

На правах рукописи

КАДНИКОВ ВИТАЛИЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания
углеводородов на дне озера Байкал**

(03.01.03 – молекулярная биология)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
А.В. Марданов

Москва-2014

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	3
ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1. Углеводороды: характеристика, биологическое и геохимическое образование	7
2. Микроорганизмы, осуществляющие анаэробную деградацию углеводородов	16
3. Методы исследования биоразнообразия микроорганизмов	26
4. Микробные сообщества мест залегания газовых гидратов в морских осадках	36
5. Разнообразие микроорганизмов озера Байкал	43
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
РЕЗУЛЬТАТЫ	56
1. Микробное сообщество микроорганизмов, ассоциированных с газовыми гидратами на дне озера Байкал	56
2. Микробное сообщество микроорганизмов битумных холмов в естественных выходах нефти на дне озера Байкал	76
ОБСУЖДЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	95
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	96
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биоразнообразия микроорганизмов и структур микробных сообществ занимает центральное место среди задач экологии микроорганизмов и имеет важное значение как для понимания биогеохимических циклов, так и для пополнения знаний о ресурсах биосферы. Уникальной экологической нишей является озеро Байкал, возраст которого оценивается в 20-30 млн. лет. Его характеризуют большие глубины, низкая температура воды и постоянство химического состава вод в глубинной части. Высокая насыщенность кислородом всей толщи воды, низкая концентрация органических веществ и минерализация воды обуславливают специфические условия жизнедеятельности организмов. Около 60% флоры и фауны Байкала являются эндемиками (Тимошкин, 2001).

В последние годы на дне Байкала открыты места приповерхностного залегания газовых гидратов и выходов нефти, но признаков загрязнения вод Байкала нефтью не выявлено. Вероятно, в этих районах происходят активные процессы биодеградаци, а возможно и образования углеводородов, ключевую роль в которых играют микроорганизмы донных осадков и водной толщи.

В настоящее время углеводороды являются одним из основных источников энергии. Превращение комплексов органического вещества в метан - важнейший биологический процесс в глобальном цикле углерода. Метан может выходить в атмосферу в газовой форме, или быть изолированным в твердой форме, в виде газовых гидратов. Около 500-2500 гигатонн суммарного углерода в виде газовых гидратов метана находится в глубоководных морских осадках (Milkov, 2004) и большая часть этого метана имеет биологическое происхождение (Kvenvolden, 1995). Недавние исследования показали, что разнообразные микробные сообщества ассоциированы с метановыми гидратами морских осадков, которые были отобраны в районах впадины Нанхай (Reed et al., 2002; Newberry et al., 2004), в Охотском море (Inagaki et al., 2003), в Перу и Cascadia Margins в восточной части Тихого океана (Bidle et al., 1999; Marchesi et al., 2001; Yoshioka et al., 2010). Микробные процессы могут способствовать не только образованию метановых гидратов, но также и их разрушению через анаэробное окисление метана (АОМ), осуществляющееся некоторыми линиями архей.

Исследования микробных сообществ нефтяных резервуаров показали, что обитающие в них микроорганизмы влияют на качество и выход нефти (Head et al., 2003, 2006). Было показано, что действие микроорганизмов может повышать эффективность нефтеотдачи (Lake, 1989), но также и оказывать негативные эффекты, такие как биодегградация углеводородов и коррозия нефтепроводов (Magot et al., 2000; Nemat et al.,

2001; Head et al., 2003; Li and Hendry 2008). В тоже время нефть и нефтепродукты являются одним из основных загрязнителей окружающей среды. Микроорганизмы обладают огромным разнообразием ферментных систем и путей метаболизма, с использованием которых они способны разлагать широкий спектр химически устойчивых соединений, возвращая основные химические элементы в глобальные циклы. Изучение биodeградирующих способностей микроорганизмов стало наиболее актуально в последние десятилетия, когда в биосфере значительно увеличилось количество устойчивых загрязнителей антропогенного происхождения. Результаты исследования микроорганизмов, участвующих в процессах биodeградации нефти и ее производных представлены в многочисленных публикациях (Leahy and Colwell, 1990; Барышникова и др., 2001; Head et al., 2006). Впервые бактерии, разлагающие углеводороды, были выделены около ста лет назад (Sohnngen, 1913). Наиболее охарактеризованы процессы деградации углеводородов в аэробных условиях, но известны и анаэробные процессы, использующие другие окислители. В настоящее время способность использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии отмечена, по крайней мере, у 80 родов бактерий, у 9 родов цианобактерий, у 103 родов грибов и 14 родов водорослей (Head et al., 2006). Несмотря на большое количество публикаций о биodeградации углеводородов, наши знания об этих процессах, в особенности о механизмах биodeградации углеводородов в анаэробных условиях, крайне ограничены (Head et al., 2006). Исследование микробных сообществ экологических ниш, ассоциированных с естественными выходами углеводородов, в которых осуществляются процессы их биodeградации, расширят наши знания об этих процессах.

Ранее в рамках микробиологических исследований донных отложений Байкала проводили определение численности микроорганизмов и сезонной динамики, изучение различных физиологических групп (Луста и Намсараев, 1988; Лаптева, 1990). В исследованиях использовали методы электронной микроскопии, биохимии и радиоизотопного анализа (Земская и др., 1997). Однако, известно, что как правило не более 0.1-1% микроорганизмов из природного сообщества удается культивировать в лабораторных условиях, поэтому при исследовании природных образцов классическими методами большая часть сообщества остается неизученной (Amann et al., 1995).

Для характеристик состава микробных сообществ используются как традиционные микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур микроорганизмов и их характеристику, так и молекулярные методы идентификации микроорганизмов по последовательностям генов 16S рНК, не требующие культивирования. Идентификация микроорганизмов осуществляется в результате

сравнения полученных последовательностей с генами 16S рРНК известных организмов. Применение молекулярных методов дало возможность более полно исследовать сообщества микроорганизмов, в том числе, участвующих в биodeградации нефти и ее производных в различных биотопах. Следующий качественный этап в развитии молекулярных методов анализа микробных сообществ был обусловлен развитием геномных технологий. Разработка метода параллельного пиросеквенирования дала возможность проведение анализа нескольких десятков-сот тысяч независимых нуклеотидных последовательностей, что дает возможность достоверного количественного определения долей отдельных групп микроорганизмов. Применение методов пиросеквенирования к анализу 16S РНК микробных сообществ сразу же выявило неожиданно большое разнообразие многих из них и позволило идентифицировать новые филогенетически линии микроорганизмов.

Феномен байкальской нефти и газовых гидратов являлся предметом всестороннего геолого-геофизического изучения. Имеется ряд работ, посвященных выделению и культивированию бактерий – биодеструкторов нефти, однако исследования микробных сообществ, ассоциированных с районами нефтепроявлений и газовых гидратов в Байкале, методами высокопроизводительной геномики не проводились. Таким образом, задача «глубокой» количественной характеристики этих микробных сообществ молекулярными методами является актуальной и представляет интерес для исследований в области микробиологии и молекулярной биологии.

Предметом настоящей работы является молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания гидратов метана и естественных выходов нефти на дне Байкала.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Целью работы является определение структур сообществ микроорганизмов в местах залегания гидратов метана и естественных выходов нефти на дне Байкала и реконструкция их метаболизма.

При этом были поставлены следующие основные **задачи**:

1. Идентификация микроорганизмов на основе нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рибосомной РНК, определенных методом пиросеквенирования.
2. Идентификация и анализ генов, определяющих ключевые процессы, протекающие в исследуемых экологических нишах.
3. Реконструкция путей метаболизма сообществ на основе данных об их составе.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Углеводороды: характеристика, биологическое и геохимическое образование.

Углеводороды - молекулы, состоящие только из углерода и водорода. В отсутствие функциональных групп углеводороды в большинстве своем являются неполярными и проявляют низкую химическую активность при комнатной температуре. Различия в их активности главным образом определяется наличием, типом и расположением ненасыщенных связей (π -связей). Это свойство является основой деления углеводородов на 4 группы: алканы (насыщенные углеводороды), алкены, алкины и ароматические углеводороды. В каждой группе неароматических (алифатических) углеводородов различают неразветвленные (например, *n*-алканы), разветвленные и циклические (алициклические) соединения. Ароматические углеводороды могут быть моно- и полициклическими, многие из них также содержат алифатические углеводородные цепи (например, алкилбензолы).

Углеводороды имеют важное практическое значение, как исходные соединения для широкого спектра синтеза химических веществ, а также в качестве топлива. Почти все используемые углеводороды имеют природное происхождение или получают в ходе химического синтеза из природных. Природные углеводороды образуются в течение долгого времени в результате геохимического разложения захороненной биомассы или в качестве метаболитов живых организмов (Widdel and Rabus, 2001). Использование человеком продуктов переработки углеводородов привело к значительному увеличению их добычи. Присутствие углеводородов в биосфере предполагает наличие микроорганизмов, способных использовать их в качестве субстратов для роста. Изучение таких микроорганизмов представляет научный (например, изучение биохимических путей биodeградации углеводородов), экологический и биотехнологический интерес.

Бактерии и грибы, которые способны расти на углеводородах в присутствии кислорода, известны с начала XX века. Для разложения углеводородов требуется их активация молекулярным кислородом с помощью оксигеназ. Однако, во многих местообитаниях, содержащих углеводороды, отсутствует кислород, поэтому долгое время был актуален вопрос о возможности биodeградации углеводородов в анаэробных условиях. В конце 1980-х годов были обнаружены микроорганизмы, способные деградировать углеводороды в строго анаэробных условиях. (Рис. 1). Большинство из этих микроорганизмов в качестве акцепторов электронов используют нитрат, железо или сульфат в качестве акцепторов электрона в процессе анаэробного дыхания, но известны также примеры аноксигенных фототрофов, бродильщиков или синтрофных микроорганизмов, способных деградировать углеводородные субстраты (Heinrich et al.

2010; Widdel and Grundmann 2010; Widdel and Musat 2010). Биохимические механизмы анаэробного метаболизма углеводов значительно более разнообразны, чем реакции гидроксирования, используемые в процессе аэробного метаболизма углеводов (Widdel and Musat 2010).

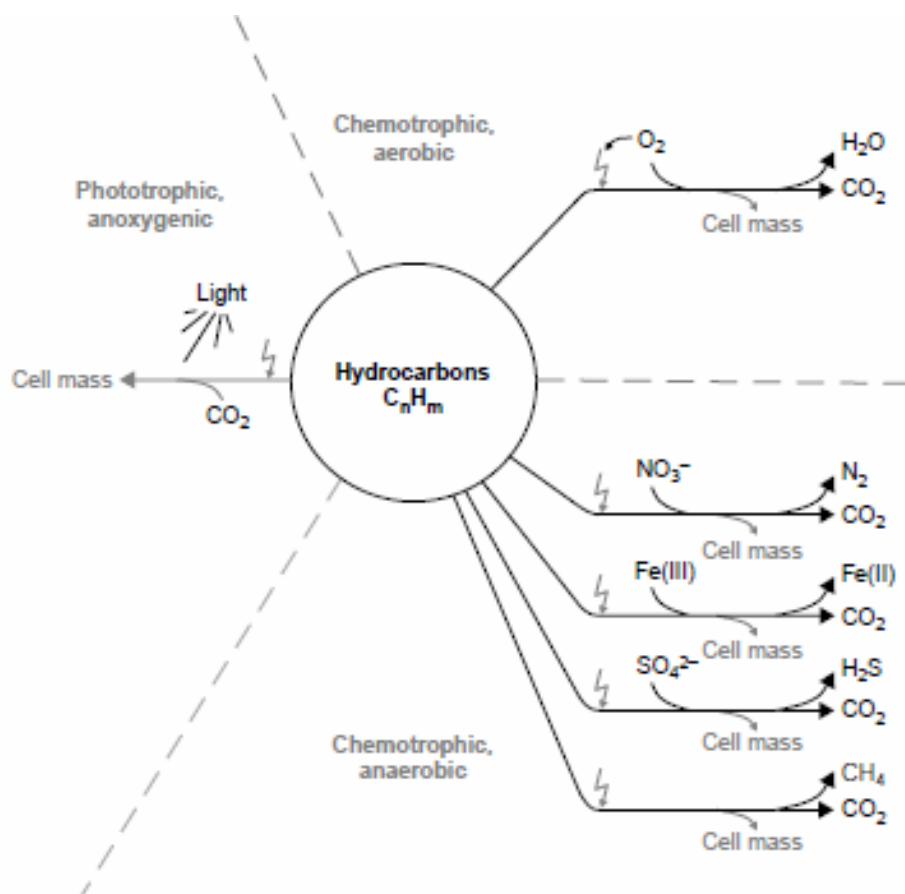


Рисунок 1. Основные физиологические пути деградации углеводов микроорганизмами, подтвержденные экспериментально (Widdel and Rabus, 2001)

В настоящее время известно не менее шести различных механизмов активации углеводов в анаэробных условиях (1) добавление радикала к метиловым или метиленовым группам углеводов, (2) гидроксирование вторичных или третичных атомов углерода, (3) карбоксилирование ароматических колец, (4) гидратация двойной связи алкенов, (5) гидратация тройной связи ацетилена, (6) активирование метана в обратном процессе метаногенеза (Harder 2010; Boll and Heider 2010; Taupp et al. 2010; Tierney and Young 2010). Также известны случаи, когда внутри микроорганизмов образуются молекулярный кислород из хлорита или нитрита, который затем используется моно- или диоксигеназой в процессе деградирования углеводов в анаэробных условиях (Mehboob et al. 2010). Механизмы анаэробного окисления углеводов в настоящее время интенсивно изучаются.

