

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ МЕТАНА В РАЙОНАХ
ГАЗОРАЗВЕДЫВАТЕЛЬНОГО БУРЕНИЯ В КАРСКОМ МОРЕ

© 2023 г. Е. Н. Тихонова^{а, *}, И. И. Русанов^а, В. В. Кадников^а, Е. В. Демкина^а, С. В. Тошаков^б,
А. О. Изотова^б, Н. В. Пименов^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^бКурчатовский геномный центр, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123098 Россия

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Поступила в редакцию 25.10.2022 г.

После доработки 14.11.2022 г.

Принята к публикации 14.11.2022 г.

Исследованы скорости окисления метана и разнообразие метаноокисляющих микроорганизмов в верхних слоях осадков района законсервированных скважин газоразведывательного бурения в Карском море. Анализ последовательностей гена *16S rPHK* выявил микроорганизмы класса *Gamma proteobacteria*, порядка *Methylococcales*. Сходное разнообразие микроорганизмов метанового фильтра показано для всех образцов, его основу составляли метанотрофы, близкие к роду *Methyloprofundus*, и некультивируемые метанотрофные бактерии, обнаруженные ранее в поверхностных отложениях Арктических морей. Молекулярная идентификация метаноокисляющих бактерий в составе такого сообщества с помощью высокопроизводительного секвенирования гена *pmoA*, кодирующего мембранную метанмонооксигеназу, подтверждает сходную структуру метанового фильтра поверхностных осадков, нарушенных в результате бурения, и фоновых районов, находящихся на значительном расстоянии от скважин. Показано, что осадочные отложения вблизи законсервированной скважины, пробуренной менее двух лет назад, имеют характерные признаки метанового сипа, выраженные в повышенном содержании растворенного метана и высоких скоростях его микробного окисления. Скважины, законсервированные более двух лет назад, не обнаруживали признаков высачивания метана, а наблюдаемое количество метаноокисляющих бактерий в непосредственной близости от них находилось ниже уровня детекции.

Ключевые слова: метан, окисление метана, аэробные метанотрофы, Карское море, газоразведывательное бурение, высокопроизводительное секвенирование, антропогенно-нарушенные экосистемы

DOI: 10.31857/S0026365622600705, EDN: AUHNZW

Метан — основной компонент природного газа. Он занимает второе по значимости место среди парниковых газов, уступая лишь углекислому газу. Доля метана в общемировом объеме выбросов парниковых газов составляет 14%. Добыча, транспортировка, переработка нефти и природного газа в совокупности образуют второй по величине источник антропогенного метана, поступающего в атмосферу (<https://www.globalmethane.org>).

Шельф российских арктических морей характеризуется огромными запасами разведанных газовых и нефтяных месторождений, часть из которых активно эксплуатируется в настоящее время.

Карское море является частью Арктического бассейна и играет ведущую роль в формировании среды всей Арктики (Лисицын и соавт., 1994; Мошаров, Мошарова, 2010). Карское море относится к западно-арктическим акваториям, наиболее изученным сейсморазведкой и бурением. Его до-

ля в общей структуре начальных суммарных геологических ресурсов углеводородов арктического шельфа России составляет 39% (Григоренко и соавт., 2006).

Шельф Карского моря включает две существенно отличающиеся по геологическому строению части — южную и северную. Первая — Южно-Карская нефтегазоносная область (НГО) в нефтегазогеологическом отношении является акваториальным продолжением Западно-Сибирской нефтегазоносной провинции, и это является определяющей чертой перспективности региона на присутствие морских месторождений углеводородного сырья (УВС). Здесь около 30 лет назад были открыты два уникальных газоконденсатных месторождения — Русановское и Ленинградское, а в 2019 г. — газоконденсатное месторождение им. В.А. Динкова и крупное газовое — Нярмейское. Вторая, северная часть, является самостоя-

тельной Северо-Карской перспективной нефтегазонасыщенной областью, на площади которой до настоящего времени не пробурено ни одной скважины (<https://neftegaz.ru>).

Микробиом морей Российской Арктики изучен с помощью молекулярно-генетических методов достаточно хорошо. В бактериальных сообществах донных отложений моря Лаптевых, Карского и Баренцева морей показано доминирование *Proteobacteria* (более 60% всех последовательностей генов 16S рРНК). В большом количестве представлен филум *Bacteroidetes*, составивший до 26% микробного сообщества. Также широко распространены представители *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* и *Actinobacteria*. Более 20% последовательностей генов 16S рРНК представлено некультивируемыми линиями (Саввичев и соавт., 2018; Savvichev et al., 2018a; Begmatov et al., 2021; Tikhonova et al., 2021, 2022).

Показано, что процессы аэробного окисления метана (МО) в осадках Арктических морей протекают с разной интенсивностью, степень которой прямо пропорциональна концентрациям метана. Максимальные величины МО зафиксированы для отдельных районов моря Лаптевых, где в осадках, формирующихся в районах струйных высачиваний метана, скорости МО достигают 3.9 мкмоль CH_4 /(л сут), в то время как в осадках, не подверженных влиянию метановых сипов, скорость окисления метана не превышает 50 нмоль CH_4 /(л сут) (Savvichev et al., 2018a, Tikhonova et al., 2021). Схожая картина по скорости биогеохимических процессов описана для Баренцева (0.3–23 нмоль CH_4 /(л сут)) (Begmatov et al., 2021) и Карского (2.2–103 нмоль CH_4 /(л сут)) (Саввичев и соавт., 2018) морей. С помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК выявлены физиологические группы микроорганизмов, ответственные за протекание процесса аэробного окисления метана, объединенные в семейство *Methylococcaceae* (Саввичев и соавт., 2018; Savvichev et al., 2018a; Begmatov et al., 2021). По численности представители метаноокисляющих бактерий составляют минорную часть бактериального сообщества. Показано, что в местах, не подверженных влиянию метановых сипов, доля метанотрофов составляет от 0.1 до 0.4%. Вблизи струйных высачиваний метана их количество в осадках возрастает и составляет до 2.5% (Tikhonova et al., 2021, 2022).

Проведение поисково-разведочных работ предполагает различные исследования, среди которых одно из основных мест отводится скважинному бурению. Законсервированные устья скважин — это газовые скважины, использованные ранее в целях разведывательно-исследовательских работ. Несмотря на консервацию, метан может просачиваться из таких скважин как в виде

пузырьковых, так и диффузных высачиваний и воздействовать на структуру и активность микробного сообщества осадочных отложений прилегающих районов. Вопрос консервации скважин, в том числе газоразведывательных, является весьма спорным и актуальным. Высказываются мнения о деградации материалов, с последствиями в виде возникновения активных газовых высачиваний (<https://neftegaz.ru>).

Изучение микробных сообществ, формирующихся под влиянием метановых сипов, вызывает широкий научный интерес. Вопрос о влиянии законсервированных скважин газоразведывательного бурения на структуру сообществ микроорганизмов не изучен.

