

УДК 574.58+579.68:579.222

АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ НЕФТИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ДОННЫХ ОСАДКОВ РАЙОНА ЕСТЕСТВЕННОГО НЕФТЕПРОЯВЛЕНИЯ (СРЕДНИЙ БАЙКАЛ, БОЛЬШАЯ ЗЕЛЕНОВСКАЯ)¹

© 2024 г. О. Н. Павлова^{а, *}, С. В. Букин^а, О. Н. Изосимова^а, С. М. Черницына^а,
В. Г. Иванов^а, А. В. Хабуев^а, Т. В. Погодаева^а, И. С. Еловская^а, А. Г. Горшков^а, Т. И. Земская^а

^а Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

*e-mail: pavlova@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 09.01.2024 г.

После доработки 29.02.2024 г.

Принята к публикации 18.03.2024 г.

Определено разнообразие микробных сообществ донных осадков района нефтепроявления Бол. Зеленовская (оз. Байкал) и потенциальная функциональная активность в анаэробных процессах деградации нефти. При культивировании микроорганизмов подповерхностного и глубинного осадка в накопительных культурах, содержащих нефть и различные акцепторы электронов, в течение одного года при 10°C, концентрация н-алканов снизилась в 1.2–2 раза, ПАУ – в 2.2–2.8 раза. Конверсия углеводов сопровождалась генерацией углеводородных газов (метан, этан). Микробное сообщество подповерхностного осадка характеризовалось большим бактериальным разнообразием, чем глубинного, и представлено микроорганизмами, специализирующимися на процессах разложения широкого спектра субстратов, включая нефтяные углеводороды. В глубинных слоях осадка преобладали *Atribacterota*, *Caldisericota* и *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*), а также представители “редкой биосферы” *Elusimicrobiota* и *Candidatus* *Nadarchaeota*. К числу основных участников деградации нефти в донных осадках оз. Байкал могут быть отнесены представители филумов *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Halobacteriota* и *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*).

Ключевые слова: оз. Байкал, донные осадки, анаэробное окисление нефти, микробное сообщество, углеводородные газы

DOI: 10.31857/S0026365624050044

Оз. Байкал – озеро тектонического происхождения в южной части Восточной Сибири, является крупнейшим природным резервуаром пресной воды. Три пресноводные озера в мире, включая оз. Байкал, а также рифтовое глубоководное озеро Танганьика и мелководное озеро Чапала, характеризуются природными выходами нефти. На оз. Байкал установлены два района естественных нефтепроявлений; один расположен в устье р. Большая Зеленовская (БЗ) и известен с конца XVIII века, второй – у м. Горевой Утес (ГУ) (открыт в 2005 г.) (Хлыстов и соавт., 2007).

Естественный выход нефти у устья реки Бол. Зеленовская, несмотря на свое более длительное существование, остается менее изученным в плане геологического строения донных отложений и рельефа дна в сравнении с нефтепроявлением ГУ.

Разгрузка нефти в виде всплывающих нефтяных капель обнаруживается только на водной поверхности напротив устья реки Бол. Зеленовская на расстоянии ~2 км от береговой линии (рис. 1).

Место выхода нефти на дне долгое время не было установлено. Опробование донных осадков, проведенное с целью уточнения места разгрузки нефти, выявило следы углеводов в осадках подводного каньона, который является продолжением речной долины (БЗ_К) (рис. 1). Скопления нефти и газовых гидратов были установлены также в верхнем слое донных отложений, находящихся в 3.5 км от берега в районе устья р. Бол. Зеленовская на глубине 420 м, которые обозначены как холодный нефтегазовый сип “Зеленсип” (Хлыстов и соавт., 2022).

¹ Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050044

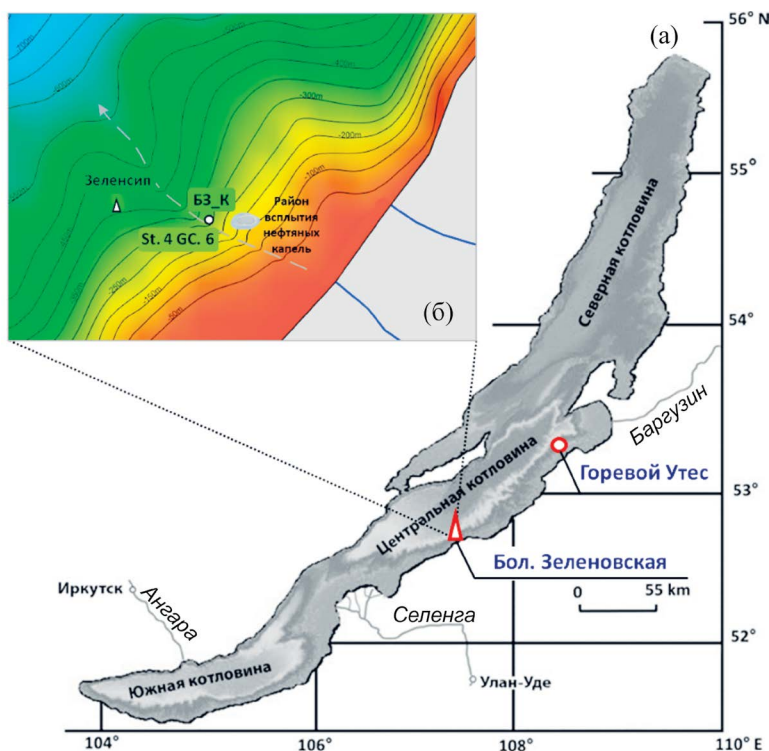


Рис. 1. Карта-схема расположения районов нефтепроявлений в оз. Байкал (а); схема района нефтепроявления напротив устья реки Бол. Зеленевская: ○ — место отбора проб; ▲ — место расположения нефтегазового сипа. Серой линией показано направление подводного каньона (б).

Образцы нефти, собранные как с поверхности озера в районе Бол. Зеленевской, так и в верхнем слое донных отложений “Зеленсип”, представляют собой биodeградированную ароматико-нафтеновую нефть (Хлыстов и соавт., 2022). В подводных каньонах, как и в осадках холодного нефтегазового сипа, где скопления углеводородов находятся длительное время и не поступают на поверхность водной толщи, может функционировать микробное сообщество, деятельность которого обуславливает высокую степень трансформации нефти в анаэробных условиях. В отсутствие кислорода нефтяные углеводороды могут окисляться микроорганизмами при использовании в качестве акцепторов электронов HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^- и Fe^{3+} (Zhang et al., 2019). Проведенные ранее исследования показали, что аэробные углеводородокисляющие микроорганизмы вносят значительный вклад в самоочищение озера от нефтяного “загрязнения” (Павлова и соавт., 2012). Вместе с тем, исследования микроорганизмов, участвующих в деградации нефти в анаэробной зоне осадочной толщи озера Байкал, находятся на начальном этапе (Pavlova et al., 2022).

Сравнение микробного разнообразия нефтяных коллекторов в разных частях мира показало корреляцию состава прокариотических сообществ с температурой и глубиной пласта

и отсутствие влияния географического расстояния между нефтяными резервуарами. Показано, что основной микробиом включает три класса бактерий (*Gammaproteobacteria*, *Clostridia* и *Bacteroidia*) и класс архей (*Methanomicrobia*), повсеместно распространенных в нефтяных коллекторах (Sierra-Garcia et al., 2017). По результатам метагеномного анализа известно, что состав микробных сообществ и их потенциальная функциональная активность меняются в зависимости от физико-химических условий нефтяных пластов и степени воздействия при эксплуатации нефтяных месторождений (Hidalgo et al., 2021; Gittins et al., 2023). Библиотеки ампликонов гена 16S рРНК и метагеномные библиотеки микроорганизмов нефтяных резервуаров не содержали общих основных таксонов на уровне вида, рода, семейства или отряда. На уровне высших таксонов только представители филумов *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Halobacteriota* встречались наиболее часто (75% от всех ампликонов гена 16S рРНК) в основном микробиоме нефтяных резервуаров (Gittins et al., 2023).

Естественные нефтепроявления оз. Байкал не подвергаются антропогенному воздействию. Донные осадки оз. Байкал, ассоциированные с разгрузкой углеводородов, содержат автохтонное

микробное сообщество, в котором ключевые участники деградации нефти могут быть отличными или схожими с микроорганизмами других нефтяных экосистем, не подвергшихся воздействию.

Цель исследования — изучить разнообразие и потенциальную функциональную активность микробного сообщества района нефтепроявления донных осадков в устье р. Большая Зеленовская (БЗ) в процессах анаэробного окисления нефти в присутствии различных акцепторов электронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Для исследования отобраны два образца донных осадков из керна St.4 GC. 6, полученного с помощью гравитационной трубы с борта НИС “Г.Ю. Верещагин” (~1.4 км от берега, глубина на водной толщи 320 м, Средний Байкал) в 2020 г. (рис. 1). Первый интегральный образец (K1) соответствовал глубине керна 30–50 см, второй (K2) — 250–270 см.