1.1. Места распространения углеводородов.

Одним из источников природного газа являются места залегания гидратов метана, большинство из которых располагаются на морском дне или в регионах вечной мерзлоты, расположенных вокруг континентальных шельфов (рис. 2). По оценки специалистов общее количество природного газа в этих местах в несколько раз превосходит общее количество газа из других источников. Гидраты метана формируются из метана геохимического или микробного происхождения и представляют собой клатраты углеводородных молекул (Crabtree, 1995) – кристаллические структуры, в которых газ находится в окружении молекулы воды. Образовывать клатраты способны большинство газов (CH_4 , C_2H_6 , C_3H_8 , CO_2 , N_2 , H_2S , изобутан и т.п.). Имя «клатраты» было дано Пауэллом в 1948г. и происходит от латинского «clathratus», что значит «сажать в клетку». Молекулы газа связаны с каркасом воды ван-дер-ваальсовскими связями. В общем виде состав газовых гидратов описывается формулой $\text{M} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где М – молекула газогидратообразователя, n – число, показывающее количество молекул воды, приходящихся на одну молекулу газа (n может изменяться от 5.75 до 17) (Соловьев, 2001; Истомин, Яукшев, 1992). При этом 1 м³ воды может связать до 220 м³ метана.

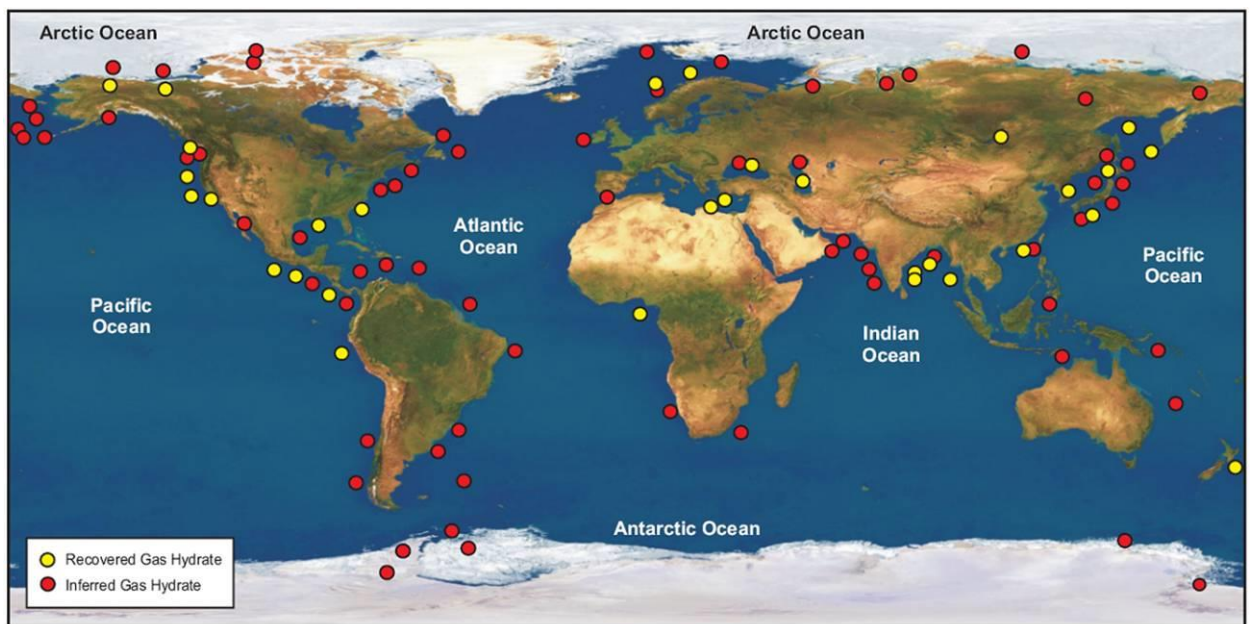


Рисунок 2. Распространение гидратов метана в мире.

(<http://theconsciousaim.com/2013/03/18/discovery-of-new-energy-source-fire-ice-or-methane-hydrate-near-japan/>)

Гидрат метана внешне напоминает лед или спрессованный снег, который способен гореть, если его поджечь. Исходя из физико-химических свойств гидрата метана было установлено, что для его образования требуются низкие температуры и высокое давление. Чем выше давление, тем выше температура, при которой гидрат метана устойчив. Так, при 0 °C он стабилен при давлении порядка 25 атмосфер и выше. Такое давление достигается, например, в океане на глубине около 250 м. При атмосферном давлении для устойчивости гидрата метана нужна температура около –80 °C.

Медленное разложение гидратов метана приводит к формированию выходов метана, такие места формируют экологические ниши, в которых развиваются специализированные сообщества, рост которых зависит от метан-деградирующих хемотрофных организмов (метанотрофов). Первоначально были известны только аэробные бактерии, обладающие подобными свойствами. Около 40 лет назад на основании геохимических исследований морских осадков было выдвинуто предположение о существовании анаэробных метан-окисляющих микроорганизмов (Martens and Berner 1974; Reeburgh 1976). Существование таких организмов позже было подтверждено анализом метаболитов *in situ* в экспериментах по инъекции ¹⁴C-метана и данных по содержанию ¹³C (Reeburgh 1980; Iversen and Jorgensen 1985; Paull et al. 1992). Позже был описан анаэробный метан-деградирующего микробный консорциум, ассоциированный с морскими гидратами метана, что послужило окончательным доказательством существования таких микроорганизмов (Boetius et al. 2000). Интересные структуры микробных сообществ были обнаружены в районах газовых выходов на дне Черного моря, для которых было показано, что столб воды ниже 300 метров не содержит кислород. В этом случае аэробная деградация метана в глубоководных слоях воды не происходит, что способствует росту анаэробных метан-окисляющих прокариот, которые в таких условиях формируют маты и рифо-подобные структуры (Michaelis et al. 2002).

Кроме того, на морском дне встречаются места выходов тяжелых углеводородов в регионах залегания нефти (Wilkinson, 1972). В этих местах обнаружены микробные сообщества, разлагающие углеводороды в аэробных и анаэробных условиях, для них такой способ питания является основным источником энергии (LaMontagne et al. 2004). В местах просачивания нефти, как и в местах выходов метана, также обнаружены метан-окисляющие микроорганизмы, что служит подтверждением схожести процессов микробной деградации тяжелых углеводородов и метана (LaMontagne et al. 2004; Gray et al. 2010; Lloyd et al. 2010).

Наземные выходы углеводородов часто располагаются рядом с местом

нефтедобычи, или в грязевых вулканах, которые могут содержать большое количество метана и других углеводородов в основном в газовой форме. Для этих экологических ниш были описаны микробные сообщества, способные к анаэробному разложению углеводородов (Alain et al. 2006; Gray et al. 2010; Lloyd et al. 2010). В микробных сообществах, ассоциируемых с морскими выходами углеводородов, в отличие от наземных, доминируют сульфатредукторы, поскольку в морской воде концентрация сульфата выше. Таксономический состав микроорганизмов, ассоциируемых с различными наземными местами выходов углеводородов, значительно отличается и сильно зависит от физико-химических характеристик исследуемых экологических ниш, в частности, от доступности акцепторов электронов.

В последние десятилетия были описаны процессы биodeградции углеводородов происходящие *in situ* в подземных нефтяных резервуарах. В одной из первых работ в этой области было показано образования метана из алканов в накопительных анаэробных культурах (Zengler et al. 1999). Эти процессы *in situ* происходят при повышенных, но не экстремально высоких температурах (45–70°C). Они могут осуществляться метаногенными консорциумами микроорганизмов (Gray et al. 2010), а также сульфатредуцирующими организмами (Gieg et al. 2010). Биогенное образование метана из неочищенной нефти обнаружено в местах нефтедобычи (Назина и др., 2006; Jones et al. 2008; Gray et al. 2009; Gieg et al. 2010), а также была показана связь этого процесса с хорошо известными эффектом «выветривания» (исчезновение низкомолекулярных компонентов нефти) нефтяных месторождений (Gray et al. 2010). Окисление углеводородов в нефтяных резервуарах приводит к тому, что более легкие углеводороды со временем теряются, поскольку являются более доступным субстратом для микроорганизмов, в результате остаются более тяжелые углеводороды. Для оценки процессов биodeградции углеводородов используют два основных подхода. Первый основан на оценке изотопного состава нефти, а второй на анализе характерных молекулярных маркеров, которые образуются в результате метаболизма углеводородов (Wardlaw et al. 2008; Gray et al. 2010; Yagi et al. 2010). Ранее было показано, что одни и те же виды микроорганизмов, участвующие в деградации углеводородов, встречаются в различных экологических нишах, ассоциируемых с углеводородами (Назина и др., 2006; Gieg et al. 2010; Gray et al. 2010, Jones et al. 2008). Таким образом, организмы, участвующие в «выветривании» нефти в нефтяных резервуарах похожи на организмы, найденные в местах выходов углеводородов.

1.2. Биологическое и геохимическое образование углеводородов.

Углеводороды, образованные живыми организмами, имеют различные биологические функции, например защитную или являются продуктами процессов метаболизма. Большинство биогенных углеводородов первой категории являются алкенами и включают огромное разнообразие монотерпенов, обнаруженных в высших растениях; монотерпены могут функционировать как отпугивающее средство, ингибиторы грибкового или бактериального роста или аттрактанты, но часто их роль неизвестна (Birch and Bachofen, 1988). Насыщенные и ароматические углеводороды могут также иметь полезные функции в живых организмах. Различные n-алканы или простые метил-разветвленные алканы были обнаружены в бактериях (Birch and Bachofen, 1988; De Rosa et al., 2000), растениях (Birch and Bachofen, 1988), и животных (Birch and Bachofen, 1988; Brown et al., 2000). Высоко метилированные алканы, полученные из единиц изопрена, распространены в археях (Oremland, 1988). Биосинтез алканов пока плохо изучен. Недавно был описан путь биосинтеза алканов из жирных кислот у цианобактерий (Schirmer et al., 2010).

Безусловно, самым важным углеводородом является метан, образуемый в результате биodeградации органических веществ в анаэробных условиях в отсутствие других акцепторов электронов (рис. 3).

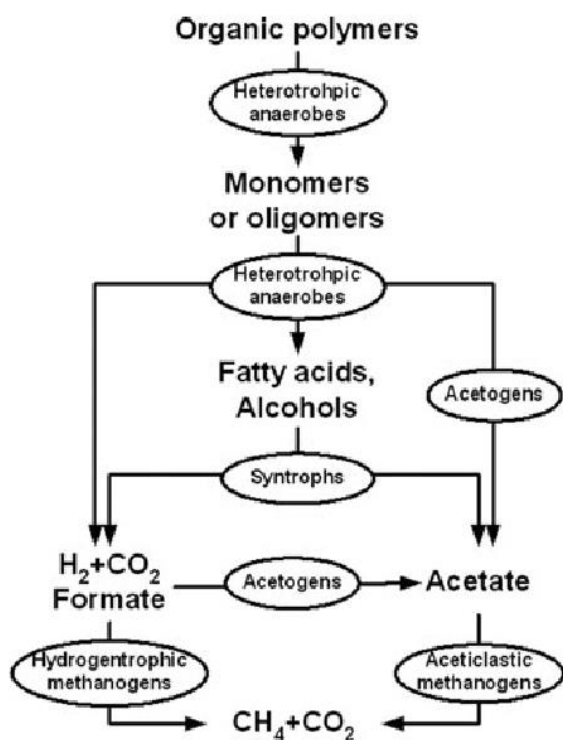


Рисунок 3. Анаэробные процессы деградации органических веществ с образованием метана (из Liu and Whitman, 2008).