Целью настоящей работы было изучение влияния антропогенного воздействия на структуру и функционирование сообществ аэробных метаноокисляющих бактерий в осадках Карского моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Пробы донных осадков были отобраны в сентябре 2020 г. в рейсе НИС “Виктор Буйницкий”, на полигоне Ямальской акватории юго-западной части Карского моря (72.6° и 73.6° N; 64.4° и 68.4° E) (рис. 1). Акватория, на которой были отобраны пробы, располагается западнее северной половины п-ова Ямал, от побережья и на несколько сотен километров по акватории. Для данной работы взяты поверхностные осадки на 12 станциях из 6 различных по глубине и удаленности от берега районов. Образцы донных осадков (отбор приповерхностного слоя 1–3 см) отбирали в устьях законсервированных скважин, образовавшихся при проведении газоразведывательного бурения. Для каждой скважины была взята контрольная (“фоновая”) точка на удалении 1 км. Диапазон глубин водной толщи в акватории проведения исследований составлял 14–117 м. Точки отбора находились на разной удаленности от берега в рамках указанного координатами региона.

В работе использован комплекс радиоизотопных, газо-геохимических, микробиологических и молекулярно-биологических методов.

Пробы донных осадков отбирали дночерпателем “Океан”. Для газохроматографических, биогеохимических, микробиологических и молекулярно-биологических исследований использовали одни и те же стандартные поверхностные горизонты. Все эксперименты с осадками, их первичную обработку и консервацию проводили в первые часы после отбора проб.

Концентрацию метана в донных отложениях измеряли на газовом хроматографе Кристалл-2000-М (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором методом фа-



Рис. 1. Карта-схема расположения станций, исследованных в ходе рейса НИС “Виктор Буйницкий” 2020 г.

зово-равновесной дегазации (Egorov, Ivanov, 1998). Погрешность измерения не превышала 5%.

Иловые (поровые) воды получали центрифугированием осадков при 5000 g на центрифуге “ЦУМ-1” (Россия). Величину щелочного резерва определяли с использованием набора реактивов (“Merck”, Германия). Определение содержания хлорид-иона и сульфат-иона в поровых водах осадков проводили на ионном хроматографе “Стайер” (Россия).

Измерение скорости окисления метана радиоизотопным методом. Скорость окисления метана (МО) определяли радиоизотопным методом с ^{14}C -метаном, растворенным в дегазированной дистиллированной воде. Ненарушенные осадки в количестве 2.5 см³ из каждого горизонта отбирали пластиковыми шприцами (общий объем 5 см³) с резиновым поршнем и отсеченным краем, герметично закрывали пробкой из бутиловой резины. 0.2 мл меченого ^{14}C -метана (1 мКи на пробу) вносили туберкулиновым шприцем, прокалывая резиновую пробку иглой по центру и равномерно распределяя субстрат по длине шприца с осадком. Контролем служили пробы, фиксированные 1 мл 0.5 н раствора КОН и выдержанные в холодильнике 6 ч до внесения меченого субстрата. По-

сле внесения меченого метана образцы донных осадков инкубировали в течение 2 сут при температуре, близкой к температуре *in situ*. После инкубации пробы фиксировали и транспортировали в стационарную лабораторию для дальнейшего определения продуктов микробного окисления и трансформации ^{14}C метана: в углекислоту (CO_2), в биомассу микроорганизмов (БМ) и в растворенный органический углерод (РОУ) в составе растворенного органического вещества (РОВ). Обработку проб и расчеты интенсивности метаноокисления проводили по ранее описанной методике (Русанов и соавт., 1998; Ivanov et al., 2002). Радиоактивность (^{14}C) продуктов микробного процесса МО измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике PackardTRI-CarbTR 2400 (США). Для расчетов численных показателей интенсивности образования продуктов микробного окисления и трансформации углерода метана использовали среднюю величину, полученную из двух повторностей измерений для каждого образца.

Идентификация аэробных метанооксиляющих бактерий методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Суммарная ДНК была выделена из 3 г осадка с помощью DNeasy PowerMax Soil Kit (“Qiagen”, Carlsbad, CA, США). ПЦР фрагменты гена 16S рРНК были получены с ис-

пользованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWSCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 ("Illumina", США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads ("Beckman Coulter", Brea, CA, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была подсчитана с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit ("Invitrogen", Carlsbad, CA, США). Затем все ПЦР фрагменты были смешаны в равных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 × 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные прочтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации с использованием алгоритма Usearch. Таксономическая идентификация была выполнена по базе SILVA v.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Полученные последовательности были депонированы в GenBank NCBI в рамках проекта PRJNA679168.

Идентификация аэробных метанокисляющих бактерий методом высокопроизводительного секвенирования гена *pmoA*. Концентрация препаратов ДНК оценивалась при помощи флуориметрии на приборе Qubit™ ("ThermoFischer Scientific", США). Библиотеки гена метанмонооксигеназы (*pmoA*) готовились с использованием двустадийной ПЦР-реакции (Gohl et al., 2016). Первую стадию ПЦР проводили с использованием Q5 hot start high fidelity 2× master mix ("New England Biolabs", США) с гибридными праймерами *pmoA*_189F (GGNGACTGGGACTTCTGG) и *pmoA*_682R (GAASGCNGAGAAGAASGC) (Tavormina et al., 2008), одна часть которых отжигалась на последовательность гена *pmoA*, а другая представляла собой часть технической последовательности (адаптера) Illumina. Концентрация праймеров составляла 0.25 мкМ. ПЦР проводили с помощью амплификатора Veriti™ ("ThermoFischer Scientific", США) со следующими параметрами циклирования: первичная денатурация – 4 мин при 95°C; далее 40 циклов денатурации – 1 мин при 95°C, отжига праймеров – 1 мин при 60°C, элонгации – 1 мин при 72°C; финальная элонгация – 5 мин при 72°C. Полученный амплификат очищали при помощи набора Cleanup Mini ("Evrogen", Россия) и использовали в качестве матрицы для второй ПЦР. Вторую ПЦР также проводили с помощью Q5 полимеразы ("New England Biolabs", США) с использованием следующих праймеров в концентрации 0.25 мкМ: R1TM AATGATACGGCGAC-CACCGAGATCTACACA XXXXXX CGTCGGCAG-CGTC и R2TM CAAGCAGAAGACGGCATAС-

GAGAT XXXXXX GTCTCGTGGTGGCTCGG, где первая часть соответствовала олигонуклеотидам P5 или P7 Illumina flowcell, XXXXXX соответствовали 6-нуклеотидным индексным последовательностям, а последняя часть соответствовала "хвостам" первых ПЦР-праймеров. Амплификацию также проводили на термоциклере Veriti ("Applied Biosystems", США) с использованием параметров амплификации, описанных ранее (Toshchakov et al., 2021). Полученные библиотеки ампликонов проверяли на агарозном геле и пулировали эквимольно. Финальный пул библиотек очищали с помощью набора Cleanup Mini ("Evrogen", Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для секвенирования парно-концевых прочтений длиной 300 п.н. использовали систему MiSeq™ Personal Sequencing System ("Illumina", США).

