящих в состав клеточной стенки и внутриклеточных компонентов зеленых и бурых водорослей (Youssef et al., 2015). Следует отметить незначительное представительство филума *Cyanobacteria* (4 %), для последовательностей которого ближайшие гомологи выделены из бескислородных осадков мелководного озера Испании, бактериального мата со стенки глубочайшей в мире термальной карстовой воронки, газогидратных осадков вблизи Тайваня. Представители филума *Deferribacteres* (0,14 %) выявлялись только в сообществе этого слоя, тогда как бактерии филума *Caldiserica* (0,2–2,5 %) присутствовали во всех сообществах, прилегающих к ГГ прослоям. Значительная доля последнего филума в сообществах из ГГ прослоев отмечалась ранее в керне из района метанового сипа «Санкт-Петербург» (Kadnikov et al., 2012).

В библиотеке сообщества микроорганизмов, обитающего на глубине 100 см, выявлены последовательности бактерий филумов-кандидатов (23 %), *Chloroflexi* (21,8 %), *Acidobacteria* (7,9 %), *Planctomycetes* (9 %), *Firmicutes* (8,9 %) и неклассифицированных бактерий (8,7 %). Количество последовательностей генов 16S рРНК протеобактерий уменьшилось до 5,5 %, изменилась и их таксономическая принадлежность. Среди δ -*Proteobacteria* обнаружены представители рода *Desulfovirga*, восстанавливающие сульфат, сульфит, тиосульфит и серу до сероводорода. В библиотеке отмечалось увеличение последовательностей генов 16S рРНК бактерий филума *Bacteroidetes* до 2,8 % и планктомицетов рода *Schlesneria* до 9 %.

В составе библиотеки из слоя 140 см (ниже ГГ прослоя) были наиболее многочисленны последовательности генов 16S рРНК филумов *Proteobacteria* (46 %), *Deinococcus-Thermus* (14,5 %) и *Actinobacteria* (4,6 %), филумов-кандидатов *Aminicenantes* (19 %) и *Atribacteria* (10,9 %). Представительство филума *Chloroflexi* при этом уменьшилось до 2,3 %. Присутствие последовательностей бактерий филумов-кандидатов *Aminicenantes* и *Atribacteria* отмечено в библиотеках генов 16S рРНК микроорганизмов из Йеллоустонского национального парка (Hugenholtz et al., 1998), глубоководных осадков из районов холодных сипов Японского моря (Li et al., 1999), пелагической глины Охотского моря (Inagaki et al., 2003) и других экотопов. Представители этих групп участвуют в окислении водорода и восстановлении серы (Hugenholtz

et al., 1998), а также характеризуются наличием большого количества генов, кодирующих аминолитические ферменты (Rinke et al., 2013). Геномные исследования этих групп показали, что они являются анаэробными гетеротрофами, обладают сахаролитической ферментативной активностью с конечным образованием ацетата, этанола и CO₂, которые служат субстратом для метаногенов (Carr et al., 2015).

Среди *Proteobacteria*, в сообществе этого образца доминировали представители γ - и α -*Proteobacteria* (26 и 16 % соответственно). Первые в основном были представлены бактериями родов *Acinetobacter*, *Azomonas* и *Pseudomonas* порядка *Pseudomonadales* (25,5 %). Бактерии рода *Acinetobacter* являются хемоорганотрофами с окислительным метаболизмом, представители рода *Azomonas* фиксируют азот в аэробных условиях. Последовательности α -*Proteobacteria* принадлежали порядку *Caulobacterales*. В сообществе этого слоя весьма немногочисленны δ -*Proteobacteria* порядка *Desulfuromonadales* (1,2 %), представители которого способны к анаэробному дыханию с использованием серы, нитрата, марганца(IV) и железа(III) в качестве акцепторов электронов.

В библиотеке генов 16S рРНК архей сообщества исследуемого керна выявлены последовательности четырех филумов: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Bathyarchaeota* (ранее Miscellaneous Crenarchaeotic Group) (рис. 10).

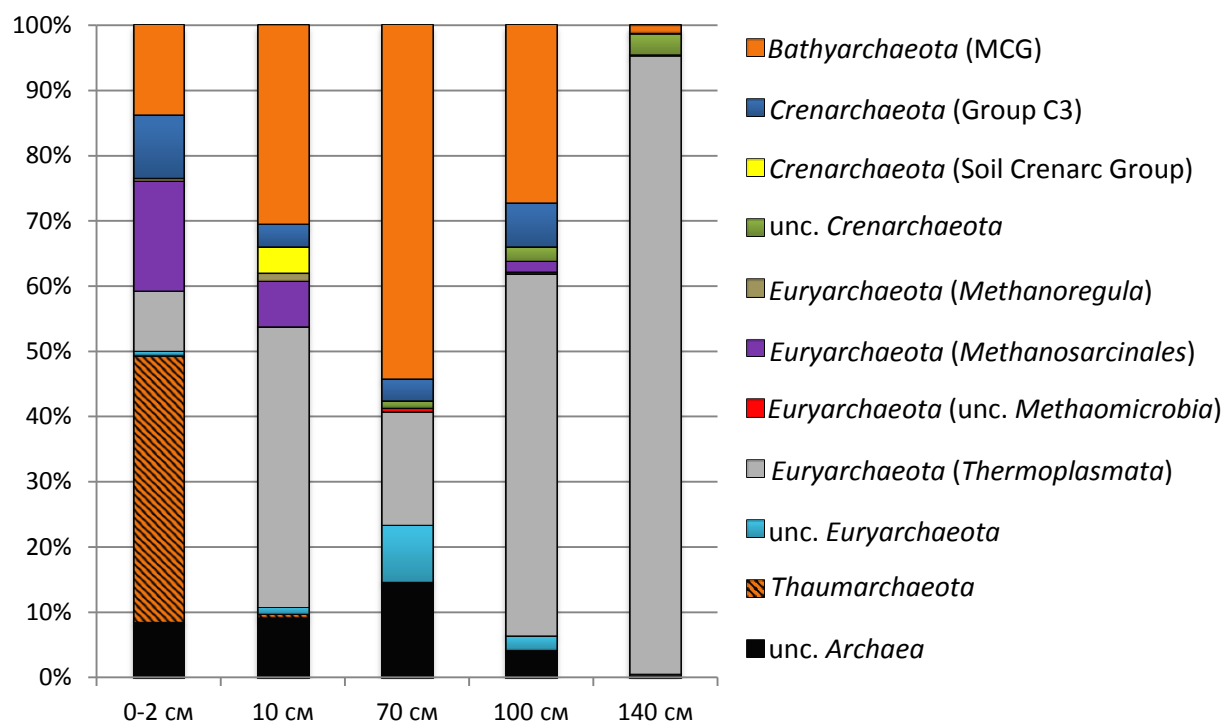


Рис. 10. Состав архейного сообщества донных осадков в разных слоях керна из района холодного метанового сипа «Посольская Банка» по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.

В библиотеке сообщества поверхностного слоя численно преобладали последовательности филумов *Thaumarchaeota* (40 %) и *Euryarchaeota* (27 %). Последние

составляли 95 % в библиотеке сообщества, обитающего на глубине 140 см, тогда как филум *Thaumarchaeota* был представлен единичными последовательностями. Все культивируемые представители филума *Thaumarchaeota* являются хемолитотрофами, способными окислять аммоний, они доминируют в водах олиготрофных озер и встречаются в местах с низким содержанием аммония и углекислого газа (French et al., 2012).

Последовательности эвриархеот принадлежали археям классов *Methanomicrobia* (17 %) и *Thermoplasmata* (10 %). Порядок *Thermoplasmatales* включает ацидофильные микроорганизмы, окисляющие в анаэробных условиях органические вещества с использованием серы в качестве акцептора электронов. Ближайшие гомологи выделены из бескислородных осадков различных озер, подземных геотерм в Японии и пустыни Калахари, при изучении процесса анаэробного окисления метана. Последовательности *Methanomicrobia* (17 %), в основном принадлежали неклассифицированным микроорганизмам группы GOM Arc I (Gulf of Mexico Archaea group 1), формально названной ANME-2d за филогенетическую близость к группе анаэробных метанотрофных архей ANME-2 (Mills et al., 2005). Недавно среди ANME-2d был обнаружен микроорганизм *Methanoperedens nitroreducens*, способный окислять метан по обратному пути метаногенеза используя в качестве терминального акцептора электронов NO_2^- (Haroony et al., 2013). В меньшем количестве в библиотеках двух поверхностных слоёв обнаружены последовательности ацетат-использующих метаногенов рода *Methanosaeta* и автотрофных метаногенов рода *Methanoregula*.

В сообществах архей из ГГ прослоев наблюдалось различное соотношение доминирующих таксонов: на глубине 70 см преобладали представители филумов *Bathyarchaeota* (54,2 % от общего количества генов 16S рРНК архей в библиотеке) и *Crenarchaeota* (26,7 %), на глубине 100 см – *Euryarchaeota* (59,7 %) и *Bathyarchaeota* (27,1 %). Для представителей последних предсказана способность ферментировать белки и полисахариды в совокупности с возможностью осуществлять метангенерацию при использовании метилированных субстратов (Evans et al., 2015), либо продуцировать ацетат в ходе уксуснокислого брожения и автотрофной ассимиляции CO_2 (Lazar et al., 2015). Последовательности ближайших некультивируемых представителей филума *Crenarchaeota* выявлены при анализе термальных источников, «черных курильщиков», мини-вулканов и илов геотермальных районов, палеопочв, озерных осадков, морского детрита и активного ила очистных сооружений. Представители выявленных в настоящей работе филумов архей распространены повсеместно, в том числе и в других районах Байкала (Kadnikov et al., 2012, 2013). Следует отметить отсутствие в анализируемых библиотеках последовательностей гена 16S рРНК «байкальских» линий архей, обнаруженных в осадках метанового сипа «Санкт-Петербург» (Kadnikov et al., 2012).

Сравнение таксономической структуры бактериальных сообществ из различных слоев осадка с помощью диаграмм Венна (рис. 11А) не выявило ни одной общей ОТЕ со 100% гомологией. Наибольшее количество общих бактериальных ОТЕ отмечено в библиотеках сообществ поверхностного и подповерхностного слоев осадка (29 ОТЕ), по 4 общих ОТЕ выявлено в библиотеках сообществ слоев 10–70 см и 10–100 см. В библиотеках генов 16S рРНК архей из всех исследованных слоев донных отложений выявлены 2 общих ОТЕ (класс *Thermoplasmata*) (рис. 11Б). Как и для бактериальных сообществ, наибольшее количество общих ОТЕ архей обнаружено в библиотеках ампликонов для поверхностного и подповерхностного слоев осадка (26 ОТЕ) и слоев 10–100 см (16 ОТЕ).

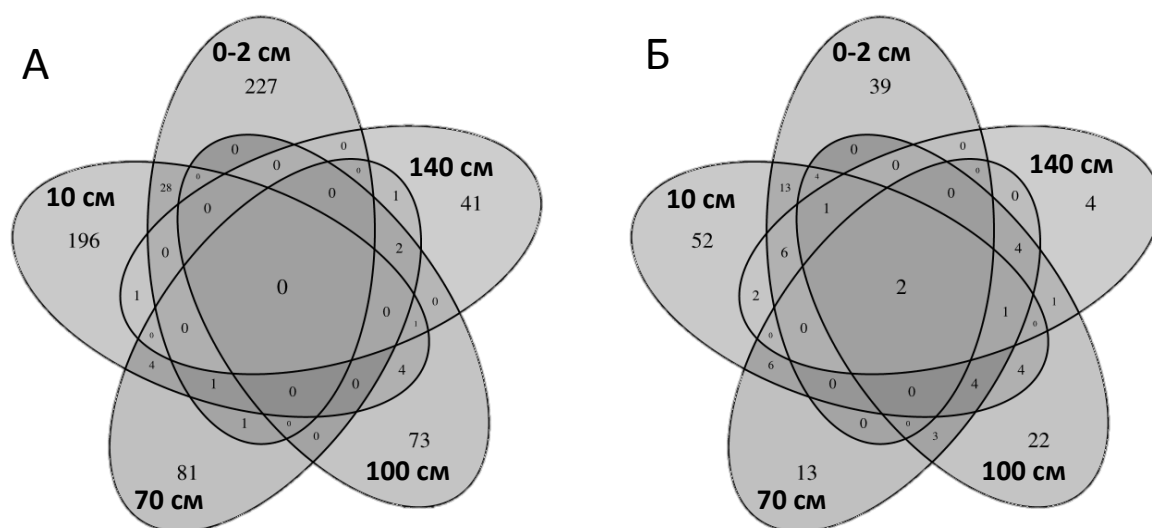


Рис. 11. Диаграммы Венна для библиотек генов 16S рРНК бактерий (А) и архей (Б), показывающие перекрытие микробных сообществ между различными слоями исследуемого керна. Диаграммы построены для ОТЕ 0,03, цифрами обозначено количество ОТЕ.

Как было показано ранее (Zemskaya et al., 2015), большее количество уникальных ОТЕ (46–85 %) и небольшое представительство общих (0,5–2 %) типично для библиотек бентосных бактериальных сообществ озера Байкал. В то же время в эпилимнионе озера Байкал существует единое метасообщество, о чём свидетельствуют результаты анализа планктонных бактериальных сообществ, пространственно удаленных друг от друга (Михайлов и др., 2015).

С помощью метода непараметрического многомерного шкалирования была исследована сопряженность некоторых ионов, общей минерализации поровой воды и отдельных филогенов (ОТЕ) всех исследованных библиотек генов 16S рРНК (при уровне достоверности 0,03). Распределение большинства ОТЕ в библиотеках почти всех слоев исследуемого керна не коррелировало с компонентным составом поровых вод (рис. 12). Достоверное влияние на присутствие *Chloroflexi*, *Lentisphaerae*, *Acidobacteria*, *Aminicenantes*, семейства *Nitrospinaceae*

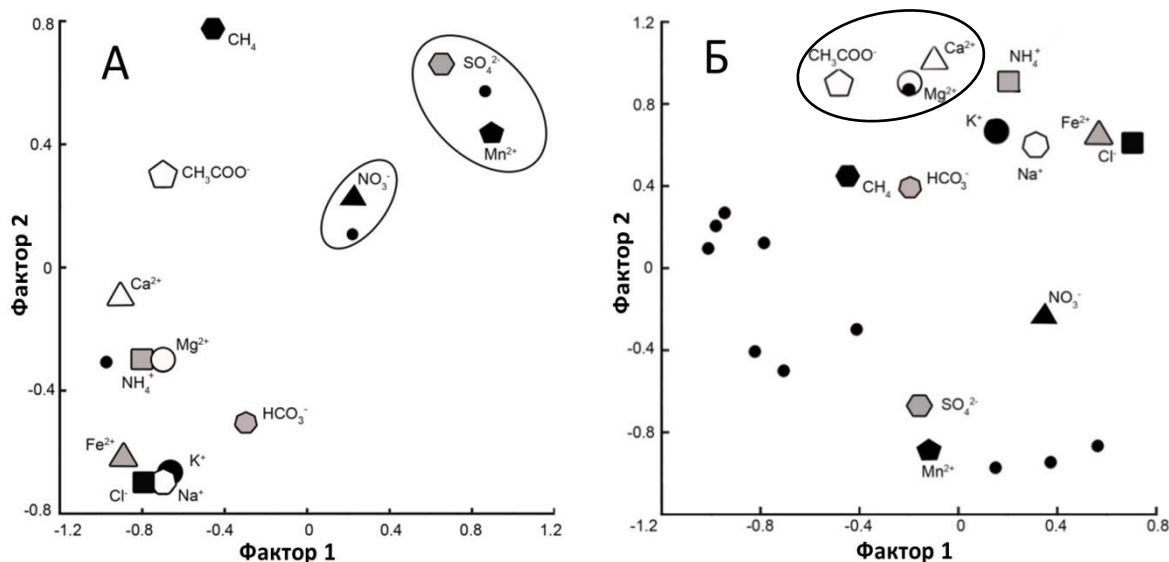


Рис. 12. График многомерного непараметрического шкалирования (nmds), показывающий взаимосвязь между ОТЕ библиотек генов 16S рРНК бактерий (А) и архей (Б), детектированных в донных осадках района метанового сипа «Посольская Банка», и химическими компонентами поровых вод.

(*δ-Proteobacteria*) и *Methylococcaceae* (*γ-Proteobacteria*) оказывали концентрации ионов сульфата и марганца(II). Присутствие представителей филумов *Chloroflexi* и *Bacteroidetes* было сопряжено с содержанием нитрат-иона, а представителей *Bathyarchaeotae* – с содержанием ионов магния, кальция и ацетата.

В библиотеках генов 16S рРНК прокариот, созданных на основе ДНК микроорганизмов, выделенной из разных слоев керна из метанового сипа «Посольская Банка», выявлены последовательности представителей девяти филумов *Bacteria* и четырех филумов *Archaea*. Их соотношение в разных слоях исследуемого керна имело свои особенности. В отличие от сообществ из других приразломных районов (Zemskaya et al., 2015), в сообществах исследуемого керна цианобактерии присутствовали в небольших количествах либо не выявлялись совсем. *δ-Proteobacteria* были многочисленны от поверхности осадка и до ГГ прослоев. Ранее отмечалась их значительная представленность в составе бактериальных сообществ глубоководных слоев донных отложений в районах нефтяных сипов и сообщества из грязевого вулкана «Маленький». Большая доля *δ-Proteobacteria*, представленных в полученных библиотеках генами сульфатредуцирующих бактерий, согласуется с увеличением интегральной скорости сульфатредукции в поверхностных осадках данного района по сравнению с донными отложениями мелководных сипов на вершине Посольской Банки (Пименов и др., 2014). Вероятно, многочисленность *δ-Proteobacteria* в сообществах поверхностных донных осадков обеспечивается подтоком флюидов, обогащенных, в том числе, и сульфат-ионами. В сообществах исследуемого керна, как и в сообществах из других районов озера Байкал, не выявлены типичные для морских осадков метаноокисляющие археи групп ANME-1,2. Однако,

обнаружение потенциальных анаэробных метанотрофов группы GOM Arc I (ANME-2d), последовательности которых многочисленны в библиотеках из слоёв 0-2 и 10 см коррелирует с повышенными скоростями окисления метана именно в этих слоях изучаемого керна (Pimenov et al., 2014).

Среди известных метаногенных архей, филогенетический анализ показал незначительное присутствие представителей родов *Methanosaeta* и *Methanoregula* только в двух поверхностных слоях осадка. В слоях, ассоциированных с ГГ, выявлен небольшой процент неклассифицированных *Methanomicrobia* при численном доминировании последовательностей *Thermoplasmata*. Малая доля последовательностей метаногенов может являться следствием конкуренции за общие субстраты с бактериями, обладающими энергетически более выгодными типами анаэробного дыхания. При этом наличие большого числа последовательностей потенциально метаногенных представителей филума *Bathyarchaeota* может объясняться как использованием ими неконкурентных метилированных субстратов, так и возможностью переключаться на ферментативный тип метаболизма, что обуславливает их широкое распространение зонах активной сульфатредукции морских донных отложений (Lazar et al., 2015).

Еще одним отличием явилось присутствие в составе библиотек из всех слоев исследуемого керна значительного количества последовательностей филумов *Chloroflexi* и *Acidobacteria*, филумов-кандидатов *Aminicenantes* и *Atribacteria*, а в библиотеке из глубинных слоев осадков – филума *Deinococcus-Thermus*. Следует отметить, что, как и для донных отложений морских экосистем, высокая численность последовательностей *Chloroflexi* в целом коррелирует с высокой численностью *Bathyarchaeota*, что может предполагать наличие трофических связей между представителями этих фил (Ruff et al., 2015).

Маркерным представителем микробного сообщества ГГ прослоев предполагаются бактерии группы JS1 филума-кандидата *Atribacteria* (Inagaki et al., 2006), присутствие которых ранее отмечалось при анализе сообществ из ГГ прослоев на Байкале (Zemskaya et al., 2015). Как показали наши данные, в библиотеках сообщества ГГ прослоев из района Посольская Банка внутри *Atribacteria* все последовательности принадлежат бактериям группы OP9, а JS1 не выявлены.

В отличие от других районов озера Байкал, уже с первых сантиметров исследуемого керна наряду с таксонами, обеспечивающими начальные этапы деструкции органического вещества (*Chloroflexi*, *Aminicenantes*, *Atribacteria*), значительную долю составляли анаэробные хемолитотрофные микроорганизмы, участвующие в циклах азота (*Thaumarchaeota*, *Nitrospira*, β -*Proteobacteria*) и серы (δ -*Proteobacteria*). Значительный вклад нехарактерных для сообществ поверхностных осадков представителей *Chloroflexi*, δ -*Proteobacteria*, и филумов-кандидатов,

скорее всего, является следствием влияния потока термогенного газа и флюидов, проходящих сквозь изучаемый осадок и обеспечивающий создание восстановительных условий среды. Их постоянный поток также может обуславливать поступление дополнительных источников углерода и энергии в верхние сантиметры осадка. Если циркуляция флюидов действительно осуществляется в осадочной толще до глубины залегания BSR, то в сообществах поверхностных и подповерхностных слоев изучаемых осадков наряду с космополитными прокариотами могут присутствовать глубинные микроорганизмы с неизвестным метаболизмом и иными адаптационными возможностями.

3.2 Образование метана микробным сообществом донных осадков сипа «Посольская Банка» в эксперименте с различными субстратами

Для исследования процессов метангенерации микробные сообщества из различных слоёв донных отложений, отобранных в 2012, 2014 и 2015 гг. подвергали краткосрочному (3 мес.) и долгосрочному (1 год; только для образцов 2014, 2015 гг.) культивированию в психрофильных условиях (4 °С) на среде для метаногенных микроорганизмов с различными субстратами метаногенеза (табл. 2). По результатам культивирования установлено, что активность процессов генерации метана различалась в зависимости от литологической структуры осадка и химического состава поровых вод кернов.

В эксперименте с осадками керна, характеризующегося высокой газонасыщенностью (2012 г.), в поверхностных, восстановленных слоях концентрация образовавшегося метана на средах для ацетокластических и гидрогенотрофных архей, не превышала 0,002 ммоль/л. Наибольшая концентрация метана выявлена в накопительных культурах, содержащих микробное сообщество слоя 55 см (рис. 13А). На среде с ацетатом и водородом концентрация CH_4 достигла 6,15 ммоль/л, при восстановлении углекислого газа – 4,51 ммоль/л. С увеличением глубины осадка наблюдалось снижение влияния ацетата на продуктивность метангенерации и преимущественное увеличение концентрации метана за счет деятельности гидрогенотрофных архей.