Получение накопительных культур. Для получения накопительных культур образцы донных осадков асептически отбирали из центральной части керна и сразу помещали во флаконы объемом 116 мл, содержащие 50 мл стерильной анаэробной минеральной среды следующего состава (г/л): NaCl — 0.25, KCl — 0.1, NH₄Cl — 0.1, KH₂PO₄ — 0.1, MgCl₂ · 6H₂O — 0.2, CaCl₂ · 2H₂O — 0.1, NaHCO₃ — 1, Na₂S · 9H₂O — 0.5 мМ, резазурин — 0.001, раствор витаминов — 1 мл, раствор микроэлементов по Пфеннигу (Практикум..., 2005) — 1 мл. Флаконы закрывали резиновыми пробками и алюминевыми колпачками, продували очищенным от кислорода азотом и встряхивали 15 мин при 160–180 об./мин на орбитальном шейкере (OS-20, “BioSan”, Рига, Латвия). Полученную суспензию с помощью шприца переносили во флаконы с минеральной средой (50 мл) указанного выше состава, содержащей различные акцепторы электронов: H₂ : CO₂ (80 : 10, об.); Na₂SO₄ (20 ммоль), газовая фаза N₂ : CO₂ (90 : 10, об.); NaNO₃ (2.3 ммоль), газовая фаза N₂ (100%, об.). Аморфный оксид Fe(III) (10 ммоль), полученный согласно (Slobodkin et al., 1997), вносили в минеральную среду, не содержащую восстанавливающих агентов, газовая фаза CO₂ (100%, об.). Таким образом, были получены 8 накопительных культур (таблица).

В качестве источника углерода использовали 50 мкл (38 мг, ρ = 760 мкг/мкл) нефти (“Ангарская нефтехимическая компания”, Россия), стерилизованной фильтрованием через фильтр-насадку (0.2 мкм, Minisart, “Sartorius Stedim”). Эксперименты проводили в трех повторностях при температуре 10°С в темноте без перемешивания. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду с нефтью без добавления проб осадков.

Аналитические методы. Газообразные углеводороды в экспериментальных флаконах и донных осадках определяли модифицированным методом фазово-равновесной дегазации; погрешность определения концентрации метана составляла ±5% (Большаков, Егоров, 1987). Содержание полициклических ароматических углеводородов и n-алканов в модельных экспериментах определяли согласно (Pavlova et al., 2022). Химический состав поровых вод донных отложений определяли, как описано ранее (Pogodaeva et al., 2017). Исследования проводены на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП “Ультрамикрoанализ”).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование гена 16S рРНК. Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование и биоинформатический анализ проводили согласно (Lomakina et al., 2023). Полученные препараты ДНК использовали для амплификации V2–V3 участка гена 16S рРНК бактерий с использованием праймеров 16S_BV2f (50-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-30) и 16S_BV3r (50-CCGCGGCTGCTGGCAC-30) (Sahm et al., 2013) и V5–V6 участка гена 16S рРНК архей с использованием праймеров Arch-0787f (50-ATTAGATACCCSBGTA GTCC-30) и Arch-1059r (50-GCCATGCACCCWCCTCT-30) (Yu et al., 2005). Библиотеки секвенировали с использованием стандартного набора Illumina MiSeq v.3 (“Illumina”) в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИ-ИСХМ. Таксономия приведена согласно геномной базе GDTB (<https://gtdb.ecogenomic.org/>). Уровень покрытия для всех библиотек фрагментов гена 16S рРНК был почти максимальным (от 98.08 до 99.9%), что подтверждалось низкими значениями индекса Chao1, и свидетельствовало о полной репрезентативности библиотек (табл. S1). Полученные нуклеотидные последовательности доступны в базе данных NCBI в рамках проекта PRJNA1056780.

Таблица. Условные обозначения полученных накопительных культур

Глубина отбора проб донных осадков/ условное обозначение	Акцептор электронов			
	H ₂ : CO ₂	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Fe ³⁺
St.4 GC.6, 30–50 см/K1	K1_HCO ₃	K1_SO ₄	K1_NO ₃	K1_Fe
St.4 GC.6, 250–270 см/K2	K2_HCO ₃	K2_SO ₄	K2_NO ₃	K2_Fe

Для сравнения разнообразия сообществ донных осадков и накопительных культур на уровне филума и рода построены пузырьковые диаграммы для операционных таксономических единиц с относительной численностью $\geq 1\%$ хотя бы в одной библиотеке с использованием программных пакетов *ggplot2* и *reshape2* для языка R (R Core Team, 2022) в среде Rstudio (<https://www.R-project.org/>). Программа iVikodak позволяет на основании таксономического состава исследуемых бактериальных сообществ предсказывать их функциональные характеристики, используя геномные базы данных. С использованием базы данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000) с помощью PICRUSt2 алгоритма (Douglas et al., 2020) был выполнен поиск ближайшего гомологичного аннотированного референсного генома для каждой ОТЕ_{0.03}. Визуализация полученных результатов в виде тепловой карты выполнена с использованием программных пакетов *cluster*, *vegan* и *heatmap* в R. Все ресурсоемкие операции выполнены с использованием высокопроизводительного кластера “Академик В.М. Матросов” Центра коллективного пользования “Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Литолого-химическая характеристика донных осадков. Донные осадки керна St.4 GC.6

представлены восстановленными с поверхности глинами с $Eh -146...-216$ мВ. Окисленный слой отсутствовал. На глубине 50 и 250 см присутствовали песчаные прослои со следами нефти. Осадки характеризовались низкой газонасыщенностью, концентрация метана составляла 0.08 мг/л осадка на глубине 10 см и 5.2–9.4 мг/л осадка на глубине 50–250 см. Гомологи метана в газе в глубинных слоях осадка представлены этаном в следовых количествах.

Поровые воды отложений у поверхности пресные гидрокарбонатно-кальциевые первого типа, с глубиной на пресные гидрокарбонатно-натриевые первого типа. Минерализация у поверхности осадка (105 мг/л) схожа с фоновой в Среднем Байкале (90–180 мг/л) (Pogodaeva et al., 2017). С глубиной она аномально нарастает на порядок (до 1030 мг/л на 250 см). Концентрация ионов гидрокарбоната увеличивается с глубиной от 73 мг/л, достигая максимальных значений 700 мг/л на глубине 250 см. Концентрация ионов хлора увеличивается от 0.6 до 86 мг/л на глубине 270 см (рис. S1a). Нитрат-ионы варьируют от 0.2 до 0.6 мг/л по всему профилю керна. Наибольшая концентрация сульфатов выявлена в поверхностном осадке (6.6 мг/л); по глубине керна она снижалась от 0.9 до 0.3 мг/л. Исследуемые осадки обогащены ионами Mn(II) и Fe(II), максимальные концентрации которых отмечены на глубине 50 см (1.3 и 6.7 мг/л соответственно) (рис. S1б).

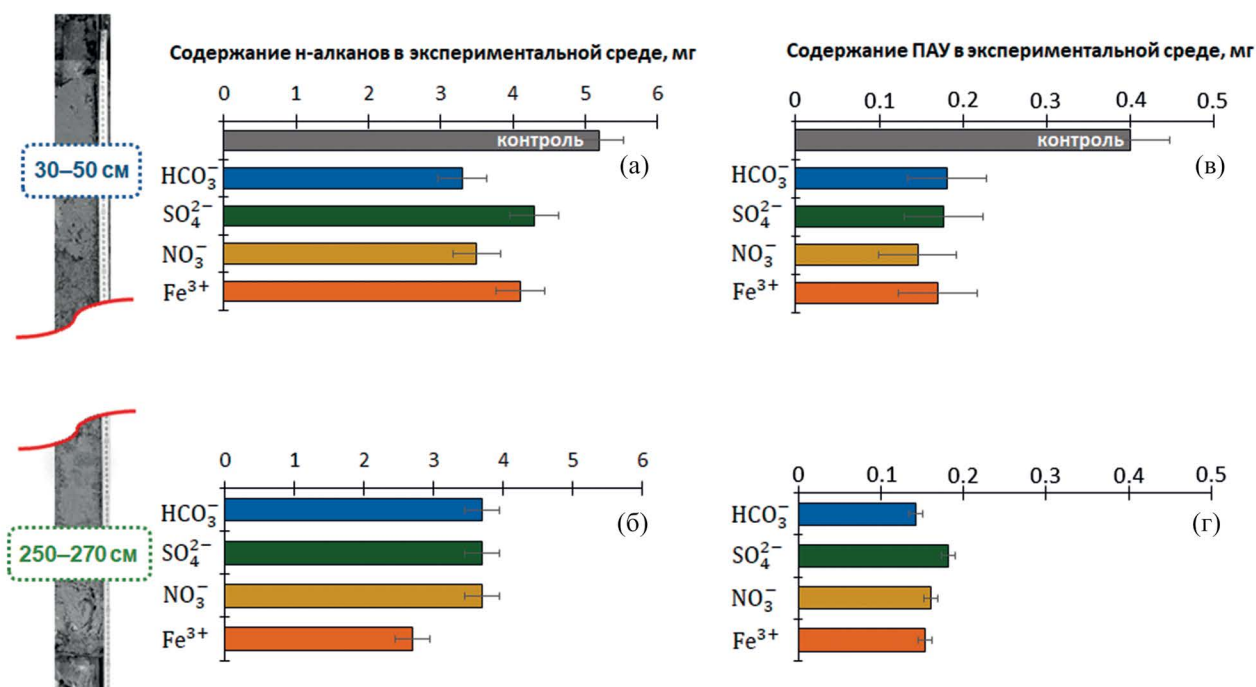


Рис. 2. Убыль н-алканов (а, б) и ПАУ (в, г) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные гидрокарбонат-, сульфат-, нитрат- ионами и Fe(III).