Фильтрацию и удаление участков прочтений с низким качеством проводили с использованием пакета CLC Genomic Workbench v. 20.0.4 ("Qiagen", Германия). Демультиплексирование осуществляли при помощи пакета deML (Renaud et al., 2015) с параметрами, исключающими наличие ошибок секвенирования в индексных последовательностях. Количество полученных пар прочтений для каждого образца варьировало в диапазоне от 95 до 365 тысяч. Обработанные пары прочтений депонированы в архив коротких прочтений базы NCBI (SRA archive), под общим номером биопроекта (Bioproject) PRJNA848985.

Высококачественные пары прочтений "сращивали" при помощи ПО pandaseq (Masella et al., 2012). Поскольку, с одной стороны, ампликоны обладают значимой вариабельностью по длине (Samad et al., 2017), а с другой – средняя длина фрагмента подразумевает, что перекрытие двух прочтений будет сравнительно небольшим, прочтения сращивали без учета перекрытия при помощи конкатенирования с инсерцией 18 неопределенных нуклеотидов между ними. Дальнейшую обработку (кластеризация и анализ представленности последовательностей) производили при помощи пакета usearch (Edgar, 2010). Было получено 127 ОТЕ с 97% идентичностью. Анализ данных ОТЕ при помощи blastx (Camacho et al., 2009) показал, что лишь 20 последовательностей относительно к гену *pmoA*, тогда как остальные были результатом неспецифичной амплификации. Полученные последовательности были транслированы *in silico* при помощи пакета CLC Genomic Workbench v. 20.0.4 ("Qiagen", Германия).

В качестве референтных последовательностей для построения филогенетического дерева были использованы последовательности гена *pmoA* валлидных видов и природные (полученные на основании метагеномного анализа) последовательности гена *pmoA*, описанные в работе Knief (2015).

Транслированные последовательности выравнивали при помощи MAFFT (Katoh, Standley, 2013), после чего выравнивание обрезалось при помощи пакета Trimal, в автоматическом режиме выбора параметров (Capella-Gutiérrez et al., 2009). Дерево было построено на основании пакета RAxML с применением гамма модели аминокислотных замен на основе WAG матрицы (GTRGAMMAWAG), с использованием быстрого бутстрэп-анализа по 1000 репликам (Stamatakis, 2014).

Проведение инкубационного эксперимента. Для проведения эксперимента по оценке влияния температуры на активность и состав метанового фильтра 5 г осадка помещали в 120 мл флаконы и добавляли 5 мл минеральной среды следующего состава: (г/л): KNO_3 – 0.25; NH_4Cl – 0.25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; CaCl_2 – 0.1; NaCl – 20.0; KCl – 1.5; Na_2HPO_4 – 0.358; KH_2PO_4 – 0.13 и 1 мл раствора микроэлементов следующего состава (мг/100 мл): нитрилтриуксусная кислота (НТА) – 150; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 50; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10; CoCl_2 – 10; ZnSO_4 – 10; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – 1; H_3BO_3 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1; pH готовой среды составлял 6.8–7.2. В газовую фазу добавляли 5% метана, инкубирование проводили при 4, 10, 15 и 20°C в течение 30 сут. Убыль метана оценивали методом газовой хроматографии на приборе ГХ Кристалл 5000.2 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. После окончания эксперимента из образцов выделена тотальная ДНК для проведения анализа метагеномных библиотек *rhoA* методом высокопроизводительного секвенирования (HiSeq Illumina) и количественной ПЦР.

Определение количественного содержания метанотрофных бактерий методом ПЦР в реальном времени. Количественное содержание метанотрофов в исследуемых образцах проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймерной системы: A189/mb661 (Chen et al., 2007).

ПЦР в режиме реального времени по технологии SYBR Green I проводили в ПЦР буфере-RB (“Синтол”, Россия) в присутствии пассивного референсного красителя ROX для нормализации сигнала флуоресценции красителя, используемого в реакции. Детекцию для каждого образца осуществляли в двукратной повторности. В качестве отрицательного контроля (реакционная смесь без ДНК-матрицы) использовали ddH_2O (“Синтол”, Россия). Амплификацию проводили с использованием Системы ПЦР-обнаружения реального времени CFX96 TouchTM (“Bio-Rad”). Состав реакционной смеси: 2.5× ПЦР буфер-Б – 10 мкл, праймер A189 (20 пкмоль/мкл) – 0.25 мкл, праймер mb661R (20 пкмоль/мкл) – 0.25 мкл, образец ДНК – 5 мкл, деионизованная вода – до конечного объема 25 мкл. Температурно-временной про-

филь реакции: активация полимеразы 5 мин при 95°C, следующие 40 циклов – 20 с при 95°C, 56°C – 20 с, 62°C – 50 с.

Для подсчета количества клеток в анализируемых образцах, сравнивали сигнал, полученный в исследуемом образце, со стандартной кривой. Для построения стандартных кривых применяли серию последовательных разведений стандартного образца. В качестве стандартного образца использовали предварительно очищенный с помощью набора WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) и впоследствии клонированный в pGEM-T вектор (“Promega”, США) целевой ПЦР-фрагмент.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика района исследований и интенсивности микробного окисления метана. Исследованные скважины пробурены в период с 2017 по 2021 г. Устье скважины представляло собой выход к поверхности дна трубы диаметром около 70 см, залитой бетонной смесью. В поверхностных осадках, в непосредственной близости от скважины, выявлены повышенные концентрации метана по сравнению с фоновыми осадками, отобранными на расстоянии 1 км от скважины. Предполагается, что аномалии по содержанию метана связаны с капиллярным высачиванием газа из трубы.

Характеристики осадков для большинства образцов были сходными, как в целом по району исследований, так и в парах “скважина” – “фоновая” (табл. 1). Гранулометрия донных осадков не имеет явных закономерностей в зависимости от глубины водной толщи. Основным источником для формирования поверхностных донных отложений служат рыхлые отложения западного берега п-ова Ямал и п-ова Югорский. В результате термоабразии с Ямальского берега в акваторию поступают мелкозернистые пески с суглинистым материалом, а более тонкодисперсные выносы глинистой фракции – с п-ова Югорский (Саввичев и соавт., 2018). Современные донные осадки представлены алевроито-пелитовыми, пелито-алевритовыми илами, песчаным илом, пелитовым илом и смесью среднезернистого и мелкозернистого песков. Большинство осадков слагаются в разном соотношении несколькими видами илов с мелкозернистым песком. Большинство отобранных осадков характеризуется серо-коричневым цветом, типичным для окисленных осадочных отложений. Величина pH осадков изменялась в интервале 6.8–8.0 единиц. Значения температуры варьировали в пределах $-0.5...+1.5^\circ\text{C}$.