Для многих пресноводных озёр, осадконакопление в которых протекает в спокойных условиях, скорости образования метана максимальны в поверхностном слое донных отложений (2–25 см) и в целом снижаются с глубиной, вслед за уменьшением концентраций органического вещества (Therbach et al., 1992; Zepp–Falz et al., 1999). В нашем случае, низкая метаногенная активность сообщества восстановленного поверхностного слоя, по всей видимости, обусловлена деятельностью сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), которые конкурируют с метанобразующими археями за общие субстраты. Данное предположение согласуется с результатами изучения активности процесса сульфатредукции (СР) в тех же донных осадках, что и в данном эксперименте, свидетельствующими о максимальных скоростях протекания СР

в поверхностных слоях (Пименов и др., 2014). Анализ структуры микробных сообществ поверхностных слоев осадка, также подтверждает присутствие значительной доли последовательностей СРБ (преимущественно класса *δ-Proteobacteria*) в полученных для них библиотеках ампликонов участка гена 16S рРНК (рис. 9).

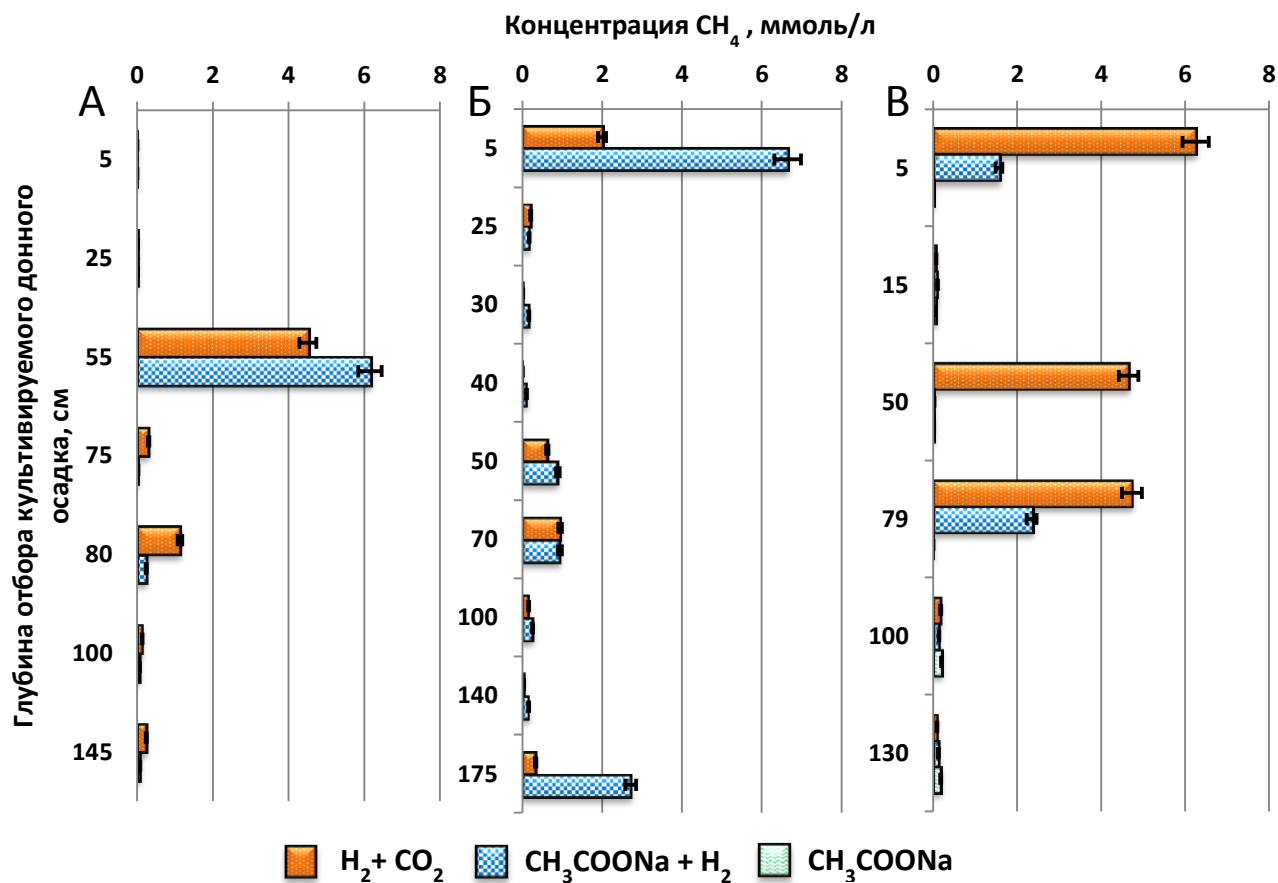


Рис. 13. Концентрации метана, образовавшегося в накопительных культурах донных осадков метанового сипа «Посольская Банка». Приведены данные для осадков кернов (А) Ст-5 ГТ-4 (2012 г.), (Б) Ст-1 ГТ-3 (2014 г.) и (В) Ст-2 ГТ-3 (2015 г.) через 90 суток культивирования при 4 °С. При использовании среды с ацетатом натрия и водородом доля водорода в атмосфере флаконов с накопительными культурами составляла 80 % в 2012 и 2014 гг. и 20 % в 2015 г.

В эксперименте с микробными сообществами донных отложений 2014 и 2015 гг., удаленных от места разгрузки флюидов, имеющих малую газонасыщенность и химический состав поровых вод, характерный для фоновых районов, интенсивные процессы метангенерации зафиксированы в поверхностном окисленном слое, и в слоях соответствующих верхней границе ледниковых глин (50–80 см) (рис. 13Б, В). Образование зоны активной метангенерации в слоях осадка на глубине 50–80 см может быть следствием как снижения активности СРБ от поверхности осадков до глубины 50 см (в случае осадков 2012 г.), так и переходом иловых отложений в глины, характеризующихся повышенным содержанием в них не полностью деградированного органического вещества, которое могло захораниваться в условиях резкого увеличения поступления детрита в послеледниковый период (Безрукова и др.,

2004). Ранее, повышенные скорости образования метана в интервалах глубин 50–80 см отмечались в донных отложениях Центральной и Южной котловин озера (Земская, Намсараев, 2000).

Метаногенные сообщества донных отложений **2015 г.**, в составе поровых вод которых не обнаружен ацетат-ион (рис. 13В), образовывали метан преимущественно по гидрогенотрофному пути, а количество продуцируемого метана коррелировало с начальной концентрацией водорода в среде. Наличие в среде ацетата не приводило к увеличению продуктивности метангенерации. При длительном культивировании динамика образования метана по глубине керна оставалась неизменной – активные процессы метангенерации шли только в культурах, поверхностного слоя и слоёв 50 и 80 см с доминированием гидрогенотрофного пути (рис. 14Б). Вместе с тем, в накопительных культурах, содержащих микробное сообщество донных осадков **2014 г.**, ацетат-ион в которых присутствовал изначально (рис. 13Б), образование метана в первые месяцы культивирования наиболее интенсивно происходило на средах, содержащих ацетат и водород, нежели на средах с $\text{CO}_2 + \text{H}_2$. Однако, длительное культивирование приводило к выравниванию концентраций газа в культурах, содержащих $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ и в культурах с $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2$, несмотря на более широкий спектр субстратов в последних (рис. 14А). Помимо этого, с различиями во времени, концентрации метана начинали увеличиваться в накопительных культурах всех исследуемых слоёв осадка.

Различие в сроках начала образования метана в культурах и активность процесса метангенерации, по всей видимости, связаны с разной изначальной численностью метаногенных микроорганизмов в сообществах отдельных слоёв донных отложений. В то же время увеличение продуктивности метангенерации на среде с ацетатом Na не являлось следствием протекания процесса ацетакластического метаногенеза, доминирующего в холодных осадках других пресноводных озёр (Kuivila et al., 1989; Thebrath et al., 1993; Schulz, Conrad, 1996; Nozhevnikova et al., 1997, 2007; Zepp–Falz et al., 1999; Glissmann et al., 2004). В нашем случае присутствие в среде ацетата, по всей видимости, стимулировало развитие автотрофных метаногенов, использующих его в качестве источника углерода.

Для выяснения структуры метаногенных сообществ был проанализирован состав представителей *Archaea* в двух накопительных культурах 2014 г. («гидрогенотрофной» – № 1 и «ацетокластической» – № 2) из поверхностного слоя осадка на 150-е сутки культивирования (рис. 14А).

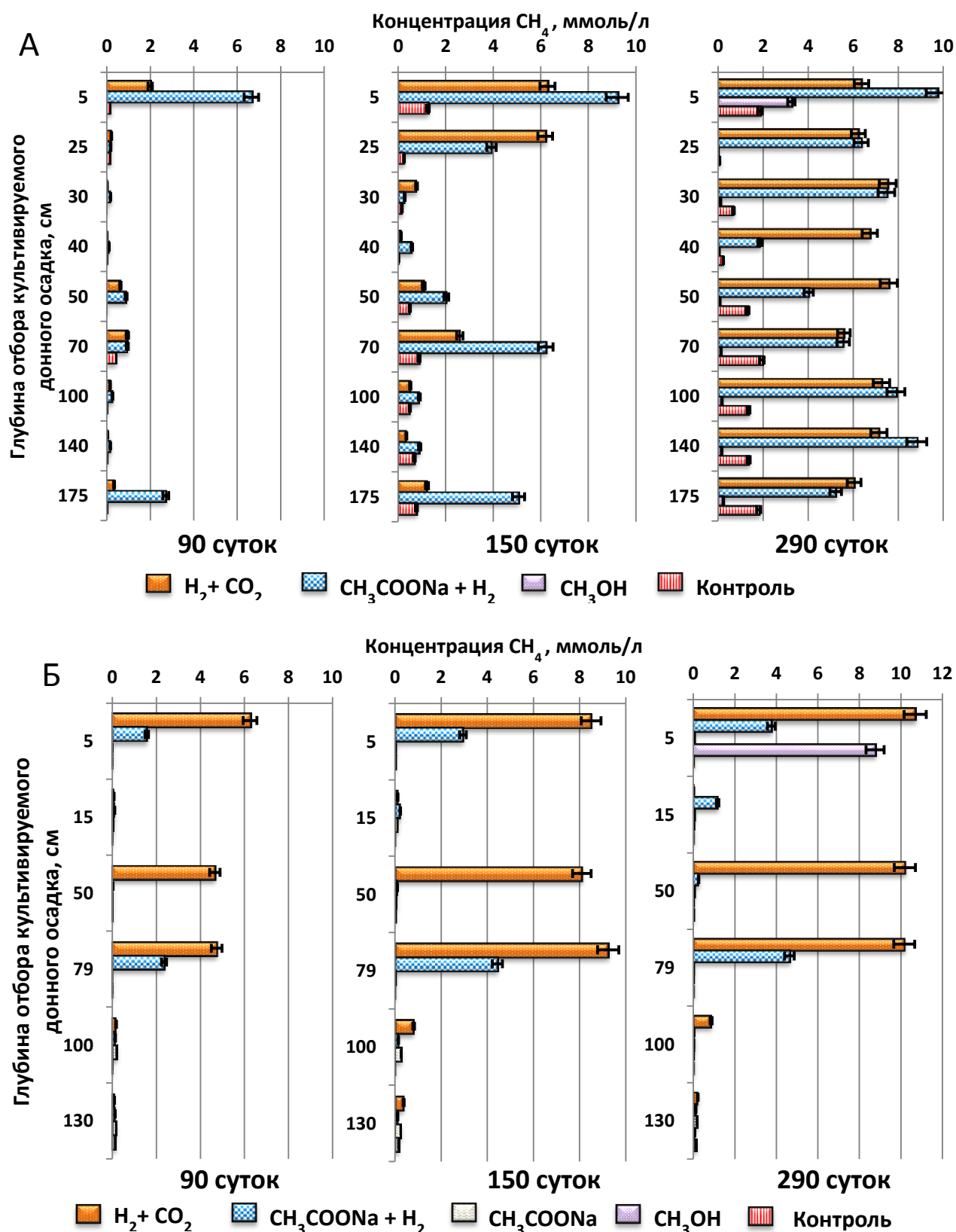


Рис. 14. Динамика изменений концентрации метана в накопительных культурах осадков района метанового сипа «Посольская Банка». Приведены данные для осадков кернов (А) Ст-1 ГТ-3 (2014 г.) и (Б) Ст-2 ГТ-3 (2015 г.). Температура культивирования 4 °С. При использовании среды с ацетатом Na и водородом, доля водорода в атмосфере флаконов составляла 80 % в пробах 2014 г. и 20 % в пробах 2015 г. Данные о концентрациях метана, образовавшегося при культивировании на средах с метанолом, приведены только на 290-е сутки.

Археи рода *Methanocella* и *Methanobacterium* являются облигатно-автотрофными метаногенами, использующими CO_2 и формиат в качестве субстратов метаногенеза. Все культивируемые представители *Methanocella*, последовательности которых численно доминировали в библиотеке культуры № 1, не способны использовать CO_2 в качестве единственного источника углерода и развиваются только в присутствии ацетата (Sakai et al., 2008, 2010; Lu et al., 2012). Микроорганизмы рода *Methanobacterium* также способны использовать ацетат в качестве источника углерода, что стимулирует их развитие в среде с его присутствием. Объём полученных библиотек клонов не позволяет с уверенностью утверждать об отсутствии в исследуемых культурах представителей порядка *Methanosarcinales*, способных образовывать метан путём диспропорционирования ацетата, но, вероятно, именно особенности метаболизма микроорганизмов родов *Methanocella* и *Methanobacterium* обуславливают большую интенсивность процесса метангенерации при росте сообщества на среде с ацетатом. На среде с $\text{H}_2:\text{CO}_2$ развитие *Methanocella*, а вместе с тем и активность метангенерации, по-видимому, ограничивались скоростью образования ацетата автотрофными ацетогенными микроорганизмами (включая представителей *Bathyarchaeota*), а также снижением концентраций доступных субстратов (H_2 и CO_2).

Как и в случае анализа состава клональных библиотек, по результатам флуоресцентной *in situ* гибридизации накопительных культур № 1 (рис. 16А) и № 2 (рис. 16Б) с зондом, комплементарным участку гена 16S рРНК микроорганизмов типа *Euryarchaeota*, в них не обнаружены клетки, обладающих морфологией, типичной для представителей ацетокластических метаногенов родов *Methanosarcina* и *Methanosaeta* (рис. 16В, Г).

Поскольку при развитии автотрофного микробного сообщества в первую очередь потребляются лёгкие изотопы углерода (^{12}C), на среде с $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ жизнедеятельность ацетогенных микроорганизмов должна приводить к обеднению лёгким изотопом находящейся в ней углекислоты. Это, в свою очередь, приводит к образованию из оставшегося CO_2 обеднённого ^{12}C «тяжёлого» метана метаногенными археями. Анализ изотопного состава углерода метана из атмосферы флаконов с культурами № 1 и № 2 показал, что на стадии активной метангенерации (127-е сутки), более тяжёлый газ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} = -44.8$ против -56.1) образовывался при росте сообщества именно на среде без ацетата. Таким образом, результаты гибридизации и изотопного анализа подтверждают данные секвенирования, свидетельствующие о развитии в исследуемых накопительных культурах метаногенных сообществ, основой которых являются автотрофные представители родов *Methanocella* и *Methanobacterium*.

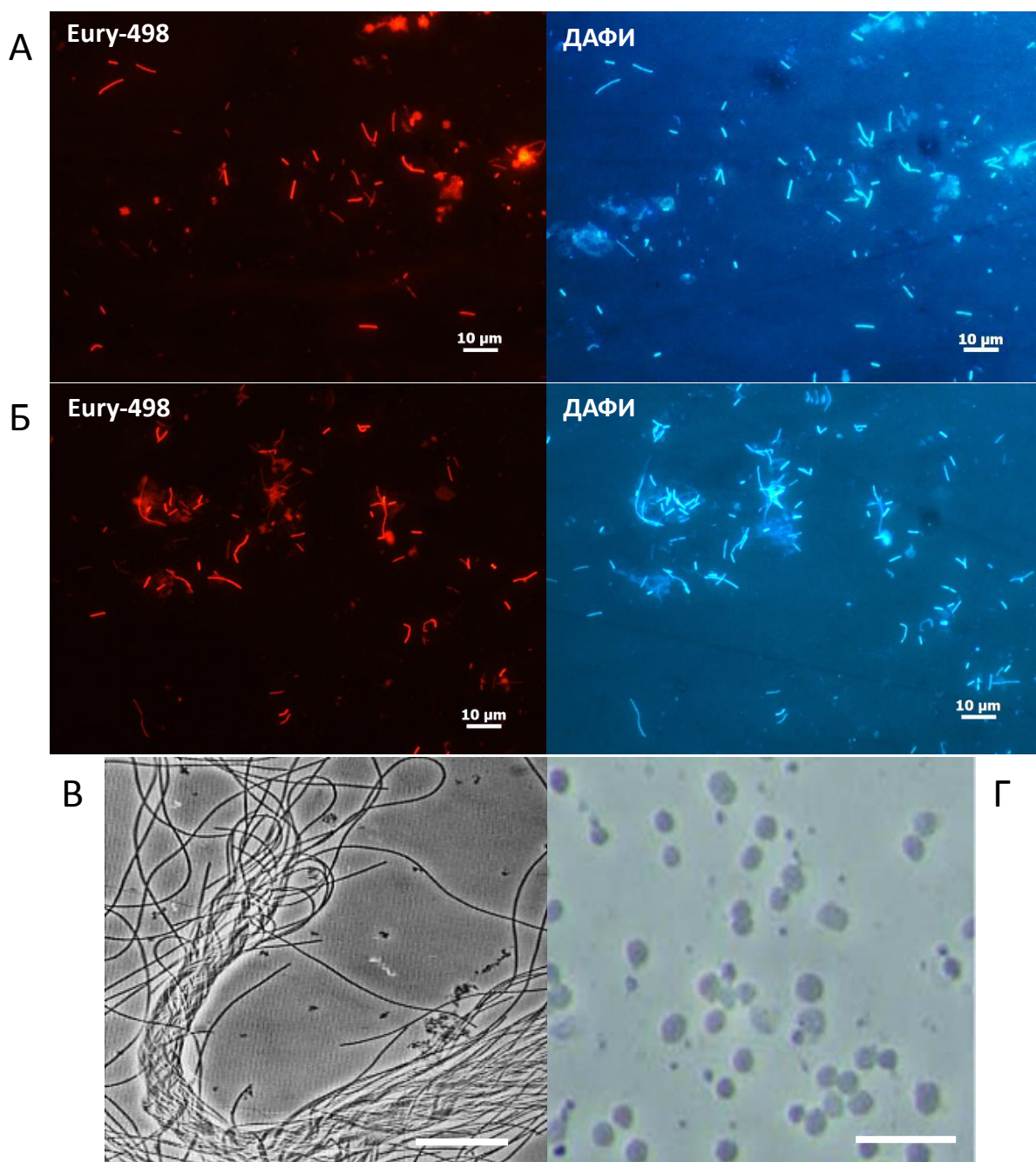


Рис. 16. Морфология клеток в накопительных культурах из поверхностного слоя донных осадков (5 см) района метанового сипа «Посольская Банка» (кern Ст-1 ГТ-3 (2014 г.) специфично окрашивающихся Су-3 меченым зондом Eury-498 при росте на средах с (А) $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2$ и (Б) $\text{H}_2 + \text{CO}_2$. Типовая морфология клеток представителей микроорганизмов порядка *Methanosarcinales* на примере (В) *Methanosaeta pelagica* (по Mori et al., 2012) и (Г) *Methanosarcina horonobensis* (по Shimizu et al., 2011). Масштаб - 10 мкм.

Тот факт, что изначально присутствие ацетат-иона в осадках данных кернов не привело к преимущественному накоплению метана на среде с ацетатом Na в культурах глубинных (2012 г.) и поверхностных (2014 г.) осадков может говорить о наличии в них активного пула психрофильных метаногенных архей, использующих CO_2 и H_2 в качестве основного источника углерода и энергии. Однако отсутствие, в настоящее время, данных о составе микробных

сообществ культур из других исследуемых слоёв осадков, отобранных в 2012 и 2014 гг., не позволяет делать выводы об образовании в них метана по тому или иному пути и не исключает развитие в них ацетокластического метаногенного сообщества. Преимущественное образование метана по автотрофному пути в накопительных культурах из донных отложений, отобранных в 2015 г., согласуется как с отсутствием в поровых водах ацетат-иона, так и с данными изотопных исследований, указывающим на то, что в донных отложениях глубоководной зоны озера Байкал, 75–100 % метана образуется автотрофно (Намсараев и др., 1995).

Меньшая активность ацетокластических метаногенов может являться следствием повышенного содержания в осадках зоны разгрузки ионов аммония (до 3,7 мг/л в керне 2012 г. табл. 2). Результаты недавних исследований показывают, что увеличение содержания аммония в среде приводит к подавлению метаболической активности ацетокластических архей в большей степени, чем гидрогенотрофных, и увеличению вклада синтрофного пути образования метана из ацетата консорциумами ацетат-утилизирующих бактерий и автотрофных архей (Kato et al., 2014). Однако при низких положительных температурах, характерных для донных отложений глубинных зон озера Байкал, протекание процесса синтрофного окисления ацетата в совокупности с гидрогнотрофным метаногенезом маловероятно. Ранее синтрофное окисление ацетата до метана было зафиксировано только в мезофильных экосистемах при температурах от 15 °С и выше (Nusslein et al., 2001). Это связано с тем, что при низких положительных температурах энергетический выход реакции восстановления углекислоты до метана снижается, и процесс синтрофного образования метана из ацетата термодинамически не выгоден (Kotsyurbenko, 2005). Исследование состава представителей *Archaea* в низкопродуктивной ацетокластической культуре 2012 г. из слоя 100 см, подтверждает присутствие в ней последовательностей только ацетокластических метаногенных архей рода *Methanosaeta* (см. раздел 3.3).

Возможность использовать метаногенным микробным сообществом исследуемых осадков C_1 метелированных соединений изучалась на средах с метанолом. При использовании данного субстрата в качестве единственного источника углерода и энергии процесс образования метана зафиксирован в культурах из поверхностного слоя окисленных донных отложений кернов 2014 и 2015 гг. (рис. 14). В отсутствие водорода образование метана из метанола может осуществляться напрямую в результате жизнедеятельности метилотрофных метаногенных архей рода *Methanosarcina* (Liu, Whitman, 2008) и, вероятно, отдельными представителями филы *Bathyarchaeota* (Evans et al., 2015). Также возможен путь синтрофной утилизации метанола в консорциумах анаэробных метилотрофных бактерий и гидрогенотрофных метаногенов (Тарасов и др., 2011). Установление состава и структуры

метаногенного сообщества, а также выяснение вероятных путей образования метана в полученных метилотрофных культурах является предметом дальнейших исследований.