Дегградация углеводородов в условиях эксперимента. Накопительные культуры, полученные на средах с разными акцепторами электронов и нефтью, в течение одного года показали различную степень конверсии н-алканов и ПАУ (рис. 2).

В культурах, полученных путем заражения сред подповерхностным осадком K1, наибольшая убыль н-алканов (32–36%) отмечена в среде с нитратом и H_2CO_2 в газовой фазе. В этих культурах содержание $\Sigma_{\text{алк}}$ в нефти снизилось до 3.3–3.5 мг в сравнении с контролем (5.2 мг). В сульфатредуцирующей (K1_SO_4) и железоредуцирующей культуре (K1_Fe) содержание алкановой фракции уменьшилось на 17–20%. В культурах из глубинного осадка (K2) максимальная конверсия н-алканов (48%) отмечена в среде с Fe^{3+} . В присутствии других акцепторов электронов (HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) биодегградация н-алканов составляла 27–29% (рис. 2а, 2б).

Дегградация ПАУ (55–65%) была сопоставима в накопительных культурах K1 и K2 (рис. 2в, 2г). Наибольшая конверсия полициклических ароматических углеводородов (64–65%) зафиксирована в культурах K1_NO_3 и K2_HCO_3 , где отмечено снижение $\Sigma_{\text{ПАУ}}$ с 0.4 мг в контроле до 0.14–0.15 мг в эксперименте. Среди индивидуальных полициклических углеводородов наибольшая степень конверсии (55–79%) отмечена для нафталина, 1-метилнафталина, 2-метилнафталина, флуорена, антрацена, бензо[а]антрацена, бензо[б]флуорена, бензо[к]флуорена, бензо[а]пирена и бензо[ghi]перилена в культурах K1 и K2, вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. Наименьшей дегградации (1–14%) подверглись 1-метилфенантрен, 9-метилфенантрен, пирен и бензо[е]пирен в накопительных культурах K1. Добавление нитрат-иона увеличивало степень конверсии до 25%. В культурах K2 дегградация этих соединений составила 12–29%.

В накопительной культуре K1_HCO_3 выявлено образование метана. Концентрация метана

в начале эксперимента составляла 0.04 мг/л осадка. Через двенадцать месяцев культивирования содержание метана увеличилось до 37.9 мг/л. К концу эксперимента концентрация CH_4 составляла 27.2 мг/л (рис. 3а). В накопительных культурах K2_HCO_3 концентрация метана в течение всего эксперимента оставалась практически неизменной (0.02–0.05 мг/л осадка), что свидетельствует об отсутствии метаногенеза (рис. 3б).

Образование этана выявлено в накопительных культурах как с подповерхностным, так и с глубинным осадком (рис. 3). В культуре K1_HCO_3 через 6 мес. культивирования концентрация C_2H_6 увеличилась в 7 раз в сравнении с исходной (0.002 мг/л осадка) и составила 0.014 мг/л осадка. К концу эксперимента содержание этана снизилось до 0.003 мг/л. В культуре K2_HCO_3 концентрация этана увеличилась в 2 раза. Максимальное его содержание (0.02 мг/л осадка) зафиксировано по истечении 6 мес. от начала эксперимента. К концу эксперимента концентрация этана в накопительных культурах K1_HCO_3 и K2_HCO_3 составляла 0.003–0.01 мг/л осадка соответственно.

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества подповерхностного осадка и накопительных культур K1. В составе микробного сообщества донного осадка с глубины 30–50 см были обнаружены представители 41 филума домена *Bacteria* и 10 филумов домена *Archaea*, среди которых только 17 и 6 филумов, соответственно, включали более 1% последовательностей в составе библиотек. В сообществе доминировали бактерии филумов *Chloroflexota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Nitrospirota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota* и *Desulfobacterota* (рис. 4а).

Культивирование подповерхностного осадка в присутствии разных акцепторов электронов привело к увеличению доли представителей некоторых таксонов, в частности, *Bacillota* и *Pseudomonadota* (рис. 4а). В контрольном осадке доля представителей *Bacillota* составляла 0.3%

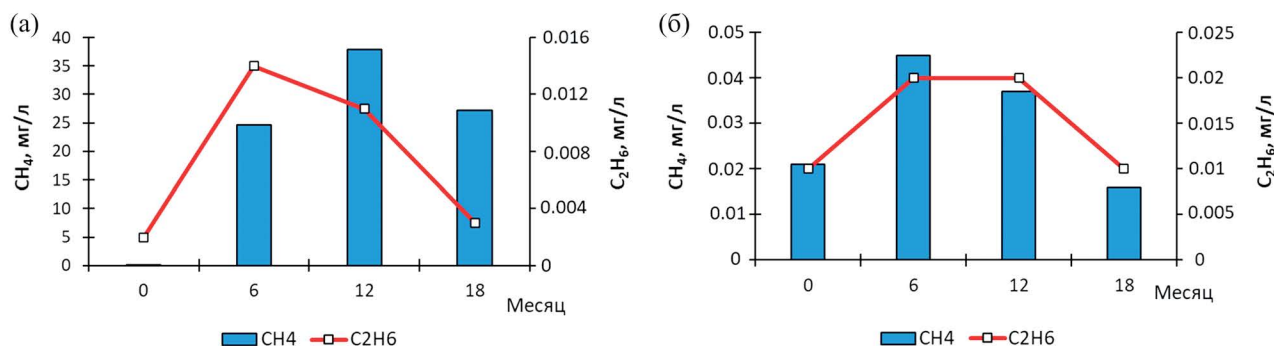


Рис. 3. Динамика образования метана и этана в накопительных культурах, содержащих подповерхностные (а) и глубинные (б) осадки, обогащенных гидрокарбонат-ионом.