Содержание хлорид-аниона (консервативного показателя минерализации) в иловых водах варьировало от 441 до 512 ммоль л^{-1} . Незначительное распреснение иловых вод связано с придон-

Таблица 1. Характеристика станций отбора образцов

Скважина (дата бурения)	Координаты	Глубина, м	Характеристика осадка	Хлорид, мМ	Сульфат, мМ	SO ₄ ²⁻ /Cl ⁻ , %	Alk, мМ
Ленинградская 1							
1Л/1 (скважина, 2017 г.)	72°18'25.82" N 65°40'09.89" E	85	Серый, песчано-глинисто-алевроитовый, мягкий, влажный, с темными вкраплениями, запах органики	504.6	29.9	15.8	4.7
1Л/6 (фон)	72°18'10.94" N 65°38'35.74" E	90	Коричневато-сероватый, песчано-глинисто-алевроитовый с темными вкраплениями, слабый запах, мягкий, влажный	500.3	30.5	16.3	5.3
Ленинградская 2							
2Л/1 (скважина, 2018 г.)	72°13'22.49" N 65°34'26.40" E	114	Темно-серый, обводненный, алевроитово-пелитовый, мягкий, без запаха	511.3	32.8	17.1	3.3
2Л/6 (фон)	72°13'29.44" N 65°32'43.24" E	117	Серый, алевроитовый, с песком, влажный, мягкий, без запаха	501.8	30.4	16.1	3.9
Ленинградская 3							
3Л/1 (скважина, 2019 г.)	72°18'06.26" N 65°50'36.94" E	104	Серый, песчаный, плотный, водянистый, без запаха	512.3	32.2	16.7	3.8
3Л/6 (фон)	72°18'31.93" N 65°49'32.64" E	103	Коричнево-серый, глинистый, мягкий, влажный, без запаха	507.0	29.4	15.4	4.0
Русановская							
6Р/1 (скважина, 2017 г.)	73°01'35.81" N 65°56'26.46" E	64	Серый песчано-алевроитовый, влажный, мягкий, без запаха	487.9	29.1	15.9	3.2
6Р/6 (фон)	73°01'48.31" N 65°54'44.61" E	75	Коричневый с серыми вкраплениями, алевроитовый с песчаными добавками, влажный, мягкий, без запаха	497.5	29.5	15.8	3.3
Скуратовская							
1С/1 (скважина, 2020 г.)	73°00'07.49" N 68°55'13.90" E	14	Серо-коричневый, мелкий песок с добавками алевроита, водянистый, без запаха	446.4	25.9	15.5	4.3
1С/6 (фон)	72°59'37.15" N 68°54'36.32" E	14	Коричнево-серый алевроитопесчаный, водянистый, без запаха	440.9	27.3	16.5	6.5
Нярмейская							
1Н/1 (скважина, 2021 г.)	72°23'56.30" N 68°15'38.25" E	21	Коричнево-серый пелито-алевроитовый, песчаный, водянистый, без запаха	468.8	28.5	16.2	6.1
1Н/6 (фон)	72°23'24.59" N 68°15'58.05" E	21	Серовато-коричневый, глинисто-алевроитопелитовый, маслянистый, мягкий, без запаха	481.7	29.1	16.1	5.9

Таблица 2. Содержание метана и активность его микробного окисления в образцах осадков юго-западного сектора Карского моря

Скважина	Содержание CH ₄ , нМ	Скорость окисления CH ₄ , нмоль CH ₄ /(л сут)	Включение C-CH ₄ в CO ₂	Включение C-CH ₄ в РОУ	Включение C-CH ₄ в БМ
			нмоль CH ₄ /(л сут) (% от общего)		
Ленинградская					
1Л/6	33.24	3.04	1.31 (43.2)	1.72 (56.4)	0.01 (0.4)
1Л/1	37.10	2.71	2.04 (75.3)	0.64 (23.5)	0.03 (1.2)
Ленинградская					
2Л/6	60.19	3.64	2.26 (62.0)	1.36 (37.3)	0.03 (0.7)
2Л/1	48.43	1.77	0.8 (45.2)	0.87 (49.0)	0.10 (5.8)
Ленинградская					
3Л/6	18.43	2.05	1.00 (48.6)	0.94 (45.9)	0.11 (5.5)
3Л/1	60.69	5.55	2.76 (49.7)	2.72 (48.9)	0.08 (1.4)
Русановская					
6Р/1	38.04	1.68	1.3 (77.4)	0.34 (20.5)	0.04 (2.1)
6Р/6	17.37	0.69	0.61 (87.5)	0.06 (9.0)	0.02 (3.5)
Скуратовская					
1С/1	51.98	5.98	1.4 (23.5)	4.20 (70.3)	0.37 (6.2)
1С/6	42.89	2.64	0.45 (17.1)	1.94 (73.6)	0.25 (9.3)
Нярмейская					
1Н/6	8.97	1.60	0.83 (51.8)	0.74 (46.2)	0.03 (2.0)
1Н/1	85.15	11.11	4.56 (41.0)	6.50 (58.5)	0.06 (0.5)

ными течениями, неравномерными на большой площади морского дна. Содержание сульфат-аниона в иловых водах варьировало от 25.9 до 32.8 г л⁻¹. Значения хлор-сульфатного коэффициента ($\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-} \times 100, \%$), показателя активности процесса микробной сульфатредукции, варьировали от 15.4 до 17.1 (табл. 1). Незначительное увеличение значений хлор-сульфатного коэффициента является геохимическим показателем слабовыраженного процесса сульфатредукции.

Содержание щелочного резерва (Alk) в иловых водах исследованных осадков варьировало от 3.2 до 6.5 ммоль л⁻¹, что является характерным для поверхностных осадков Карского моря (Саввичев и соавт., 2018).

Содержание растворенного метана в осадках варьировало от 9 до 85 нмоль/дм⁻³, при среднем значении в 42 нмоль/дм⁻³. Существенных различий между скважинами и контрольными (фоновыми) точками не отмечено, за исключением Нярмейской, где содержание метана практически на порядок было выше в осадках района скважины (85.15 нмоль/дм⁻³) по сравнению с фоновой (8.97 нмоль/дм⁻³).

Скорость окисления метана также была достаточно низкой (0.69–5.98 нмоль CH_4 дм⁻³ сут⁻¹),

без существенных различий между скважинами и фоновыми станциями для 5 площадок парных точек (скважина – фоновая) исследования (табл. 2). При этом, для Нярмейской скважины величина интенсивности окисления метана была выше, чем на всех остальных станциях исследования (11.1 нмоль CH_4 дм⁻³ сут⁻¹), и заметно отличалась от значений на фоновой станции (1.6 нмоль CH_4 дм⁻³ сут⁻¹).

Тем не менее, несмотря на низкие скорости МО, суточное микробное потребление метана составляло от 3.7 до 17.9% (среднее 8.5%) от концентрационного пула метана в каждом исследованном осадке (табл. 2).