3.3 Биогенное образование этана микробным сообществом донных отложений сипа «Посольская Банка»

Образование метана в осадках морей и пресноводных водоемов происходит либо в результате микробиологических процессов преобразования органического вещества, либо в результате термокаталитических процессов (Леин, Иванов, 2009; Floodgate, Judd, 1992). Микробный метан характеризуется невысокой примесью гомологов (этана, пропана, бутана) и их концентрация, как правило, на три порядка ниже, чем концентрация метана ($C_1/C_{2+} > 1000$). Содержание гомологов метана в термогенном газе существенно выше и может достигать 10–15 об. % ($C_1/C_{2+} < 100$) (Whiticar, 1999). 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).

Углеводородные газы различного генезиса отличаются, в первую очередь, изотопным составом углерода. Этан микробного происхождения содержит изотопнолегкий углерод ($\delta^{13}C-C_2 < -40$ ‰), термогенный этан характеризуется более высокими значениями $\delta^{13}C$ (> -40 ‰) (Milkov, 2005). О способности микроорганизмов образовывать другие углеводородные газы, отличные от метана, впервые было сообщено в 1948 г. (Davis, Squires, 1954). В настоящее время установлено, что процесс этаногенеза осуществляется метаногенными археями при соблюдении всех условий, необходимых для протекания процесса образования метана (бескислородные условия, низкие значения Eh и др.) (Oremland et al., 1981; Oremland et al., 1988). Тем не менее, в настоящее время остается открытым вопрос о механизмах образования биогенного этана и биохимии участвующих в этом процессе микроорганизмов. Так как в чистую культуру не выделен ни один штамм, осуществляющий процесс образования этана, вывод о механизме генерации микробного C_2H_6 авторы делают на основании результатов экспериментов с микробным сообществом при добавлении различных субстратов (Davis, Squires, 1954; Oremland et al., 1981; Oremland et al., 1988; Claypool, 1999; Hinrichs et al., 2006).

В донных отложениях оз. Байкал, так же как в морских осадках, выявлен микробный и термогенный метан (Кузьмин и др., 2001; Калмычков и др., 2006). Микробный метан присутствует в осадках всех районов оз. Байкал, тогда как биогенный этан ($\delta^{13}C-C_2$ от -62.7 до -60.0 ‰) выявлен лишь в одном районе оз. Байкал – холодном сипе «Песчанка» (Южный Байкал) (Nashikubo et al., 201). Вместе с тем, на дне озера имеется целый ряд газывыводящих структур, где происходит разгрузка газа, содержащего в качестве примеси этан, который по изотопным данным ($\delta^{13}C-C_2 = -27.6...-23.3$ ‰) можно классифицировать как термогенный,

причем концентрация этана в некоторых случаях может достигать 3–5 об. %. Высокие концентрации этана в газе, растворенном в поровых водах, способствуют образованию в некоторых районах Байкала газовых гидратов не только структуры КС-1 (монокристаллический гидрат), но структуры КС-2 (гидрат в виде гранул), различающихся по размеру полостей кристаллического каркаса гидрата и содержанию этана в гидратном газе (Калмычков и др., 2006, Манаков и др., 2013).

В составе газа исследуемой разгрузки «Посольская Банка» гомологи метана были представлены, в основном, этаном. Так, в осадках керна отобранного в 2012 г. на глубине 60 см доля этана достигала 2,2 %, пропан и бутан присутствовали в следовых количествах. Значение $\delta^{13}\text{C}-\text{C}_1$ составляло -44,0 ‰, значение $\delta^{13}\text{C}-\text{C}_2 = -27,4$ ‰, что свидетельствует о термогенном генезисе газа. В ходе культивирования донных отложений керна 2012 г. (см. раздел 3.2) образование этана было зафиксировано в накопительных культурах из всех исследуемых слоёв. Результаты измерения концентрации C_2H_6 приведены на рис. 17.

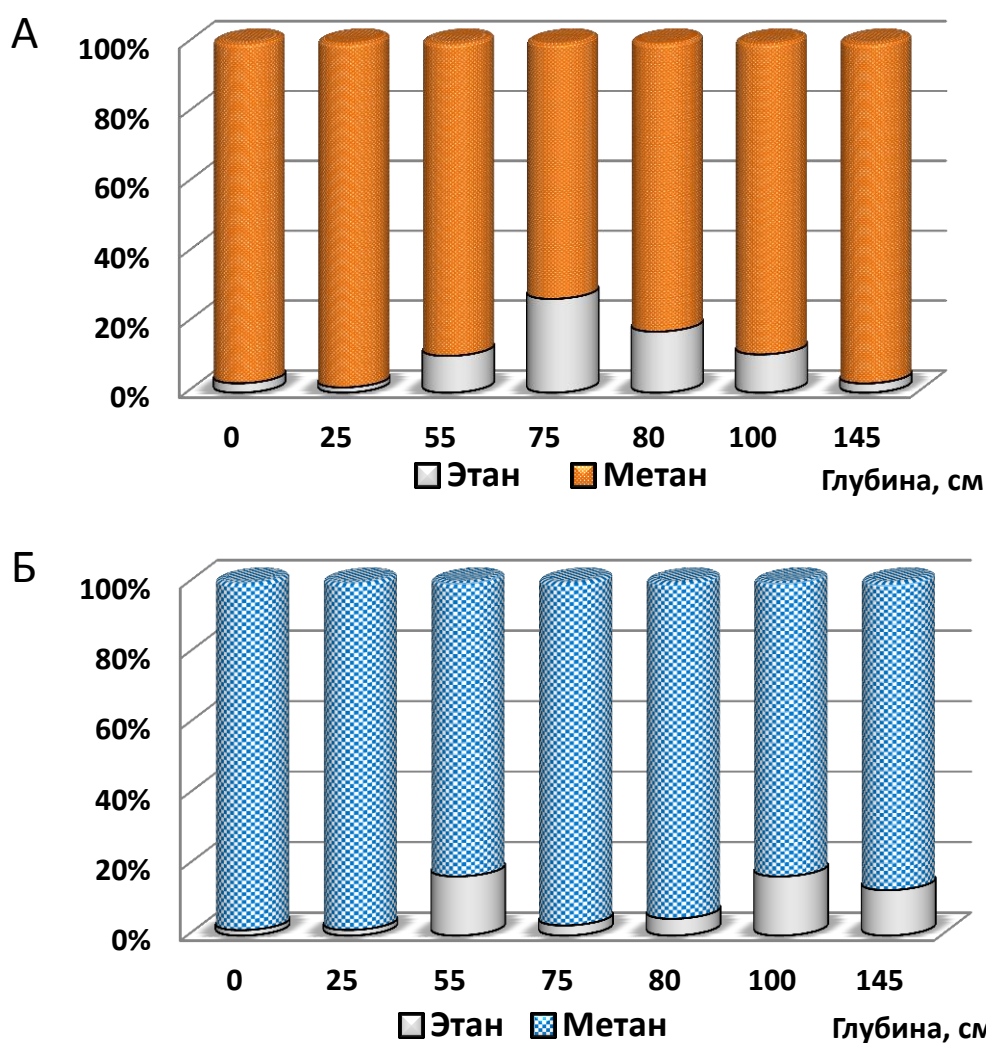


Рис. 17. Соотношение углеводородных газов в накопительных культурах с $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (А) и $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2$ (Б), содержащих донные осадки керна Ст-5 ГТ-4 (2012 г.).

Как и в случае метана, содержание этана во флаконах после культивирования образцов осадков из глубинных слоёв было заметно выше по сравнению с образцами поверхностных донных отложений. В перерасчете на углеводородные газы, наибольшая концентрация этана (26,8 об. %) зафиксирована в пробах, содержащих в качестве источника углерода CO_2 и микробное сообщество из слоя осадка, прилегающего к ГГ (75 см). В то же время на среде с ацетатом натрия наибольшая концентрация C_2H_6 выявлена при культивировании сообществ из осадков с глубин 55 и 100 см – 16,7 об. %.

Для изучения состава микробного сообщества глубинного слоя осадка, где было выявлено образование этана, после ряда последовательных разведений получена накопительная культура анаэробных микроорганизмов. Для данной культуры была проанализирована библиотека из 24-х клонов с фрагментами последовательностей гена 16S рРНК представителей *Archaea*. В результате проведенного филогенетического анализа в составе библиотеки выявлены последовательности микроорганизмов, родственные представителям филумов *Euryarchaeota* и *Bathyarchaeota* (MCG) (рис. 18).

Большинство нуклеотидных последовательностей (14), формирующих на филогенетическом древе отдельный кластер, были отнесены к филуму *Bathyarchaeota*. Два полученных филотипа данного филума (61-5f и 61-10f) имели 98–99 % сходства с последовательностями некультивируемых *Bathyarchaeota* из донных осадков озера Киву, расположенного в Центральной Африке (идентификационный номер JN853746) и арктических заболоченных территорий (AB364895). «Байкальских линий» филума *Crenarchaeota*, полученных в результате пиросеквенирования образцов ДНК метанового сипа «Санкт-Петербург» (Средний Байкал), среди архейного сообщества накопительной культуры получено не было (рис. 18). Филум *Euryarchaeota* представлен 10 клонами, которые были отнесены к порядкам *Methanococcales*, *Methanosarcinales* метаногенных архей. Три клона (11f, 47f, 28f) отнесены к порядку *Thermoplasmatales*. Этот порядок включает археи, которые окисляют органические субстраты в аэробных или анаэробных условиях за счет восстановления серы (Reysenbach, 2001). Среди ближайших родственников байкальских клонов этого порядка известны последовательности из анаэробных осадков мелководного испанского озера (HQ003663, HQ003673), поверхностных осадков озера Honghu, Китай (HM244360) и осадков альпийского озера (AM851082). Одна последовательность (61-18f) по результатам филогенетического анализа (с вероятностью 99 %) была отнесена к порядку *Methanococcales*, шесть последовательностей с гомологией 98–99 % – к порядку *Methanosarcinales*. Одна последовательность данного порядка образовала отдельный кластер с последовательностями *Baikal group 2* из осадков метанового сипа «Санкт-Петербург», полученных в результате пиросеквенирования (Kadnikov et al., 2012).

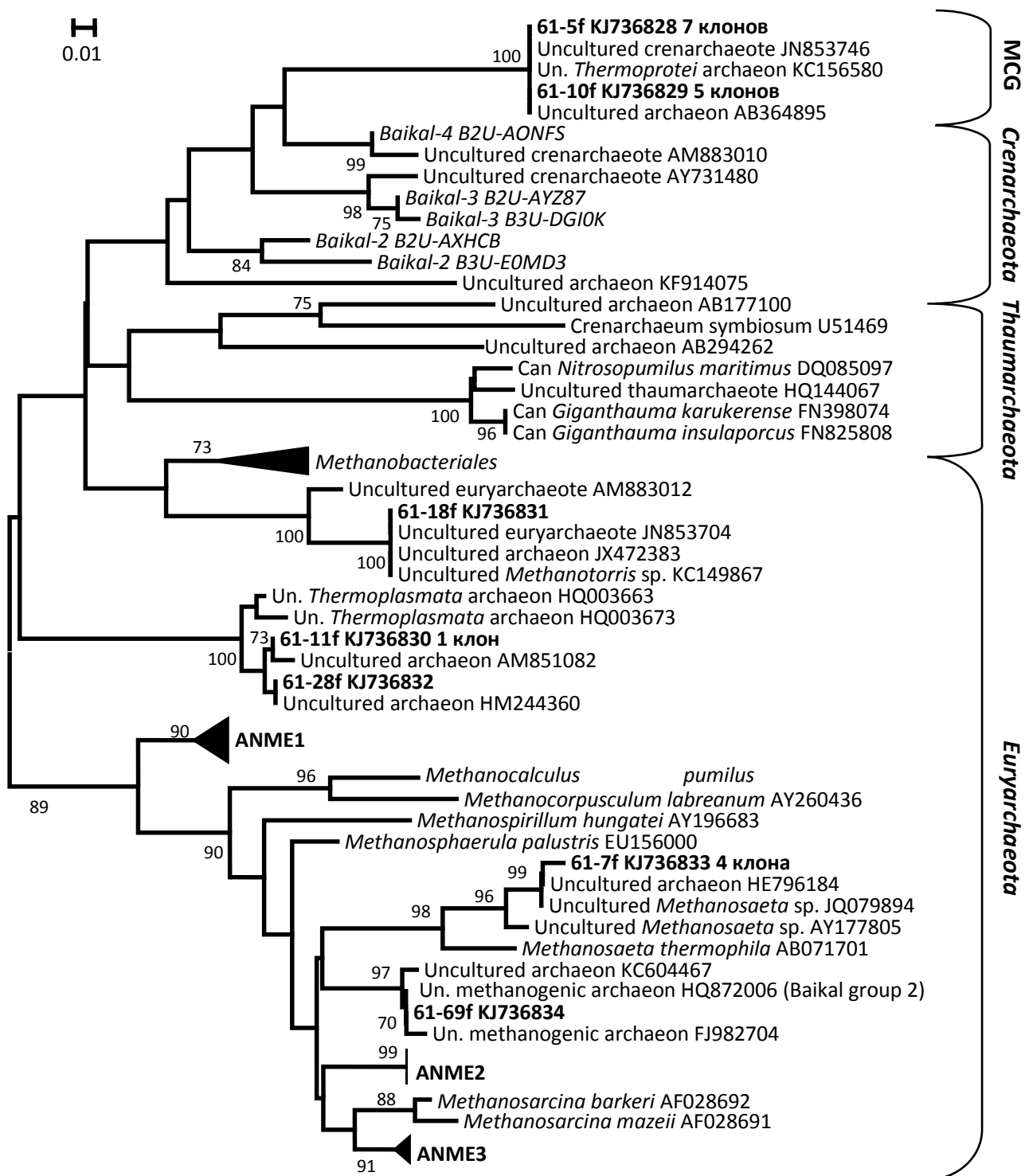


Рис. 18. Филогенетическое дерево генов 16S рРНК, обнаруженных в смешанной культуре архей из донных осадков (100 см) района метанового сипа «Посольская Банка». Последовательности, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. Последовательности «Байкальских линий» архей из метанового сипа «Санкт-Петербург» выделены курсивом. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев (значимыми признаются значения больше 70).

С помощью эпифлуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии в культуре выявлены палочки длиной 4–8 мкм, лежащие поодиночке либо составляющие цепочки и окруженные чехлом, а также парные или одиночные кокки диаметром 1 мкм и короткие палочки размером $(0,5-0,7) \times 2$ мкм (рис. 19А-В). По морфологии клетки в исследуемой накопительной культуре имели некоторое сходство с известными представителями рода *Methanosaeta* (Patel, Sprott, 1999).

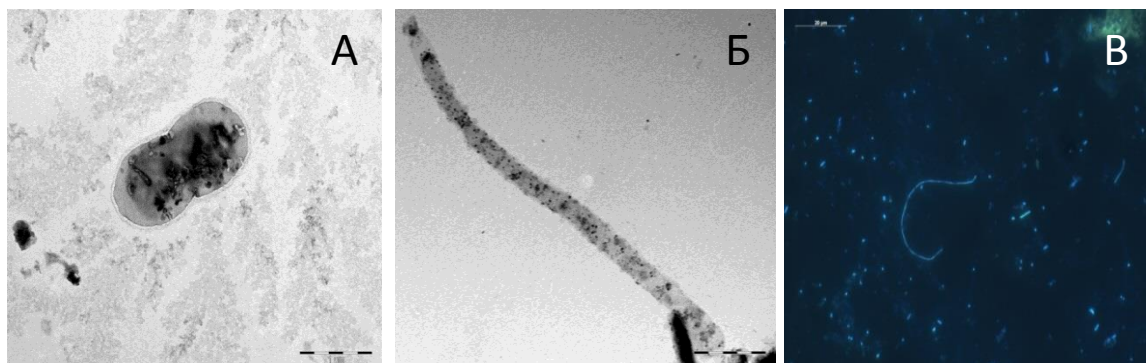


Рис. 19. Морфология клеток в накопительной культуре из глубинного слоя осадка (100 см) сипа «Посольская Банка»; (А, Б) – трансмиссионная электронная микроскопия, (В) – эпифлуоресцентная микроскопия. Масштаб – 2 мкм.

Проведенные исследования показали, что микробное сообщество из разных слоев донных осадков метанового сипа «Посольская Банка» при инкубации в психрофильных условиях лабораторного эксперимента продуцирует не только метан, но и этан. В накопительных культурах доля этана в перерасчете на углеводородные газы варьировала от 1,5 до 26,8 %, причем наибольшее содержание этого газа наблюдались во флаконах с образцами осадков, отобранных над ГГ и из гидратвмещающих слоев.

Образование 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. Поэтому для получения достоверных данных о происхождении метана необходимо сочетание геохимических и изотопных исследований метана и его гомологов.

Наличие в смешанной культуре, образующей в процессе культивирования этан, представителей филумов *Bathyarchaeota* и *Euryarchaeota* может свидетельствовать об их возможном участии в данном процессе.

3.4 Деструкция органического вещества микробным сообществом донных осадков сипа «Посольская Банка» в условиях протокатагенеза

Наличие потока термогенных газов в районах глубоководных разгрузок на оз. Байкал обуславливает вероятность попадания в холодные поверхностные осадки представителей глубинного термофильного микробного сообщества. С целью установления возможности присутствия в низкотемпературных приповерхностных осадочных отложениях метанового сипа Посольская Банка микроорганизмов, способных развиваться в условиях высоких температур, характерных для глубинных слоев земной коры, были проведены лабораторные эксперименты по культивированию природных образцов осадков, приуроченных к зоне тектонического разлома в анаэробных условиях при температуре 80 °С и давлении 5 МПа, исследован состава микробного сообщества с помощью высокоразрешающего пиросеквенирования фрагментов гена 16S рНК и охарактеризованы процессы преобразования органического вещества с применением хромато-масс-спектрометрического анализа.



Рис. 20. Внешний вид экспериментального автоклава.

Для экспериментального культивирования были выбраны образцы осадка из слоя 60-100 см (Ст-5 ГТ-4 (2012 г.); табл. 2), примыкающего к прослоям газовых гидратов. Культивирование донных осадков проводили в трех экспериментальных автоклавах (рис. 20) в условиях, различающихся по составу газовой фазы, а также типу добавляемого питательного субстрата.

В автоклаве № 1 к образцу осадка было добавлено 5 г детрита байкальской диатомовой водоросли *Synedra acus* из аксеничной культуры, полученной в отделе Ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН (Shishlyannikov et al., 2011), в автоклав № 2 был помещён осадок без дополнительных субстратов, осадки в автоклаве № 3 были стерилизованы автоклавированием и выступали в качестве отрицательного контроля. Газовая фаза в автоклаве № 1 состояла из смеси газов $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$ (50 % : 40 % : 10 %), в автоклавах №2 и 3 из CH_4 .

Суммарные данные пиросеквенирования (см. раздел 3.1) библиотек ампликонов фрагментов генов 16S рНК для образцов с глубины 70 см и 100 см, входящих в исследуемый слой донных отложений, указывают на то, что среди *Bacteria* наиболее многочисленны последовательности представителей филумов *Chloroflexi* (23,6 %), *Atribacteria* (OP9) (11,6 %), *Deinococcus-Thermus* (11,4 %), *Acidobacteria* (7,8 %), *Aminicenantes* (6,7 %), *Latescibacteria* (5,5 %), *Saccharibacteria* (4,8 %), *Planctomycetes* (4,7 %) и *Firmicutes* (3,5 %) (рис. 21А). К редким таксонам, составляющим менее 3 % последовательностей, относятся филумы

Actinobacteria, *Bacteroidetes*, *Caldiserica*, *Cyanobacteria*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* (α , β , γ , δ), *Verrucomicrobia* и др.

В домене *Archaea* все классифицированные последовательности распределены между *Bathyarchaeota* (MCG) (32,2 %), *Crenarchaeota* (Group C3) (6,14 %) и классами *Thermoplasmata* (47,9 %) и *Methanomicrobia* (1,71 %) представляющими филум *Euryarchaeota* (рис. 21А).

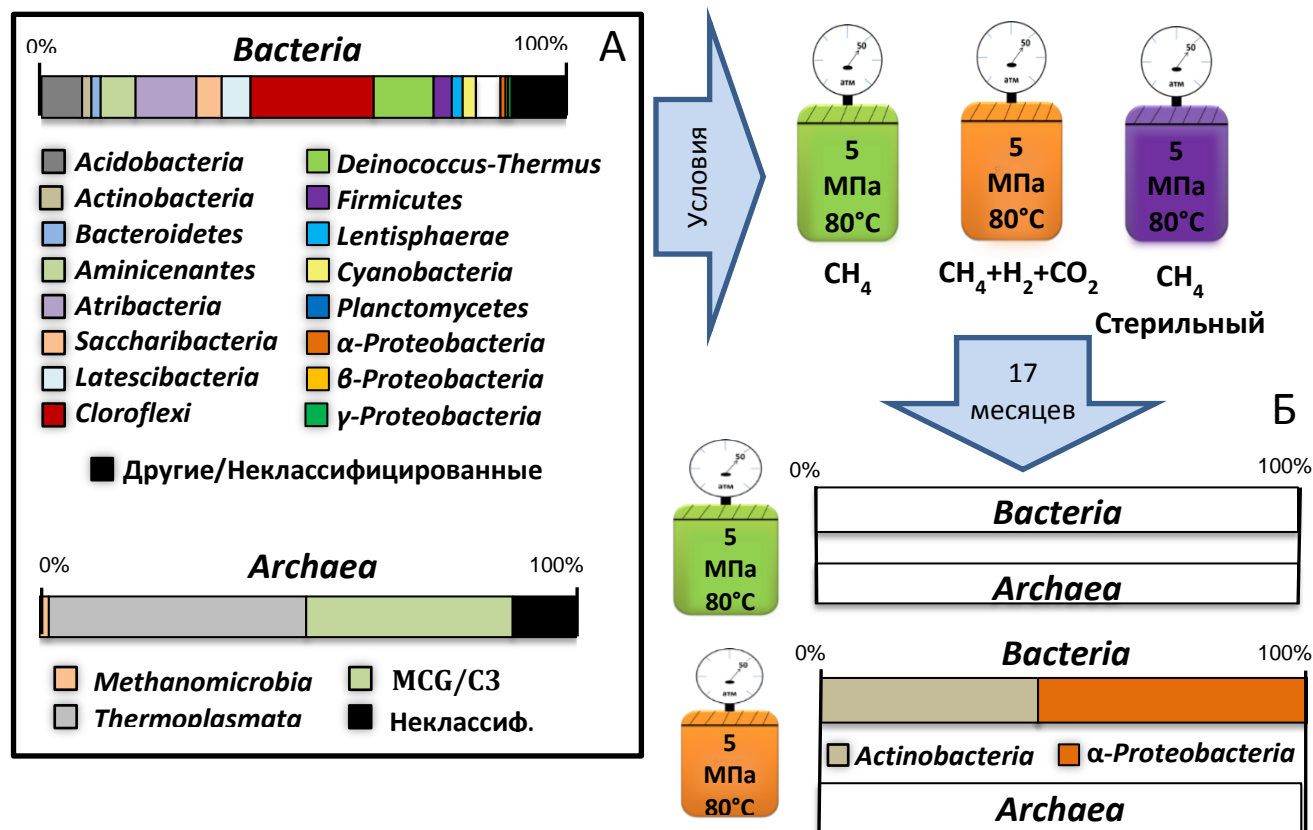


Рис. 21. Схема эксперимента. (А) Суммарный состав микробного сообщества отдельных слоёв донных отложений метанового сипа «Посольская Банка» до культивирования. (Б) Состав микробного сообщества образцов осадка после 17 месяцев культивирования.