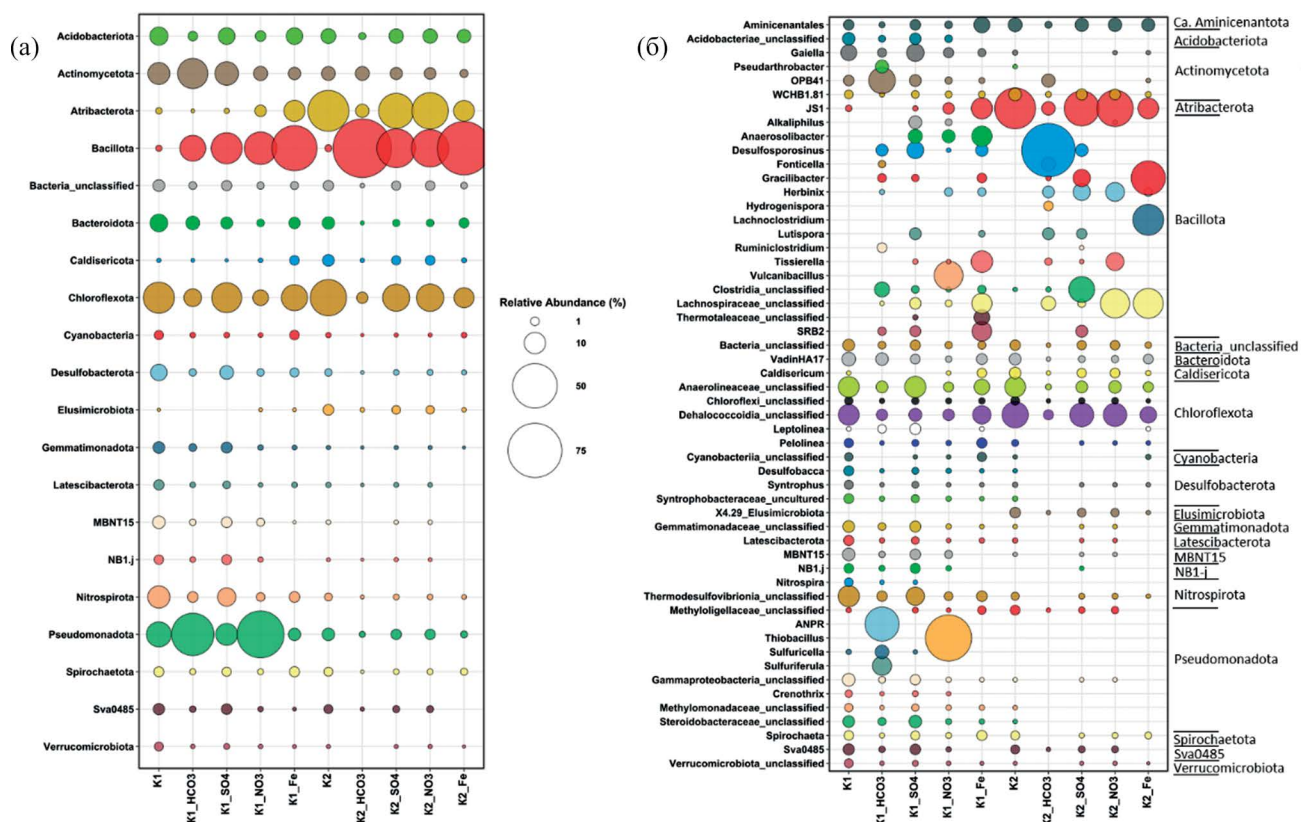


Рис. 4. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне филумов (а) и родов (б) в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек.

от всех последовательностей гена 16S рРНК, филум представлен не идентифицированными родами семейства *Clostridiaceae*. В культуре K1_HCO₃ доля *Bacillota* увеличивалась до 15.3%. Доминирующее положение в ней занимали представители родов *Desulfosporosinus* (2.5%), *Gracilibacter* (1%), *Ruminiclostridium* (1.4%) и неидентифицированные *Clostridia* (4.4%) (рис. 4б). В культуре K1_SO₄ доля бактерий рода *Desulfosporosinus* возрастала до 5.8% в сравнении с K1_HCO₃. В числе доминирующих ОТЕ выявлены последовательности бактерий родов *Anaerosolibacter* (3.6%), *Alkaliphilus* (3%), *Lutispora* (2.4%), неклассифицируемых бактерий семейства *Lachnospiraceae* (2.2%) и SRB2 (2%). В культуре K1_Fe доля *Bacillota* составляла 51.5% и была самой большой в сравнении с другими культурами K1. Наряду с последовательностями *Anaerosolibacter* и *Desulfosporosinus* выявлены последовательности бродильных бактерий рода *Tissierella* и неидентифицированных *Lachnospiraceae*. Бактерии рода *Anaerosolibacter* способны осуществлять анаэробное дыхание, восстанавливая трехвалентное железо, сульфат, тиосульфат и элементную серу за счет окисления органических соединений (Hong et al.,

2015). Сульфатвосстанавливающие бактерии рода *Desulfosporosinus* используют углеводы, короткоцепочечные жирные кислоты и ароматические соединения, способны расти хемолитотрофно, окисляя водород (Spring, Rosenzweig, 2006). Бактерии родов *Gracilibacter*, *Ruminiclostridium*, *Alkaliphilus* и *Lutispora* характеризуются как строго анаэробные хемоорганотрофные термотолерантные микроорганизмы. В культуре K1_NO₃ основную долю (19.5%) составляли последовательности строго анаэробных хемоорганотрофных бактерий рода *Vulcanibacillus*, использующих нитрат в качестве единственного акцептора электронов (L'Haridon et al., 2006).

Филум *Pseudomonadota* в контрольном осадке K1 был представлен неидентифицированными представителями класса *Gammaproteobacteria* и семейств *Methylomonadaceae* и *Steroidobacteraceae*. Культивирование осадка K1 с H₂: CO₂ в газовой фазе привело к увеличению содержания сероокисляющих бактерий родов *Sulfuricella*, *Sulfuriferula* и ANPR. В базе данных рРНК SILVA последовательности, связанные с *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* и *Rhizobium*, помещены в отдельный род ANPR в пределах семейства *Rhizobiaceae*. Бактерии этого

семейства характеризуются как хемоорганогетеротрофы, способные к биодegradации нефтяных углеводов в почве (Wang et al., 2021). В накопительной культуре K1_NO₃ доля *Pseudomonadota* составляла 56%. Наиболее многочисленная ОТЕ (54%) отнесена к роду *Thiobacillus* и имела 97.2% сходства с геном 16S рРНК хемолитотрофной бактерии *Thiobacillus denitrificans*, сочетающей окисление соединений серы с денитрификацией (Robertson, Kuenen, 2006).

Филумы *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota*, *Nitrospirota* и *Desulfobacterota*, как в контрольном осадке, так и накопительных культурах, были представлены одними и теми же родами бактерий. Наблюдались количественные изменения в составе доминирующих родов в накопительных культурах. Филум *Acidobacteriota* состоял из неидентифицированных представителей семейств *Acidobacteriaceae* и анаэробных, хемоорганогетеротрофных бактерий порядка *Candidatus Aminicenantes* (OP8), которые в настоящее время отнесены к *Candidatus Aminicenantes* (Oren, Goker, 2023). Последовательности *Ca. Aminicenantes* наиболее часто выявляются при анализе обогащенных углеводородами биотопов, включающих нефтяные резервуары, глубоководные морские гидротермальные экосистемы и др. (Kadnikov et al., 2019). ОТЕ из филума *Actinomycetota* в основном принадлежали бактериям группы OPB₄₁ и хемоорганотрофным бактериям рода *Gaiella*. Представители рода *Pseudarthrobacter* (*Actinomycetota*) выявлены только в культуре K1_HCO₃. Филотипы OPB₄₁ были обнаружены в нефтеносных, осадочных и подповерхностных средах. Культивируемые представители группы OPB₄₁ являются анаэробными литотрофами, фиксирующими CO₂ через восстановительный глициновый путь и использующими тиосульфат, элементарную серу, либо Fe(III) в качестве акцепторов электронов (Khomyakova et al., 2022). Для психрофильных бактерий рода *Pseudarthrobacter* показана способность к биодegradации фенолов и других ПАУ (Asimakoula et al., 2023).

Филум *Chloroflexota* состоял из неклассифицируемых представителей семейств *Anaerolineaceae* и *Dehalococcoidaceae*. Микроорганизмы, отнесенные к этим семействам, обнаружены в широком диапазоне анаэробных сред обитания, включая донные отложения, горячие источники, анаэробные реакторы, экотопы, загрязненные углеводородами, где они способны осуществлять синтрофное окисление углеводов (*Anaerolineaceae*) с образованием метана при участии метаногенных архей или восстановительное дехлорирование хлорированных углеводов и галогенорганическое дыхание (*Dehalococcoidia*) (Liang et al., 2015; Löffler et al., 2015). Филум *Bacteroidota* представлен семейством VadinHA17, протеолитическими бактериями, ферментирующими углеводы с образованием летучих

жирных кислот (Kampmann et al., 2012). ОТЕ, отнесенные к филуму *Desulfobacterota*, принадлежали анаэробным бактериям, окисляющим органические субстраты (*Syntrophaceae*, *Syntrophobacteraceae*) или ацетат (*Desulfobacca*) в процессе синтрофного роста с метаногенными археями. Нуклеотидные последовательности бактерий филума *Nitrospirota* составляли от 1 до 11% в анализируемых библиотеках образца K1 и принадлежали неклассифицированным бактериям класса *Thermodesulfobacteria*, известным способностью восстанавливать сульфат до сульфида за счет окисления органических субстратов или водорода (Umezawa et al., 2021).

Архейная компонента контрольного осадка K1 была представлена филумами *Halobacteriota*, *Methanobacteriota*, *Thermoproteota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Hadarchaeota* (рис. 5а).