Основными продуктами микробного окисления и трансформации углерода метана являлись углекислота (HCO_3^-) и внеклеточные экзометаболиты (внеклеточный растворенный органический углерод – РОУ, в составе различных РОВ – растворенное органическое вещество). Соотношение продуктов микробного окисления углерода метана изменялось на разных станциях без видимых закономерностей. Основным продуктом микробной утилизации метана для всех исследованных образцов являлся HCO_3^- (от 17.1 до 87.5%, при среднем значении 51.9%). Диапазон величин

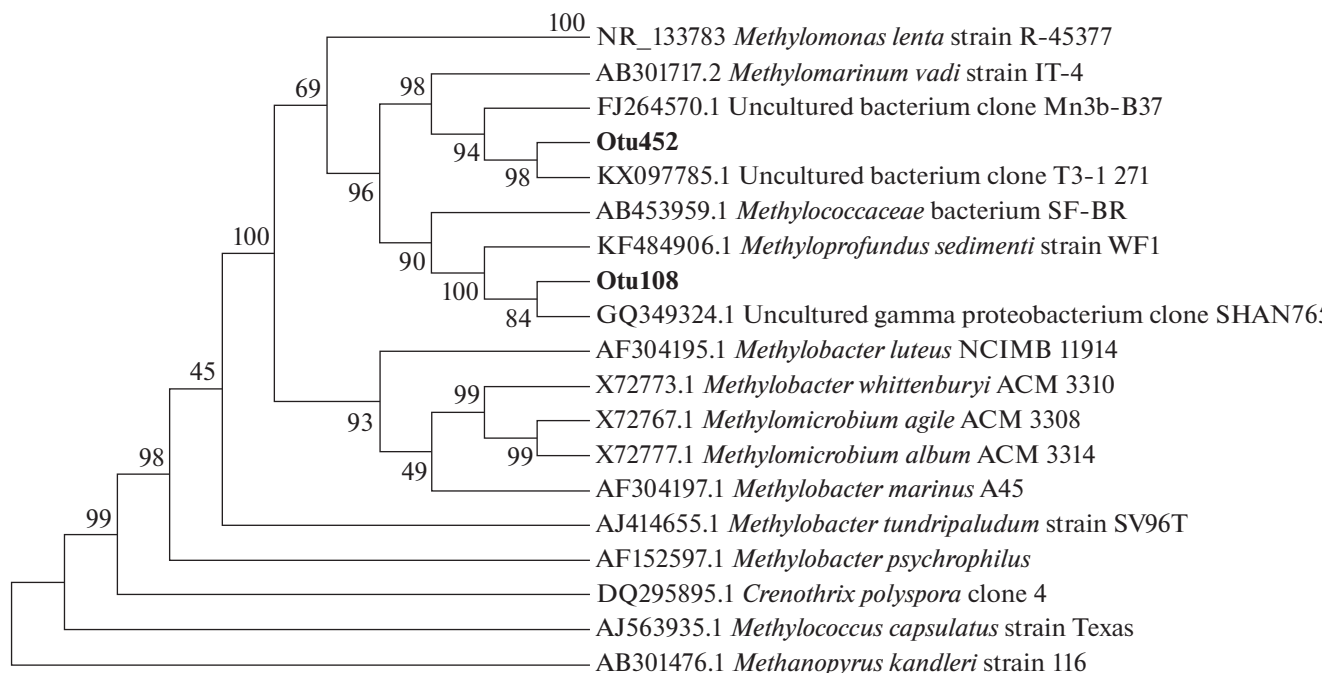


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S рРНК и отображающее положение выявленных в ходе данного исследования ОТЕ.

микробной трансформации углерода метана в РОУ составил для разных станций 9.0–73.6% углерода метана, при средней величине 44.9%. Доля включения углерода метана в биомассу была незначительной и составляла в среднем 3.2% (табл. 2).

Идентификация аэробных метанотрофов в нативных осадках. Анализ разнообразия метанотрофных микроорганизмов в нативных образцах, проведенный методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК, выявил присутствие представителей семейства *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* (рис. 2). Таксономическое разнообразие метанотрофов было невелико, выявлены представители *Methylococcaceae*, близкие к роду *Methyloprofundus* и отнесенные в 2 ОТЕ (рис. 2). Их доля не превышала 0.06% от общего числа прочтений всех прокариот (табл. 3).

Проведен анализ разнообразия метанотрофных микроорганизмов методом высокопроизводительного секвенирования гена *pmoA* (метанмонооксигеназа, ключевой фермент процесса окисления метана). Ввиду специфичности и избирательности анализа выявлено большее разнообразие ор-

ганизмов, отнесенных к 7 ОТЕ. Среди них представители *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* родов *Methyloprofundus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, а также *Alphaproteobacteria* рода *Methylocystis*. Существенных различий в составе метанотрофов, детектированных в естественных и антропогенно-нарушенных осадках выявлено не было (рис. 3).

Влияние температуры на состав и функционирование аэробного метанотрофного сообщества. Методом ПЦР в реальном времени установлено, что количество копий генов *pmoA* в нативных образцах осадков составляло 5.2×10^2 – 3.5×10^4 (табл. 4). В инкубационных экспериментах проведена оценка воздействия температуры на активность окисления метана и динамики количества метанотрофов в исследуемых осадках. Во всех образцах, инкубированных при 4 и 20°C отмечена убыль метана. За время эксперимента его количество снизилось с 10000 до 100–30 ppm. В образцах, инкубированных при 4°C, потребление метана было отмечено лишь по истечении 7 сут с максимальной убылью на 13–14 сут. Количество копий гена метанмонооксигеназы увеличилось на 1–2 порядка и соста-

Таблица 3. Относительное обилие метанотрофов в образцах ила Карского моря по результатам секвенирования гена 16S рРНК (% от всего сообщества)

ОТЕ	1Л/1	1Л/6	2Л/1	2Л/6	3Л/1	3Л/6	6Р/1	6Р/6	1С/1	1С/6	1Н/1	1Н/6
108	0.02	0	0	0	0.02	0	0.02	0	0	0	0.02	0
452	0.04	0	0.01	0	0	0	0	0	0.06	0.04	0.02	0.01

Таблица 4. Количества копий генов *pmoA* на 1 г осадка

Станция	Нативный осадок	Инкубирование при 4°C	Инкубирование при 20°C
1Л/1	(2.95 ± 0.34)E+03	(3.13 ± 0.50)E+05	(2.89 ± 0.52)E+03
1Л/6	(7.22 ± 0.25)E+03	(3.96 ± 0.24)E+04	(3.13 ± 0.28)E+03
2Л/1	(3.47 ± 0.34)E+03	(6.21 ± 0.16)E+04	(3.52 ± 0.03)E+03
2Л/6	(5.45 ± 0.38)E+03	(6.48 ± 0.19)E+03	(9.46 ± 0.21)E+03
3Л/1	(5.24 ± 0.20)E+02	(1.56 ± 0.23)E+05	(4.32 ± 0.28)E+02
3Л/6	(1.96 ± 0.06)E+03	(1.06 ± 0.10)E+04	(6.42 ± 0.07)E+03
6Р/1	(3.29 ± 0.51)E+03	(7.21 ± 0.26)E+05	(3.97 ± 0.30)E+04
6Р/6	(5.36 ± 0.17)E+03	(3.43 ± 0.21)E+05	(4.12 ± 0.23)E+03
1С/1	(2.80 ± 0.07)E+04	(1.77 ± 0.30)E+05	(4.43 ± 0.47)E+04
1С/6	(2.79 ± 0.09)E+04	(4.15 ± 0.13)E+05	(4.69 ± 0.13)E+04
1Н/1	(3.55 ± 0.50)E+04	(1.05 ± 0.03)E+05	(1.17 ± 0.39)E+05
1Н/6	(5.55 ± 0.35)E+03	(4.03 ± 0.48)E+03	(3.68 ± 0.01)E+03

щества (термогенный метан) и абиотический метан, поступающий в составе газов в зонах разгрузки подводных гидротерм и грязевых вулканов (Пименов и соавт., 2000). Метан, попавший в воду, распространяется путем диффузии и пузырьковым способом. Диффузия метана в воду является медленным процессом. Пузырьковый перенос значительно интенсивнее диффузионного. В глубоководной части Северного Ледовитого океана этот процесс может обеспечивать вынос метана к поверхности морского льда, если объем пузырьков достаточно велик. В противном случае метан успевает раствориться по мере поднятия пузырьков до полного их исчезновения (Шахова и соавт., 2009).