Природное микробное сообщество исследуемых образцов донных отложений представлено филумами, обладающими большим набором метаболических возможностей и широко распространенными в пресноводных экосистемах (Newton et al., 2011). Однако преобладание среди *Bacteria* некультивируемых представителей *Atribacteria* и *Chloroflexi* не характерно для сообществ донных отложений большинства исследованных районов разгрузок нефти и газа на оз. Байкал (Zemskaya et al., 2015), в составе которых, как и в осадках многих других пресноводных озёр (Winters et al., 2014; Zhang et al., 2014; Ding et al., 2015), доминируют представители филумов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Ранее сходное по структуре сообщество, большинство микроорганизмов в котором принадлежат к *Atribacteria*, *Chloroflexi* и *Bathyarchaeota*, было выявлено только в подповерхностных гидрат-ассоциированных осадках метанового сипа «Санкт-Петербург» в центральной котловине озера Байкал (Kadnikov et al., 2012).

Несмотря на присутствие трех перечисленных филумов в составе донных отложений пресноводных озер (Zhang et al., 2014; Ding et al., 2015), их доминирование в большей степени характерно для сообществ различных морских глубинных экосистем, включая сипы и газогидратные сайты (Orcutt et al., 2011; Parkes et al., 2014; Ruff et al., 2015). *Chloroflexi* преимущественно распространены в донных отложениях, богатых органическим веществом, тогда как представители *Atribacteria* составляют основу сообществ гидрат-ассоциированных осадков, а *Bathyarchaeota* содержат большое число разнообразных филогенетических линий и распространены повсеместно (Inagaki et al., 2006; Webster et al., 2006; Yanagawa et al., 2013; Parkes et al., 2014). Для микроорганизмов типов *Chloroflexi* и *Atribacteria* предполагают гетеротрофный метаболизм и участие в различных этапах деструкции детрита или органических веществ, поступающих из других источников (Webster et al., 2006., Kubo et al., 2012; Hug et al., 2013., Dodsworth et al., 2013). Среди представителей типа *Bathyarchaeota* возможно наличие ферментативного типа метаболизма и/или способности к метилотрофному метаногенезу (Evans et al., 2015; Lazar et al., 2015). Ещё одна широко представленная группа архей – *Thermoplasmata*. Несмотря на то, что большинство культивируемых штаммов данного класса изолированы из аэробных/термофильных мест обитания, последовательности некультивированных представителей (некультивированные *Thermoplasmatales* в нашем случае) многочисленны в холодных донных отложениях морских и пресноводных экосистем (Lloyd et al., 2013).

Многочисленность представителей филумов *Atribacteria*, *Chloroflexi*, *Bathyarchaeota* и класса *Thermoplasmata* в анализируемых осадках может быть обусловлена активными процессами деструкции детрита или привносимых углеводородных компонентов в районе разгрузки газа. Косвенно об этом свидетельствует повышенное содержание в керне ацетата-иона и ионов аммония, которые могут образовываться как в ходе локального активного анаэробного разложения органического вещества (и/или нитратредукции), так и непосредственно поступать с глубинным флюидом (Krylov et al., 2008; Sass, Parkes, 2011; Voetius, Wenzhöfer, 2013). Функции первичных и вторичных анаэробов в микробном сообществе исследуемых донных отложений могут выполнять представители и других обнаруженных таксонов, а именно: *Acidobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Aminicenantes*, *Latescibacteria*, *Saccharibacteria*. Микроорганизмы класса *Acidobacteria* могут использовать железо(III) как акцептор электронов при анаэробном дыхании (Ward et al., 2009), тогда как *Planctomycetes* способны анаэробно окислять аммоний (Fuerst, Sagulenko, 2011). Малое количество последовательностей метаногенных архей класса *Methanomicrobia* согласуется с полученными нами данными о низкой активности процессов метангенерации в

слоях исследуемого осадка, залегающих ниже 55 см, а также данными о том, что разгружающийся в сипе метан имеет термогенное происхождение.

Через 17 месяцев термобарического культивирования в автоклавах при окрашивании ДАФИ и АО единичные клетки микроорганизмов детектировались только в образцах донных отложений с добавлением детрита водоросли *S. acuis*. Микроорганизмы, ассоциированные с частицами осадка, в основном были представлены палочковидными формами (рис. 22).

Положительные результаты ПЦР реакции после эксперимента также удалось получить только для препарата тотальной ДНК, экстрагированной из образца донных отложений культивировавшегося в автоклаве № 1 с добавлением детрита водоросли *S. acuis* 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 нуклеотидных последовательности средней длиной 275 пар нуклеотидов, принадлежащих домену *Bacteria*. Археи детектированы не были.

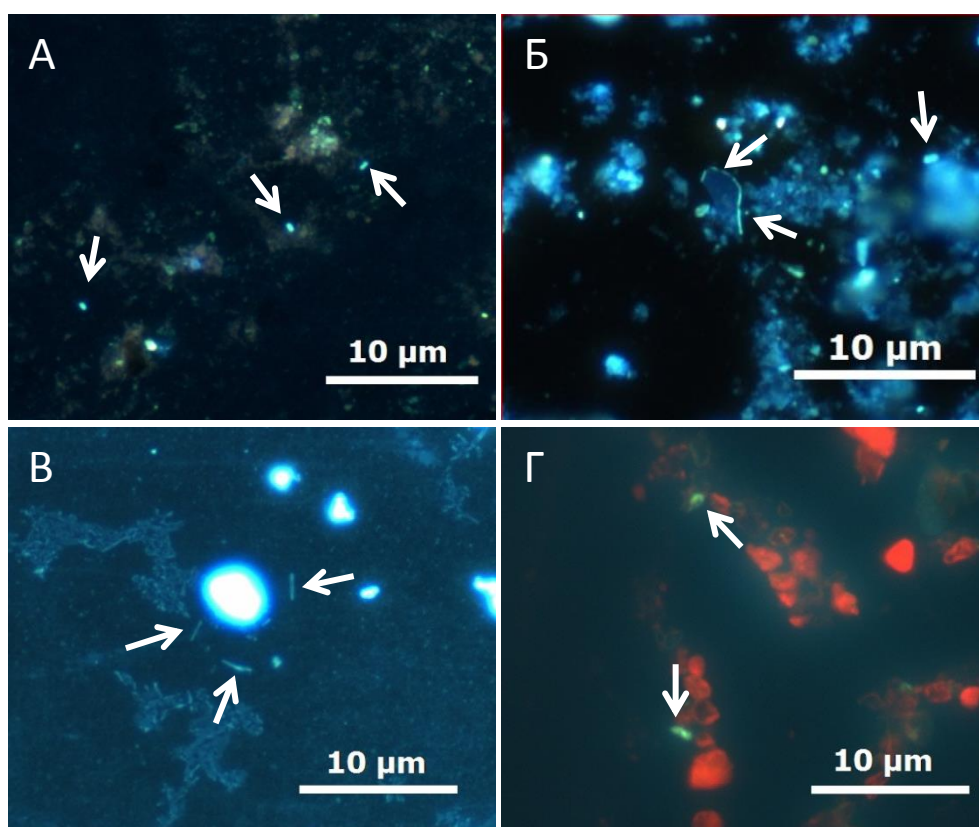


Рис. 22. Морфология микроорганизмов в донных отложениях метанового сипа «Посольская Банка» после культивирования в термобарических условиях. Флуорисцентная микроскопия при окрашивании (А-В) ДАФИ и (Г) АО.

Полученные последовательности были сгруппированы в 41 ОТЕ_{0.03}. Кривые разрежения (рис. 23), а также полученные значения индексов ACE, Chao1 (табл. 6) указывают, что полученного объема секвенирования достаточно для характеристики разнообразия сообществ на уровне рода (генетическая дистанции 0.03).

По результатам таксономической классификации установлено, что 99,4 % всех последовательностей принадлежат микроорганизмам родов *Arthrobacter* (16,6 %) и *Solirubrobacter* (27,5 %), относимых к филуму *Actinobacteria* (44,5 %), а также роду *Sphingomonas* (55,3 %), представляющим класс α -*Proteobacteria* (55,3 %) (рис. 21Б). В свою очередь 0,2 % последовательностей распределены между филумами *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, классами γ , δ - *Proteobacteria*.

Результаты сравнения полученных последовательностей с базой данных NSBI по протоколу BLAST свидетельствуют о том, что последовательности 16S рНК, наиболее сходные с полученными в метагеномном исследовании, принадлежат микроорганизмам, обнаруженным в почве, воде и донных отложениях пресноводных и морских водоёмов, а также в подземных водах и экосистемах загрязнённых углеводородами (табл. 7).

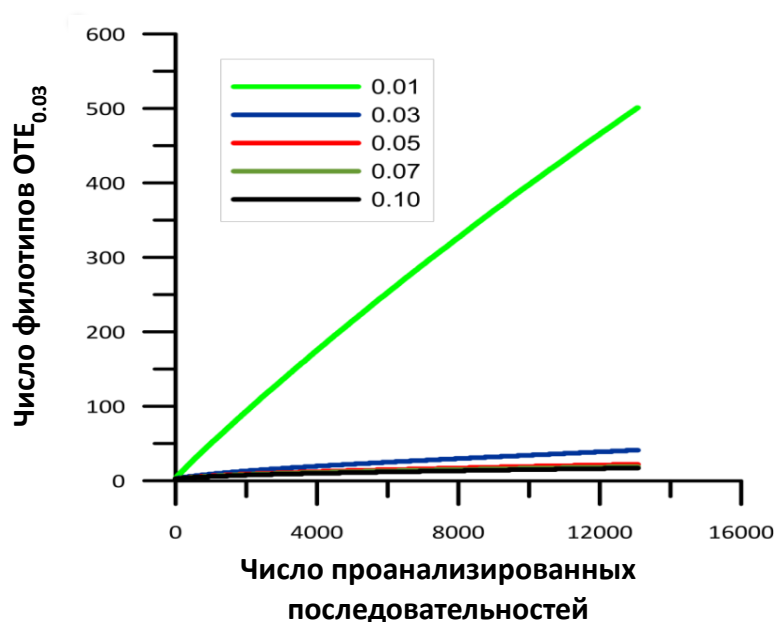


Рис. 23. Разнообразие микробного сообщества в образце донных отложений метанового сипа «Посольская Банка» после 17 месяцев культивирования в термобарических условиях. Показана зависимость числа филоטיפов различного уровня от количества полученных последовательностей региона гена 16S рНК бактерий.

Значительные изменения в составе и разнообразии микробного сообщества природных осадков, произошедшие в ходе экспозиции в экспериментальных условиях, свидетельствует о том, что доминирующие таксоны, вероятно, представлены аборигенными микроорганизмами холодных слоёв донных отложений. В то же время, согласно результатам микроскопического и метагеномного анализов образцов, полученных после 17 месяцев культивирования, среди филумов *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, изначально относимых к редким таксонам, присутствуют микроорганизмы, способные выживать в анаэробных гипертермофильных условиях.

Таблица 6

Качество покрытия и индексы видового богатства и разнообразия для микробного сообщества донных отложений после 17 месяцев культивирования в термобарических условиях

Генетическая дистанция для ОТЕ кластеризации	Качество покрытия, %	Количество ОТЕ	ACE	Chao1	Обратный индекс Симпсона
0,01	96,6	501	2807,8 (2159,3 ÷ 3710,0)	3040,5 (239,3 ÷ 872,2)	2,7 (2,7 ÷ 2,8)
0,03	99,7	41	380,1 (263,5 ÷ 558,0)	447,0 (239,3 ÷ 872,2)	2,4 (2,4 ÷ 2,4)
0,05	99,9	22	83,6 (52,6 ÷ 145,9)	55,0 (30,3 ÷ 153,5)	2,4 (2,4 ÷ 2,4)

Таблица 7

Нуклеотидные последовательности из базы данных NCBI, наиболее родственные последовательностям, полученным из донных отложений после 17 месяцев культивирования в термобарических условиях

Тип/класс	Число последовательностей	Доля, %	Ближайший гомолог	№ в базе NCBI	Место выделения	Сходство, %	E-значение
<i>α-Proteobacteria</i>	7224	55.3	<i>Sphingomonas</i> sp.	LN832012	Нейстон, озеро Байкал, Россия	100	2e-129
			<i>Sphingomonas hunanensis</i>	KF923436	Вечномёрзлая почва, Китай	100	2e-129
			<i>Sphingomonas</i> sp.	FM999997	Грунтовые воды, Финляндия	100	2e-129
			<i>Sphingomonas</i> sp.	GQ249218	Нефтезагрязненная почва, Китай	100	2e-129
			<i>Sphingomonadaceae bacterium</i>	DQ490372	Вулканические породы, США	100	2e-129
<i>Actinobacteria</i>	2174	16.6	<i>Arthrobacter</i> sp.	HQ690898	Морская губка, Тихий океан	100	2e-139
			<i>Arthrobacter</i> sp.	KP756664	Морская вода и песок, Антарктика	99	1e-137
			<i>Arthrobacter agilis</i>	KF306343	Донные осадки Сев.-Ледовитого океана	99	5e-136
			Un. bacterium	HQ606221	Донные осадки, Тихий океан	99	1e-137
			<i>Arthrobacter</i> sp.	KF295504	Ледовый керн, глубина 78.26 м, Китай	99	5e-136
	3586	27.4	Un. bacterium	JQ369448	Почва, США	100	3e-143
Un. <i>Actinobacterium</i>	EU979046	Ризосфера, Китай	100	3e-143			
Un. <i>Solirubrobacterales bacterium</i>	JQ400427	Soil, USA	99	6e-140			
<i>Solirubrobacter</i> sp. ^a	FJ459990	Лесная почва, Южная Корея	90	2e-95			

^a Ближайший культивируемый гомолог

Большинство выявленных после эксперимента филотипов относятся к бактериям родов *Arthrobacter*, *Solirubrobacter* и *Sphingomonas*, представители которых способны утилизировать широкий спектр органических субстратов, в том числе ароматические углеводороды, хлорированные и другие токсичные соединения (Daane et al., 2002; Choi et al., 2004; Story et al., 2004; Nordin et al., 2005), и играют важную роль в микробных сообществах нефтезагрязнённых почв (Peng et al., 2015). Однако культивируемые штаммы данных родов являются типично мезофильными обитателями почв и донных отложений. Кроме того, способность к росту в анаэробных условиях за счёт 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 слоёв 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 позитивные и негативные тепловые аномалии (Naudts et al., 2012) могут свидетельствовать о её функционировании по модели конвективной флюидной петли (Vanneste et al., 2003). Ранее некоторые представители *Arthrobacter*, *Solirubrobacter* и *Sphingomonas* уже 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). По одной из гипотез, широкая распространённость представителей филумов *Actinobacteria* и *Proteobacteria* может объясняться наличием у них «гибкого» метаболизма, позволяющего приспосабливаться к изменениям условий окружающей среды, происходящим в процессе захоронения отдельных слоёв донных отложений и циркуляции флюидных потоков (Ciobanu et al., 2013). В подтверждение этой гипотезы выступает тот факт, что в ассоциированных с угольными прослоями донных отложениях Тихого Океана залегающих на глубине до 2,5 км ниже уровня дна и имеющих температуру 40–60 °С, микробное сообщество состояло из представителей типов *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и др., являющихся типичными обитателями лесных почв (Inagaki et al., 2015).

Наличие признаков микробной активности через 17 месяцев культивирования только в донных отложениях, обогащенных детритом *S. acus*, может объясняться относительной

высокой концентрацией органического вещества и наличием таких источников углерода и электронов как CO₂ и H₂, что могло поддерживать жизнедеятельность как органотрофных, так и автотрофных микроорганизмов. В осадке с добавлением детрита представители выявленного сообщества также могли использовать субстраты, образующиеся в ходе низкотемпературной активации органического вещества. Ранее в экспериментальных условиях было продемонстрировано, что нагрев донных отложений может приводить к деструкции органических и неорганических соединений, что в свою очередь приводит к образованию водорода и стимулированию развития населяющих их популяций прокариот. Однако в случае стерильных образцов осадка никаких геохимических изменений не наблюдалось даже при их нагревании до температур 100 °С (Parkes et al., 2011).

О том, что под воздействием микробного сообщества в термобарических условиях эксперимента происходят процессы преобразования органического вещества, свидетельствуют результаты хромато-масс-спектрометрического анализа донных осадков, обогащённых детритом водоросли *S. acus*, до и после 17 месяцев эксперимента. Так, значимые изменения в составе органического вещества наблюдались лишь в образце из автоклава № 1. Содержание C_{орг} в осадке ходе эксперимента снизилась с 0,77 % до 0,66 %. Содержание растворимого в хлороформе битумоида в осадке до и после эксперимента составило всего 0,02 %, что не позволило выделить асфальтены. Количество насыщенных углеводородов в битумоиде образца до эксперимента составило 19,6 %, асфальтово-смолистых компонентов – 80,4 %. В образце после эксперимента содержание последних увеличилось до 91,2 %. Ароматическая фракция в образце до эксперимента отсутствовала, тогда как после эксперимента она составила 4,4 %. Битумоидные коэффициенты (отношение выхода экстракта к содержанию C_{орг}) образцах до и после эксперимента составили 2,68 и 3,48 соответственно. Соотношения ациклических изопреноидов пристан/фитан возросло с 0,53 до 0,63. Индекс нечетности для высокомолекулярных углеводородов (carbon preference index, CPI), рассчитанный по формуле 3 уменьшился с 5,1 до 3.

$$CPI = \frac{(C_{23}+C_{27}+C_{29}+C_{31})}{(C_{26}+C_{28}+C_{30}+C_{32})}, \quad (3)$$

Кривая распределения нормальных алканов в образце до эксперимента (прил. 1) «пилообразная», асимметричная с максимумом на C₃₁. Величина отношения n-C₂₇/n-C₁₇ равна 10. Параметры распределения нормальных алканов в образце после эксперимента изменились (прил. 1). Величина отношения n-C₂₇/n-C₁₇ стала равной 15,4.

В составе циклических углеводородов-биомаркеров стеранового ряда (C₂₇–C₃₀) в насыщенной фракции образцов до и после эксперимента доминировали этилхолестаны (37,3% и 39,2 %, соответственно). Среди терпанов, в осадке после эксперимента преобладали гопаны

C₂₇–C₃₅ – 53,0 % (прил. 2). В этой же фракции после эксперимента зафиксировано увеличение содержания таких биомаркеров как гаммацерен и ретен (прил. 3)

В ходе культивирования значение коэффициента CPI уменьшилось с 5,1 до 3, что свидетельствует о том, что степень превращения углеводородной составляющей органического вещества достигла 41 %. 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 термического превращения ОВ количество четных и нечетных молекул УВ выравнивается. Коэффициент CPI по величине становится близким к единице и в последующих позднекатагенных преобразованиях (после прохождения главной стадии нефтеобразования) не меняется (Mukhopadhyay et al., 1979). В природе температурные условия термического разложения ОВ (катагенеза) варьируют от 85 до сотен градусов Цельсия (Schobert, 2013), однако в нашем случае (культивирование при 80 °С) фиксируемые изменения являются следствием процессов биологической деструкции, так как данные значения с одной стороны 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.

Еще одной отличительной особенностью является образование пентациклического биомаркера гаммацерена. Гаммацерен, также как и его предшественник гаммацеран, как правило, рассматривается как признак накопления отложений в соленой среде (Sinninghe Damste et al., 1995; Peters et al., 2005). В нашем случае, исходный субстрат являлся пресноводным, о чем свидетельствует численная величина соотношения изопреноидов пристан/фитан. На основании данных, полученных в работе (Vaz dos Santos Neto et al., 1998), $\delta^{13}\text{C}$ гаммацерана свидетельствуют о его происхождении из биомассы простейших, цианобактерий и других микроорганизмов растущих в различных палеоусловиях (Vaz dos Santos Neto et al., 1998). Кроме того, гаммацеран основной биомаркер во многих озёрных нефтях и битумах, включая нефтяное месторождение «Green river» в Китае, где органическое вещество в основном представлено детритом водорослей и бактерий (Peters et al., 2005).

Сходные результаты были выявлены ранее в наших исследованиях по культивированию микробного сообщества донных отложений метанового сипа «Голойстное» (Южный Байкал). В образцах после эксперимента было зафиксировано образование полициклического ароматического углеводорода, ретена. Наши экспериментальные данные подтверждают, что ретен мог быть образован в процессе деструкции биомассы диатомовой водоросли, осуществляемой микробным сообществом донных отложений озера Байкал (Pavlova et al., 2016). Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что

микробные сообщества донных отложений озера Байкал с различными геохимическими характеристиками при достаточном количестве органического вещества и определенных температурных условиях способны осуществлять деструкцию органических субстратов с образованием таких компонентов нефти как ретен и гаммацерен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробные сообщества донных отложений морских и пресноводных водоёмов играют важную роль в круговороте биогенных элементов, продукции, трансформации и деструкции органического вещества, тем самым принимая непосредственное участие в установлении динамического равновесия между биогеохимическими процессами в донных отложениях и водной толще. Различия в составе и численности микробных популяций донных осадков с различным набором физико-химических параметров могут отражать динамику протекающих в них биогеохимических процессов. Таким образом, исследование структуры микробных сообществ является актуальной задачей фундаментальной микробиологии, представляя собой один из важнейших шагов к пониманию механизмов функционирования биогеохимических циклов в донных отложениях и экологической роли тех или иных групп микроорганизмов.

Особый интерес для изучения представляют микробные популяции, населяющие донные осадки районов субаквальных разгрузок углеводородов озера Байкал, где физико-химические параметры среды изменяются под влиянием состава разгружающихся флюидов. Ещё одной особенностью таких районов является возможность поступления в поверхностные осадки вместе с потоком флюида представителей микробных сообществ глубинных слоёв донных отложений, изучение состава и метаболических возможностей которых позволяет ответить на вопрос о роли биологической компоненты в процессах деструкции керогена и ранней генерации углеводородов в озере.