В настоящее время активно обсуждается отличие биологического и геохимического метана (Tissot and Welte, 1984; Oremland, 1988; Martini et al., 1996). Метан биологического происхождения имеет низкое соотношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Oremland, 1988; Martini et al., 1996). Значительная часть метана в природе находится в виде газовых гидратов; содержание приблизительно 10^{12} тонн углерода. Биологический метан образуется разнообразными облигатными анаэробными археями. Они используют ацетат и биогенные C_1 соединения (метанол, метиламины и метилсульфиды, формат) которые подвергаются реакциям диспропорционирования или CO_2 , который восстанавливается с использованием H_2 или других доноров водорода, образовавшихся в результате брожения (Oremland, 1988; Thauer, 1998; рис. 4). Центральную роль в процессе метаногенеза играет кофермент М (метил коэнзим М редуктаза). Он необходим всем метаногенам и обнаружен только у них; у других архей отсутствует и поэтому служит молекулярным маркером для выявления метаногенов. Через бродильщиков, синтрофных и метаногенных микроорганизмов, биомасса может быть полностью преобразована в метан и CO_2 (Oremland, 1988). Реакции продолжаются до конечного термодинамически устойчивого состояния углерода, которое достигнуто в форме метана и CO_2 (табл. 1).

Таблица 1. Энергетический выход и организмы, осуществляющие процессы метаногенеза (Liu and Whitman, 2008).

Reaction	$\Delta G^{\circ \prime}$ a (kJ/mol CH_4)	Organisms
I. CO_2-type		
$4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	–135	Most methanogens
$4 \text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	–130	Many hydrogenotrophic methanogens
$\text{CO}_2 + 4 \text{isopropanol} \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{acetone} + 2 \text{H}_2\text{O}$	–37	Some hydrogenotrophic methanogens
$4 \text{CO} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2$	–196	<i>Methanothermobacter</i> and <i>Methanosarcina</i>
II. Methylated C1 compounds		
$4 \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	–105	<i>Methanosarcina</i> and other methylotrophic methanogens
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	–113	<i>Methanomicrococcus blatticola</i> and <i>Methanosphaera</i>
$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S}$	–49	Some methylotrophic methanogens
$4 \text{CH}_3\text{-NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	–75	Some methylotrophic methanogens
$2 (\text{CH}_3)_2\text{-NH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$	–73	Some methylotrophic methanogens
$4 (\text{CH}_3)_3\text{-N} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	–74	Some methylotrophic methanogens
$4 \text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4\text{Cl}$	–74	Some methylotrophic methanogens
III. Acetate		
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	–33	<i>Methanosarcina</i> and <i>Methanosaeta</i>

Метаногенные сообщества, таким образом, получают максимальную свободную энергию, доступную от соединений углерода в отсутствие внешних электронных акцепторов. Даже ароматические (Spormann, Widdel, 2000; Beller, Edwards, 2000) или насыщенные (Zengler et al., 1999; Anderson, Lovley, 2000) углеводороды могут быть преобразованы микробными сообществами в метан.

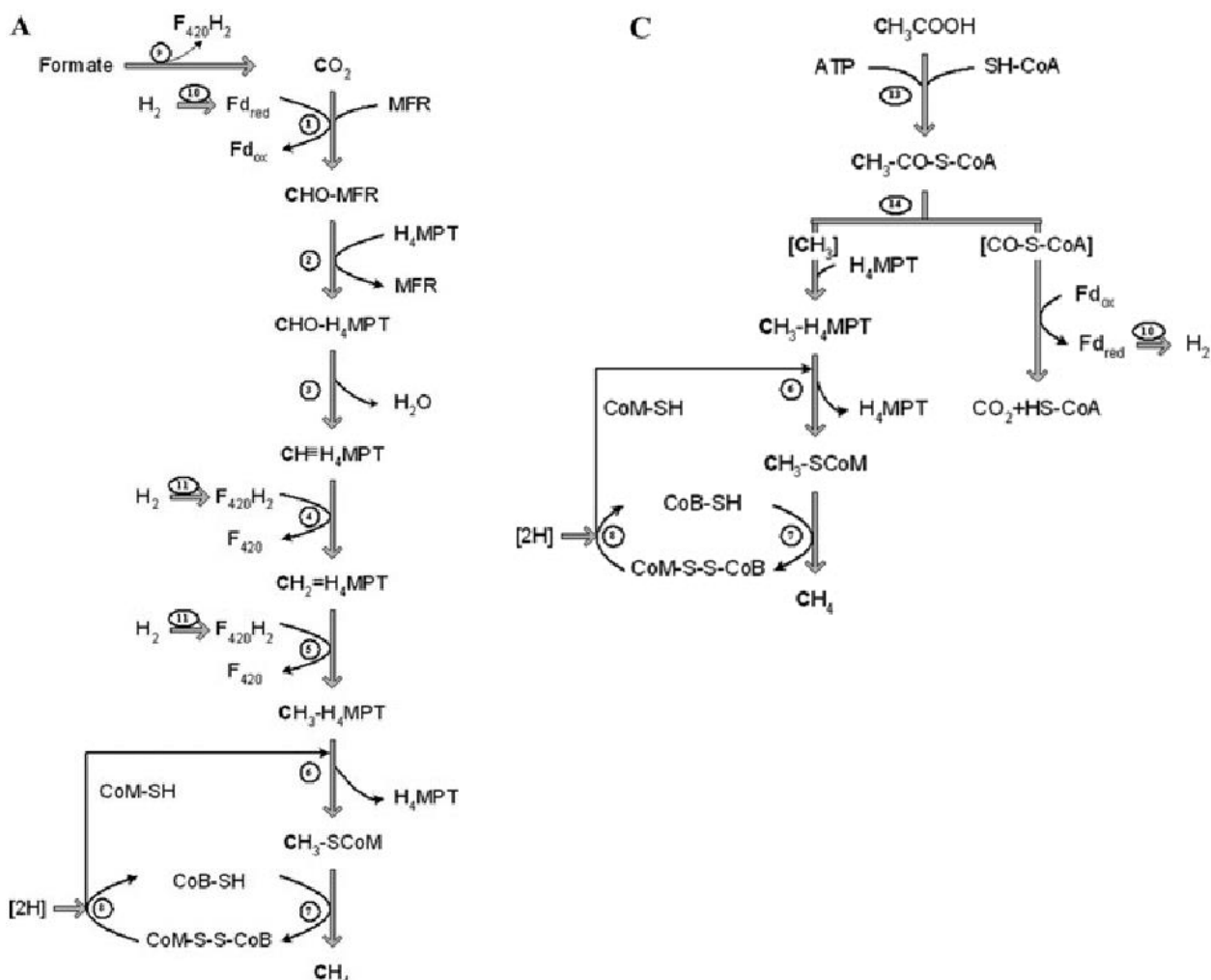


Рисунок 4. Процессы образования метана из формиата или H₂/CO₂ (слева) и из ацетата (справа). Обозначения: Fd_{red} = reduced form of ferredoxin; Fd_{ox} = oxidized form of ferredoxin; F₄₂₀H₂ = reduced form coenzyme F₄₂₀; MFR - methanofuran; H₄MPT = tetrahydromethanopterin; CoM-SH = coenzyme M; CoB-SH = coenzyme B; CoM-S-S-CoB = heterodisulfide of CoM and CoB; CoASH = coenzyme A. Ферменты: 1. formyl-MFR dehydrogenase (Fmd); 2. formyl-MFR:H₄MPT formyltransferase (Ftr); 3. methenyl-H₄MPT cyclohydrolase (Mch); 4. methylene-H₄MPT dehydrogenase (Hmd); 5. methylene-H₄MPT reductase (Mer); 6. methyl-H₄MPT:HS-CoM methyltransferase (Mtr); 7. methyl-CoM reductase (Mcr); 8. heterodisulfide reductase (Hdr); 9. formate dehydrogenase (Fdh); 10. energy conserving hydrogenase (Ech); 11. F₄₂₀-reducing hydrogenases; 12. methyltransferase; 13. acetate kinase (AK)-phosphotransacetylase (PTA) system в Methanosarcina; AMP-forming acetyl-CoA synthetase в Methanosaeta; 14. CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase (CODH/ACS).

Формирование этана и более высших газообразных алканов из природных или внесенных этиловых или высших алкильных соединений, соответственно, были обнаружены в естественных микробных сообществах и в культурах метаногенов (Oremland, 1988; McKay et al., 1996); однако эти углеводороды были найдены только в низких концентрациях.

Ароматические углеводороды могут также быть образованы как биологические продукты деградации. *Tolumonas auensis* преобразовывает фенилацетат (произведенный из ферментативного распада фенилаланина) в течение миксотрофного роста с толуолом (Fischer-Romero et al., 1996). Анаэробное образование p-cymene из алкеновых кислот (alkenoic) и содержащих кислород монотерпенов в условиях метаногенеза представляют другой пример биологического образования ароматических углеводородов из реакций деградации (Harder and Foss, 1999).

Геохимическое образование углеводородов

В морских отложениях содержится большое количество насыщенных и ароматических углеводородов, образованных в геохимических процессах преобразования захороненной биомассы в течении долгого периода времени. В локальных местах интенсивное формирование углеводородов привело к образованию нефтяных и газовых скоплений (Tissot and Welte, 1984). В среднем около 80% (массы) нефтяных компонентов состоят из насыщенных и ароматических углеводородов.

Геохимические процессы преобразования, приводящие к формированию углеводородов чрезвычайно сложны (Tissot and Welte, 1984; Tyson, 1995). Ранняя дефункционализация и реакции конденсации осадков захороненной биомассы при умеренной температуре ($\leq 50^{\circ}\text{C}$), называется диагенезом (иногда включает реакции биodeградации), приводят к образованию структурно очень сложных полимеров обозначаемых керогеном. Кероген в отложениях различных возрастов - безусловно самая богатая форма органического углерода на нашей планете.

Суммарная масса керогена соответствует больше, чем 10^{15} тонн углерода (Tissot and Welte, 1984); это намного больше, чем количество, которое может быть окислено всем свободным кислородом на Земле. Образование керогена при более высокой температуре и давлении, называются катагенезом (katagenesis), увеличивает его гидрофобный характер за счет дефункционализации и секреции части органического углерода как алифатических и ароматических углеводородов. В подземных местах залегания углеводородах могут протекать реакции метаногенеза, в результате которых образуется метан и CO_2 , и/или нативный углерод. Образующийся в процессе геохимических процессов углерод постепенно приближается к своему стабильному энергетическому состоянию, однако это происходит значительно медленнее, чем это протекает при биогенном образовании. Существенное различие геохимической трансформации углерода от биогенной - это образование многочисленных химически инертных углеводородов.

2. Микроорганизмы, осуществляющие анаэробную деградацию углеводов

В настоящее время способность использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии отмечена, по крайней мере, у 80 родов бактерий, у 9 родов цианобактерий, у 103 родов грибов и 14 родов водорослей (Head et al., 2006). Наиболее известны и хорошо охарактеризованы процессы биodeградации углеводов в аэробных условиях. Так, различные виды бактерий, способные разлагать углеводороды, выделены из морских экосистем (Head et al., 2006). Например, *Alcanivorax* spp., *Oleiphilus* spp., и *Thalassolituus* spp., деградируют насыщенные углеводороды различной структуры, *Planomicrobium alkanoclasticum* способен окислять алканы, а *Yeosuana aromativorans* -деградировать ароматические углеводороды в аэробных условиях (Dyksterhouse et al., 1995; Yakimov et al., 1998; Golyshin et al., 2002).

Окисление метана в аэробных условиях осуществляется двумя филогенетически различными группами метилотрофных бактерий, известных как метанотрофы 1 и 2 типа (см. обзор McDonald et al., 2008). Первый тип – это гамма-протеобактерии родов *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylothermus*, *Methylosarcina*, *Methylohalobius*, *Methylosoma*, и *Methylococcus*. Метанотрофами второго типа являются альфа-протеобактерии родов *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella*, и *Methylocapsa*. Еще одной недавно обнаруженной группой аэробных метанотрофов являются термоацидофильные бактерии филума *Verrucomicrobia* (Dunfield et al., 2007). Метан окисляется с помощью метан монооксигеназы до метанола, который затем окисляется через формальдегид и формиат до CO₂.