Доминирующее положение в контрольном осадке и в накопительных культурах K1_SO₄, K1_NO₃ и K1_Fe занимали гидрогенотрофные археи рода *Methanoregula* (*Halobacteriota*), где они составляли от 37.8 до 51.7% от состава сообщества, за исключением K1_HCO₃ (3.9%) (рис. 5б). Культивирование осадка K1 с H₂:CO₂ в газовой фазе привело к увеличению доли гидрогенотрофных архей родов *Methanobacterium* (*Methanobacteriota*, ранее *Euryarchaeota*) (20.1%), *Methanosphaerula* (64.7%) и *Methanocella* (2.3%) (*Halobacteriota*) в сравнении с контрольным осадком (до 0.2%). В накопительных культурах K1_SO₄, K1_NO₃ и K1_Fe их доля не превышала 0.3–1.1%. В K1_SO₄ и K1_NO₃ филум *Halobacteriota* был представлен ацетокластическими археями рода *Methanotherix* (7.0–9.5%), метанол, моно-, ди- и триметиламин-использующими археями рода *Methanomethylivorans* (1.3–3.8%) и археями рода *Methanosarcina* (0.4–1.4%), осуществляющими все известные пути метаногенеза. Среди ОТЕ, отнесенных к филуму *Halobacteriota*, также выявлены последовательности, принадлежащие *Ca. Methanoperedens* – археям, осуществляющим анаэробное окисление метана (АОМ) в сочетании с восстановлением нитратов, железа и марганца (Haroony et al., 2013; Cai et al., 2018; Leu et al., 2020). Их представленность была наибольшей в накопительной культуре K1_Fe – 5.2%, наименьшей в K1_HCO₃ – 0.2%.

Филум *Thermoproteota* (ранее *Crenarchaeota*) представлен классами *Bathyarchaeia*, *Nitrososphaeria* (род *Nitrosopumilus*) и неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei*. Наибольшая доля *Bathyarchaeia* выявлена в культуре K1_Fe – 32.7%, наименьшая в K1_HCO₃ – 2.8%. В контрольном осадке, K1_SO₄ и K1_NO₃ их доля варьировала от 17.1 до 21.9%. На основе анализа геномов, космополитным археям *Bathyarchaeia* предсказана способность осуществлять ацетогенез, метаногенез и брожение (Zhou et al., 2018; Hou et al., 2023). Анализ фенотипических и геномных свойств первого

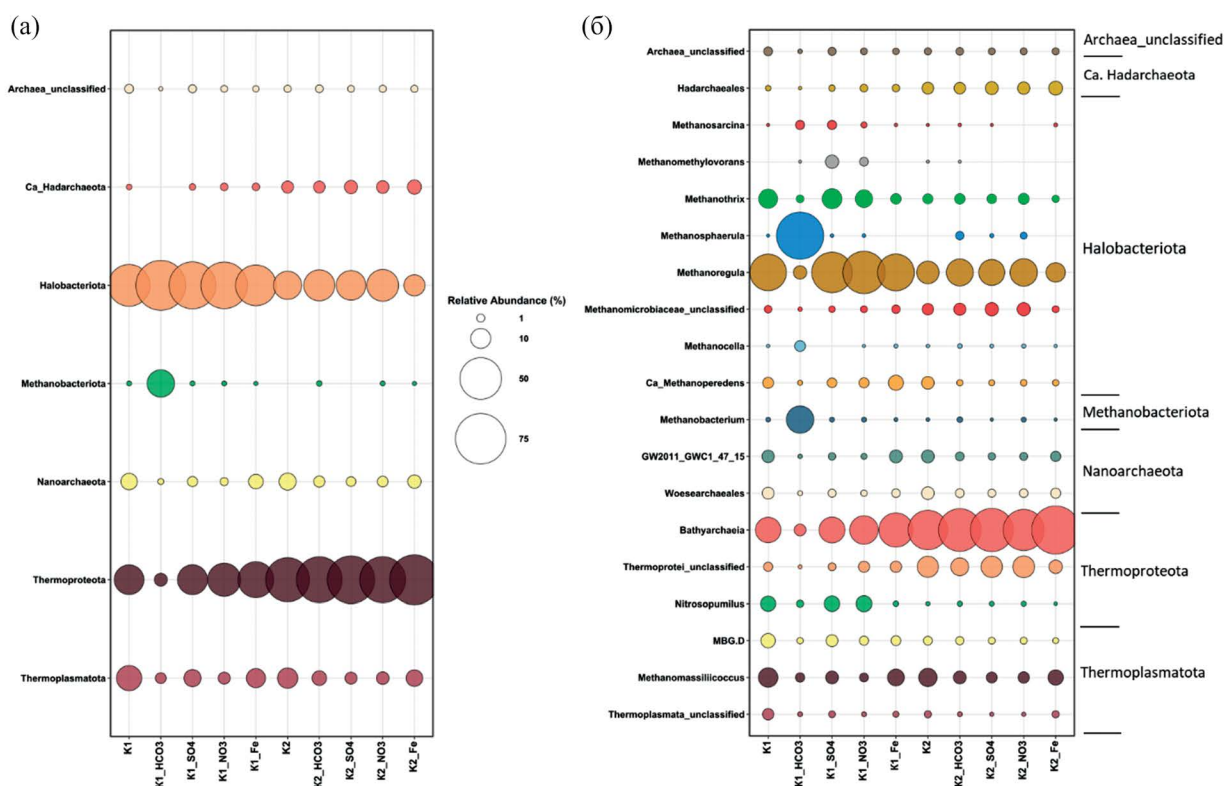


Рис. 5. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Archaea*, представленных на уровне филумов (а) и родов (б) в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек.

культивируемого штамма M17C^{Ts}, отнесенного к *Candidatus Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., показал его способность к использованию сложных белковых субстратов и метоксилированных ароматических соединений (Khomyakova et al., 2023). В накопительных культурах K1_SO₄ и K1_NO₃ выявлена наибольшая доля (5.5–5.9%) последовательностей архей рода *Nitrosopumilus*, окисляющих аммиак и осуществляющих автотрофную фиксацию углерода через 3-гидроксипропионат/4-гидроксипропионатный путь (Liu et al., 2021).

Филум *Thermoplasmatota* был представлен археями рода *Methanomassiliicoccus* и Marine Benthic Group D (MBG-D), восстанавливающих метанол и окисляющих водород, характеризующихся как космополиты донных осадков, со специфическим миксотрофным метаболизмом, включающим гетеротрофию и автотрофную фиксацию CO₂ (Zhou et al., 2019). Наибольшая доля *Methanomassiliicoccus* выявлена в K1 (9.4%), K1_SO₄ (3.5%) и K1_Fe (6.7%); MBG-D – в K1_SO₄ (2.9%). Филум *Nanoarchaeota* состоял, в основном, из ОТЕ, отнесенных к семействам GW2011_GWC1_47_15 и *Woesearchaeales* – археям, выявленным в различных

средах обитания, среди которых нефтяные резервуары и серные источники. Эти археи являются частью консорциума с бактериями, где бактерии участвуют в круговороте углерода, а археи – в фиксации азота, денитрификации и восстановлении сульфата в анаэробных условиях (Liu et al., 2021; Köhler et al., 2023). Их наибольшая доля выявлена в K1 (6.4%), наименьшая – в K1_HCO₃ – 0.4%.

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества глубинного осадка и накопительных культур K2. В составе микробного сообществ донного осадка с глубины ядра 250 см обнаружены представители 27 филумов домена *Bacteria* и 10 филумов домена *Archaea*. Последовательности архей, составляющие более 1% в составе библиотек, выявлены в 11 высших таксонах домена *Bacteria* и 5 филумах *Archaea* (рис. 4, 5). Доминирующее положение занимали представители филумов *Atribacterota* (41.5%) и *Chloroflexota* (32%). Около 2.2–3.6% последовательностей принадлежало представителям *Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Caldisericota*, *Bacteroidota* и *Pseudomonadota*. Доля *Elusimicrobiota*, *Spirochaetota*, Sva0485 и неклассифицируемых *Bacteria* не превышала 1.6%.

Архейная компонента представлена филумами *Thermoproteota*, *Halobacteriota*, *Thermoplasmatota*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Hadarchaeota*. Филум *Thermoproteota* представлен классом *Bathyarchaeia* (44%) и неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei* (12%); филум *Halobacteriota* — родом *Methanoregula* (13%), *Ca. Methanoperedens* (3.3%) и родом *Methanosaeta* (2%); филум *Thermoplasmatota* — неидентифицированными *Methanomassiliicoccaceae* (8%) и MBG-D (1.3%). Последовательности филума *Ca. Hadarchaeota* составляли 2.8–4.3% от общего числа последовательностей в каждой из библиотек K2, в сравнении с библиотеками из образцов K1, где доля этих архей не превышала 0.8%.