Методами классической и молекулярной биологии в работе исследовано разнообразие природных микробных сообществ донных отложений подводного поднятия Посольская Банка (Южный Байкал) в зоне выхода термогенного газа и их способность к деструкции органического вещества с образованием углеводородов при росте в психрофильных и термобарических условиях экспериментов.

С помощью метода массового параллельного секвенирования в микробных сообществах всех исследуемых слоёв осадка обнаружены представители девяти типов бактерий: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Aminicenantes* (OP8) и *Atribacteria* (OP9), *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* (α , β и δ), и четырёх типов архей: *Bathyarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota*, однако видовой состав микроорганизмов был индивидуален для каждого слоя. По структуре бактериальное сообщество донных осадков Посольской Банки с первых сантиметров отложений значительно отличается от сообществ других районов разгрузки углеводородов оз. Байкал. Наряду с представителями типично малочисленных таксонов (*Chloroflexi*, *Atribacteria*, *Aminicenantes*), способных обеспечивать начальные этапы деструкции органического вещества, значительную долю в сообществах составляют анаэробные хемолитотрофные микроорганизмы, участвующие в циклах азота

(*Thaumarchaeota*, *Nitrospira*, β -*Proteobacteria*) и серы (δ -*Proteobacteria*), в то время как доля *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* и метаногенных *Euryarchaeota* невелика. Структура сообществ донных отложений, ассоциированных с прослоями газовых гидратов, отличалась присутствием значительного количества последовательностей органотрофных микроорганизмов филумов-кандидатов *Aminicenantes*, *Latescibacteria*, *Saccharibacteria*.

В результате исследования низкотемпературных процессов образования углеводородных газов для микробных сообществ донных осадков метанового сипа «Посольская Банка» установлена способность к образованию, как метана, так и этана. Наибольшая концентрация этана выявлена в накопительных культурах, развивавшихся на среде с углекислым газом в качестве источника углерода и содержащих микробное сообщество донных осадков, прилегающих к газовым гидратам. В этих же накопительных культурах на основе анализа фрагментов гена 16S рНК выявлены представители порядков *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Thermoplasmatales* и филума *Bathyarchaeota*. В восстановленных с поверхности, газонасыщенных осадках сипа с наибольшей активностью процессы образования метана протекали в накопительных культурах, содержащих микробное сообщество с глубины 50–80 см, в то время как в донных отложениях удалённых от места разгрузки, активное метаногенное сообщество было обнаружено и в поверхностном окисленном слое. Установлено, что в психрофильных условиях эксперимента метаногенные сообщества с различных глубин донных отложений способны продуцировать метан по автотрофному пути, в том числе при участии архей родов *Methanocella* и *Methanobacterium*. Эффективное использование метилированных субстратов метаногенеза было зафиксировано только при культивировании сообществ поверхностного окисленного слоя осадка.

По результатам термобарического эксперимента присутствие жизнеспособных микроорганизмов и процессы трансформации органического вещества с образованием таких углеводородов как ретен и гаммацерен, выявлены в образцах донных отложений с добавлением детрита диатомовой водоросли *Synedra acus* культивировавшихся в атмосфере, состоящей из смеси газов $\text{CH}_4:\text{H}_2:\text{CO}_2$. На основе анализа последовательностей гена 16S рНК в микробном сообществе данных образцов выявлено присутствие микроорганизмов родов *Sphingomonas*, *Solirubrobacter* и *Arthrobacter*. В образцах стерильного осадка и донных отложениях без дополнительных субстратов наличие последовательностей 16S рНК представителей *Bacteria* и *Archaea* и каких-либо изменений в составе органического вещества обнаружено не было.

Таким образом, в донных отложениях исследуемого района разгрузки термогенного газа сформированы микробные сообщества, ориентированные как на разложение органического вещества с образованием метана и этана, так и использование энергии поступающих с флюидом неорганических соединений и восстановленных газов. Вместе с тем поступление

газонасыщенного флюида обуславливает наличие в микробном сообществе микроорганизмов способных к трансформации органического вещества в термобарических условиях с образованием биомаркеров нефти.

ВЫВОДЫ

1. С помощью метода массового параллельного секвенирования исследовано разнообразие микробных сообществ в пяти слоях донных отложений подводного поднятия Посольская Банка в зоне выхода углеводородных газов. Во всех исследованных сообществах обнаружено присутствие девяти филумов бактерий: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Aminicenantes* (OP8) и *Atribacteria* (OP9), *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, и *Proteobacteria*, среди которых наиболее представительны последовательности последних двух (42 % и 46 % соответственно). Архейные сообщества включали представителей филумов *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Bathyarchaeota* и *Euryarchaeota*.

2. Экологические условия - влияние потока газа и флюидов, проходящих сквозь изучаемый осадок и обеспечивающих создание восстановительных условий среды, а также поступление дополнительных источников углерода и энергии, обуславливают отличие состава и структуры бактериального сообщества донных осадков Посольской Банки от сообществ других районов разгрузки углеводородов оз. Байкал. С первых сантиметров отложений, наряду с представителями типично малочисленных таксонов (*Chloroflexi*, *Atribacteria*, *Aminicenantes*), способных выполнять начальные этапы деструкции органического вещества, значительную долю составляют анаэробные хемолитотрофные микроорганизмы участвующие в циклах азота (*Thaumarchaeota*, *Nitrospira*, β -*Proteobacteria*) и серы (δ -*Proteobacteria*).

3. Различие геохимических условий и литологической структуры донных отложений района глубоководного метанового сипа «Посольская Банка» влияет на субстратную специфичность и активность процессов генерации метана. Активные метаногенные сообщества присутствуют как в поверхностном окисленном, так и в глубинных восстановленных слоях донных отложений. Метаногенные сообщества донных отложений Посольской Банки в психрофильных условиях образуют метан по автотрофному пути, в том числе при участии архей родов *Methanocella* и *Methanobacterium*.

4. Впервые, в условиях эксперимента с микробными сообществами донных осадков оз. Байкал установлено, что в накопительных культурах метаногенов образуется не только метан, но и этан. Образование в значительных количествах этана (до 26,8 об. % в перерасчёте на углеводородные газы) зафиксировано в пробах, содержащих в качестве источника углерода как CO₂, так и ацетат натрия. В этаногенном сообществе на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК выявлены представители порядков *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Thermoplasmatales* и филума *Bathyarchaeota*.

5. Установлено, что длительное культивирование микробных сообществ донных осадков глубоководного сипа «Посольская Банка», в термобарических условиях (80°C, 5 МПа), обогащённых детритом водоросли *Synedra acus* и газовой смесью CH₄:H₂:CO₂ способствует

развитию термофильных микроорганизмов, осуществляющих деструкцию биомассы диатомей с образованием биомаркеров нефти, таких как ретен и гаммацерен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барам Г. И. Микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием для определения анионов в объектах окружающей среды / Г. И. Барам, А. Л. Верещагин, Л. П. Голобокова // Ж. аналит. химии. – 1999. – Т. 54, № 9. – С. 962–965.
2. Богданов Ю. А. Обнажения миоценовых осадков на дне озера Байкал и время сбросообразования (по наблюдениям с подводных обитаемых аппаратов 'Пайсис') / Ю. А. Богданов, Л. П. Зоненшайн // Докл. АН СССР. – 1991. – Т. 320, № 4. – С. 931–933.
3. Большаков А. М. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях в акваториях / А. М. Большаков, А. В. Егоров // Океанология. – 1987. – Т. 37, № 5. – С. 861–862.
4. Гранина Л. З. Аномалии состава поровых вод донных осадков Байкала / Л. З. Гранина, Е. Каллендер, И. С. Ломоносов, В. Д. Матц // Геология и геофизика. – 2001. – Т. 42, № 1–2. – С. 362–372.
5. Гранина Л. З. Ранний диагенез донных осадков озера Байкал. – Новосибирск: Академ. изд-во «Гео», 2008. – 160 с.
6. Дагурова О. П. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал / О. П. Дагурова, Б. Б. Намсараев, Л. П. Козырева, Т. И. Земская, Л. Е. Дулов // Микробиология. – 2004. – Т. 74, № 2. – С. 248–257.
7. Зоненшайн Л. П. Структура Байкальского рифта / Л. П. Зоненшайн, А. Я. Гольмшток, Д. Хатчинсон // Геотектоника. – 1992. – № 5. – С. 63–78.
8. Калмычков, Г. В. Генетические типы метана озера Байкал / Г. В. Калмычков, А. В. Егоров, М. И. Кузьмин, О. М. Хлыстов // ДАН. – 2006. – Т. 411. – С. 672–675.
9. Каширцев В. А. Биодеградация насыщенных циклических хемофоссилий / В. А. Каширцев, А. Э. Конторович, Р. П. Филп, О. Н. Чалая, И. Н. Зуева, И. К. Иванова, Н. П. Меметова // Геология и геофизика. – 2001. – Т. 42, № 11–12. – С. 1792–1800.
10. Клеркс Я. Гидраты метана в поверхностном слое глубоководных осадков озера Байкал / Я. Клеркс, Т. И. Земская, Т. В. Матвеева, О. М. Хлыстов, Б. Б. Намсараев, О. П. Дагурова, Л. П. Голобокова, С. С. Воробьева, Т. П. Погодаева, Н. Г. Гранин, Г. В. Калмычков, В. А. Пономарчук, Х. Шоджи, Л. Л. Мазуренко, В. В. Каулио, В. А. Соловьев, М. А. Грачев // ДАН. – 2003. – Т. 393, № 6. – С. 822–826.
11. Конторович А. Э. Нефтегазоносность отложений оз. Байкал / А. Э. Конторович, В. А. Каширцев, В. И. Москвин, Л. М. Бурштейн, Т. И. Земская, Г. В. Калмычков, Е. А. Костырева, О. М. Хлыстов // Геология и геофизика. – 2007. – Т. 48, № 12. – С. 1346–1356.
12. Кузьмин, М. И. Первая находка газогидратов в осадочной толще озера Байкал / М. И. Кузьмин, Г. В. Калмычков, В. Ф. Гелетий // ДАН. – 1998. – Т. 362, № 4. – С. 541–543.

13. Кузьмин М. И. Глубоководное бурение на Байкале – основные результаты / М. И. Кузьмин, Е. Б. Карабанов, Т. Каваи, Д. Ф. Вильямс, В. А. Бычинский, Е. В. Кербер, В. А. Кравчинский, Е. В. Безрукова, А. А. Прокопенко, Г. К. Хурсевич, А. Н. Гвоздков, В. Ф. Гелетий, Г. В. Калмычков, А. В. Горегляд, В. С. Антипин, М. Ю. Хомутова, Н. М. Сошина, Е. В. Иванов, Г. К. Хурсевич, Л. Л. Ткаченко, Э. П. Солотчина, Н. Йошида, А. Н. Гвоздков // Геология и геофизика. – 2001. – Т. 42, № 1–2. – С. 8–34.
14. Леин А. Ю. Биогеохимический цикл метана в океане / А. Ю. Леин, М. В. Иванов. – М.: Наука, 2009. – 576 с.
15. Ломакина А. В. Микробные сообщества зоны разгрузки газонефтедержащих флюидов ультрапресного озера Байкал / А. В. Ломакина, Т. В. Погодаева, И. В. Морозов, Т. И. Земская // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 3. – С. 355–365.
16. Макаров М. М. Пузырьковые выходы метана из донных отложений озера Байкал : географ. исслед. : дис. ... канд. географ. наук : 25.00.28. – Иркутск, 2016. – 116 с.
17. Манаков А. Ю. Физико-химическая модель образования газовых гидратов с различным структурным типом на грязевом вулкане К2 (Кукуйский каньон, озеро Байкал) / А. Ю. Манаков, О. М. Хлыстов, А. Хачикубо, А. Г. Огиенко // Геология и геофизика. – 2013. – Т. 54, № 4. – С. 615–625.
18. Мизандронцев И.Б. Осадкообразование // Труды ЛИН СО АН СССР. – 1978. – Т. 16, № 36. – С. 33–46.
19. Михайлов И. С. Об однородности таксономического состава бактериальных сообществ фотического слоя трех котловин озера Байкал, различающихся по составу и обилию весеннего фитопланктона / И. С. Михайлов, Ю. Р. Захарова, Ю. П. Галачьянц, М. В. Усольцева, Д. П. Петрова, М. В. Сакирко, Е. В. Лихошвай, М. А. Грачев // ДАН. – 2015. – Т. 465, № 5. – С. 620–626.
20. Намсараев Б. Б. Бактериальное образование метана в донных осадках озера Байкал / Б. Б. Намсараев, Л. Е. Дулов, Е. Н. Соколова, Т. И. Земская // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 411–417.
21. Намсараев Б. Б. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал : монография / Б. Б. Намсараев, Т. И. Земская ; под ред. В.М. Горленко. – Новосибирск : Академ. изд-во «Гео», 2000. – 160 с.
22. Пименов Н. В. Микробные процессы в зонах разгрузки газосодержащих флюидов на дне океана // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Вып. XII. Юбилейный сборник к 70-летию института. – М. : Наука, 2004. – С. 337–360.
23. Пименов Н. В. Активность и структура сообщества сульфат-редуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал / Н. В. Пименов, Е. Е. Захарова, А. Л. Брюханов, В.

- А. Корнеева, Б. Б. Кузнецов, Т. П. Турова, Т. В. Погодаева, Г. В. Калмычков, Т. И. Земская // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 2. – С. 180–190.
24. Погодаева Т. В. Особенности химического состава поровых вод донных отложений различных районов озера Байкал / Т. В. Погодаева, Т. И. Земская, Л. П. Голобокова, О. М. Хлыстов, Х. Минами, Х. Сакагами // Геология и геофизика. – 2007. – Т. 48, № 11. – С. 1144–1160.
25. Тарасов, А. Л. Исследование трофических связей анаэробных микроорганизмов из подземного хранилища газа в процессе утилизации метанола / А. Л. Тарасов, И. А. Борзенков, С. С. Беляев // Микробиология. - 2011. - Т. 80, N2. - С. 192–199.
26. 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.
27. Хлыстов О. М. Геологическое и биогеохимическое изучение осадков Байкала в районе разгрузки метана / О. М. Хлыстов, О. В. Шубенкова, С. М. Черницына, Т. И. Земская, О.П. Дагурова // Матер. конф. мол. учен., посвящ. М. А. Лаврентьеву [Новосибирск, 4-6 декабря 2001 г.]: сборн. в 2 ч. Ч. 2 - Новосибирск: Академ. изд-во «Гео», 2002. – С. 209–214.
28. Хлыстов, О.М. Новые находки газовых гидратов в донных осадках озера Байкал // Геология и геофизика. – 2006. – Т. 47, № 8. – С. 979–981.
29. Хлыстов О. М. Нефть в озере мирового наследия / О. М. Хлыстов, А. Г. Горшков, А. В. Егоров, Т. И. Земская, Н. Г. Гранин, Г. В. Калмычков, С. С. Воробьева, О. Н. Павлова, М. А. Якуп, М. М. Макаров, В. И. Москвин, М. А. Грачев // ДАН. – 2007. – Т. 414, № 5. – С. 656–659.
30. Холодов В. Н. Грязевые вулканы: распространение и генезис // Геология и полезные ископаемые мирового океана. – 2012. – № 4. – С. 5–27.
31. Черницына С. М. Сравнительный молекулярный анализ микробных сообществ в голоценовых и плейстоценовых осадках из района Посольской Банки (озеро Байкал) / С. М. Черницына, Т. И. Земская, С. С. Воробьева, О. В. Шубенкова, О. М. Хлыстов, Т. Я. Косторнова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 1. – С. 116–125.
32. Шубенкова О. В. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана / О. В. Шубенкова, Т. И. Земская, С. М. Черницына, О. М. Хлыстов, Т. И. Трибой // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 370–377.
33. Aitken C. M. Evidence that crude oil alkane activation proceeds by different mechanisms under sulfate-reducing and methanogenic conditions / C. M. Aitken, D. M. Jones, M. J. Maguire, N. D.

- Gray, A. Sherry, B. F. J. Bowler, A. K. Ditchfield, S. R. Larter, I. M. Head // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2013. - № 109. P. 162–174.
34. Amann R. I. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations / R. I. Amann, B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, D. A. Stahl // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56, № 6. – P. 1919–1925.
 35. Anderson R. E. Biogeography and ecology of the rare and abundant microbial lineages in deep-sea hydrothermal vents / R. E. Anderson, M. L. Sogin, J. A. Baross // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2014. – V. 91, № 1. – P. 1–11.
 36. Baker B. J. Corrigendum: Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface *Archaea*, *Hadesarchaea* / B. J. Baker, J. H. Saw, A. E. Lind, C. S. Lazar, K.-U. Hinrichs, A. P. Teske, T. J. G. Ettema // *Nat. Microbiol.* – 2016. – V. 1. – Art. № 16032.
 37. Balk M. Oxidation of water to hydrogen peroxide at the rock–water interface due to stress-activated electric currents in rocks / M. Balk, M. Bose, G. Ertem, D. A. Rogoff, L. J. Rothschild, F. T. Freund // *Earth Planet. Sci. Lett.* – 2009. – V. 283, № 1-4. – P. 87–92.
 38. Balkwill D. L. Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. / D. L. Balkwill, G. R. Drake, R. H. Reeves, J. K. Fredricson, D. C. White, D. B. Ringelberg, D. P. Chandler, M. F. Romine, D. W. Kennedy, C. M. Spadoni // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 1997. – V. 47, № 1. – P. 191–201.
 39. Barnes S. P. Isolation of sulfate-reducing bacteria from deep sediment layers of the Pacific Ocean / S. P. Barnes, S. D. Bradbrook, B. A. Cragg, J. R. Marchesi, A. J. Weightman, J. C. Fry, R. J. Parkes // *Geomicrobiol. J.* – 1998. – V. 15 № 2. – P. 67–83.
 40. Batzke A. Phylogenetic and physiological diversity of cultured deep-biosphere bacteria from equatorial Pacific Ocean and Peru Margin sediments / A. Batzke, B. Engelen, H. Sass, H. Cypionka // *Geomicrobiol. J.* – 2007. – V. 24, № 3-4. P. 261–273.
 41. Baumer S. The F₄₂₀H₂ dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases // *Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, № 24. – P. 17968–17973.
 42. Beal E. J. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation / E. J. Beal, C. H. House, V. J. Orphan // *Science*. – 2009. – V. 325, № 5937. – P. 184–187.
 43. Bennett B. The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface – Part 3. The impact of microorganism distribution on petroleum geochemical gradients in biodegraded petroleum reservoirs / B. Bennett, J. J. Adams, N. D. Gray, A. Sherry, T. B. P. Oldenburg, H. Huang, S. R. Larter, I. M. Head // *Org. Geochem.* – 2013. – V. 56. – P. 94–105.

44. Bezrukova E. A. new quaternary record of regional tectonic, sedimentation and paleoclimate changes from drill core BDP-99 at Posolskaya Bank, Lake Baikal / Baikal Drilling Project members // *Quat. Int.* – 2005. – V. 136, № 1. – P. 105–121.
45. Biddle J. F. Prospects for the study of evolution in the deep biosphere / J. F. Biddle, J. B. Sylvan, W. J. Brazelton, B. J. Tully, K. J. Edwards, C. L. Moyer, J. F. Heidelberg, W. C. Nelson // *Front. Microbiol.* – 2012. – V. 2. – Art. № 285.
46. Blair C. C. Radiolytic hydrogen and microbial respiration in subsurface sediments / C. C. Blair, S. D'Hondt, A. J. Spivack, R. H. Kingsley // *Astrobiol.* – 2007. – V.7, № 6. – P. 951–970.
47. Bleicher K. Growth of methanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase / K. Bleicher, G. Zellner, J. Winter // *FEMS Microbiol. Let.* – 1989. – V. 59, № 3. – P. 307–312.
48. Boetius A. Seafloor oxygen consumption fueled by methane from cold seeps / A. Boetius, F. Wenzhöfer // *Nat. Geosci.* – 2013. – V. 6, № 9. – P. 725–734.
49. Bonch-Osmolovskaya E. A. Radioisotopic, culture-based and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir / E. A. Bonch-Osmolovskaya, M. L. Miroshnichenko, A. V. Lebedinsky, N. A. Chernyh, T. N. Nazina, V. S. Ivoilov, S. S. Belyaev, E. S. Boulygina, Yu. P. Lysov, A. N. Perov, A. D. Mirzabekov, H. Hippe, E. Stackebrandt, S. L'Haridon, C. Jeanthon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, № 10. – P. 6143-6151.
50. Borrel G. Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association / G. Borrel, P. S. Adam, S. Gribaldo // *Genome Biol. Evol.* – 2016. – V. 8, № 6. – P. 1706–1711.
51. Bott M. Proton-motive-force-driven formation of CO from CO₂ and H₂ in methanogenic bacteria / M. Bott, R. K. Thauer // *Eur. J. Biochem.* – 1987. – V. 168, № 2. – P. 407–412.
52. Bradbury J. P. A synthesis of post-glacial diatom records from Lake Baikal / J. P. Bradbury, Y. V. Bezrukova, G. P. Chernyaeva, S. M. Colman, G. Khursevich, J. W. King, Ye. V. Likoshway // *J. Paleolimnol.* – 1994. – V. 10, № 3. – P. 213–252.
53. Breuker, A. The deep biosphere in terrestrial sediments in the Chesapeake Bay area, Virginia, USA / A. Breuker, G. Köweker, A. Blazejak, A. Schippers // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2. – Art. № 156.
54. Bryant M. P. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria / M. P. Bryant, E. A. Wolin, M. J. Wolin, R. Wolfe // *Archiv. Mikrobiol.* – 1967. – V. 59, № 1-3. – P. 20–31.