Проведение газоразведывательного бурения в морских акваториях сопровождается выбросами метана в толщу воды, что позволяет рассматривать такие скважины как сипы антропогенного происхождения. При консервировании поисковых скважин возможно неполное прекращение выброса или высачивания метана, что может провоцировать дополнительную нагрузку на экосистему.

Литературные данные, полученные в ходе исследования арктических морей, свидетельствуют о том, что в местах отсутствия признаков газовой выделений из морского дна концентрация растворенного метана в воде невелика. Так, для Баренцева моря содержание метана в фоновых образцах поверхностных осадков не превышало 0.5 мкМ, в то время как в районе сипа концентрация метана повышалась до 9.5 мкМ (Begmatov et al., 2021). Для моря Лаптевых влияние сипов прослеживалось более отчетливо: на сиповых станциях содержание метана варьировало от 19 до 539 мкМ, на фоновых станциях не превышало 0.012 мкМ (Savvichev et al., 2018a).

В ходе исследований поверхностного слоя донных осадков Ямальского сектора Карского моря по-

казано, что содержание метана, растворенного в поверхностных осадках, составляет от 1.9 до 20.3 мкМ дм⁻³ при среднем значении в 8.16 мкМ дм⁻³ (Саввичев и соавт., 2018). Это согласуется с данными, полученными в ходе более ранних исследований, проведенных в различных районах Карского моря (Леин и соавт., 1996; Саввичев и соавт., 2018). Значения концентрации метана, приведенные в нашей работе, невелики, варьируют в диапазоне 0.009–0.9 мкМ и соответствуют нижнему уровню интервалов, приведенных в более ранних работах.

В целом, анализ данных о скорости микробного окисления метана в поверхностных осадках арктических морей выявляет общие закономерности. Для осадков, не подверженных влиянию сипов, скорости МО были низкими и коррелировали с количеством содержащегося метана. Резко отличались скорости окисления метана в образцах, отобранных в районах сипов моря Лаптевых. Там величины интенсивности этого микробного процесса составляли 460–3900 нмоль СН₄/(л сут). В то время как на фоновых станциях значения МО не превышали 2 нмоль СН₄/(л сут). В Баренцевом море значения МО на сиповой станции также были выше, чем на фоновых (соответственно, 22.8 и 2.1–8.2 нмоль СН₄/(л сут)). Для Карского моря скорость окисления метана составляла от 0.69 до 5.98 нмоль СН₄/(л сут) (Саввичев и соавт., 2018). В образцах осадков, отобранных в районах законсервированных скважин, количество метана и скорости его окисления коррелируют с величинами, показанными для мест, не подверженных влиянию сипов. В то же время для законсервированной скважины Няремейского месторождения (образец 1Н/1) зафиксирована максимальная величина МО, составлявшая 11.11 нмоль СН₄/(л сут). Наряду с повышенным содержанием

метана в осадках, можно полагать, что данная скважина проявляет признаки сипа. В образцах, отобранных на контрольной станции (образец 1Н/6), концентрация метана и скорость его микробного окисления меньше в 10 раз. Очевидно, что скважины, где бурение осуществлялось не более 1 года назад (Нярмейская), проявляют признаки сипов. Для станций, на которых газоразведывательное бурение проводилось более 2 лет назад (Ленинградская, Русановская, Скуратовская), количество метана и скорость его микробного окисления соотносятся с данными, показанными для фоновых станций.

Разнообразие аэробных метанотрофных бактерий в нативных осадках изучалось нами методами высокопродуктивного секвенирования генов 16S рРНК и *pmoA*. Анализ генов 16S рРНК позволяет оценить долю метанотрофов в сообществе бактерий, но не дает возможность детектировать полный спектр этих организмов, т.к. достоверно не учитывает минорные компоненты. Согласно результатам анализа гена 16S рРНК, разнообразие аэробных метанотрофов в исследованных осадках было невелико и ограничивалось 2 ОТЕ. На филогенетическом дереве детектированные последовательности образуют кластер организмов, типичных для морских экосистем. Так, ОТЕ 108 относится к “deep sea-1 cluster”. Единственным культивируемым представителем клады является *Methyloprofundus sedimenti* WF1. Представители этого кластера типичны не только для северных морей, но для морских экосистем в целом, что отмечено во многих работах (Knief, 2015; Hirayama et al., 2022). Их вклад в морской цикл метана заключается не только в потреблении метана в толще воды и морских отложениях, но и в образовании эндосимбиотических связей с морскими животными. В морских экосистемах условия обитания для аэробных метанотрофов ограничены количеством кислорода, а также нестабильным поступлением субстрата — метана, концентрации которого варьируют в зависимости от сезона (активности метаногенеза) или высачиваний газа. Низкие значения температур также сдерживают активность микробных клеток (Knoblauch et al., 2013). Поэтому представители клады “deep sea-1” адаптированы к неблагоприятным условиям среды: в клетках изменяется уровень насыщения жирными кислотами, увеличивается содержание кардиолипина, отвечающего за поддержание функционирования дыхательной цепи (Romantsov et al., 2009), увеличивается количество гранул запасных веществ в цитоплазме, происходит ряд структурных изменений. Метановое голодание провоцирует увеличение количества транскриптов генов *pmoA*, в то время как транскрипция всех остальных генов снижается. Таким образом, поступление метана после периода голодания провоцирует резкий скачок активности метанотрофов, при этом большая часть

метана окисляется не полностью, что приводит к значительным выбросам в окружающую среду метанола, давая субстрат для развития других звеньев трофической цепи (Tavormina et al., 2017).

Несмотря на постоянно низкие значения температур в исследуемых осадках, обнаруженные метанотрофные бактерии относятся к мезофильным (психротолерантным). Изучение чистой культуры *Methyloprofundus sedimenti* WF1 позволило определить температурный оптимум роста, находящийся в диапазоне 18–23°C, что характерно для мезофильных микроорганизмов. После инкубирования с метаном при 20°C достоверного увеличения количества копий гена метанмонооксигеназы не зафиксировано, однако потребление метана происходило более активно, чем при 4°C. Инкубирование образцов при 4°C сопровождалось пониженной активностью клеток, метан потреблялся медленнее, в то же время происходил прирост количества копий гена *pmoA*, что свидетельствует о снижении стрессового воздействия на клетки метанотрофов с повышением температуры. Обращает на себя внимание тот факт, что при 10 и 15°C в накопительных культурах мы не наблюдали активности потребления метана, что может свидетельствовать о существовании в микробном сообществе донных осадков как истинно психрофильных метанотрофных бактерий, так и мезофилов, рост которых начинается при температуре выше 15°C.