Несмотря на различные условия культивирования, накопительные культуры K2, содержащие сульфат- и нитрат-ионы, не отличались значительно по составу бактерий, варьировало соотношение микроорганизмов различных таксономических групп. Общими для этих накопительных культур были последовательности бактерий порядка *Aminicenantales* (*Acidobacteriota*), группы WCHB1-81 (*Actinomycetota*) и рода *Caldisericum* (*Caldisericotota*). В трех накопительных культурах (K2_HCO₃, K2_SO₄, K2_NO₃) присутствовали *Atribacterota* (3.1–32%); неидентифицированные представители филума *Chloroflexota*, семейств *Dehalococcoidiaceae* и *Anaerolineaceae* (1.65–13.5%) и филума *Bacillota*, род *Herbinix* (6.2–27.4%). Представители группы OPB₄₁ (*Actinomycetota*) и рода *Fonticella* (*Bacillota*) выявлены только в культуре K2_HCO₃, а неклассифицируемые бактерии семейства *Clostridiaceae*, рода *Gracilibacter* и группы SRB₂ — только в культурах K2_SO₄ и K2_Fe. Последовательности бактерий родов *Desulfosporosinus* (2.8–74.5%) и *Lutispora* (1.8–2.3%), обнаружены в библиотеках накопительных культур K2_SO₄ и K2_HCO₃. В накопительных культурах, содержащих железо, доминирующее положение занимали представители родов *Gracilibacter*, *Lachnoclostridium* и неклассифицированные *Lachnospiraceae*. Как и в случае с бактериальной компонентой, культивирование осадка K2 в присутствии различных акцепторов электронов незначительно повлияло на состав архей в накопительных культурах в сравнении с природным осадком. Варьировала доля представителей различных таксонов. Доминирующее положение в библиотеках всех четырех накопительных культур занимали последовательности представителей класса *Bathyarchaeia*, которые составляли 48.5–67.7% от общего количества прочтений в каждой библиотеке. Филум *Thermoproteota* также был представлен неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei* (8–12.4%). Метаногенные археи были представлены родами *Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanomassiliicoccus* и неклассифицируемыми

представителями семейства *Methanomicrobiaceae*. Последовательности *Woesearchaeales* и MBG-D составляли 0.62–1.4% в K2 библиотеках.

Анализ потенциальных функциональных характеристик микробных сообществ с использованием базы данных KEGG (рис. S2) показал, что, бактерии, входящие в сообщество подповерхностного донного осадка K1, обладали потенциальной способностью осуществлять основные пути метаболизма углеводов, липидов и энергетического метаболизма, а также деградацию бифенола, стероидов, толуола, этилбензола и аминокислот. Изменение условий, в частности, культивирование микробного сообщества в присутствии H₂: CO₂, привело к экспрессии генов, участвующих в метаболизме серы и азота, а также ответственных за деградацию ПАУ, ксенобиотиков, стирола, солей бензойной кислоты, нафталина и хлорированных углеводородов, в дополнение к функциональным характеристикам, приведенным выше. У архей, входящих в исследуемое сообщество, предсказано наличие ферментов метаболизма метана, фиксации углерода, цикла азота и серы, деградации стеранов, ксилола, ксенобиотиков, толуола, хлоралканов, нафталина, хлорциклогексана, хлорбензола и фторбензоата. Бактерии из глубинного осадка K2 характеризовались, в основном, присутствием генов “домашнего хозяйства” и отсутствием потенциальной способности деградировать углеводороды. Для архей предсказаны функции деградации бензоата, этилбензола, бутирата. Потенциальная способность осуществлять деградацию ксилола, диоксинов, хлоралканов, хлоралкенов и нитротолуола выявлена у бактерий, культивируемых в присутствии H₂: CO₂ (рис. S2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Состав нефти в водной толще и донных осадках исследуемого района указывает на ее биотрансформацию и может быть обусловлен деятельностью микробных сообществ. Об этом свидетельствуют результаты культуральных исследований, показавших биodeградацию компонентов нефти 35% (для n-алканов) и 65% (для ПАУ) анаэробными углеводородокисляющими сообществами, а также молекулярно-экологический анализ филогенетического и функционального разнообразия микробных сообществ. В подповерхностном осадке K1 доминирующее положение занимали микроорганизмы, способные хемогетеротрофно использовать различные соединения посредством аэробного и анаэробного дыхания (*Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*, Sva0485, MBNT15), анаэробно окислять метан (*Methylomonadaceae*, *Ca. Methanoperedens*), а также синтрофно окислять углеводороды нефти (бактерии филумов *Bacillota*,

Chloroflexiota, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota* и археи *Halobacteriota* и *Methanobacteriota*). Культивирование подповерхностного осадка в различных условиях приводило к увеличению доли бактерий некоторых таксонов, в частности, *Bacillota*, *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* в составе накопительных культур. Исследуемый керн К1 имел повышенную минерализацию за счет гидрокарбонат-, сульфат-, нитрат-ионов и ионов хлора (рис. S1). Компонентный состав поровых вод исследуемого керна, вероятно, нивелировал действие добавленных акцепторов электронов в накопительные культуры, что выражалось в доминировании микроорганизмов, сочетающих окисление соединений серы с денитрификацией (*Thiobacillus denitrificans*) в культурах, содержащих нитрат-ион, или доминирование восстанавливающих соединения азота микроорганизмов в культурах, содержащих сульфат-ион или железо. Об этом свидетельствует обнаружение *Ca. Methanoperedens* — архей, первоначально описанных, как анаэробно окисляющие метан в сочетании с восстановлением нитрата (Haroony et al., 2013). В настоящее время показано, что в геномах этих архей присутствуют гены, кодирующие путь “обратного метаногенеза”, мультигеновые цитохромы C-типа, которые, как предполагается, способствуют диссимиляционному восстановлению Fe(III), а также гены для окисления водорода и восстановления сульфата при синтрофном взаимодействии с *Desulfobacterota* (Cai et al., 2018; Bell et al., 2022).

Несмотря на то, что бактерии глубинного осадка К2 характеризовались отсутствием потенциальной способности деградировать углеводороды, сырая нефть, добавленная в накопительные культуры, подвергалась биодеградации, о чем свидетельствует убыль н-алканов и ПАУ. Значимое влияние на биодеградацию н-алканов имело только добавление Fe^{3+} . В накопительных культурах, содержащих H_2 : CO_2 , SO_4^{2-} и NO_3^- , степень конверсии н-алканов была одинаковой, так же как и состав микробных сообществ, отличающийся незначительным варьированием процентного содержания микроорганизмов различных систематических групп. В глубинном осадке конверсия углеводородов, вероятно, может проходить при участии представителей филумов *Bacillota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota* и класса *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*). В настоящее время, на основе метаболической реконструкции геномов *Atribacterota* и *Bathyarchaeia* показано, что микроорганизмы могут осуществлять не только ферментацию углеводов, но и окислять короткоцепочечные н-алканы и ароматические соединения до жирных кислот, которые затем потребляются вторичными деструкторами. Окисление н-алканов происходит путем гидроксирования, добавления фумарата к углеводородам, а также деградации анаэробных ароматических соединений с использованием

бензоил-КоА-редуктазы I класса (Dong et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021). В библиотеках генов 16S рРНК из образца К2 в значимых количествах (1.8–4.3%), выявлены последовательности представителей филумов *Elusimicrobiota* и *Ca. Hadarchaeota*, которые обычно составляют менее 1% в составе микробных сообществ и являются представителями “редкой биосферы” или “микробной темной материи” (Pascoal et al., 2021). На основании реконструкции геномов этих прокариот показано, что бактерии обладают ферментативным метаболизмом, магнитотаксисом и участвуют в круговороте железа и серы, в то время как археи являются автотрофами, способными осуществлять фиксацию углерода через восстановительный ацетил-КоА путь, метаногенез и метаболизм алканов (Hua et al., 2019; Wang et al., 2019; Uzun et al., 2023). Термофильные облигатные анаэробные гетеротрофы филума *Caldiseriicota*, восстанавливающие соединения серы, также входили в число доминирующих таксонов в глубинных осадках. В настоящее время последовательности бактерий этого филума выявляются при анализе гидротермальных экосистем, водоносных горизонтов, загрязненных углеводородами, содовых озер, биореакторов и т.д. (Mori et al., 2009).

Биодеградация нефти накопительными культурами сопровождалась образованием метана в значимых количествах ($37.9 \text{ мг/л CH}_4 = 2.37 \text{ ммоль/л CH}_4 = 54 \text{ мл/л CH}_4$), что было сравнимо с диапазоном концентрации метана в донных осадках оз. Байкал (от нескольких мкл/л до 20 мл/л) (Pogodaeva et al., 2017). Образование метана при биодеградации нефти показано во многих нефтяных резервуарах (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Назина и соавт., 2006; Jones et al., 2008). Расширение геохимической базы данных о газах и нефтях из неглубоких нефтяных скоплений и естественных нефтепроявлений привело к признанию того, что газы, ранее считавшиеся имеющими первичное микробное происхождение, на самом деле образовались из нефти в ходе вторичного метаногенеза (Milkov, 2011).