55. Burke S. A. Reconstitution of monomethylamine: coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri* / S. A. Burke, J. A. Krzycki // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272, № 26. – P. 16570–16577.
56. Burggraf S. Identifying members of the domain *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes / S. Burggraf, T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauer, C. R. Woese, K. O. Stetter // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60, № 9. – P. 3112–3119.
57. Capone D. G. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism / D. G. Capone, R. P. Kiene // Limnol. Oceanogr. – 1988. – V. 33, № 4. – P. 725–749.
58. Cardman Z. Verrucomicrobia are candidates for polysaccharide-degrading bacterioplankton in an arctic fjord of Svalbard / Z. Cardman, C. Arnosti, A. Durbin, K. Ziervogel, C. Cox, A. D. Steen, A. Teske // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80, № 12. – P. 3749-3756.
59. Carr S. A. Abundant *Atribacteria* in deep marine sediment from the Adelie Basin, Antarctica / S.A. Carr, B. N. Orcutt, K. W. Mandernack, J. R. Spear // Front. Microbiol. – 2015. –V. 6. – Art. № 872.
60. Chang H. W. *Arthrobacter subterraneus* sp. nov., isolated from deep subsurface water of the South Coast of Korea / H. W. Chang, J. W. Bae, Y. D. Nam, H. Y. Kwon, J. R. Park, K. S. Shin, K. H. Kim, Z. X. Quan, S. K. Rhee, K. G. An, Y. H. Park // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 17, № 11. – P. 1875–1879.
61. Charlet F. Sedimentary dynamics on isolated highs in Lake Baikal: evidence from detailed high-resolution geophysical data and sediment cores / F. Charlet, N. Fagel, M. De Batist, F. Hauregard, B. Minnebo, D. Meischner // Global Planet. Chang. – 2005. – V. 46, № 1-4. – P. 125–144.
62. Choi K. K. Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater / K. K. Choi, C. W. Park, S. Y. Kim, W. S. Lyoo, S. H. Lee, J. W. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 14, № 5. – P. 1009-1013.
63. Ciobanu M.-C. Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin / M.-C. Ciobanu, G. Burgaud, A. Dufresne, A. Breuker, V. Rédou, S. Ben Maamar, F. Gaboyer, O. Vandenabeele-Trambouze, J. S. Lipp, A. Schippers, P. Vandenkoornhuyse, G. Barbier, M. Jebbar, A. Godfroy, K. Alain // ISME J. – 2014. – V. 8, № 7. – P. 2352–2352.
64. Claypool G. E. Biogenic ethane: Where does it come from? // Natural gas formation and occurrence: AAPG Hedberg Conf. Abst. (Durango, Colorado, June 6-10, 1999). Durango. – 1999. – P. 27–29.

65. Conrad M. E. Seasonally-induced fluctuations in microbial production and consumption of methane during bioremediation of aged subsurface refinery contamination / M. E. Conrad, A. S. Templeton, P. F. Daley, L. Alvarez-Cohen // *Environ. Sci. Technol.* – 1999. – V. 33, № 22. – P. 4061–4068.
66. Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1999. – V. 28, № 3. – P. 193–202.
67. Cowen J. P. Fluids from aging ocean crust that support microbial life / J. P. Cowen, S. J. Giovannoni, F. Kenig, H. P. Johnson, D. Butterfield, M. S. Rappé, M. Hutnak, P. Lam // *Science.* – 2003. – V. 299, № 5603. – P. 120–123.
68. Crocker F. H. Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments / F. H. Crocker, J. K. Fredrickson, D. C. White, D. B. Ringelberg, D. L. Balkwill // *Microbiology+*. – 2000. – V. 146, № 6. – P. 1295-310.
69. D'Hondt S. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments / S. D'Hondt, B. B. Jørgensen, D. J. Miller, A. Batzke, R. Blake, B. A. Cragg, et al. // *Science.* – 2004. – V. 306, № 5705. – P. 2216–2221.
70. Daane L. L. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants / L. L. Daane, I. Harjono, S. M. Barns, L. A. Launen, N. J. Palleron, M. M. Häggblom // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52, № 1. – P. 131-139.
71. Davis J. B. Detection of microbially produced gaseous hydrocarbons other than methane / J. B. Davis, R. M. Squires // *Science.* – 1954. – V. 119, № 3090. – P. 381–382.
72. De Batist M. Active hydrate destabilization in Lake Baikal, Siberia? / M. De Batist, J. Klerkx, P. Van Rensbergen, M. Vanneste, J. Poort, A. Golmshtok, A. Kremlev, O. Khlystov, P. Krinitsky // *Terra Nova.* – 2002. – V. 14, № 6. – P. 436–442.
73. DeLong E. F. Archaea in coastal marine environments // *P. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – P. 5685- 5689.
74. DeMoll E. Nitrogen and phosphorus metabolism of methanogens / E. De Moll; eds. J. G. Ferry // *Methanogenesis - Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics.* – New York: Chapman & Hall, 1993. – P. 473–489.
75. Denisova L. Ya. Bacterial diversity at various depths in the Southern part of Lake Baikal as revealed by 16S rDNA sequencing / L. Ya. Denisova, N. L. Bel'kova, I. I. Tulokhonov, E. F. Zaichikov // *Microbiology.* – 1999. – V. 68, № 4. – P. 475-483.

76. Ding X. Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in a beach wetland of the largest freshwater lake in China / X. Ding, X.-J. Peng, B.-S. Jin, M. Xiao, J.-K. Chen, B. Li, C.-M. Fang, M. Nie // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6. – Art. № 129.
77. Dodsworth J. A. Single-cell and metagenomic analyses indicate a fermentative and saccharolytic lifestyle for members of the OP9 lineage / J. A. Dodsworth, P. C. Blainey, S. K. Murugapiran, W. D. Swingley, C. A. Ross, S. G. Tringe // *Nat. Comms.* – 2013. – V. 4. – Art. № 1854.
78. Dong X. Psychrotolerant methanogenic archaea: Diversity and cold adaptation mechanisms / X. Dong, Z. Chen // *Sci. China Ser. C.* – 2012. – V. 55, № 5. – P. 415–421.
79. Ghai R. Key roles for freshwater *Actinobacteria* revealed by deep metagenomic sequencing / R. Ghai, C. M. Mizuno, A. Picazo, A. Camacho, F. Rodriguez-Valera // *Mol. Ecol.* – 2014. – V. 23, № 24. – P. 6073–6090.
80. Edgar R. C. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection / R. C. Edgar, B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, R. Knight // *Bioinformatics.* – 2011. – V. 27, № 17. – P. 2194–2200.
81. Edwards K. J. The deep, dark energy biosphere: intraterrestrial life on Earth / K. J. Edwards, K. Becker, F. Colwell // *Annu. Rev. Earth Pl. Sci.* – V.40, № 1. – P. 551–568.
82. Engelen B. Fluids from the oceanic crust support microbial activities within the deep biosphere / B. Engelen, K. Zieglmüller, L. Wolf, B. Köpke, A. Gittel, H. Cypionka, T. Treude, S. Nakagawa, F. Inagaki, M. A. Lever, B. O. Steinsbu // *Geomicrobiol. J.* – 2008. – V. 25, № 1. – P. 56–66.
83. Eschbach M. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil / M. Eschbach, H. Möbitz, A. Rompf, D. Jahn // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – V. 223, № 2. – P. 227–230.
84. Evans P. N. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics / P. N. Evans, D. H. Parks, G. L. Chadwick, S. J. Robbins, V. J. Orphan, S. D. Golding, G. W. Tyson // *Science.* – 2015. – V. 350, № 6259. – P. 434–438.
85. Fahrbach M. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium / M. Fahrbach, J. Kuever, M. Remesch, B. E. Huber, P. Kampfer, W. Dott, J. Hollender // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – V. 58, № 9. – P. 2215–2223.
86. Falkner, K. K. The major and minor element geochemistry of Lake Baikal / K. K. Falkner, C. I. Measures, S. E. Herbelin, J. M. Edmond, R. F. Weiss // *Limnol. Oceanogr.* – 1991. – V. 36, № 3. – P. 413–423.

87. Fey A. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil / A. Fey, R. Conrad // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, № 11. – P. 4790–4797.
88. Floodgate L. G. The origins of shallow gas / L. G. Floodgate, A. G. Judd // *Cont. Shelf Res.* – 1992. – V. 12, № 10. – P. 1145–1156.
89. Forschner S. R. Microbial diversity in Cenozoic sediments recovered from the Lomonosov Ridge in the Central Arctic Basin / S. R. Forschner, R. Sheffer, D. C. Rowley, D. C. Smith // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 3. – P. 630–639.
90. Fredrickson J. K. Microbial community structure and biogeochemistry of Miocene subsurface sediments: implications for long-term microbial survival / J. K. Fredrickson, J. P. McKinley, S. A. Nierzwicki-Bauer, D. C. White, D. B. Ringelberg, S. A. Rawson, S. A. Rawson, S.-M. Li, F. J. Brockman, B. N. Bjornstad // *Mol. Ecol.* – 1995. – V.4, № 5. – P. 619–626.
91. French E. Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing *Archaea* and *Bacteria* from freshwater / E. French, J. A. Kozlowski, M. Mukherjee, G. Bullerjahn, A. Bollmann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78, № 16. – P. 5773–5780.
92. Fricke W. F. The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis / W. F. Fricke, H. Seedorf, A. Henne, M. Kruer, H. Liesegang, R. Hedderich, G. Gottschalk, R. K. Thauer // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 188, № 2. – P. 642–658.
93. Fry J. C. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere / J. C. Fry, R. J. Parkes, B. A. Cragg, A. J. Weightman, G. Webster // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2008. – V. 66, № 2. – P. 181–196.
94. Fuerst J. A. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function / J. A. Fuerst, E. Sagulenko // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – V. 9, № 6. – P. 403–413.
95. Fukuda H. Ethylene production by microorganisms / H. Fukuda, T. Ogawa, S. Tranase // *Adv. Microb. Physiol.* – 1993. – V. 35. – P. 275–306.
96. Galagan J. E. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity // *Genome Research.* – 2002. – V. 12, № 4. – P. 532–542.
97. Gieg L. M. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields / L. M. Gieg, I. A. Davidova, K. E. Duncan, J. M. Suflita // *Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 12, № 11. – P. 3074–3086.
98. Glissman K. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: Effect of temperature / K. Glissman, K.-J. Chin, P. Casper, R. Conrad // *Microbial Ecol.* – 2004. – V. 48, № 3. – P. 389–399.

99. Glöckner F. O. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization / F. O. Glöckner, B. M. Fuchs, R. Amann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65, № 8. – P. 3721-3726.
100. Gottschalk, G., Thauer, R. K. The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea // *BBA–Bioenergetics.* – 2001. – V. 1505, № 1. – P. 28–36.
101. Granin N. G. Gas seeps in Lake Baikal—detection, distribution, and implications for water column mixing / N. G. Granin, M. M. Makarov, K. M. Kucher, R. Y. Gnatovsky // *Geo-Mar. Lett.* – 2010. – V. 30, № 3-4. – P. 399–409.
102. Gray N. D. Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments / N. D. Gray, A. Sherry, C. Hubert, J. Dolfing, I. M. Head // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2010. – V. 72. – P. 137–161.
103. Hachikubo A. Molecular and isotopic characteristics of gas hydrate-bound hydrocarbons in southern and central Lake Baikal / A. Hachikubo, O. Khlystov, A. Krylov, H. Sakagami, H. Minami, Y. Nunokawa, S. Yamashita, N. Takahashi, H. Shoji, S. Nishio, M. Kida, T. Ebinuma, G. Kalmychkov, J. Poort // *Geo-Mar. Lett.* – 2010. – V. 30, № 3-4. – P. 321–329.
104. Hachikubo A. Raman spectroscopic and calorimetric observations on natural gas hydrates with cubic structures I and II obtained from Lake Baikal / A. Hachikubo, O. Khlystov, M. Kida, H. Sakagami, H. Minami, S. Yamashita, N. Takahashi, H. Shoji, G. Kalmychkov, J. Poort // *Geo-Mar. Lett.* – 2012. – V. 32, № 5-6. – P. 419–426.
105. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 1999. – V. 41. – P. 95-98.
106. Hamdan L. J. Bacterial community composition and diversity in methane charged sediments revealed by multitag pyrosequencing / L. J. Hamdan, M. Sikaroodi, P. M. Gillevet // *Geomicrobiol. J.* – 2012. – V. 29, № 4. – P. 340–351.
107. Haroon M. F. Erratum: Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage / M. F. Haroon, S. Hu, Y. Shi, M. Imelfort, J. Keller, P. Hugenholtz, Z. Yuan, G. W. Tyson // *Nature.* – 2013. – V. 501, № 7468. – P. 578–578.
108. He Y. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum *Bathyarchaeota* widespread in marine sediments / Y. He, M. Li, V. Perumal, X. Feng, J. Fang, J. Xie, S. M. Sievert, F. Wang // *Nat. Microbiol.* – 2016. – V. 1, № 6. – Art. № 16035.
109. Hedges J. I. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. / J. I. Hedges, R. G. Keil // *Mar. Chem.* – 1995. - V. 49. – P. 81–115.

110. Herrmann G. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria / G. Herrmann, E. Jayamani, G. Mai, W. Buckel // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 190, № 3. – P. 784–791.
111. Hinrichs K.-U. Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface / K.-U. Hinrichs, J. M. Hayes, W. Bach, A. J. Spivack, L. R. Hmelo, N. G. Holm, C. G. Jonson, S. P. Sylva // *P. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103, № 40. – P. 14684–14689.
112. Hoehler T. M. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments / T. M. Hoehler, M. J. Alperin, D. B. Albert, C. S. Martens // *Geochim. Cosmochim. Ac.* – 1998. – V. 62, № 10. – P. 1745–1756.
113. Hoehler T. M. Acetogenesis from CO₂ in an anoxic marine sediment / T. M. Hoehler, D. B. Albert, M. J. Alperin, C. S. Martens // *Limnol. Oceanogr.* – 1999. – V. 44, № 3. – P. 662–667.
114. Hoehler T. M., Jørgensen B. B. Microbial life under extreme energy limitation // *Nat. Rev. Micro.* – 2013. – V. 11, № 2. – P. 83–94.
115. Horsfield B. Living microbial ecosystems within the active zone of catagenesis: Implications for feeding the deep biosphere / B. Horsfield, H. J. Schenk, K. Zink, R. Ondrak, V. Dieckmann, J. Kallmeyer, K. Mangelsdorf, R. di Primlo, H. Wilkes, R. J. Parkes, J. C. Fry, B. A. Cragg // *Earth Planet. Sci. Lett.* – 2006. – V. 246, 55–69.
116. Hoshino T. Comparative study of subseafloor microbial community structures in deeply buried coral fossils and sediment matrices from the Challenger Mound in the Porcupine Seabight / T. Hoshino, Y. Morono, T. Terada, H. Imachi, T. G. Ferdelman, F. Inagaki // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2. – Art. № 160.
117. Hubert C. A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold arctic seabed / C. Hubert, A. Loy, M. Nickel, C. Arnosti, C. Baranyi, V. Bruchert, T. Ferdelman, K. Finster, F. M. Christensen, J. R. De Rezende, V. Vandieken, B. B. Jørgensen // *Science.* – 2009. – V. 325, № 5497. – P. 1541–1544.
118. Hug L. A. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the *Chloroflexi* phylum and indicate roles in sediment carbon cycling / L. A. Hug, C. J. Castelle, K. C. Wrighton, B. C. Thomas, I. Sharon, K. R. Frischkorn, K. H. Williams, S. G. Tringe, J. F. Banfield // *Microbiome.* – 2013. – V. 1. – Art. № 22.
119. Hugenholtz P. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring / P. Hugenholtz, C. Pitulle, K. L. Hershberger, N. R. Pace // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180, № 2. – P. 366–376.
120. Hutchinson D. R. Depositional and tectonic framework of the rift basins of Lake Baikal from multichannel seismic data / D. R. Hutchinson, A. J. Golmshtok, L. P. Zonenshain, T. C. Moore, C. A. Scholz, K. D. Klitgord // *Geology.* – 1992. – V. 20, № 7. – P. 589–600.

121. Inagaki F. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk / F. Inagaki, M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto, K. Aoki, K. H. Nealson, K. Horikoshi // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. - V. 69, № 12. – P. 7224–7235.
122. Inagaki F. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin / F. Inagaki, T. Nunoura, S. Nakagawa, A. Teske, M. Lever, A. Lauer, M. Suzuki, K. Takai, M. Delwiche, F. S. Colwell, K. H. Nealson, K. Horikoshi, S. D'Hondt, B. B. Jørgensen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103, № 8. – P. 2815–2820.
123. Inagaki F. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to 2.5 km below the ocean floor / F. Inagaki, K.-U. Hinrichs, Y. Kubo, M. W. Bowles, V. B. Heuer, W.-L. Hong et al. // *Science.* – 2015. – V. 349, № 6249. – P. 420–424.
124. Ito T. Seismo-geochemical observation at a deep bore-hole well of nagashima spa in the yoro-ise bay fault zone, central Japan / T. Ito, K. Kawasaki, K. Nagamine, K. Yamamoto, M. Adachi, I. Kawabe // *J. Earth Plan. Sci.* – 1998. – V. 45. – P. 1-15.
125. Jetten M. S. M. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngeni* and *Methanosarcina* spp. / M. S. M. Jetten, A. J. M. Stams, A. J. B. Zehnder // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – V. 88, № 3–4. – P. 181–198.
126. Jones J. G. Factors affecting methanogenesis and associated processes in the sediments of a stratified eutrophic lake / J. G. Jones, B. M. Simon, S. Gardener // *J. Gen. Microbiol.* – 1982. – V. 128, № 1. – P. 1–11.
127. Jones W. J. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent / W. J. Jones, J. A. Leigh, F. Mayer, C. R. Woese, R. S. Wolfe // *Arch. Microbiol.* – 1983. – V. 136, № 4. – P. 254–261.
128. Jørgensen S. L. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge / S. L. Jørgensen, B. Hannisdal, A. Lanzen, T. Baumberger, K. Flesland, R. Fonseca, L. Ovreas, I. H. Steen, I. H. Thorseth, R. B. Pedersen, C. Schleper // *P. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109, № 42. – P. 2846–2855.
129. Kadnikov V. V. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal / V. V. Kadnikov, A. V. Mardanov, A. V. Beletsky, O. V. Shubenkova, T. V. Pogodaeva, T. I. Zemskaya, N. V. Ravin, K. G. Skryabin // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2012. – V. 79, № 2. – P. 348–358.
130. Kadnikov V. V. Composition of the microbial communities of bituminous constructions at natural oil seeps at the bottom of Lake Baikal / V. V. Kadnikov, A. V. Lomakina, A. V.

- Likhoshvai, A. G. Gorshkov, T. V. Pogodaeva, A. V. Beletsky, A. V. Mardanov, T. I. Zemskaya, N. V. Ravin // *Microbiology+*. – 2013. – V. 82, № 3. – P. 373-382.
131. Kallmeyer J. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment / J. Kallmeyer, R. Pockalny, R. R. Adhikari, D. C. Smith, S. D'Hondt // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – V. 109, № 40. – P. 16213–16216.
132. Kato S. Physiological and transcriptomic analyses of the thermophilic, acetoclastic methanogen *Methanosaeta thermophila* responding to ammonia stress / S. Kato, K. Sasaki, K. Watanabe, I. Yumoto, Y. Kamagata // *Microbes Environ.* – 2014. – V. 29, № 2. – P. 162–167.
133. Kendall M. M. *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments / M. M. Kendall, Y. Liu, M. Sieprawska-Lupa, K. O. Stetter, W. B. Whitman, D. R. Boone // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – V. 56, № 7. – P. 1525–1529.
134. Khlystov O. M. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties / O. M. Khlystov, M. De Batist, H. Shoji, A. Hachikubo, S. Nishio, L. Naudts // *J. Asian Earth Sci.* – 2013. – V. 62. – P. 162-166.
135. Kielak A. M. The ecology of *Acidobacteria*: moving beyond genes and genomes / A. M. Kielak, C. C. Barreto, G. A. Kowalchuk, J. A. van Veen, E. E. Kuramae // *Front. Microbiol.* – 2016. – V.7. – Art. № 744.
136. Kindaichi T. Phylogenetic diversity and ecophysiology of Candidate phylum *Saccharibacteria* in activated sludge / T. Kindaichi, S. Yamaoka, R. Uehara, N. Ozaki, A. Ohashi, M. Albertsen, P. H. Nielsen, J. L. Nielsen // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2016. – V. 92, № 6. – Art. № 78.
137. Klerkx J. Tectonically controlled methane escape in Lake Baikal. Advances in the geological storage of carbon dioxide / J. Klerkx, M. De Batist, J. Poort, R. Hus, P. Van Rensbergen, O. M. Khlystov, N. Granin // *NATO Sci. Ser., IV. Earth and Environ. Sci.* – 2006. – V. 65. – P. 203-219.
138. Knittel K. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process / K. Knittel, A. Boetius // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2009. – V. 63, № 1. – P. 311–334.
139. Kobayashi T. Phylogenetic and enzymatic diversity of deep subseafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula / T. Kobayashi, O. Koide, K. Mori, S. Shimamura, T. Matsuura, T. Miura, Y. Takaki, Y. Morono, T. Nunoura, H. Imachi, F. Inagaki, K. Takai, K. Horikoshi // *Extremophiles.* – 2008. – V. 12, № 4. – P. 519–527.
140. Kotelnikova S. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden / S. Kotelnikova, K. Pedersen // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1998. – V. 26, № 2. – P. 121–134.

141. Kotlar H. K. High coverage sequencing of DNA from microorganisms living in an oil reservoir 2.5 kilometres subsurface / H. K. Kotlar, A. Lewin, J. Johansen, M. Throne-Holst, T. Haverkamp, S. Markussen, A. Winnberg, P. Ringrose, T. Aakvik, E. Ryeng, K. Jakobsen, F. Drabløs, S. Valla // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2011. – V. 3, № 6. – P. 674–681.
142. Kotsyurbenko O. R. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2005. – V. 53, № 1. – P. 3–13.
143. Kotsyurbenko O. R. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a west Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain / O. R. Kotsyurbenko, M. W. Friedrich, M. V. Simankova, A. N. Nozhevnikova, P. N. Golyshin, K. N. Timmis, R. Conrad // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73, № 7. – P. 2344–2348.
144. Kröninger L. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis* / L. Kröninger, S. Berger, C. Welte, U. Deppenmeier // *FEBS J.* – 2015. – V. 283, № 3. – P. 472–483.
145. Kryachko Y. Compositions of microbial communities associated with oil and water in a mesothermic oil field / Y. Kryachko, X. Dong, C. W. Sensen, G. Voordouw // *A. van Leeuw. J. Mikrob.* – 2011. – V. 101, № 3. – P. 493–506.
146. Krylov A. First discovery and formation process of authigenic siderite from gas hydrate-bearing mud volcanoes in fresh water: Lake Baikal, eastern Siberia / A. Krylov, O. Khlystov, T. Zemskaya, H. Minami, A. Hachikubo, Y. Nunokawa, M. Kida, H. Shoji, L. Naudts, J. Poort, T. Pogodaeva // *Geophys. Res. Lett.* – 2008. – V. 35, № 5. – P. 1–6.
147. Kubo K. Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments / K. Kubo, K. G. Lloyd, J. F. Biddle, R. Amann, A. Teske, K. Knittel // *ISME J.* – 2012. – V. 6, № 10. – P. 1949–1965.
148. Kuivila K. M. Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington / K. M. Kuivila, J. W. Murray, A. H. Devol, P. C. Novelli // *Geochim. Cosmochim. Ac.* – 1989. – V. 53, № 2. – P. 409–416.
149. Kurr M. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C / M. Kurr, R. Huber, H. König, H. W. Jannasch, H. Fricke, A. Trincone, J. K. Kristjansson, K. O. Stetter // *Arch. Microbiol.* – 1991. – V. 156, № 4. – P. 239–247.
150. Lazar C. S. Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of *Bathyarchaeota* in estuarine sediments / C. S. Lazar, B. J. Baker, K. Seitz, A. S. Hyde, G. J. Dick, K.-U. Hinrichs, A. P. Teske // *Environ. Microbiol.* – 2016. – V. 18, № 4. – P. 1200–1211.