Процессы аэробного окисления углеводов и осуществляющие их группы микроорганизмов хорошо изучены, поэтому основное внимание в обзоре литературы будет уделено процессам окисления углеводов в анаэробных условиях.

Организмы, вовлеченные в деградацию углеводов в условиях отсутствия кислорода, в большинстве своем являются анаэробными бактериями. Это позволяет решить проблему получения энергии для роста на энергетически бедных субстратах, сочетая процессы окисления углеводов с переносом электронов в электрон-транспортных цепях, в условиях отсутствия доступного кислорода, необходимого для моно- или диоксигеназных начальных реакций аэробной деградации углеводов. Эти организмы способны использовать практически все известные акцепторы электронов: нитраты, нитриты, оксид азота, окисленные ионы металлов, сульфат или тиосульфат.

Денитрифицирующие бактерии

Большинство известных денитрифицирующих углеводород окисляющих бактерий относятся к порядку *Rhodocyclales* из *Betaproteobacteria* (табл. 2). За последние два десятилетия были выделены штаммы, деградирующие толуол, этиленбензин, р-цимол, р-этилтолуол, некоторые монотерпены, п-гексаны (табл. 2). Таксономический анализ показал, что они относятся к родам *Thauera*, *Azoarcus*, *Aromatoleum*, и *Georgfuchsia*. Род *Thauera*, содержит толуол или м-ксилен разлагающие виды *T. aromatica*, тогда как виды *T. terpenica* и *T. linaloolentis* включает штаммы окисляющие терпены, р-цимол или р-этилтолуол (Anders et al. 1995; Foss and Harder 1998; Heider and Fuchs 2005). Большинство других описанных анаэробных углеводород деградирующих изолятов были отнесены к роду *Azoarcus*. Первоначально к этому роду относились азот-фиксирующие растительные симбионты, не способные к анаэробной деградации углеводов или ароматических соединений (Reinhold-Hurek and Hurek 2000). В настоящее время описаны толуол-деградирующие виды *A. toluovorans*, *A. tolulyticus*, и *A. toluclasticus*, в тоже время многие углеводород-деградирующие штаммы до сих пор не депонированы (Zhou et al. 1995; Song et al. 1999; Reinhold-Hurek et al. 2005). В работах Widdel и Rabus предлагается выделить штаммы, анаэробно-окисляющие ароматические или углеводородные субстраты, из рода *Azoarcus* в отдельный род и назвать его *Aromatoleum*. Наиболее известными из этих штаммов являются *Aromatoleum aromaticum* EbN1, способный расти на толуоле или этиленбензиле, а также штамм HxN1, способный анаэробно расти на п-гексане и некоторых п-алканов (Ehrenreich et al. 2000). Штамм EbN1 является первым организмом этой группы для которого был расшифрован геном (Rabus et al. 2005) (рис. 5).

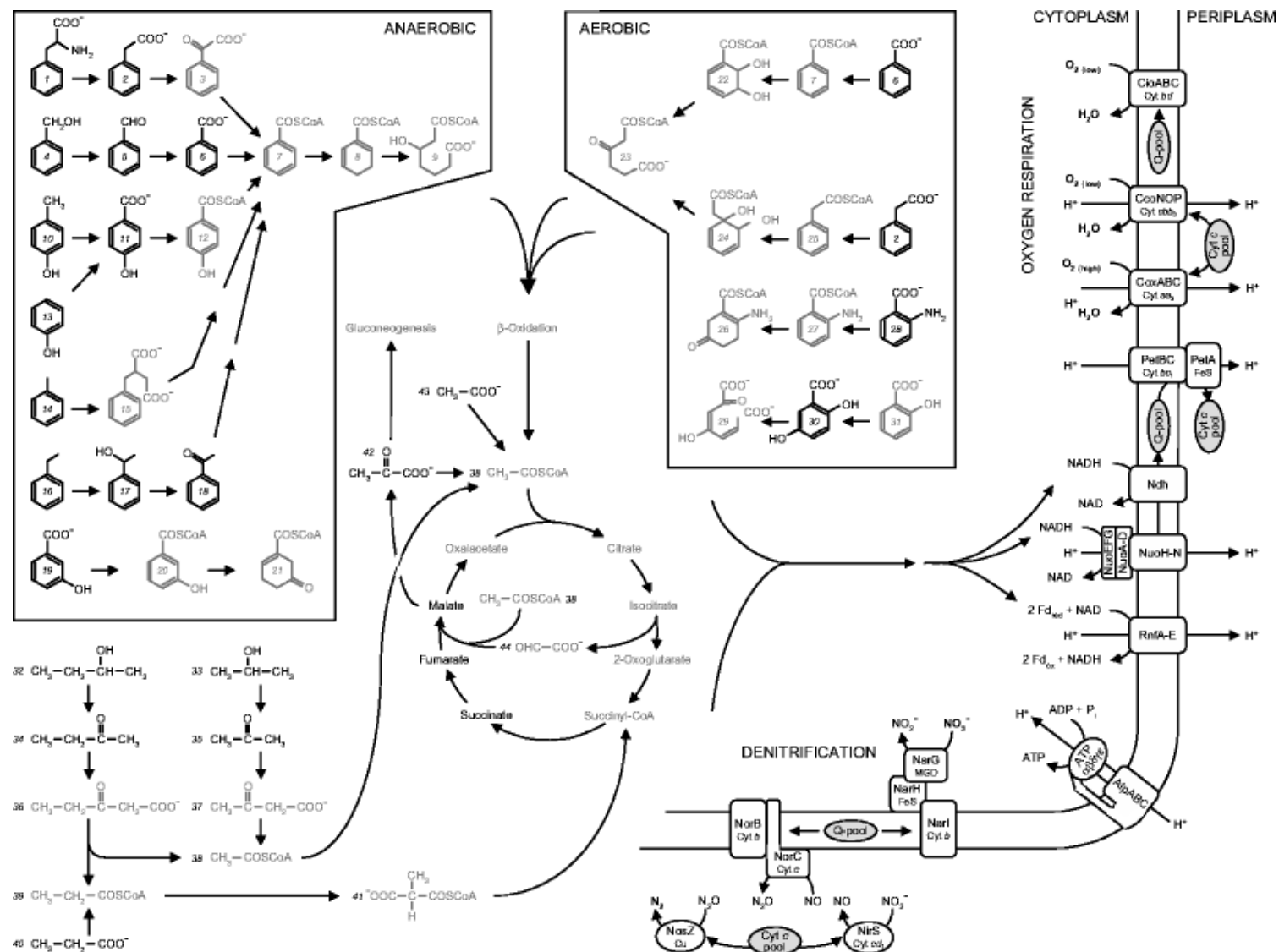


Рисунок 5. Основные пути метаболизма *Aromatoleum aromaticum* EbN1, определенные в результате расшифровки генома. (Rabus et al., 2005).

Таблица 2. Денитрифицирующие углеводород-деградирующие бактерии. Штаммы для которых нет ближайшего таксономического валидированного штамма, отнесены к ближайшему родственному организму и обозначены как «близкие к».

Организм	Филогения	используемые субстраты	Описание (ссылка)
<i>Thauera aromatica</i> (например, штамм K172, T1)	Beta-proteobacteria	толуол	Anders et al. (1995)
<i>Azoarcus tolulyticus</i> (например, штамм Tol14, Td15)		Толуол, <i>мета</i> -ксилол	Zhou et al. (1995)
<i>Azoarcus toluvorans</i>		толуол	Song et al. (1999)
<i>Azoarcus toluclasticus</i>		толуол	Song et al. (1999)
<i>Azoarcus</i> sp. штамм T		Толуол, <i>мета</i> -ксилол	Reinhold-Hurek et al. (2005)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1		толуол, этилбензол	Rabus et al. (2005)
Strain PbN1 (близкие к <i>Aromatoleum</i>)		этилбензол, пропилбензол	Reinhold-Hurek et al. (2005)
Strain ToN1 (близкие к <i>A. toluvorans</i>)		толуол	Reinhold-Hurek et al. (2005)
mXyN1 (близкие к <i>T. aromatica</i>)		Толуол, <i>мета</i> -ксилол	Heider and Fuchs (2005)
pCyN1 (близкие к <i>Aromatoleum</i>)		толуол, цимол, различные монотерпены	Reinhold-Hurek et al. (2005)
<i>Thauera linaloolentis</i>		различные монотерпены	Foss and Harder (1998)
<i>Thauera terpenica</i>		различные монотерпены	Heider and Fuchs (2005)
pCyN2 (близкие к <i>T. terpenica</i>)		толуол, цимол, различные монотерпены	Heider and Fuchs (2005)
<i>Castellaniella defragrans</i>		различные монотерпены	Foss et al. (1998)
Strain HxN1 (близкие к <i>Aromatoleum</i>)		C6-8 алканы	Ehrenreich et al. (2000)
Strain OcN1 (близкие к <i>Aromatoleum</i>)		C8-12 алканы	Ehrenreich et al. (2000); Zedelius et al. (2011)
<i>Dechloromonas aromatica</i>		Бензол, толуол, этилбензол, ксилен	Coates et al. (2001)
Штамм HdN1	Gamma-proteobacteria	C14-20 алканы	Ehrenreich et al. (2000); Zedelius et al. (2011)
<i>Methylomirabilis oxyfera</i>	Филум NC10	Метан	Ettwig et al. (2010)

Недавно описанный новый род *Georgfuchsia* семейства *Rhodocyclaceae* представлен микроорганизмами, являющимися строгими анаэробами и деградирующими толуол. Представители этого рода распространены в загрязнённых водоносных горизонтах и способны изменять свои физиологические свойства. Метаболизм углеводов у этих организмов протекает либо при денитрификации, либо в процессе восстановления железа Fe(III) (Weelink et al. 2009). Ещё один вид *Thauera terpenica* из семейства *Rhodocyclaceae* был описан как штамм, окисляющий терпеноиды. Для близкородственного вида *T. linaloolentis* известно, что он способен деградировать только полярные терпеноиды (Foss and Harder 1998). По крайней мере, один штамм *T. terpenica* использует алканы при восстановлении нитрата (Foss and Harder 1998). Близкородственный штамм pCyN2 способен деградировать ароматический терпеноид цимол (Harms et al. 1999; Heider and Fuchs 2005), а другой штамм pCyN1, анаэробно разлагающий цимон (Harms et al. 1999), в результате филогенетического анализа на основании гена 16S рРНК был отнесен к роду *Aromatoleum* (таблица 2). Другим видом бетапротеобактерий, способным деградировать терпеноидные углеводороды (например, мирцен) в процессах денитрификации является *Castellaniella defragrans* (Foss et al. 1998; Brodkorb et al. 2010). Эта бактерия относится к семейству *Alcaligenaceae* порядка *Burkholderiales*, как и многие другие углеводород-деградирующие бетапротеобактерии.

Денитрифицирующих бактерий, способных утилизировать углеводороды в анаэробных условиях и относящихся к другим таксономическим группам, известно мало. Одним из таких штаммов является альфапротеобактерия рода *Magnetospirillum*, которая растет в условиях денитрификации на толулене или других полярных ароматических компонентах и использует общеизвестные анаэробные пути метаболизма толуола (Shinoda et al. 2005).

Металл-редуцирующие микроорганизмы

Строго анаэробные представители родов *Geobacter* (*Deltaproteobacteria*) (Lovley et al. 1989; Lovley and Lonergan 1990) и *Georgfuchsia* (*Betaproteobacteria*) (Weelink et al. 2009) являются организмами, представляющими металл редуцирующих деструкторов углеводов. Для чистых культур этих видов была показана способность утилизировать только толуол, но проведенные «полевые» исследования, показывают, что эта группа микроорганизмов обладает более широким углеводород-деградирующим потенциалом, как и денитрифицирующие и сульфатредуцирующие штаммы (Weelink et al. 2009; Piloni et al. 2011; Staats et al. 2011). Большинство из этих микроорганизмов в качестве акцепторов электронов используют Fe(III), но есть и такие, которые способны

использовать другие ионы металлов, например Mn(IV) или U(VI) в качестве акцепторов электронов (Shelobolina et al. 2008; Weelink et al. 2009). Интересно отметить, что оба штамма могут переключаться и на восстановление нитратов (Weelink et al. 2009).