Схожие процессы образования углеводородных газов происходят и в донных осадках озера Байкал, где в настоящее время установлено более 60 участков, содержащих газогидраты, расположенных в южной и центральной котловине озера (Khlystov et al., 2022). Газ, образующийся в донных осадках озера Байкал, на основе характеристик молекулярного и изотопного состава, отнесен к трем основным типам: термогенный газ, образуемый из сырой нефти, в некоторых случаях сопровождаемый вторичным микробным газом; термогенный газ, поднимающийся из глубоких осадочных слоев через разломы, смешанный с микробным газом в неглубоких слоях; микробный газ, образовавшийся в неглубоких осадочных слоях. Из 60 участков в 21 выявлены газогидраты, содержащие

микробный этан (Nachikubo et al., 2023). На эмпирической диаграмме, основанной на классификации Милкова и Этиопа (Milkov, Etiop, 2018), газ из района Бол. Зеленовская имеет $\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_1} \dots -45\text{‰}$ и $\delta^2\text{H}_{\text{C}_1} -308\text{‰}$ и находится за пределами термогенной зоны с соотношением $\text{C}_1/(\text{C}_2 + \text{C}_3)$ равным 274 и небольшим содержанием C_2 и C_3 , что указывает на влияние вторичного микробного газа, который образуется при анаэробной биodeградации более тяжелых углеводородов (Nachikubo et al., 2023).

Образование углеводородных газов в экспериментальных условиях установлено не только для осадков из районов нефтепроявлений (Pavlova et al., 2022). В накопительных культурах, содержащих микробное сообщество донных осадков метанового сипа Посольская Банка (Средний Байкал), доля образовавшегося этана в пересчете на углеводородные газы составляла от 1.5 до 26.8% (Павлова и соавт., 2014). Экспериментально доказано образование вторично-микробного газа при разложении углей Танхойской свиты олигоцен-плиоценового возраста, находящихся вдоль южного берега озера Байкал и погружающихся под его Южную котловину, в которой обнаружено несколько зон разгрузки углеводородных флюидов (Крылов и соавт., 2023).

Таким образом, микробное сообщество донных осадков, функционирующее в анаэробных условиях в длительно существующем районе нефтепроявления Бол. Зеленовская, является важным звеном в процессах самоочищения озера от нефтяного “загрязнения”. Микробное сообщество донных осадков представлено бактериями и археями, специализирующимися на процессах разложения широкого спектра субстратов, включая углеводы, пептиды, жирные кислоты и нефтяные углеводороды. В числе основных участников деградации нефти в донных осадках оз. Байкал могут быть синтрофно окисляющие углеводороды нефти бактерии (*Bacillota*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexota*, *Actinomyceota*, *Desulfobacterota*) и археи (*Halobacteriota*, *Bathyarchaeia*), входящие в “ядро углеводородоокисляющего микробиома”, сходное по составу с микроорганизмами-деструкторами в нефтяных экосистемах в разных частях мира. Генерация метана и этана при биodeградации нефти в экспериментальных условиях может объяснить нахождение газа из района Бол. Зеленовская за пределами термогенной зоны на эмпирической диаграмме по изотопным данным углерода и водорода (Nachikubo et al., 2023) за счет добавления вторичного микробного газа к термогенному.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 0279-2021-0006 (121032300223-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Большаков А. М., Егоров А. В. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях в акваториях // Океанология. 1987. Т. 27. С. 861–862.
- Крылов А. А., Хлыстов О. М., Семенов П. Б., Сагидуллин А. К., Малышев С. А., Букин С. В., Видищева О. Н., Манаков А. Ю., Исмагилов З. Р. Источники углеводородных газов в грязевом вулкане Кедр, южная котловина озера Байкал: результаты экспериментальных исследований // Литология и полезные ископаемые. 2023. Т. 6. С. 542–553.
- Krylov A. A., Khlystov O. M., Semenov P. B., Sagidullin A. K., Malyshev S. A., Bukin S. V., Vidischeva O. N., Manakov A. Yu., Ismagilov Z. R. Sources of hydrocarbon gases in the Kedr mud volcano, Southern Basin of Lake Baikal: results of experimental studies // Lithol. Miner. Resour. (Moscow). 2023. V. 58. P. 534–543.
- Назина Т. Н., Шестакова Н. М., Григорьян А. А., Михайлова Е. М., Турова Т. П., Полтараус А. Б., Фен Ц., Ни Ф., Беляев С. С. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 70–81.
- Nazina T. N., Shestakova N. M., Grigor'yan A. A., Mikhailova E. M., Tourova T. P., Poltaraus A. B., Feng C., Ni F., Belyaev S. S. Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P. R. China) // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 55–65.
- Павлова О. Н., Ломакина А. В., Горшков А. Г., Суслова М. Ю., Лихошвай А. В., Земская Т. И. Микробные сообщества и их способность окислять n-алканы в районе разгрузки газо-нефте содержащих флюидов в Среднем Байкале (мыс Горевого утес) // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. С. 540–545.
- Pavlova O. N., Lomakina A. V., Gorshkov A. G., Suslova M. Yu., Likhoshvai A. V., Zemskaya T. I. Microbial communities and their ability to oxidize n-alkanes in the area of release of gas- and oil-containing fluids in Mid-Baikal (Cape Gorevoi Utes) // Biol. Bull. (Moscow). 2012. V. 39. P. 458–463.

- Павлова О.Н., Букин С.В., Ломакина А.В., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Морозов И.В., Погодаева Т.В., Пименов Н.В., Земская Т.И. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 694–702.
- Pavlova O.N., Bukin S.V., Lomakina A.V., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Morozov I.V., Pogodaeva T.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I. Production of gaseous hydrocarbons by microbial communities of Lake Baikal bottom sediments // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 798–804.
- Практикум по микробиологии. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр “Академия”, 2005. С. 577–578.
- Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В., Земская Т.И., Гранин Н.Г., Калмычков Г.В., Воробьева С.С., Павлова О.Н., Якуп М.А., Макаров М.М., Москвин В.И., Грачев М.А. Нефть в озере мирового наследия // ДАН. 2007. Т. 414. С. 656–659.
- Khlystov O.M., Gorshkov A.G., Egorov A.V., Zemskaya T.I., Granin N.G., Kalmychkov G.V., Vorob'eva S.S., Pavlova O.N., Yakup M.A., Makarov M.M., Moskvina V.I., Grachev M.A. Oil in the Lake of world heritage // Dokl. Earth Sci. (Moscow). 2007. V. 45. P. 682–685.
- Хлыстов О.М., Изосимова О.Н., Hachikubo A., Minami H., Макаров М.М., Горшков А.Г. Новый нефтегазовый сип озера Байкал // Нефтехимия. 2022. Т. 62. С. 328–335.
- Khlystov O.M., Izosimova O.N., Hachikubo A., Minami H., Makarov M.M., Gorshkov A.G. A new oil and gas seep in Lake Baikal // Pet. Chem. (Moscow). 2022. V. 62. P. 475–481.
- Asimakoula S., Marinakos O., Tsagogiannis E., Koukoku A.-I. Phenol degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 524.
- Bell E., Lamminmaki T., Alneberg J., Qian C., Xiong W., Hettich R.L., Fruttschi M., Bernier-Latmani R. Active anaerobic methane oxidation and sulfur disproportionation in the deep terrestrial subsurface // ISME J. 2022. V. 16. P. 1583–1593.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu. P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 6143–6151.
- Cai C., Leu A.O., Xie G.J., Guo J., Feng Y., Zhao J.-X., Tyson G.W., Yuan Z., Hu S.A. methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction // ISME J. 2018. V. 2. P.1929–1939.
- Dong X.Y., Greening C., Rattray J.E., Chakraborty A., Chuvochina M., Mayumi D., Dolfig J., Li C., Brooks J.M., Bernard B.B., Groves R.A., Lewis I.A., Hubert C.R.J. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments // Nat. Commun. 2019. V. 10. Art. 1816.
- Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C., Langille M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 685–688.
- Gittins D.A., Bhatnagar S., Hubert C.R.J. Environmental selection and biogeography shape the microbiome of subsurface petroleum reservoirs // MSystems. 2023. V. 8. Art. e00884-22.
- Hachikubo A., Minami H., Sakagami H., Yamashita S., Krylov A., Kalmychkov G., Poort J., Batist M., Manakov A., Khlystov O. Characteristics and varieties of gases enclathrated in natural gas hydrates retrieved at Lake Baikal // Sci. Rep. 2023. V. 13. Art. 4440.
- Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // Nature. 2013. V. 500. P. 567–570.
- Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Zafra G., de Oliveira V.M. Genome-resolved meta-analysis of the microbiome in oil reservoirs worldwide // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 1812.
- Hong H., Kim S.J., Min U.G., Lee Y.J., Kim S.G., Roh S.W., Kim J.G., Na J.G., Rhee S.K. Anaerobacter carboniphilus gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic iron-reducing bacterium isolated from coal-contaminated soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 1480–1485.
- Hou J., Wang Y., Zhu P., Yang N., Liang L., Yu T., Niu M., Konhauser K., Woodcroft B.J., Wang F. Taxonomic and carbon metabolic diversification of *Bathymicrobia* during its coevolution history with early Earth surface environment // Sci. Adv. 2023. V. 9. Art. eadf5069.
- Hua Z.-S., Wang Y.-L., Evans P.N., Qu Y.-N., Goh K.M., Rao Y.-Z., Qi Y.-L., Li Y.-X., Huang M.-J., Jiao J.-Y., Chen Y.-T., Mao Y.-P., Shu W.-S., Hozzein W., Hedlund B.P., Tyson G.W., Zhang T., Li W.-J. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring *Archaea* // Nat. Commun. 2019. V. 10. Art. 4574.
- Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F.J., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs // Nature. 2008. V. 451. P. 176–180.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Genome of the candidate phylum *Aminicenantes* bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle // Extremophiles. 2019. V. 23. P. 189–200.
- Kampmann K., Ratering S., Kramer I., Schmidt M., Zerr W., Schnell S. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 2106–2119.
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 27–30.