151. Lee S. Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria / S. Lee, C. Malone, P. Kemp // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1993. – V. 101. – P. 193–201.
152. Lee Y.-J. *Thermosediminibacter oceani* gen. nov., sp. nov. and *Thermosediminibacter litoriperuensis* sp. nov., new anaerobic thermophilic bacteria isolated from Peru Margin / Y.-J. Lee, I. D. Wagner, M. E. Brice, V. V. Kevbrin, G. L. Mills, C. S. Romanek, J. Wiegel // *Extremophiles.* – 2006. – V. 10, № 3. – P. 257–257.
153. Lee J.-W. Microbial community structures of methane hydrate-bearing sediments in the Ulleung Basin, East Sea of Korea / J.-W. Lee, K. K. Kwon, A. Azizi, H.-M. Oh, W. Kim, J.-J. Bahk, D.-H. Lee, J.-H. Lee // *Mar. Petrol. Geol.* – 2013. – V. 47. – P. 136–146.
154. Lessner D. J. Methanogenesis Biochemistry // *Encyclopedia of Life Sciences.* – 2009. – URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000573.pub2/full>
155. Lettinga G. High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures / G. Lettinga, R. Salih, S. N. Parshina, A. N. Nozhevnikova, J. B. van Lier, A. J. M. Stams // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 1696–1702.
156. Lever M. A. Acetogenesis in deep seafloor sediments of the Juan de Fuca Ridge Flank: a synthesis of geochemical, thermodynamic, and gene-based evidence / M. A. Lever, V. B. Heuer, Y. Morono, N. Masui, F. Schmidt, M. J. Alperin, F. Inagaki, K.-U. Hinrichs, A. Teske // *Geomicrobiol. J.* – 2010. – V. 27, № 2. – P. 183–211.
157. Lever M. A. Diversity of methane-cycling *Archaea* in hydrothermal sediment investigated by general and group-specific PCR primers / M. A. Lever, A. P. Teske // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – V. 81, № 4. – P. 1426–1441.
158. Lewalter K. Bioenergetics of archaea: Ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life / K. Lewalter, V. Müller // *BBA–Bioenergetics.* – 2006. – V. 1757, № 5–6. – P. 437–445.
159. Li L. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench / L. Li, C. Kato, K. Horikoshi // *Mar. Biotechnol.* – 1999. – V. 1, № 4. – P. 391–400.
160. Li F. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri* / F. Li, J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel, R. K. Thauer // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 190, № 3. – P. 843–850.
161. Li D. Microbial biodiversity in a Malaysian oil field and a systematic comparison with oil reservoirs worldwide / D. Li, D. J. Midgley, J. P. Ross, Y. Oytam, G. C. J. Abell, H. Volk, P. Hendry // *Arch. Microbiol.* – 2012. – V. 194, № 6. – P. 513–523.

162. Liu Y. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *Archaea* / Y. Liu, W. B. Whitman // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V. 1125, № 1. – P. 171–189.
163. Liu Y. Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism / Y. Liu, L. L. Beer, W. B. Whitman // *Trends Microbiol.* – 2012. – V. 20, № 5. – P. 251–258.
164. Lloyd K. G. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins / K. G. Lloyd, L. Schreiber, D. G. Petersen, K. U. Kjeldsen, M. A. Lever, A. D. Steen, R. Stepanauskas, M. Richter, S. Kleindienst, S. Lenk, A. Schramm, B. B. Jørgensen // *Nature.* – 2013. – V. 496, № 7444. – P. 215–218.
165. Lü Z. *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil / Z. Lü, Y. Lu // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7, № 4. – Art. № e35279.
166. Lückner S. The Genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer / S. Lückner, Nowka B., Rattei T., Spieck E., Daims H. // *Front. Microbiol.* – 2013. – V. 4. – Art. № 27.
167. Mason O. U. First investigation of the microbiology of the deepest layer of ocean crust / O.U. Mason, T. Nakagawa, M. Rosner, J. D. Van Nostrand, J. Zhou, A. Maruyama // *PLoS ONE.* – 2010. – V. 5. – Art. № e15399.
168. Massana R. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel / R. Massana, A. E. Murray, C. M. Preston, E. F. DeLong // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63, № 1. – P. 50-56.
169. Mathrani I. M. *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen / I. M. Mathrani, D. R. Boone, R. A. Mah, G. E. Fox, P. P. Lau // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1988. – V. 38, № 3. – P. 333.
170. Matveeva T. V. Gas hydrate accumulation in the subsurface sediments of Lake Baikal (Eastern Siberia) / T. V. Matveeva, L. L. Mazurenko, V. A. Soloviev, J. Klerkx, V. V. Kaulio, E. M. Prasolov // *Geo-Mar. Lett.* – 2003. – V. 23. – P. 289–299.
171. Mbadinga S. M. Analysis of alkane-dependent methanogenic community derived from production water of a high-temperature petroleum reservoir / S. M. Mbadinga, K.-P. Li, L. Zhou, L.-Y. Wang, S.-Z. Yang, J.-F. Liu, B.-Z. Mu // *Appl. Microbiol. Biot.* – 2012. – V. 96, № 2. – P. 531–542.
172. Meister P. Dolomite formation in the dynamic deep biosphere: results from the Peru Margin / P. Meister, J. A. Mckenzie, C. Vasconcelos, S. Bernasconi, M. Frank, M. Gutiahr, D. P. Schrag // *Sedimentology.* – 2007. – V. 54, № 5. – P. 1007–1032.

173. Milkov A.V. Molecular and stable isotope compositions of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings // *Org. Geochem.* – 2005. – V. 36, № 5. – P. 681–702.
174. Mills H. J. Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries / H. J. Mills, R. J. Martinez, S. Story, P. A. Sobecky // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, № 6. – P. 3235–3247.
175. Mori K. Aceticlastic and NaCl-requiring methanogen “*Methanosaeta pelagica*” sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment / K. Mori, T. Iino, K.-I. Suzuki, K. Yamaguchi, Y. Kamagata // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78, № 9. – P. 3416–3423.
176. Morita R. Y. Occurrence of bacteria in pelagic sediments collected during the Mid-Pacific Expedition / R. Y. Morita, C. E. ZoBell // *Deep-Sea Res.* – 1953. – V. 3, № 1. – P. 66–73.
177. Mukhopadhyay P. K. The relation between organic geochemical and petrological parameters of coal in Indian coal basins / P. K. Mukhopadhyay, H. W. Hagemann, A. Hollerbach, D. H. Welte // *Energ. Source.* – 1979. – V. 4, № 4. – P. 313–328.
178. Murase J. Spatial distribution of methane in the Lake Biwa sediments and its carbon isotopic compositions / J. Murase, A. Sugimoto // *Geochem. J.* – 2001. – V. 35, № 4. – P. 257–263.
179. Muyzer G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E. C. De Waal, A. G. Uitterlinden // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, № 1. – P. 695–700.
180. Naudts L. Stratigraphic and structural control on the distribution of gas hydrates and active gas seeps on the Posolsky Bank, Lake Baikal / L. Naudts, O. Khlystov, N. Granin, A. Chensky, J. Poort, M. De Batist // *Geo-Mar. Lett.* – 2012. – V. 32. – P. 395–406.
181. Newberry C. J. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190 / C. J. Newberry, G. Webster, B. A. Cragg, R. J. Parkes, A. J. Weightman, J. C. Fry // *Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 6, № 3. – P. 274–287.
182. Newton R. J. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria / R. J. Newton, S. E. Jones, A. Eiler, K. D. McMahon, S. Bertilsson // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2011. – V. 75, № 1. – P. 14–49.
183. Nobu, M. K., Dodsworth, J. A., Murugapiran, S. K., Rinke, C., Gies, E. A., Webster, G., Phylogeny and physiology of candidate phylum “*Atribacteria*” (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics / M. K. Nobu, J. A. Dodsworth, S. K. Murugapiran, C. Rinke, E. A. Gies, G. Webster, P. Schwientek, P. Kille, R. J. Parkes, H. Sass, B. B. Jørgensen, A. J.

- Weightman, W.-T. Liu, S. J. Hallam, G. Tsiamis, T. Woyke, B. P. Hedlund // ISME J. – 2015. – V. 10, № 2. – P. 273–286.
184. Nordin K. Novel 4-Chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 / K. Nordin, M. Unell, J. K. Jansson // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71, № 11. – P. 6538–6544.
185. Nozhevnikova A. N. Acetogenesis at low temperature / A. N. Nozhevnikova, O. R. Kotsyurbenko, M. V. Simankova // Acetogenesis; ed. H. L. Drake. – N.Y.: Springer US, 1994. – P. 416–431.
186. Nozhevnikova A. Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (2–70°C) / A. Nozhevnikova, C. Holliger, A. Ammann, A. Zehnder // Water Sci. Technol. – 1997. – V. 36, № 6-7. – P. 57–64.
187. Nozhevnikova A. N. Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries / A. N. Nozhevnikova, V. Nekrasova, A. Ammann, A. J. B. Zehnder, B. Wehrli, C. Holliger // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – V. 62, № 3. – P. 336–344.
188. Nusslein B. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel) / B. Nusslein, K.-J. Chin, W. Eckert, R. Conrad // Environ. Microbiol. – 2001. – V. 3, № 7. – P. 460–470.
189. Och L. M. New insights into the formation and burial of Fe/Mn accumulations in Lake Baikal sediments / L. M. Och, B. Müller, A. Voegelin, A. Ulrich, J. Göttlicher, R. Steiniger, S. Mangold, E. G. Vologina, M. Sturm // Chem. Geol. – 2012. – V. 330-331. – P. 244–259.
190. Ollivier B. Petroleum: from formation to microbiology / B. Ollivier, J. Borgomano, P. Oger // Microbial Life of the Deep Biosphere; eds. J. Kallmeyer, D. Wagner. – Berlin, Boston: DE GRUYTER, 2014. – P. 161–186.
191. Orcutt B. N. Colonization of subsurface microbial observatories deployed in young ocean crust / B. N. Orcutt, W. Bach, K. Becker, A. T. Fisher, M. Hentscher, B. M. Toner, C. G. Wheat, K. J. Edwards // ISME J. – 2010. – V. 5, № 4. – P. 692–703.
192. Orcutt B. N. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor / B. N. Orcutt, J. B. Sylvan, N. J. Knab, K. J. Edwards // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2011. – V. 75, № 2. – P. 361.
193. Orcutt B. N. Carbon fixation by basalt-hosted microbial communities / B. N. Orcutt, J. B. Sylvan, D. R. Rogers, J. Delaney, R. W. Lee, P. R. Girguis // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – Art. № 904.
194. Oremland R.S. Microbial formation of ethane in anoxic estuarine sediments // Appl. Environ. Microbiol. – 1981. – V. 42, № 1. – P. 122–129.

195. Oremland R. S. Bacterial ethane formation from reduced, ethylated sulfur compounds in anoxic sediments / R. S. Oremland, M. J. Whiticar, F. E. Strohmaier, R. P. Kiene // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 1988. – V. 52. – P. 1895–1904.
196. Orsi W. D. Deep sequencing of subseafloor eukaryotic rRNA reveals active fungi across marine subsurface provinces / W. D. Orsi, J. F. Biddle, V. Edgcomb // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8, № 2. – Art. № e56335.
197. Orsi W. D. Gene expression in the deep biosphere / W. D. Orsi, V. P. Edgcomb, G. D. Christman, J. F. Biddle // *Nature.* – V. 499, № 7457. – P. 205–208.
198. Parkes R. J. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review / R. J. Parkes, B. A. Cragg, P. Wellsbury // *Hydrogeol. J.* – 2000. – V. 8, № 1. – P. 11–28.
199. Parkes R. J. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review / R. J. Parkes, B. A. Cragg, P. Wellsbury // *Hydrogeol. J.* – 2002. – V. 10, № 2. – P. 346–346.
200. Parkes R. J. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time / R. J. Parkes, G. Webster, B. A. Cragg, A. J. Weightman, C. J. Newberry, T. G. Ferdelman, J. Kallmeyer, B. B. Jørgensen, I. W. Aiello, J. C. Fry // *Nature.* – 2005. – V. 436, № 7049. – P. 390–394.
201. Parkes R. J. Temperature activation of organic matter and minerals during burial has the potential to sustain the deep biosphere over geological timescales / R. J. Parkes, P. Wellsbury, I. D. Mather, S. J. Cobb, B. A. Cragg, E. R. C. Hornibrook, B. Horsfield // *Org. Geochem.* – 2007. – V. 38, № 6. – P. 845–852.
202. Parkes R. J. Culturable prokaryotic diversity of deep, gas hydrate sediments: first use of a continuous high-pressure, anaerobic, enrichment and isolation system for subseafloor sediments (DeepIsoBUG) / R. J. Parkes, G. Sellek, G. Webster, D. Martin, E. Anders, A. J. Weightman, H. Sass // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 12. – P. 3140–3153.
203. Parkes R. J. Prokaryotes stimulate mineral H₂ formation for the deep biosphere and subsequent thermogenic activity / R. J. Parkes, C. D. Linnane, G. Webster, H. Sass, A. J. Weightman, E. R. C. Hornibrook, B. Horsfield // *Geology.* – 2011. – V. 39, № 3. – P. 219–222.
204. Parkes R. J. A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions / R. J. Parkes, B. Cragg, E. Roussel, G. Webster, A. Weightman, H. A. Sass // *Mar. Geol.* – 2014. – V. 352. – P. 409–425.
205. Patel G. B. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. (“*Methanothrix concilii*”) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. / G. B. Patel, G. D. Spratt // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1999. – V. 40, № 1. – P. 79–82.

206. Pavlova O. N. Transformation of organic matter by microbial community in sediments of Lake Baikal under experimental thermobaric conditions of protocatagenesis / O. N. Pavlova, T. I. Zemskaya, A. V. Lomakina, O. V. Shubenkova, A. Y. Manakov, V. I. Moskvina, I. V. Morozov, S. V. Bukin, O. M. Khlystov // *Geomicrobiol. J.* – 2016. – V. 33, № 7. – P. 599-606.
207. Peinemann S. ATP synthesis coupled to electron transfer from H₂ to the heterodisulfide of 2-mercaptoethanesulfonate and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate in vesicle preparations of the methanogenic bacterium strain Gö 1 / S. Peinemann, R. Hedderich, M. Blaut, R. K. Thauer, G. Gottschalk // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 263, № 1. – P. 57–60.
208. Peng M. Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA genes / M. Peng, X. Zi, Q. Wang // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2015. – V. 12, № 10. – P. 12002-12015.
209. Peters K. E. *The Biomarker Guide: Volume 2. Biomarkers and isotopes in petroleum systems and Earth history* / Peters, K. E., Walters, C. C., Moldowan, J. M. // Cambridge, N.Y., Melbourne: Cambridge University Press, 2005. – P. 704.
210. Pfennig N. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien / Pfennig N., K. D. Lippert // *Archiv. Mikrobiol.* – 1966. – V. 55, № 3. – P. 245–256.
211. Pham V. D. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods / V. D. Pham, L. L. Hnatow, S. Zhang, R. D. Fallon, S. C. Jackson, J.-F. Tomb, E. F. DeLong, S. J. Keeler // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 1. – P. 176–187.
212. Phelps T. J. Influence of pH on terminal carbon metabolism in anoxic sediments from a mildly acidic lake / T. J. Phelps, J. G. Zeikus // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – V. 48, № 6. – P. 1088–1095.
213. Pimenov N. V. Microbial oxidation of methane in the sediments of Central and Southern Baikal / N. V. Pimenov, G. V. Kalmychkov, M. B. Veryasov, P. A. Sigalevich, T. I. Zemskaya // *Microbiology+*. – 2014. – V. 83, № 6. – P. 773-781.
214. Porter K.G. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora / K. G. Porter, Y. S. Feig // *Limnol. Oceanogr.* – 1980. – V. 25. – P. 943–948.
215. Probst A. J. Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface / A. J. Probst, T. Weinmaier, K. Raymann, A. Perras, J. B. Emerson, T. Rattei, G. Wanner, A. Klingl, I. A. Berg, M. Yoshinaga, B. Viehweger, K.-U. Hinrichs, B. C. Thomas, S. Meck, A. K. Auerbach, M. Heise, A. Schintlmeister, M. Schmid, M. Wagner, S. Gribaldo, J. F. Banfield, C. Moissl-Eichinger // *Nat. Comms.* – 2014. – V. 5. – Art. № 5497.

216. Proskurowski G. Abiogenic hydrocarbon production at Lost City hydrothermal field / G., Lilley, M. D. Proskurowski, J. S. Seewald, G. L. Fru h-Green, E. J. Olson, J. E. Lupton, S. P. Sylva, D. S. Kelley // *Science*. – 2008. – V. 319, № 5863. – P. 604–607.
217. Purkamo L. Dissecting the deep biosphere: retrieving authentic microbial communities from packer-isolated deep crystalline bedrock fracture zones / L. Purkamo, M. Bomberg, M. Nyysönen, I. Kukkonen, L. Ahonen, R. Kietäväinen, M. Itävaara // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2013. – V. 85, № 2. P. 324–337.
218. Quince C. Removing noise from pyrosequenced amplicons / C. Quince, A. Lanzen, R. J., Davenport, P. J. Turnbaugh // *BMC Bioinf.* – 2011. – V. 12, № 1. – P. 38.
219. Reysenbach A.-L. Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction / A.-L. Reysenbach, N. R. Pace // *Archaea: A Laboratory Manual, Thermophiles*; eds. F. T. Robb, A. R. Place. – N.Y.: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1995. – P. 101–107.
220. Reysenbach A. L. Thermoprotei class. nov. / A. L. Reysenbach // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; ed. Boone D.R., Castenholz R.W. – N.Y.: Springer Verlag, 2001. – V. 1. – P. 169–210.
221. Rinke C. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter / C. Rinke, P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J.-F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan, E. A. Gies, J. A. Dodsworth, B. P. Hedlund, G. Tsiamis, S. M. Sievert, W.-T. Liu, J. A. Eisen, S. J. Hallam, N. C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E. M. Rubin, P. Hugenholtz, T. Woyke // *Nature*. – V. 499, № 7459. – P. 431–437
222. Roske K. Microbial diversity and composition of the sediment in the drinking water reservoir Saidenbach (Saxonia, Germany) / K. Roske, R. Sachse, C. Scheerer, I. Roske // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2012. – V. 35, № 1. – P. 35-44.
223. Ruff S. E. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome / S. E. Ruff, J. F. Biddle, A. P. Teske, K. Knittel, A. Boetius, A. Ramette // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2015. – V. 112, № 13. – P. 4015–4020.
224. Sakagami H. Molecular and isotopic composition of hydrate-bound and dissolved gases in the southern basin of Lake Baikal, based on an improved headspace gas method / H. Sakagami, N. Takahashi, A. Hachikubo, H. Minami, S. Yamashita, H. Shoji, M. De Batist // *Geo-Mar. Lett.* – 2012. – V. 32, № 5-6. – P. 465–472.
225. Sakai S. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. / S. Sakai, H. Imachi, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, Y. Kamagata // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – V. 58, № 4. – P. 929–936.

226. Sakai S. *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil / S. Sakai, R. Conrad, W. Liesack, H. Imachi // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – V. 60, № 12. – P. 2918–2923.
227. Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989. – V. 2. – pp. 545.
228. Saruwatari K. Generation of hydrogen ions and hydrogen gas in quartz-water crushing experiments: an example of chemical processes in active faults / K. Saruwatari, J. Kameda, H. Tanaka // *Phys. Chem. Miner.* – 2004. – V. 31, № 3. – P. 176–182.
229. Sass H. Sub-seafloor sediments: an extreme but globally significant prokaryotic habitat (taxonomy, diversity, ecology) / H. Sass, R. J. Parkes // *Extremophiles Handbook*; eds. K. Horikoshi, G. Antranikian, A. T. Bull, F. T. Robb, K. O. Stetter. – Tokyo: Springer, 2011. – P. 1016–1036.
230. Sauer K. Methanol: Coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina Barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1 / K. Sauer, U. Harms, R. K. Thauer // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V. 243, № 3. – P. 670–677.
231. Schloss P. D. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P. D. Schloss, S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, C. F. Weber // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75, № 23. – P. 7537–7541.
232. Scholz C. A. Stratigraphic and structural evolution of the Selenga Delta Accommodation Zone, Lake Baikal Rift, Siberia / C. A. Scholz, D. R. Hutchinson // *Int. J. Earth Sci.* – 2000. – V. 89, № 2. – P. 212–228.
233. Schobert H. *Chemistry of Fossil Fuels and Biofuels.* – N.Y.: Cambridge University Press, 2013. – pp. 480.
234. Schrenk M. O. Microbial provinces in the subseafloor / M. O. Schrenk, J. A. Huber, K. J. Edwards // *Annu. Rev. Mar. Sci.* – 2010. – V. 2, № 1. – P. 279–304.
235. Schrum H. N. Sulfate-reducing ammonium oxidation: A thermodynamically feasible metabolic pathway in subseafloor sediment / Schrum, H. N., Spivack, A. J., Kastner, M., D'Hondt, S. // *Geology.* – 2009. – V. 37, № 10. – P. 939–942.
236. Schulz S. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance / S. Schulz, R. Conrad // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1996. – V. 20, № 1. – P. 1–14.