Способность осуществлять анаэробную деградацию ароматических соединений, таких как бензол и фенол, сопряженную с восстановлением Fe(III) была показана для эуриархей рода *Ferroglobus* (Tor and Lovley, 2001; Holmes et al., 2012). Соответствующие кластеры генов пути деградации этих соединений, вероятно, были горизонтально перенесены в геном этих архей из бакетрий.

Сульфат-редукторы.

Известные углеводород-деградирующие прокариоты широко представлены сульфатредуцирующими бактериями и археями. Они способны разлагать не только алкилбензолы или этилбензолы, алканы и алкены, а также ароматические соединения подобные бензенам и нафталину. Наиболее известные толуол-деградирующие виды относятся к *Desulfobacula toluolica* (Rabus et al. 1993; Kuever et al. 2005a), на гексадекане способны расти виды *Desulfococcus oleovorans* (Aeckersberg et al. 1991) и *Desulfatibacillum alkenivorans* (Cravo-Laureau et al. 2004a). Другие бактерии, растущие на толуоле, относятся к *Desulfosarcina cetonicum* (Morasch et al. 2001; Kuever et al. 2005b), а также *Desulfoglaeba alkanexedens* (Davidova et al. 2006) и *Desulfatibacillum aliphaticivorans* (Cravo-Laureau et al. 2004b), которые также способны деградировать алкены и алканы. Существует большое количество штаммов, выделенных в чистые культуры, но ещё таксономически не отнесены к конкретным группам (табл. 3). В частности, были выделены новые штаммы, которые используют не только толуол, алкан и алкены в качестве субстратов, а также ксилол (штаммы oXyS1 и mXyS1, Harms et al. 1999), этилбензол (штамм EbS7, Kniemeyer et al. 2003), нафталены и метилнафталены - штаммы NaphS2, NaphS3 и NaphS6 (Galushko et al. 1999; Musat et al. 2009). Более того, был описан штамм сульфатредуцирующей дельтапротеобактерии BuS4 (Kniemeyer et al. 2007), способный окислять пропан и бутан.

Помимо дельтапротеобактерий, окисляющие углеводороды сульфатредукторы также найдены в других филогенетических групп. Это некоторые фирмикуты рода *Desulfotomaculum* (Morasch et al. 2004; Selesi and Meckenstock 2009), а также эуриархея *Archaeoglobus fulgidus*, способная деградировать длинно-цепочечные алкены (Khelifi et al. 2010).

Таблица 3. Сульфатредуцирующие углеводород-деградирующие бактерии и археи.

Организм	Филогения	используемые субстраты	Описание (ссылка)
<i>Desulfobacula toluolica</i>	Delta-proteobacteria	Толуол	Kuever et al. (2005a)
<i>Desulfosarcina cetonicum</i>		Толуол	Kuever et al. (2005b)
PRTOL1		Толуол	Beller and Spormann (1997)
oXyS1		Толуол, о-ксилол, о-этилтолуол	Harms et al. (1999)
mXyS1		Толуол, мета-толуол, м-этилтолуол	Harms et al. (1999)
EbS7		этилбензол	Kniemeyer et al. (2003)
NaphS2		нафталин, 2-метилнафталин	Galushko et al. (1999)
NaphS3		нафталин, 2-метилнафталин	Galushko et al. (1999)
NaphS6		нафталин, 2-метилнафталин	Musat et al. (2009)
<i>Desulfococcus oleovorans</i> strain Hxd		C12-20 алканы, алкены	Aeckersberg et al. (1991)
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>		Длинно цепочечные алканы, ...	Cravo-Laureau et al. (2004b)
<i>Desulfoglaeba alkenexedens</i>		Длинно цепочечные алканы, ...	Davidova et al. (2006)
<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>		Длинно цепочечные алканы, ...	Cravo-Laureau et al. (2004a)
Strain HD-3		C6-14 алканы	Rueter et al. (1994)
Strain Pnd3		C14-17 алканы	Aeckersberg et al. (1998)
Strain AK-01		C13-18 алканы	So and Young (1999)
BuS4		пропан, бутан	Kniemeyer et al. (2007)
<i>Desulfotomaculum</i>	Firmicutes	о-/м-ксилол, бифенил	Ficker et al. (1999); Morasch et al. (2004); Selesi and Meckenstock (2009)
<i>Archaeoglobus</i>	Археи: Euryarchaeota	алкены	Khelifi et al. (2010)

Фототрофные микроорганизмы

В настоящее время в литературе есть данные только об одной аноксигенной фототрофной бактерии *Blastohlotis sulfoviridis* (Zengler et al. 1999) способной анаэробно деградировать толуол, что доказывает возможность существования данного типа метаболизма у таких организмов.

Дегградация углеводов с образованием метана синтрофными консорциумами

В конце 1980-х годов появились первые работы по анаэробной дегградации ароматических углеводов до CO₂ и метана в результате диспропорционирования в отсутствии акцепторов электронов (Grbic-Galic and Vogel 1987). Эти процессы требовали совместного действия синтрофных бактерий, деградирующий органические соединения, включая углеводороды, с образованием водорода и/или ацетата, и метаногенных архей. Дегградация этих соединений термодинамически выгодна, только если концентрация водорода поддерживается на очень низком уровне, в синтрофном процессе это достигается благодаря активности метаногенов (рис. 6).

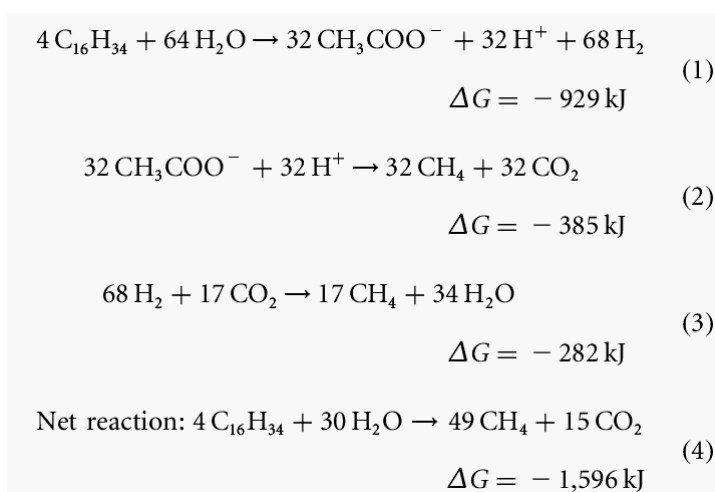


Рисунок 6. Дегградация гексадекана синтрофным сообществом (Zengler et al. 1999)

- (1) – дегградация гексадекана с образованием ацетата и водорода бактериями *Syntrophus*
- (2) – образование метана археями с использованием ацетата
- (3) – образование метана археями с использованием водорода
- (4) – суммарная реакция, осуществляемая сообществом. Энергетический выход процессов указан для концентраций водорода и ацетата в работе Zengler et al. 1999.

В последующих исследованиях было показано, что такие консорциумы способны окислять не только ароматические углеводороды, но также и алканы (Zengler et al. 1999; Anderson and Lovley 2000; Jones et al. 2008). Исследования метаногенных консорциумов показали, что они могут включать микроорганизмы разных филогенетических групп. Углеводород-дегградирующие партнеры таких консорциумов в основном относятся к дельта-протеобактериям родов *Syntrophus* и *Smithella* (Zengler et al. 1999; Grabowski et al. 2005; Gieg et al. 2008; Jones et al. 2008), или фирмикутам рода *Desulfotomaculum* (Ficker et al. 1999). Метаногенные партнеры в синтрофных сообществах значительно более разнообразны и зависят от физико-химических параметров мест обитания. Похожие

метаногенотрофы преобладают только в высокотемпературных местах, в то время как в местах обитания с низкой температурой могут доминировать ацетокластические метаногенны или другие рода гидрогенотрофных метаногенов (Grabowski et al. 2005).

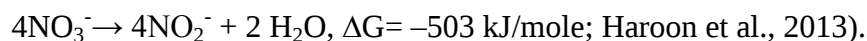
Анаэробы, получающие кислород из хлората или перхлората

Новая физиологическая группа анаэробных бактерий была обнаружена в 1990-х годах. Эта группа бактерий использовала хлорат или перхлорат в качестве акцепторов электронов с образованием кислорода (Coates et al. 1999). Образующийся кислород эти микроорганизмы способны использовать в дальнейшем метаболизме в бескислородных условиях, в частности, в процессе окисления углеводов. В этом случае эти штаммы используют обычные аэробные моно- или диоксигеназ-зависимые пути. В частности, были описаны штаммы *Dechloromonas*, способные расти на бензолах, толуолах, этилбензолах и ксилоле (Chakraborty et al. 2005), а также штамм *Pseudomonas chloritidismutans* (Mehboob et al. 2009) способный окислять алканы.

Анаэробное окисление метана

В результате исследования морских выходов метана были описаны микробные сообщества, включающие археи филума *Euryarchaeota* и сульфат редуцирующие бактерии (Boetius et al., 2000). Такие консорциумы могут в анаэробных условиях окислять метан до CO_2 , при этом восстанавливается сульфат ($\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$, $\Delta G = -14 \text{ kJ/mole}$). Исследования консорциумов показало, что археи, анаэробно окисляющие метан, названные ANME, образуют агрегаты с сульфидогенными бактериями группы *Desulfosarcina/Desulfococcus* или дельта-протеобактериями рода *Desulfobulbus* (Knittel and Boetius, 2009). Известны три группы ANME архей, - ANME-1, образующая отдельную филогенетическую линию эуриархей, а также линии ANME-2 и ANME-3, близкие к метаногенам порядка *Methanosarcinales*. К настоящему моменту не известны представители групп ANME, существующие независимо от бактерий, в отличие от бактериальных партнеров, для которых были описаны свободноживущие родственные организмы с похожими физиологическими свойствами (Pernthaler et al. 2008; Schreiber et al. 2010; Basen et al. 2011).

Хотя сульфатредукторы и являются наиболее часто описываемыми партнерами ANME архей, в процессах анаэробного окисления метана акцепторами электронов могут выступать и другие вещества, - окисленные соединения марганца ($\text{CH}_4 + 4\text{MnO}_2 + 7\text{H}^+ \rightarrow \text{HCO}_3^- + 4\text{Mn}^{2+} + 5 \text{H}_2\text{O}$, $\Delta G = -556 \text{ kJ/mole}$; Beal et al. 2009), железа ($\text{CH}_4 + 8\text{Fe}(\text{OH})_3 + 15\text{H}^+ \rightarrow \text{HCO}_3^- + 8\text{Fe}^{2+} + 21 \text{H}_2\text{O}$, $\Delta G = -270 \text{ kJ/mole}$; Beal et al. 2009) или нитрат ($\text{CH}_4 +$



Метагеномный анализ ANME архей показал, что эти они вероятно используют такие же ферменты и пути как в метаногенезе, только в обратной последовательности (рис. 7) (Meyerdierks et al., 2010; Scheller et al., 2013). Механизмы передачи окислительно-восстановительного потенциала между партнерами точно неизвестны, но проведенные исследования показали важность обоих партнеров для консорциума, поскольку археи не содержат генов, необходимых для сульфатредукции (Basen et al. 2011).

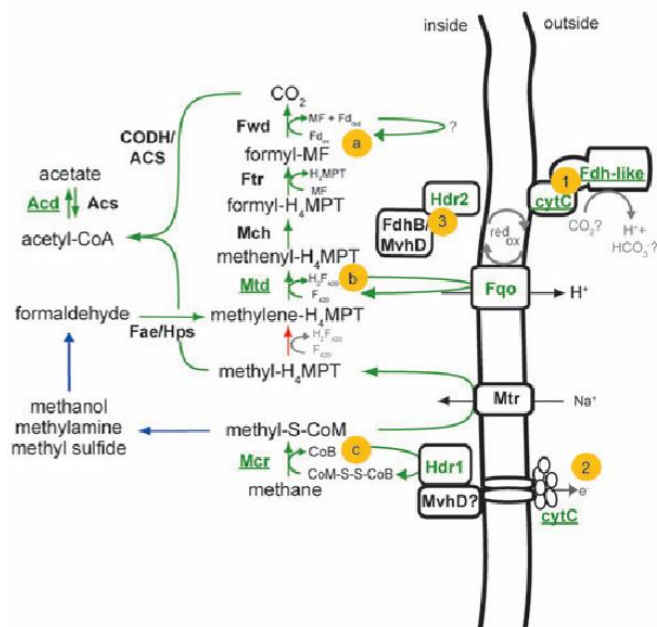


Рисунок 7. Схема анаэробного окисления метана, осуществляемого археями группы ANME-1 (Meyerdierks et al., 2010).