- Khlystov O.M., Batist M., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A.V., Kazakov A.V. The position of gas hydrates in the sedimentary strata and in the geological structure of Lake Baikal // World atlas of submarine gas hydrates in continental margins / Eds. J. Mienert, C. Berndt, A.M. Tréhu, A. Camerlenghi, C.S. Liu. Cham: Springer, 2022. P. 465–515.
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhtereva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 1047580.
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Mamiy D.D., Klyukina A.A., Slobodkin A.I. Phenotypic and genomic characterization of *Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., a cultivated representative of the archaeal class *Bathyarchaeia* // Front. Microbiol. 2023. V. 14. Art. 1214631.
- Köhler J.M., Ehrhardt L., Günther P.M. Archaeal and extremophilic bacteria from different archaeological excavation sites // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. 5519.
- Leu A.O., Cai C., McIlroy S.J., Southam G., Orphan V.J., Yuan Z., Hu S., Tyson G.W. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae* // ISME J. 2020. V. 14. P. 1030–1041.
- L'Haridon S., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Tindall B.J., Spring S., Schumann P., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Jeanthon C. *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1047–1053.
- Liang B., Wang L.-Y., Mbadinga S.M., Liu J.-F., Yang S.-Z., Gu J.-D., Mu B.-Z. *Anaerolineaceae* and *Methanosaeata* turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation // AMB Express. 2015. V. 5. Art. 37.
- Liu Y.F., Qi Z.Z., Shou L.B., Liu J.-F., Yang S.-Z., Gu J.-D., Mu B.-Z. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum 'Atribacteria' (JS1) inferred from genomics // ISME J. 2019. V. 13. P. 2377–2390.
- Liu L., Schubert D.M., Könneke M., Berg I.A. (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from the autotrophic 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in *Nitrosopumilus maritimus* // Front. Microbiol. 2021. V. 5. Art. 712030.
- Liu X., Wang Y., Gu J.-D. Ecological distribution and potential roles of *Woesearchaeota* in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis // CSB J. 2021. V. 19. P. 794–800.
- Löffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M., Adrian L., Edwards E.A., Konstantinidis K.T., Müller J.A., Fullerton H., Zinder S.H., Spormann A.M. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 625–635.
- Lomakina A., Bukin S., Shubenkova O., Pogodaeva T., Ivanov V., Bukin Y., Zemskaya T. Microbial communities in ferromanganese sediments from the Northern Basin of Lake Baikal (Russia) // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 1865.
- Milkov A.V. Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs // Org. Geochem. 2011. V. 42. P. 184–207.
- Milkov A.V., Etiope G. Revised genetic diagrams for natural gases based on a global dataset of >20,000 samples // Org. Geochem. 2018. V. 125. P. 109–120.
- Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Urabe T., Suzuki K. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia classis* nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2894–2898.
- Oren A., Goker M. *Candidatus* List. Lists of names of prokaryotic *Candidatus* phyla // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2023. V. 73. № 5. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005821>
- Pascoal F., Costa R., Magalhães C. The microbial rare biosphere: current concepts, methods and ecological principles // FEMS Microbiol. Ecol. V. 97. Art. fiaa227.
- Pavlova O.N., Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Khabuev A.V., Gorshkov A.G., Zemskaya T.I. Anaerobic oxidation of petroleum hydrocarbons in enrichment cultures from sediments of the Gorevoy Utes natural oil seep under methanogenic and sulfate-reducing conditions // Microb. Ecol. 2022. V. 83. P. 899–915.
- Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M., Egorov A.V., Zemskaya T.I. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments // J. Great Lakes Res. 2017. V. 43. P. 1030–1043.
- Robertson L.A., Kuenen J.G. The Genus *Thiobacillus*. The Prokaryotes / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. NY: Springer, 2006. P. 812–827.
- Sahm K., John P., Nacke H., Wemheuer B., Grote R., Daniel R., Antranikian G. High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods // Extremophiles. 2013. V. 17. P. 649–662.
- Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., Santos V.P., Chaves M.R., Capilla R., Neto E.V.S., Gray N., de Oliveira V.M. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 211–229.
- Slobodkin A., Wiegel J. Fe(III) as an electron acceptor for H₂ oxidation in thermophilic anaerobic enrichment

- cultures from geothermal areas // *Extremophiles*. 1997. V. 1. P. 106–109.
- Spring S., Rosenzweig F. The Genera *Desulfotobacterium* and *Desulfosporosinus*: Taxonomy // *The Prokaryotes* / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. NY: Springer, 2006. P. 771–786.
- Umezawa K., Kojima H., Kato Y., Fukui M. *Dissulfurispira thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic chemolithoautotroph growing by sulfur disproportionation, and proposal of novel taxa in the phylum *Nitrospirota* to reclassify the genus *Thermodesulfobacterium* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2021. V. 44. Art. 126184.
- Uzun M., Koziaeva V., Dziuba M., Alekseeva L., Krutkina M., Sukhacheva M., Baslerov R., Grouzdev D. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil // *ISME J.* 2023. V. 17. P. 204–214.
- Wang Y., Wegener G., Hou J., Wang F., Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of *Archaea* // *Nature Microbiol.* 2019. V. 4. P. 595–602.
- Wang B., Kuang S., Shao H., Wang L., Wang H. Anaerobic-petroleum degrading bacteria: Diversity and biotechnological applications for improving coastal soil // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 224. Art. 112646.
- Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 89. P. 670–679.
- Zhang K., Hu Z., Zeng F.F., Yang X.Y., Wang J.J., Jing R., Zhang H.N., Li Y.T., Zhang Z. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and changes in microbial community structure in sediment under nitrate-, ferric-, sulfate-reducing and methanogenic conditions // *J. Environ. Manag.* 2019. V. 249. Art. 109425.
- Zhang C., Meckenstock R.U., Weng S., Wei G., Hubert C.R.J., Wang J.H., Dong X. Marine sediments harbor diverse archaea and bacteria with potential for anaerobic hydrocarbon degradation via fumarate addition // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2021. V. 97. Art. fiab045.
- Zhou Z., Pan J., Wang F., Gu J.D., Li M. *Bathyarchaeota*: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 639–655.
- Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G., Pan J., Yang Y., Gu J.D., Li M. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermoproteales* (MBG-D archaea) // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 885–901.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Anaerobic Oxidation of Oil by Microbial Communities of Bottom Sediments of a Natural Oil Seepage Site (Bolshaya Zelenovskaya, Middle Baikal)

O. N. Pavlova¹*, S. V. Bukin¹, O. N. Izosimova¹, S. M. Chernitsyna¹, V. G. Ivanov¹, A. V. Khabuev¹, T. V. Pogodaeva¹, I. S. Elovskaya¹, A. G. Gorshkov¹, and T. I. Zemskaya¹

¹Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, 664033, Russia

*e-mail: pavlova@lin.irk.ru

Abstract. The diversity of microbial communities and potential functional activity in anaerobic processes of oil degradation of bottom sediments was determined in the area of the Bolshaya Zelenovskaya oil seepage site (lake Baikal). When microorganisms of subsurface and deep sediment were cultivated in enrichment cultures containing oil and various electron acceptors for one year at 10°C, the concentration of n-alkanes decreased by 1.2–2 times, and PAHs by 2.2–2.8 times. The conversion of hydrocarbons was accompanied by the generation of hydrocarbon gases (methane, ethane). The microbial community of the subsurface sediment was characterized by greater bacterial diversity than that of the deep sediment and was represented by microorganisms specialized in the decomposition of a wide range of substrates, including petroleum hydrocarbons. The deep layers of sediment were dominated by *Atribacterota*, *Caldisericota* and *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*), as well as representatives of the “rare biosphere” *Elusimicrobiota* and *Candidatus* Hadarchaeota. Among the main participants in the degradation of oil in bottom sediments of the lake. Representatives of the phyla *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Halobacteriota* and *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) can be classified as Baikal.

Keywords: lake Baikal, bottom sediments, anaerobic oxidation of oil, microbial community, hydrocarbon