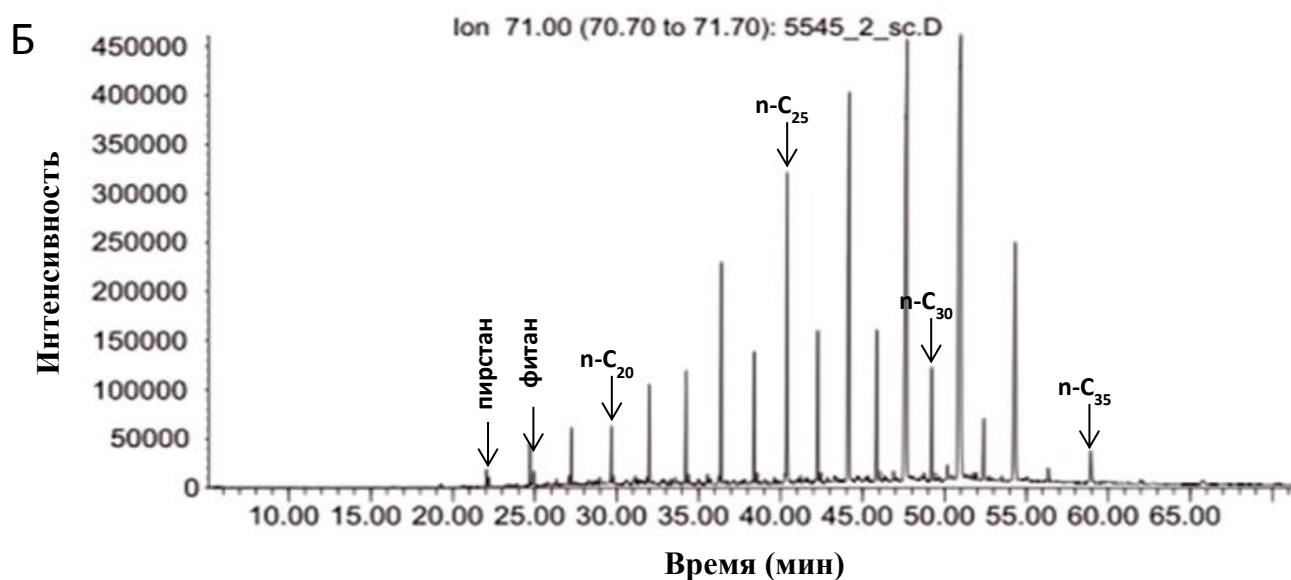
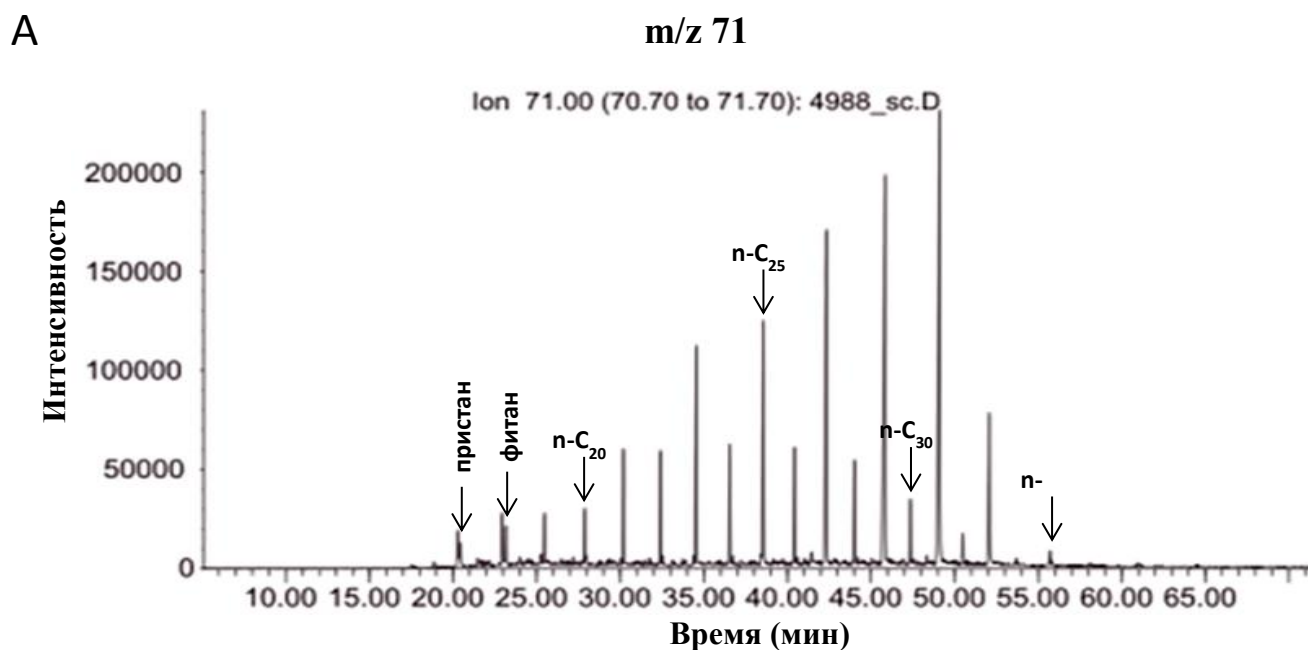
237. Shimizu S. *Methanosarcina horonobensis* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface Miocene formation / S. Shimizu, R. Upadhye, Y. Ishijima, T. Naganuma // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – V. 61, № 10. – P. 2503–2507.
238. Shishlyannikov S. M. A procedure for establishing an axenic culture of the diatom *Synedra acus subsp. radians* (Kütz.) Skabibitsch. from Lake Baikal / S. M. Shishlyannikov, Y. R. Zakharova, N. A. Volokitina, I. S. Mikhailov, D. P. Petrova, Y. V. Likhoshway // *Limnol. Oceanogr. Methods.* – 2011. – V. 9, № 10. – P. 478–484.
239. Sinninghe Damsté J. S. Evidence for gammacerane as an indicator of water column stratification / J. S. Sinninghe Damsté, F. Kenig, M. P. Koopmans, J. Köster, S. Schouten, J. M. Hayes // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – V. 59, № 9. – P. 1895–1900.
240. Smith K. S. Methanosaeta, the forgotten methanogen? / K. S. Smith, C. Ingram-Smith // *Trends Microbiol.* – 2007. – V. 15, № 4. – P. 150–155.
241. Soffientino B. Hydrogenase activity in deeply buried sediments of the Arctic and North Atlantic Oceans / B. Soffientino, A. J. Spivack, D. C. Smith, S. // *Geomicrobiol. J.* – 2009. – V. 26, № 7. – P. 537–545.
242. Sørensen K. B. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments / K. B. Sørensen, A. Teske // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72, № 7. – P. 4596–4603.
243. Sousa F. L. Lokiarchaeon is hydrogen dependent / F. L. Sousa, S. Neukirchen, J. F. Allen, N. Lane, W. F. Martin // *Nat. Microbiol.* – 2016. – V. 1, № 5. – Art. № 16034.
244. Sprenger W. W. *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. / W. W. Sprenger, M. C. van Belzen, J. Rosenberg, J. Hackstein, J. T. Keltjens // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 2000. – V. 50, № 6. – P. 1989–1999.
245. Stahl D. A. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics / D. A. Stahl, R. Amann. – Chichester: Wiley & Sons Ltd, 1991. – P. 205–248.
246. Story S. P. Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505 / S. P. Story, E. L. Kline, T. A. Hughes, M. B. Riley, S. S. Hayasaka // *Arch. Environ. Con. Tox.* – 2004. – V. 47, № 2. – P. 168-176.
247. Suzuki M. T. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR / M. T. Suzuki, S. J. Giovannoni // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62, № 3. – P. 625 – 630.
248. Takai K. *Marinobacter alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from subseafloor alkaline serpentine mud from Ocean Drilling Program Site 1200at South Chamorro Seamount, Mariana Forearc / K. Takai, C. L. Moyer, M. Miyazaki, Y. Nogi, H. Hirayama, K. H. Nealson, K. Horikoshi // *Extremophiles.* – 2004. – V. 9, № 1. – P. 17–27.

249. Takai K. Cell proliferation at 122 C° and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation / K. Takai, K. Nakamura, T. Toki, U. Tsunogai, M. Miyazaki, J. Miyazaki, K. Horikoshi // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2008. – V. 105, № 31. – P. 10949–10954.
250. Tamura K. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – V. 28, № 10. – P. 2731–2739.
251. Teske A. Deep subsurface microbiology: a guide to the research topic papers / A. Teske, J. F. Biddle, V. P. Edgcomb, A. Schippers // *Front. Microbiol.* – 2013 – V. 4. – Art. № 122.
252. Thauer R. K. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation / R. K. Thauer, A.-K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel, R. Hedderich // *Nat. Rev. Micro.* – 2008. – V. 6, № 8. – P. 579–591.
253. Thebrath B. Methane production in littoral sediment of Lake Constance / B. Thebrath, F. Rothfuss, M. J. Whitticar, R. Conrad // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1993. – V. 102, № 3-4. – P. 279–289.
254. Toerien D. F. Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion / D. F. Toerien, W. H. J. Hattingh // *Water Res.* – 1969. – V. 3, № 6. – P. 385–416.
255. Toffin L. Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program / L. Toffin, G., Webster, A. J. Weightman, J. C. Fry, D. Prieur // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2004. – V. 48, № 3. – P. 357–367.
256. Van Rensbergen P. Sublacustrine mud volcanoes and methane seeps caused by dissociation of gas hydrates in Lake Baikal / P. Van Rensbergen, M. De Batist, J. Klerkx, R. Hus, J. Poort, M. Vanneste, N. Granin, O. Khlystov, P. Krinitsky // *Geology.* – 2002. – V. 30, № 7. – P. 631–634.
257. Vanneste M. Atypical heat-flow near gas hydrate irregularities and cold seeps in the Baikal Rift Zone / M. Vanneste, J. Poort, M. De Batist, J. Klerkx // *Mar. Petrol. Geol.* – 2002. – V. 19, № 10. – P. 1257–1274.
258. Vaz dos Santos Neto E. Isotopic biogeochemistry of the Neocomian lacustrine and Upper Aptian marine-evaporitic sediments of the Potiguar Basin, Northeastern Brazil / E. Vaz dos Santos Neto, J. M. Hayes, T. Takaki // *Org. Geochem.* – 1998. – V. 28, № 6. – P. 361–381.
259. Wallner G. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms / G. Wallner, R. Amann, W. Beisker // *Cytometry.* – 1993. – V. 14, № 2. – P. 136–143.
260. Wang L.-Y. Characterization of an alkane-degrading methanogenic enrichment culture from production water of an oil reservoir after 274 days of incubation / L.-Y. Wang, C.-X. Gao, S. M.

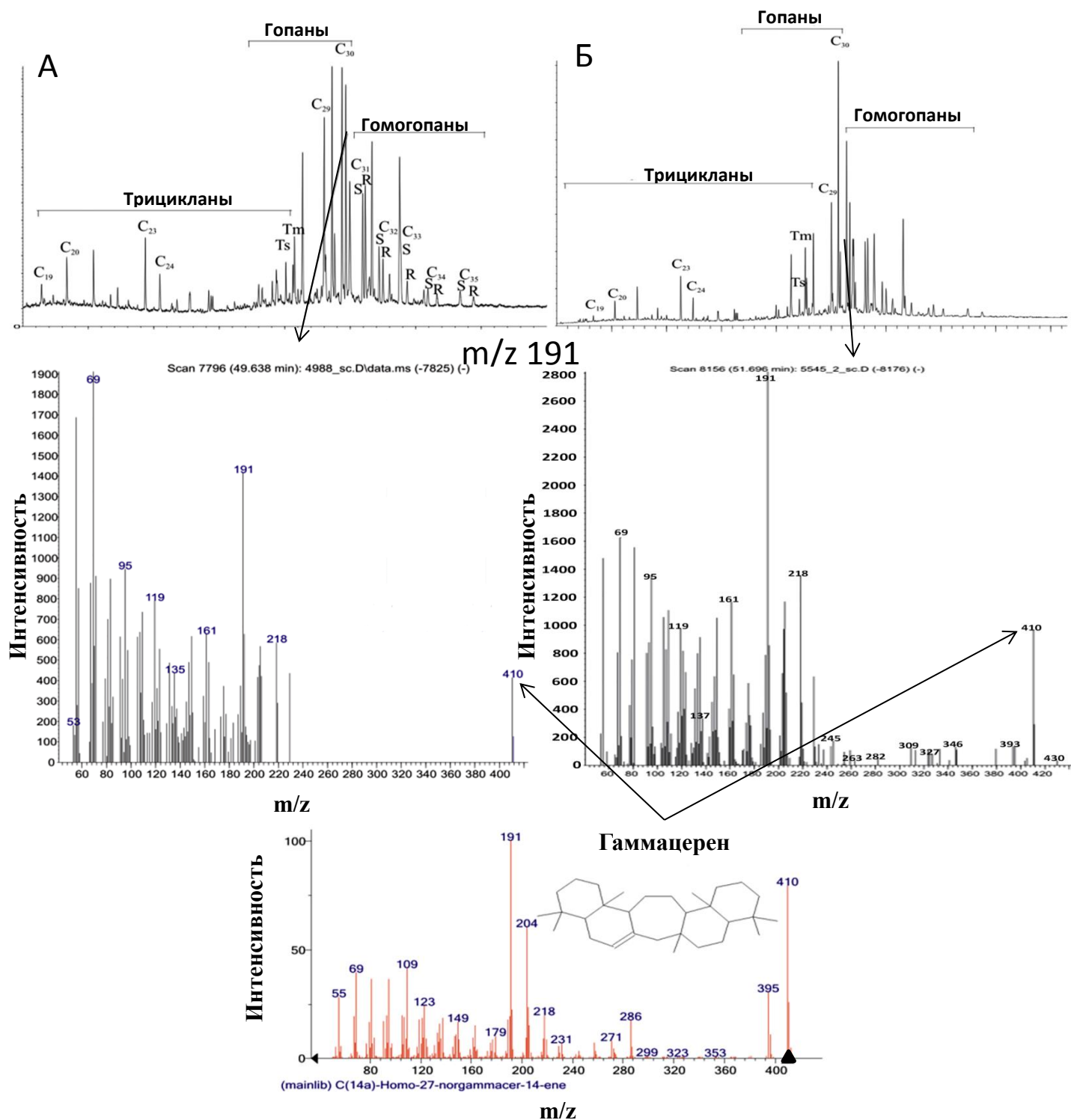
- Mbadinga, L. Zhou, J.-F. Liu, J.-D. Gu, B.-Z. Mu // *Int. Biodeter. Biodegr.* – 2011. – V. 65, № 3. – P. 444–450.
261. Ward D. M. A natural species concept for prokaryotes // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1998. – V. 1, № 3. – P. 271–277.
262. Ward N. L. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils / N. L. Ward, J. F. Challacombe, P. H. Janssen, B. Henrissat, P. M. Coutinho, M. Wu // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75, № 7. – P. 2046–2056.
263. Webster G. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin / G. Webster, R. J. Parkes, B. A. Cragg, C. J. Newberry, A. J. Weightman, J. C. Fry // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2006. – V. 58, № 1. – P. 65–85.
264. Webster G. Subsurface microbiology and biogeochemistry of a deep, cold-water carbonate mound from the Porcupine Seabight (IODP Expedition 307) / G. Webster, A. Blazejak, B. A. Cragg, A. Schippers, H. Sass, J. Rinna, R. J. Parkes // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 1. – P. 239–257.
265. Wellsbury P. Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating / P. Wellsbury, K. Goodman, T. Barth, B. A. Cragg, S. P. Barnes, R. J. Parkes // *Nature.* – 1997. – V. 388, № 6. – P. 573–576.
266. Wellsbury P. Geomicrobiology of deep, low organic carbon sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean / P. Wellsbury, I. Mather, R. J. Parkes // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2002. – V. 42, № 1. – P. 59–70.
267. Whitman W. B. Prokaryotes: The unseen majority / W. B. Whitman, D. C. Coleman, W. J. Wiebe // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1998. – V. 95, № 12. – P. 6578–6583.
268. Widdel F. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov / F. Widdel, N. Pfennig // *Arch. Microbiol.* – 1982. – V. 131, № 4. – P. 360–365.
269. Widdel, F. Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – V. 51, № 5. – P. 1056–1062.
270. Winters A. D. Molecular characterization of bacterial communities associated with sediments in the Laurentian Great Lakes / A. D. Winters, T. L. Marsh, T. O. Brenden, M. Faisal // *J. Great Lakes Res.* – 2014. – V. 40, № 3. – P. 640–645.
271. Whiticar M. J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chem. Geology.* – 1999. – V. 161, № 1-3. – P. 291–314.
272. Wolin M. J. The rumen fermentation: A model for microbial interactions in anaerobic ecosystems // *Adv. Microbial Ecol.* – 1979. – P. 49–77.

273. Wood G. E. Function and regulation of the formate dehydrogenase genes of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis* / G. E. Wood, A. K. Haydock, J. A. Leigh // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185, № 8. – P. 2548–2554.
274. Worakit S. *Methanobacterium alcaliphilum* sp. nov., an H₂-utilizing methanogen that grows at high pH values / S. Worakit, D. R. Boone, R. A. Mah, M. E. Abdel-Samie, M. M. ElHalwagi // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – V. 36, № 3. – P. 380–382.
275. Yamane K. Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98 °C subsurface crude oil deposits in Japan / K. Yamane, Y. Hattori, H. Ohtagaki, K. Fujiwara // FEMS Microbiol. Ecol. – 2011. – V. 76, № 2. – P. 220–235.
276. Yanagawa K. Distinct microbial communities thriving in gas hydrate-associated sediments from the eastern Japan Sea / K. Yanagawa, M. Kouduka, Y. Nakamura, A. Hachikubo, H. Tomaru, Y. Suzuki // J. Asian Earth Sci. – 2014. – V. 90. – P. 243–249.
277. Youssef N. H. In silico analysis of the metabolic potential and niche specialization of candidate phylum “*Latescibacteria*” (WS3) / N. H. Youssef, I. F. Farag, C. Rinke, S. J. Hallam, T. Woyke, M. S. Elshahed // PLoS One. – 2015. – V. 10. – Art. № 6.
278. Zemskaya T. I. 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 / T. I. Zemskaya, T. V. Pogodaeva, O. V. Shubenkova, S. M. Chernitsina, O. P. Dagurova, S. P. Buryukhaev, B. B. Namsaraev, O. M. Khlystov, A. V. Egorov, A. A. Krylov, G. V. Kalmychkov // Geo-Mar. Let. – 2010. – V. 30, № 3-4. – P. 411–425.
279. Zemskaya T. I. Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge / T. I. Zemskaya, A. V. Lomakina, E. V. Mamaeva, A. S. Zakharenko, T. V. Pogodaeva, D. P. Petrova, Y. P. Galachyants // Aquat. Microb. Ecol. – 2015. – V. 76, № 2. – P. 95–109.
280. Zepp-Falz K. Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland) / K. Zepp-Falz, C. Holliger, R. Grosskopf, W. Liesack, A. N. Nozhevnikova, B. Muller, B. Wehrli, D. Hahn // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, № 6. – P. 2402–2408.
281. Zhang H. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. / H. Zhang, Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata, K. Nakamura // ISEM. – 2003. – V. 53, № 4. – P. 1155–1163.

282. Zhang J. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes / J. Zhang, Y. Yang, L. Zhao, Y. Li, S. Xie, Y. Liu // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 99, № 7. – P. 3291–3302.
283. Zimmermann J. *Acidobacteria* in freshwater ponds at Donana National Park, Spain / J. Zimmermann, M. C. Portillo, L. Serrano, W. Ludwig, J. M. Gonzalez // *Microb. Ecol.* – 2012. – V. 63, № 4. – P. 844-855.
284. Zinder S. H. Physiological ecology of methanogens / Zinder S. H. // *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*; ed. J. G. Ferry. – N.Y.: Chapman & Hall, 1993. – P. 128–206.



Хромато-массфрагментограмма нормальных алканов и изопреноидов в насыщенной фракции битумоидов (А) Осадок до эксперимента. (Б) Осадок после эксперимента

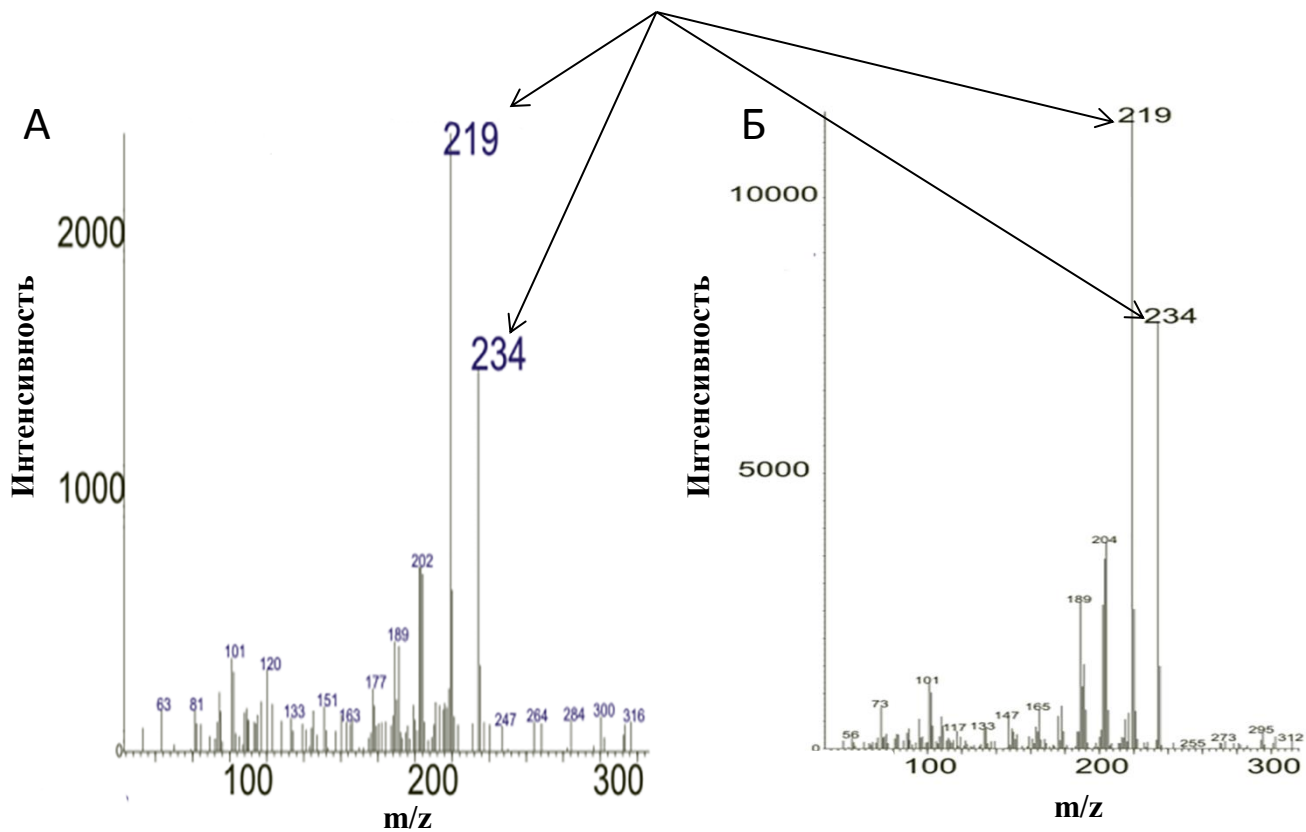


Хромато-массфрагментограмма терпанов в насыщенной фракции битумоидов (А) Осадок до эксперимента. (Б) Осадок после эксперимента



(replib) Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)-

Ретен



Масс-спектр ретена из ароматической фракции битумоида. (А)
 Осадок до эксперимента. **(Б)** Осадок после эксперимента.