3. Методы исследования биоразнообразия микроорганизмов

Микробиологические методы

Первые методы исследования биоразнообразия микроорганизмов в микробных сообществах были основаны на подходах традиционной микробиологии. Эти методы основаны на культивировании исследуемых групп микроорганизмов. Преимуществами данных методов является возможность получения чистых культур и их фенотипические характеристики (см. обзор Нетрусов и др., 2004), а также относительная быстрота и дешевизна (Kirk et al., 2004).

С другой стороны, возможности этих методов весьма ограничены. В частности, они не дают полного представления о структуре и динамике микробных сообществ *in situ* (Amann et al., 1995). Лишь небольшая часть микробной популяции может быть описана путем выделения и характеристики чистых культур. По данным многих работ менее 1% микроорганизмов, представленных в природных местообитаниях, удается культивировать в лабораторных условиях (Nannipieri et al., 2003). Большую часть сообществ составляют некультивируемые представители. Это связано, прежде всего, с различными физиологическими свойствами микроорганизмов, из-за этого возникают сложности подбора условий культивирования (среды, физико-химические условия). Также к минусам культуральных методов стоит отнести их трудоемкость, что отражается в подборе условий, необходимости микроскопической техники.

Молекулярные методы

Некоторые авторы отмечают информативность различных методов идентификации и характеристики микроорганизмов, в том числе, основанных на культивировании и на молекулярном анализе, только в их сочетании (Шестакова, 2007): культуральные, радиоизотопные методы и анализ генов 16S рРНК выделенных микроорганизмов (Назина и др., 2006; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Шестакова, 2007).

Применение методов молекулярной биологии для изучения распространения микроорганизмов в различных местообитаниях с использованием препаратов ДНК, выделенных непосредственно из природных образцов, позволяет получить более полную информацию о структурах и динамике сообществ (Daly et al., 2000). С помощью молекулярных методов может быть выявлено значительно большее разнообразие микроорганизмов в различных местообитаниях, включая горячие источники, почвы, сточные воды и осадки, чистые пресноводные экосистемы и загрязненные подземные воды (Orphan et al., 2000; Chandler et al., 1997; Urukawa et al., 1999).

В настоящее время успешно применяются методы на основе анализа гена 16S рРНК и функциональных генов. Среди них можно выделить создание специфичных нуклеотидных зондов для выявления групп микроорганизмов и их использование при Blot-гибридизации или для детекции интактных клеток, например, в ходе гибридации *in situ* (Amann et al., 1990, 1995). Второй основной подход связан с анализом последовательностей фрагментов генов 16S рРНК. Молекула 16S рРНК бактерий в среднем имеет длину 1500 нуклеотидов. Полная или близкая к полной (более 1000 нуклеотидов) молекула несет достаточную информацию для филогенетического анализа (Amann et al., 1990). Использование полимеразной цепной реакции позволяет селективно амплифицировать фрагменты гена 16S рРНК из смеси ДНК различных микроорганизмов. Данный принцип лежит в основе молекулярно-генетических методов оценки микробного биоразнообразия, основанных на анализе клонов рДНК, например, денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) (Muyzer, 1999; Muyzer et al., 1993) или молекулярного клонирования с последующим анализом нуклеотидных последовательностей.

Молекулярные методы основанные на определении содержания гуанина и цитозина (G+C) в процентах от общего количества оснований ДНК, были одними из первых методов использованные для анализа биоразнообразия микробных сообществ (Kirk et al., 2004; Lynch et al., 2004). Определение содержания гуанина и цитозина в этих методах проводится либо с помощью тепловой денатурации, либо в результате центрифугирования суммарной ДНК в градиенте хлористого цезия. На основе полученных данных строят GC-профили микробных сообществ, которые используются для оценки биоразнообразия организмов (Lynch et al., 2004). Эти методы имеют два основных недостатка: (1) это низкое разрешение, поскольку разные таксономические группы могут характеризоваться одним и тем же GC составом; (2) необходимо большое количество метагеномной ДНК, что для экологических ниш с низким титром микроорганизмов (например, различные экстремальные места обитания) практически невозможно получить (Kirk et al., 2004). В настоящее время эти методы фактически не используются.

Позднее появились методы, основанные на денатурации метагеномной ДНК при высокой температуре и последующей реассоциации гомологичных одонитевых цепей (Ranjard et al., 2000). Этот метод оценки биоразнообразия основан на том, что скорость ДНК-реассоциации с увеличением биоразнообразия микробного сообщества уменьшается (Theron and Cloete, 2000). Недостатком этого метода является влияние примесей в образце на скорость реассоциации, а также зависимость результатов от методов получения

суммарной ДНК. Впрочем второе замечание является верным для всех молекулярно-биологических методов, основанные на анализе суммарной ДНК.

Позднее были разработаны подходы анализа микробных сообществ на основе методов гибридизации. Эти методы могут использоваться как суммарные препараты ДНК, РНК, так и на клеточном уровне *in situ* (Kirk et al., 2004). Эти методы являются эффективными инструментами при идентификации микроорганизмов на уровне вида. Классификация организмов на более высоком таксономическом уровне с помощью этих методов является малоинформативной. Стоит отметить высокую чувствительность результатов этих методов от подбора условий гибридизации и выбора зонда.

Распространенным методом исследования биоразнообразия микроорганизмов в различных природных местообитаниях и очистных сооружениях служит флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) (Devereux et al., 1992). FISH позволяет определить филогенетическую принадлежность микроорганизмов в образцах природного материала или в культурах по связыванию рРНК целых клеток с группоспецифическими олигонуклеотидными зондами, помеченными флуоресцирующим красителем. Этот метод позволяет количественно оценить присутствие искомым групп микроорганизмов и, за счет гибридизации с функционально активными клетками, приблизиться к пониманию структуры и функционирования сообществ.

В настоящее время анализ состава микробных сообществ проводится с помощью молекулярных методов, основанных на ПЦР. Эту группу методов можно условно разделить на две группы. Первая группа включает методы, основанные на получении целевых маркеров и последующий их анализ в результате анализа их в геле-электрофорезе (DGGE, TGGE) или рестриктазной обработки (T-RFLP). DGGE и TGGE методы первоначально были предназначены для идентификации точечных мутаций в последовательностях ДНК (Kirk et al., 2004), позднее они были адаптированы для исследования микробных сообществ (Muzyer et al., 1993). В целом это эффективные и достаточно быстрые методы анализа микробных сообществ (Kirk et al., 2004).

Для характеристики сложных сообществ удобно применять методы т.н. «фингерпринтинга», основанных на первоначальной амплификации с использованием общих или специфических праймеров для обнаружения высоко консервативных генов с последующим фракционированием, основанным на размере фрагментов или нуклеотидном составе. Наиболее часто применяются гены 16S рРНК. Кроме того, используются функциональные гены, кодирующие ферменты метаболизма. Основным преимуществом метода фингерпринтинга является быстрый сравнительный анализ большого количества образцов, что позволяет, например, охарактеризовать изменения в

структуре популяции с изменением условий внешней среды. К методам «фингерпринтинга» относится и денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE). Метод основан на разделении с помощью гель-электрофореза фрагментов ДНК приблизительно одинаковой длины, но имеющих разный состав последовательностей (Muyzer G., 1999).

Молекулярный метод - T-RFLP - основан на амплификации консервативных меченых флуоресцентной меткой последовательностей (чаще всего используется участок гена 16S рРНК). Последующая обработка фрагментов ферментами рестрикции разделяет их на последовательности ДНК, обнаруживаемые только терминальными фрагментами. В среднем в микробной экосистеме обнаруживают 30 – 50 преобладающих терминально-рестриктированных фрагментов, что обеспечивает получение информации о разнообразии.

Ещё одна группа методов используют ДНК-фингерпринтинг на основе случайных праймеров или праймеров, комплементарных к повторяющимся структурам генома (RISA, RAPD, DAF). Недостатками этих методов является низкая воспроизводимость, высокая чувствительность к параметрам эксперимента, в частности на результаты могут существенным образом повлиять качество и количество суммарной ДНК, концентрация праймеров и т.д.

Одним из самых эффективных и широко-распространенных методов является определение таксономического положения на основе последовательностей генов рибосомной РНК. Первые работы по анализу микробных сообществ на основе рРНК приходятся на середину 1980-х годов. Выбор рибосомной РНК обусловлен следующими причинами, во-первых эти гены есть у всех прокариот, во-вторых, они состоят из консервативных и вариабельных регионов, в-третьих они скорее всего не участвуют в горизонтальном переносе. В качестве основного филогенетического маркера в настоящее время используется ген 16S рРНК. Этот ген имеет достаточную длину около 1500 нт, которой достаточно для получения статистически достоверных данных для идентификации. Широкое распространение этого подхода к таксономическому анализу микроорганизмов привело к широкому распространению открытых баз данных, которые постоянно пополняются (Prosser, 2002; Kirk et al., 2004; Cole et al., 2009).

Традиционно анализ биоразнообразия микробных сообществ на основе последовательности генов 16S рРНК занимал довольно много времени и был достаточно дорогим и трудоемким. Этот метод включал несколько этапов. На первом этапе выделяется препараты метагеномной ДНК из природного образца. Важным фактором этого этапа является подбор оптимального метода выделения, чтобы эффективность

выделения ДНК из разных организмов была одинакова. На следующем этапе амплифицируются гены 16S рРНК с помощью вырожденных праймеров на консервативные участки гена. Для этого этапа в настоящее время разработан широкий спектр праймеров: от специфических - на разные таксономические группы, до универсальных, пригодных для амплификации бактериальных и архейных генов (см. обзор Baker and Cowan, 2004). Тем не менее, стоит отметить, что выбор праймеров влияет на результаты анализа. Поскольку в настоящее время проблема неравной эффективности ПЦР-амплификации исследуемых генов является одной из основных в области молекулярной экологии микроорганизмов. Полученные ПЦР фрагменты клонируют в плазмидные вектора и затем секвенируют с помощью метода Сэнгера. Идентификация клонов осуществляется в результате сравнения полученных последовательностей с базами данных рибосомных РНК. Наиболее известными являются Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole et al., 2009). Для анализа последовательностей в данной базе данных был разработан интерфейс, позволяющий определять таксономическую классификацию последовательностей в режиме реального времени через сеть интернет (Cole et al., 2009). Приведенный выше метод анализа генов 16S рРНК является достаточно трудоемким и высокзатратным. На практике с помощью этого метода в большинстве лабораторий мира есть возможности проанализировать несколько сотен независимых клонов. Однако, проведенные исследования показывают, что этого не достаточно для анализа природных микробных сообществ, которые могут включать несколько тысяч видов бактерий и архей (Huber et al., 2007).

Настоящую революцию в методах анализа генов рибосомных РНК была совершена с разработкой метода высокопроизводительного пиросеквенирования. Этот метод позволяет проанализировать несколько десятков тысяч независимых последовательностей 16S рРНК, что значительно превосходит возможности традиционных методов основанных на клонировании. Впервые для анализа микробных сообществ метод пиросеквенирования был предложен Sogin и др. (Sogin et al., 2006), в своей работе они предложили использовать для идентификации микроорганизмов короткие вариабельные регионы генов 16S рРНК. Этот выбор был обусловлен возможностями первых пиросеквенаторов, которые позволяли прочесть в одной реакции последовательность около 200 нуклеотидов.

В первых работах в качестве вариабельного региона выбирались в основном фрагменты гена, включающие V3 или V6 вариабельные фрагменты (Рис. 8). В работах Huse et al., 2008 года были созданы базы данных V3 (123206 уникальные последовательности) и V6 (59830 уникальных последовательностей) регионов. Анализ

этих баз данных показал, что однозначно классифицируются 99% и 97% последовательностей V3 и V6, соответственно на уровне рода. Такое различие может объясняться тем, что V3 район более длинный и этим обусловлена его большая специфичность. Тем не менее, стоит отметить, что коротких фрагментов не достаточно для точной идентификации многих микроорганизмов, удаленных от известных. В настоящее время средняя длина чтений в одной реакции пиросеквенирования составляет около 700 нт, такой длины достаточно для классификации.