ОТЕ 452, принадлежащий к “deep sea-2 cluster”, относится к группе аэробных метанооксиляющих организмов, приуроченных к морским гидротермам. Представители этой группы также отмечаются как эндосимбионты моллюсков (Hirayama et al., 2012; Wang et al., 2018).

В районах законсервированных скважин метанотрофы представляли минорную часть микробного сообщества, их доля не превышала 0.06% от всех полученных ОТЕ. На фоновых станциях количество метанотрофов, как правило, было ниже уровня детекции (табл. 3).

Аналогичная структура сообщества метанотрофов показана для морей Восточно-Сибирского и Лаптевых, где по результатам анализа микробного сообщества нативных осадков методом секвенирования гена 16S рРНК также показано небольшое разнообразие аэробных метанотрофов. Обнаруженные последовательности входят в состав клады “deep sea-1”. В районах, не подверженных влиянию сипов, количество метанотрофов не превышает 0.4% и, как правило, составляет 0.01–0.1%. В местах постоянных выходов газа метанотрофы составляли 0.6–2.0% (Tikhonova et al., 2021, 2022, in press).

Для более детального выявления разнообразия аэробных метанотрофов мы использовали более специфичный и избирательный метод высокопро-

дуктивного секвенирования гена метанмоноокси-геназы *pmoA*, позволяющий детектировать минорные компоненты сообщества, которые при смене физико-химических параметров среды могут активно развиваться. При анализе результатов, полученных в ходе секвенирования гена *pmoA*, также показано присутствие в метанотрофном сообществе представителей “deep sea-1 и deep sea-2 clusters”, составляющих, соответственно, 40–50 и 0.1–0.2% от общего количества последовательно-стей, отнесенных к гену *pmoA*.

Дополнительно при анализе гена *pmoA* были обнаружены организмы, входящие в “deep sea-3 и 5 clusters” (4–8 и 1.5–14% соответственно). Представители данных кластеров присутствовали во всех исследованных осадках в разном количественном соотношении. Подобная структура метанотрофных сообществ типична для морских экосистем и отмечается в ряде исследований (Knief, 2015).

Таким образом, филогенетический состав аэробных метанотрофов для осадков, отобранных в районах законсервированных скважин, и на фоновых станциях аналогичен. Основу составляют метанотрофы, входящие в глубоководные кластеры, широко представленные в морских экосистемах.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что в антропогенно нарушенных осадках с признаками газового высачивания активизируются процессы микробного окисления метана, способствующие вовлечению углерода метана в трофическую цепь. В этой связи повышенное содержание метана, а также более высокие активности его окисления в зонах законсервированных скважин могут свидетельствовать о неполной герметизации скважин. В нашей работе признаки метанового сипа с повышенным содержанием растворенного метана и высокими скоростями его микробного окисления проявляла Няремейская скважина, пробуренная в 2021 году. Скважины, законсервированные более 2 лет назад, не обнаруживали признаков высачивания метана.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ А 20-04-00126, а также из средств государственного задания ФИЦ Биотехнологии РАН. Секвенирование и биоинформатический анализ последовательностей гена *pmoA* профинансированы Министерством высшего образования и науки РФ (соглашение № 075-15-2019-1659 на развитие Курчатковского центра геномных исследований).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григоренко Ю.Н., Мирчинк И.М., Савченко В.И., Сенин Б.В., Супруненко О.И. Угледородный потенциал континентального шельфа России: состояние и проблемы освоения // Минеральные ресурсы российского шельфа: Спецвып. журн. “Минеральные ресурсы России; экономика и управление”. М., 2006. С. 14–71.
- Леин А.Ю., Русанов И.И., Пименов Н.В. Биогеохимические процессы циклов углерода и серы в Карском море // Геохимия. 1996. № 11. С. 1027–1044.
- Лисицын А.П., Шевченко В.П., Виноградов М.Е., Северина О.В., Вавилова В.В., Мицкевич И.Н. Потоки осадочного вещества в Карском море и в эстуариях Оби и Енисея // Океанология. 1994. Т. 34. С. 748–758.
- Lisitzin A.P., Shevchenko V.P., Vinogradov M.E., Severina O.V., Vavilova V.V., Mitzkevich I.N. Particle fluxes in the Kara Sea and Ob and Yenisei estuaries // Oceanology. 1995. V. 34. P. 683–693.
- Мошаров С.А., Мошарова И.В. Сравнительный анализ продукционных и микробиологических характеристик Карского и Чукотского морей // Физические, геологические и биологические исследования океанов и морей. М.: Научный мир, 2010. С. 494–505.
- Пименов Н.В., Саввичев А.С., Русанов И.И., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробиологические процессы цикла углерода и серы на холодных метановых сипах северной Атлантики // Микробиология. 2000. Т. 69. № 6. С. 831–843.
- Pimenov N.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycles at cold methane seeps of the North Atlantic // Microbiology (Moscow). 2000. V. 69. P. 709–721.
- Русанов И.И., Саввичев А.С., Юсупов С.К., Пименов Н.В., Иванов М.В. Образование экзометаболитов в процессе микробного окисления метана в морских экосистемах // Микробиология. 1998. Т. 67. № 5. С. 710–717.
- Rusanov I.I., Savvichev A.S., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Production of exometabolites in the microbial oxidation of methane in marine ecosystems // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 590–596.
- Тихонова Е.Н., Кадников В.В., Русанов И.И., Белецкий А.В., Захарова Е.Е., Самылина О.С., Равин Н.В., Пименов Н.В. Метанооксилюющая активность и филогенетическое разнообразие аэробных метанотрофов в поверхностных осадках моря Лаптевых // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 304–314.
- Tikhonova E.N., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Beletsky A.V., Zakharova E.E., Samylina O.S., Ravin N.V., Pimenov N.V. Methane-oxidizing activity and phylogenetic diversity of aerobic methanotrophs in the Laptev Sea upper sediment horizons // Microbiology. 2021. V. 90. P. 314–323.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Кадников В.В., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В. Состав микробного сообщества и активность микробных процессов цикла метана в поверхностных осадках Ямальского сектора юго-западной части Карского моря // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 178–190.

- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Kadnikov V.V., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial community composition and rates of the methane cycle microbial processes in the upper sediments of the yamal sector of the southwestern Kara Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 238–248.
- Begmatov S., Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Rusanov I.I., Klyuvitkin A.A., Novichkova E.A., Mardanov A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V. Microbial communities involved in methane, sulfur and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea // *Microorganisms*. 2021. V. 9. P. 2362.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Kevin Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications // *BMC Bioinform.* 2009. V. 10. P. 421.
- Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M., Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // *Bioinform.* 2009. V. 25. P. 1972–1973.
- Chen Y., Dumont M.G., Cébron A., Murrell J.C. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 2855–2869.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinform.* 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Egorov A.V., Ivanov M.K. Hydrocarbon gases in sediments and mud breccias from the central and eastern part of the Mediterranean Ridge // *Geo-Mar. Lett.* 1998. V. 18. P. 127–138.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. fiw018.
- Gohl D., Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Protocol Exchange*. Epub a head of print 25 July 2016. <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- Hirayama H., Takaki Y., Abe M., Imachi H., Ikuta T., Miyazaki J., Tasumi E. Multispecies populations of methanotrophic *Methyloprofundus* and cultivation of a likely dominant species from the Iheya North deep-sea hydrothermal field // *Appl. Environ. Microbiol.* 2022. V. 88. e0075821.
- Hirayama H., Fuse H., Abe M., Miyazaki M., Nakamura T., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylo-marinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 63. P. 1073–1082. <https://www.globalmethane.org>.
- Ivanov M.V., Pimenov N.V., Rusanov I.U., Lein A. Yu. Microbial process of the methane cycle at the north-western shelf of the Black Sea // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2002. V. 54. P. 589–599.
- Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 772–780.
- Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 1346.
- Knoblauch C., Beer C., Sosnin A., Wagner D., Pfeiffer E.-M. Predicting long-term carbon mineralization and trace gas production from thawing permafrost of Northeast Siberia // *Global Change Biology*. 2013. V. 19. P. 1160–1172.
- Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. P. W293–W296.
- Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinform.* 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Masella A.P., Bartram A.K., Truszkowski J.M., Brown D.G., Neufeld J.D. PANDAsq: paired-end assembler for illumina sequences // *BMC Bioinform.* 2012. V. 13. P. 31. <https://neftgaz.ru/>.
- Renaud G., Stenzel U., Maricic T., Wiebe V., Kelso J. deML: robust demultiplexing of Illumina sequences using a likelihood-based approach // *Bioinform.* 2015. V. 31. P. 770–772.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ Preprints*. 2016. V. 4. e2409v1.
- Romantsov T., Guan Z., Wood J.M. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* 2009. V. 1788. P. 2092–2100.
- Samad M.S., Bertilsson S. Seasonal variation in abundance and diversity of bacterial methanotrophs in five temperate lakes // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 142.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Kravchishina M.D., Galkin S.V., Novigatskii A.N., Sigalevich P.A., Merkel A. Yu., Ravin N.V., Pimenov N.V., Flint M.V. Methane as an organic matter source and the trophic basis of a Laptev Sea cold seep microbial community // *Geomicrobiol. J.* 2018a. V. 35. № 5. P. 1–13.
- Shakhova N., Semiletov I., Salyuk A., Yusupov V., Kosmach D., Gustafsson O. Extensive methane venting to the atmosphere from sediments of the East Siberian Arctic Shelf // *Science*. 2010. V. 327. P. 1246–1250.
- Shakhova N.E., Semiletov I.P. Methane hydrate feedbacks // *Arctic climate feedbacks: Global implications* / Eds. Sommerkorn M., Hassol S.J. WWF International Arctic Programme August. 2009. P. 81–92.
- Stamatakis A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinform.* 2014. V. 30. P. 1312–1313.
- Tavormina P.L., Kellermann M.Y., Antony C.P., Tocheva E.I., Dalleska N.F., Jensen A.J., Valentine D.L., Hinrichs K.-U., Jensen G.J., Dubilier N., Orphan V.J. Starvation and recovery in the deep-sea methanotroph *Methyloprofundus sedimenti* // *Mol. Microbiol.* 2017. V. 103. P. 242–252.
- Tavormina P.L., Ussler W., Orphan V.J. Planktonic and sediment-associated aerobic methanotrophs in two seep systems along the North American Margin // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3985–3995.
- Tikhonova E.N., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Structural and functional organization of methane filter in the Russian Arctic Seas upper sediment horizons. 2022, in press.
- Toshchakov S.V., Izotova A.O., Vinogradova E.N., Kachmazov G.S., Tuaeve A.Y., Abaev V.T., Evteeva M.A., Gunitseva N.M., Korzhenkov A.A., Elcheninov A.G., Patrushev M.V., Kublanov I.V. Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the North Caucasus // *Biology*. 2021. V. 10. P. 1352.

Wang L., Yu M., Liu Y., Liu J., Wu Y., Li L., Liu J., Wang M., Zhang X.-H. Comparative analyses of the bacterial community of hydrothermal deposits and seafloor sediments across Okinawa Trough // J. Mar. Systems. 2018. V. 180. P. 162–172.

Yurganov L.N., Leifer I. Оценки эмиссии метана от некоторых арктических и приарктических районов по данным орбитального интерферометра IASI // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2016. Т. 13. № 3. С. 173–183.

Yurganov L.N., Leifer I., Lund Myhre C. Seasonal and inter-annual variability of atmospheric methane over Arctic Ocean from satellite data // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2016. Т. 13. № 2. С. 107–119.

Yurganov L.N., Leifer I., Lund Myhre C. Seasonal and inter-annual variability of atmospheric methane over Arctic Ocean from satellite data // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2016. Т. 13. № 2. С. 107–119.

Microbial Processes of Methane Oxidation at the Kara Sea Sites of Gas Prospecting

E. N. Tikhonova¹ *, I. I. Rusanov¹, V. V. Kadnikov¹, E. V. Demkina¹, S. V. Toshchakov², A. O. Izotova², and N. V. Pimenov¹

¹Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²National Research Center “Kurchatov Institute”, Kurchatov Complex for Genetic Research (GosNIIgenetika), Moscow, 123098 Russia

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Received October 25, 2022; revised November 14, 2022; accepted November 14, 2022

Abstract—Methane oxidation rates and diversity of methane-oxidizing microorganisms in the Kara Sea upper sediments at the sites of conserved gas prospecting wells were investigated. Analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed members of the class *Gammaproteobacteria*, order *Methylococcales*. All samples exhibited similar diversity of the methane filter microorganisms, comprising mainly of methanotrophs related to the genus *Methyloprofundus* and of uncultured methanotrophic bacteria detected previously in the upper sediments of the Arctic seas. Molecular identification of methane-oxidizing bacteria of this community by high-throughput sequencing of the *pmoA* gene encoding particulate methane monooxygenase confirmed the similar structure of the methane filter in the upper sediments impaired by drilling and at the reference sites at significant distance from the wells. The sediments at the conserved well drilled less than two years earlier were shown to have the characteristics of a methane seep, i.e., elevated level of dissolved methane and high rates of microbial methane oxidation. No indication of methane seepage was observed for the wells conserved more than two years earlier; abundance of methane-oxidizing bacteria in their vicinity was below the detection threshold.

Keywords: methane, methane oxidation, aerobic methanotrophs, Kara Sea, gas prospecting, high-throughput sequencing, ecosystems under anthropogenic impact