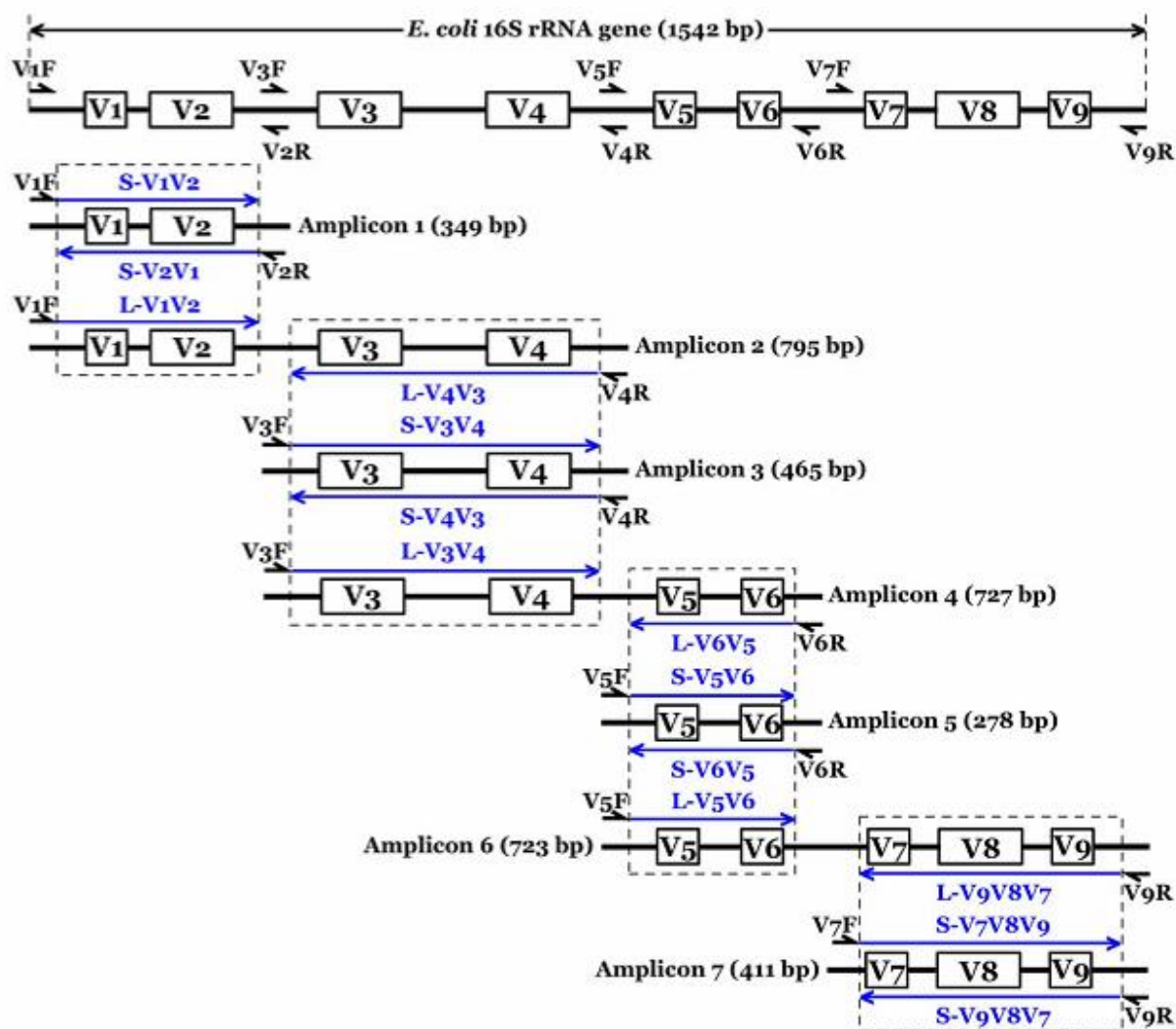


Рисунок 8. Варианты переменных фрагментов гена 16S рРНК, используемые для таксономической идентификации микроорганизмов методом пиросеквенирования (Cai et al., 2013).

Первые работы, использующие метод пиросеквенирования для анализа состава микробных сообществ, сразу показали возможности более «глубокого» анализа биоразнообразия. В работе (Sogin et al., 2006) авторы показали, что микробное разнообразие в океанах гораздо богаче прежних оценок, основанных на традиционных

молекулярно-биологических методах. Если с помощью традиционных методов видовое разнообразие микроорганизмов морской воды оценивалось в несколько сотен видов (Acinas et al., 2004), то с помощью параллельного пиросеквенирования V6 переменных регионов было показано, что микробное биоразнообразие может быть на 1-2 порядка больше (Sogin et al., 2006).

Sogin и соавторы (2006) получили около 118 000 последовательностей V6 регионов генов 16S рРНК из 8 проб, отобранных в различных районах Атлантического и Тихого океана. Для оценки биоразнообразия, каждое чтение (каждая последовательность V6 региона) сравнивалась с последовательностями референсной базы данных V6 регионов (V6RefDB), содержащей около 40 000 уникальных последовательностей. Число филотипов (OTU) определяли по числу «выявленных» при сравнении последовательностей из базы V6RefDB. В таблице 4 представлено число филотипов для каждой пробы, выявленных при сравнении с референсной базой данных.

В работе также проведен анализ биоразнообразия сообществ другим методом, независимым от существующих баз данных 16S рРНК, предполагающим кластерный анализ последовательностей V6 регионов с их объединением в кластеры на разных уровнях сходства нуклеотидных последовательностей (0, 1%, 3% и т.д.), соответствующим классификации на уровне вида, рода и т.п. Каждый кластер в этом случае принимается за филотип (OTU) соответствующего уровня. В таблице 4 представлены данные по числу кластеров для различных образцов и значения индексов ACE и Chao1, оценивающих полное биоразнообразие сообществ в 5-20 тысяч видов.

Таблица 4. Число филотипов разного уровня и оценки биоразнообразия, определенные в результате кластерного анализа (Sogin et al., 2006).

Sample ID	Reads	Cluster distance								
		0.03			0.05			0.10		
		OTU	ACE	Chao1	OTU	ACE	Chao1	OTU	ACE	Chao1
53R	5,000	1,946	7,247	6,997	1,732	5,616	5,288	1,316	3,351	3,018
55R	13,902	5,266	19,235	18,191	4,673	14,959	14,209	3,644	9,618	9,080
112R	9,282	4,241	16,002	13,772	3,770	12,341	10,870	2,958	8,011	7,108
115R	11,005	4,000	12,767	11,296	3,413	9,189	8,585	2,457	5,553	5,448
137	13,907	4,554	13,698	11,991	3,866	9,734	8,705	2,708	5,353	5,181
138	14,374	5,136	18,656	16,600	4,508	13,852	12,424	3,293	7,596	6,941
FS312	4,835	1,941	5,599	5,482	1,681	4,233	4,080	1,227	2,466	2,346
FS396	17,666	6,326	23,315	20,949	5,573	18,003	16,889	4,291	11,520	10,567

Для оценки полноты характеристики состава сообщества авторы строили кривые rarefaction, иллюстрирующие зависимость числа детектированных филотипов от числа анализируемых последовательностей (Рис. 9). Эти графики показывают, что достигнутый в этой работе объем секвенирования недостаточен для полной характеристики разнообразия сообществ даже на высоких таксономических уровнях, поскольку при увеличении числа анализируемых последовательностей кривые rarefaction не выходят на плато, т.е. увеличение числа определенных последовательностей приводит к обнаружению новых филотипов.

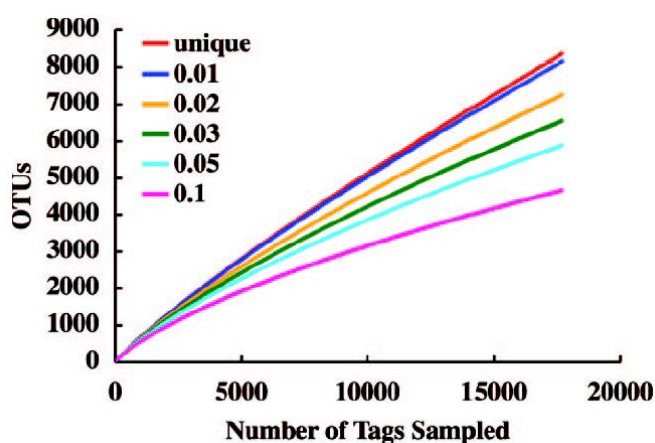


Рисунок 9. Зависимость числа филотипов разного уровня от числа анализируемых последовательностей V3 районов 16S рPHK для образца FS396 (Sogin et al., 2006). Кривые для остальных образцов имели аналогичную форму.

Таким образом, применение метода пиросеквенирования позволило провести глубокую количественную характеристику микробных сообществ океана и выявить неожиданно большое их разнообразие. Аналогичные исследования за последние годы были проведены на различных объектах, включая внутренние органы человека (Turnbaugh et al. 2006; Keijser et al., 2008 и др.), почвы (Roesch et al. 2007), метаногенный биореактор (Krause et al. 2008), арктические моря (Kirchman et al., 2010), термальные источники (Miller et al., 2009) и др.

Приведенные выше результаты работы (Sogin et al., 2006) позволили выдвинуть гипотезу о «редкой биосфере» («rare biosphere») океана, согласно которой сравнительно небольшой набор филотипов составляет большинство сообщества, а тысячи редко встречающихся видов составляют небольшую количественную долю сообщества, но на них приходится большая часть всего биоразнообразия, включающего тысячи видов микроорганизмов (Sogin et al., 2006). Однако, позднее эта концепция была поставлена под сомнение, поскольку отдельные чтения, содержащие ошибки пиросеквенирования, могут

приниматься за редкие флотипы. Например, в работе (Kunin et al., 2010) проведено пиросеквенирование 5' и 3' – участков (27-342 и 1114-1392 нт.) гена 16S рРНК лабораторного штамма *E. coli* MG1655, в котором для каждого района определено около 4250 последовательностей. Затем для этих последовательностей был проведен кластерный анализа. В отсутствии влияния ошибок пиросеквенирования число кластеров должно соответствовать числу реальных флотипов 16S РНК штамма MG1655, - пять для 5' участка и один для 3' участка (эти районы во всех пяти генах 16S РНК штамма MG1655 одинаковы). Однако, в отсутствии какой-либо фильтрации по качеству было обнаружено, соответственно 643 и 385 уникальных OTU, т.е. разнообразие было завышено на два порядка (Табл. 5). Причиной этого является большая доля чтений с ошибками (около 30% для 5' участка и 25% для 3' участка). Исключение чтений, содержащих неопределенные нуклеотиды (n), а также фильтрация чтений по качеству по мере увеличения строгости (частота ошибки на нуклеотид от 3% до 0.1%) позволяют убрать лишь часть этих артефактов, поскольку большая часть ошибок пиросеквенирования связана с прочтением гомополимерных участков (один из них, GGGGG встречается в 5'- районе), при этом чтение в целом может быть высокого качества.

Таблица 5. Влияние кластеризации и фильтрации чтений по качеству на определяемое число флотипов.

Read filtering	Number of OTUs at percentage identity thresholds						% errorless reads	% reads used
	100	99	98	97	95	90		
5' forward (V1 and V2)								
Theoretical number	5	4	3	1	1	1		
No quality filtering	643	95	31	16	5	3	68.7	77.9
Reads with N's removed	600	85	29	14	4	3	69.8	76.7
Quality score-based filtering (% per-base error probability)								
3	638	92	31	13	3	3	68.9	77.7
2	632	90	30	14	3	3	69.0	77.6
1	609	79	24	9	3	3	69.1	77.3
0.5	562	66	15	7	3	3	70.7	75.3
0.2	469	30	6	3	3	3	73.2	70.8
0.1	372	26	5	3	3	3	77.8	57.8
3' reverse (V8)								
Theoretical number	1	1	1	1	1	1		
No quality filtering	385	43	13	7	5	4	84.6	94.4
Reads with N's removed	361	40	12	6	4	3	85.3	93.6
Quality score-based filtering (% per-base error probability)								
3	378	40	12	7	5	4	84.8	94.2
2	368	32	10	6	5	4	85.1	93.8
1	342	25	9	6	5	4	85.3	93.3
0.5	310	20	8	6	5	4	87.5	89.5
0.2	236	7	2	2	2	2	89.6	82.1
0.1	196	4	2	2	2	2	90.7	70.6

Увеличение кластерного расстояния снижает наблюдаемое число OTU за счет включения чтений с ошибками в более крупные кластеры, но даже при кластерном расстоянии 0.1 (90% идентичности последовательностей) число OTU не соответствует теоретическому, хотя в эти «искусственные» OTU входит менее 0.1%

последовательностей. Практически сочетание кластеризации на уровне 97% и фильтрация по качеству с параметром 0.2% ошибки на нуклеотид (соответствует phred quality score 27) позволяет получить число филоотипов, соответствующее ожидаемому.

Поскольку большая часть ошибок пиросеквенирования связана с определением числа одинаковых нуклеотидов в гомополимерных участках, экспериментально определенные последовательности фрагментов 16S рРНК, отличающиеся только этим показателем, вероятно, относятся к одному филоотипу. Программа Pyronoise (Quince et al., 2009) и ее усовершенствованная версия, AmpliconNoise (Quince et al., 2011) позволяет идентифицировать такие последовательности и объединять их в один филоотип. Применение этого метода позволяет проводить более точную количественную оценку величины биоразнообразия (Quince et al., 2009).

Однако, помимо ошибок в прочтении гомополимерных участков, на долю которых приходится 60-80% всех ошибок, в чтениях могут обнаруживаться инсерции и точечные замены (Табл. 6, Behnke et al., 2011), которые не «учитываются» Pyronoise /AmpliconNoise. Для их устранения в работе (Behnke et al., 2011) предложено применение обычных фильтров качества исключать из анализа последовательности, присутствующие в исходном наборе данных в единственном числе (синглтоны) и, с высокой вероятностью, являющиеся следствием таких ошибок. Конечно, такое исключение может привести к потере реально существующих филоотипов, однако, проведенная в работе (Behnke et al., 2011) оценка показывает, что лишь 0.25% всех синглтонов представляли реально существующие филоотипы.

Таблица 6. Источник ошибок при пиросеквенировании генов малых субъединиц рРНК с использованием технологий FLX и Titanium (Behnke et al., 2011).

	V4-GS-FLX		V4-GS-FLX Titanium		V9-GS-FLX		V9-GS-FLX Titanium	
	No.	% of total errors	No.	% of total errors	No.	% of total errors	No.	% of total errors
2-Homopolymers	237	6.3	2 133	9.3	719	18.0	401	18.9
3-Homopolymers	143	3.8	3 151	13.7	1080	27.0	563	26.5
4-Homopolymers	620	16.6	5 471	23.8	988	24.7	730	34.4
5-Homopolymers	777	20.8	6 460	28.1	—	—	—	—
6-Homopolymers	609	16.3	1 312	5.7	—	—	—	—
Insertions	1160	31.0	6	0.0	1019	25.5	301	14.2
Transitions	57	1.5	665	2.9	135	3.4	79	3.7
Transversions	141	3.8	3 803	16.5	59	1.5	48	2.3
Sum	3744		23 001		4000		2122	

Таким образом, оптимальным способом учета ошибок пиросеквенирования может быть применение программы AmpliconNoise, удаляющей чтения низкого качества и учитывающей ошибки прочтения гомополимерных участков, с последующим исключением из анализа всех оставшихся синглтонов.

4. Микробные сообщества мест залегания газовых гидратов в морских осадках

Океаны покрывают около 70% поверхности Земли, и содержат 5-10 миллиардов тонн органических веществ, которые накапливаются в виде донных осадков. Это приводит к концентрации органического вещества в отложениях в 10 000 - 100 000 раз выше, чем в морской воде. Частично органические осадки разлагаются микроорганизмами, оставшаяся часть накапливается, в результате чего образуется самый большой резервуар органического углерода в природе. Средняя толщина осадков составляет 500 м. Средняя глубина океана составляет 3800 метров, при этом среднее гидростатическое давление - 380 атм., которое в толще осадков увеличивается за счет литостатического давления самих осадков. Кроме того морское дно содержит разнообразные местообитания, включая богатые органикой шельфы, грязевые вулканы и карбонатные холмы, также бедные органикой осадки, например в Тихом океане.

Долгое время считалось, что существующие условия на морском дне (высокое давление, низкая освещенность, низкая температура - около 2°C) не пригодны для роста микроорганизмов (Jannasch & Wirsen, 1973). В работе Parkes с соавторами в 1994 впервые была предложена модель логарифмического распределения прокариотических клеток в донных осадках. Данная модель предполагала логарифмическое уменьшение суммарного количества прокариотических клеток в толще осадка (Parkes et al., 1994). В последующих работах по изучению микроорганизмов морских донных осадков данная модель была подтверждена (Whitman et al., 1998; Parkes et al., 2000 и др.). За все время изучения осадков морского дна было отобрано и изучено несколько тысяч проб. Во всех образцах были обнаружены интактные прокариотические клетки, даже включая брекчию грязевого вулкана и гидротермальные образцы, что еще раз свидетельствует о повсеместном присутствии прокариот в осадках морского дна. Таким образом, в последнее время было обнаружено, что дно океана является динамической гео- и биосферной системой, которая обеспечивает широкий диапазон условий для жизни микроорганизмов и представляет собой большой резервуар уникальных микробных сообществ (см. Jørgensen & Boetius, 2007).

Впервые активность микроорганизмов на дне океана (глубина 167 метров) была выявлена в 1980-х годах в ходе экспедиций по глубоководному бурению в результате исследований химии поровых вод и анализа радиоактивных меток были обнаружены процессы сульфат редукции и метаногенеза (Oremland et al., 1982; Whelan et al., 1986). В течение последующих десяти лет были опубликованы первые комплексные профили глубинной микробной активности, данные по суммарному и жизнеспособному количеству клеток прокариот, а также оценки их биоразнообразия (Cragg et al., 1990;

Parkes et al., 1990). Эти результаты демонстрировали связь между активностью микробного сообщества, доступностью органического углерода и конечных акцепторов электронов (Cragg et al., 1992). Полученные геологические, геохимические и микробиологические данные в конце XX-века показали, что глубинная биомасса составляет существенную долю от суммарной биомассы Земли, - от 1/10 до 1/3 (Parkes et al., 1994; Whitman et al., 1998). Это привело к росту числа научных публикаций в области исследования донных микробных сообществ. Наши знания о разнообразии прокариотических сообществ, населяющих глубинную биосферу морского дна, очень сильно пополнились после исследований осадков во время экспедиций ODP, IODP и других. Например Inagaki с соавторами (2006) представили интегрированный анализ прокариотического разнообразия сообщества в осадках Тихого океана из 6 мест ODP; Fry с соавторами (2008), рассмотрел результаты из 13 независимых (главным образом из ODP сайтов) молекулярных исследований прокариотических сообществ осадков морского дна; Durbin и Teske (2012) противопоставили архейное распределение морских отложений с бедной органикой в глубоких морских бассейнах, и олиготрофных локаций открытого океана с наиболее часто изучаемыми, континентальными отложениями побережий, богатыми органикой и нашли, что отложения с бедной органикой населяются различными линиями архей.

Анализ 205 прокариотических библиотек гена 16S рРНК из различных осадков и разных глубин (Рис. 10, Parkes et al., 2014) показал, что доминирующие филумы бактерий - *Chloroflexi*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes* и кандидатный филум JS1 (Webster et al., 2004), с 25.5%, 10.3%, 5.6% и 22.2% последовательностей 16S рРНК (суммарно = 63.6%; представленных в 66% библиотек из осадков глубже, чем 2 mbsf), соответственно. *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- и *Epsilonproteobacteria* менее распространены, составляя в среднем 4.1%, 2.4%, 4.6% и 1% клонов 16S рРНК, соответственно. Из оставшихся 24.5% клонов новая группа NT-B6, первоначально найденная в бассейне Nankai Forearc (Reed et al., 2002), является наиболее распространенной (среднее число клонов 5.7% в 21% библиотек) и также присутствует в осадках Cascadia Margin (Inagaki et al., 2006; Nunoura et al., 2008), Мексиканского залива (Nunoura et al., 2009) и Перуанского побережья (Webster et al., 2006). Другие филумы, на которые приходилось в среднем >1% клонов, - *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* и новые филумы/группы OP8, OP11 и NT-B2.

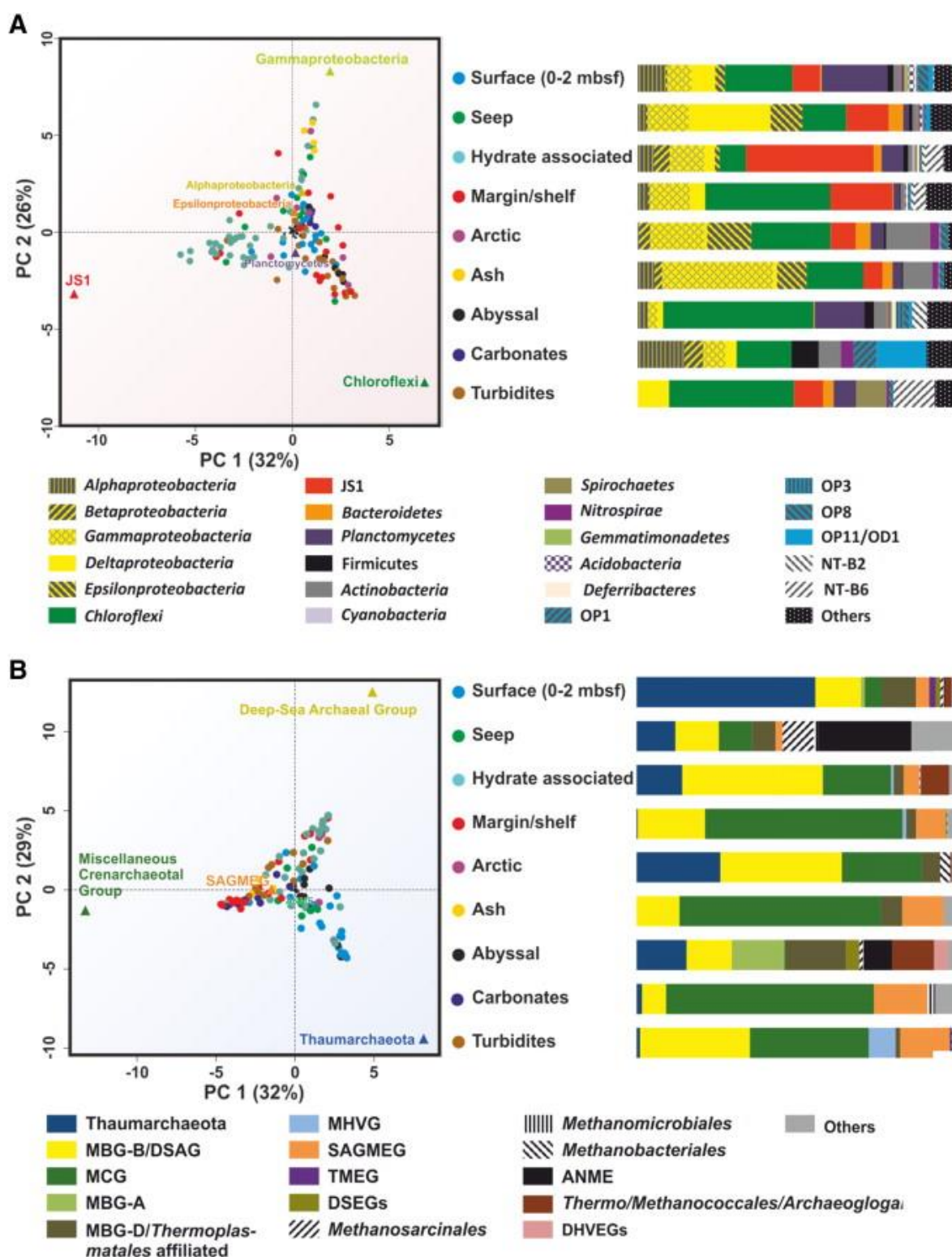


Рисунок 10. Основные филогенетические группы прокариот, идентифицируемые в донных осадках: А - Бактерии, В – Археи (Parkes et al., 2014).

Большинство последовательностей в подповерхностных отложениях (ниже 2 mbsf) архей принадлежат к некультивируемым линиям филума *Crenarchaeota* (4 группы), представляющие 66.1% всех клонов гена 16S рРНК, только 23.1% последовательностей

относится к *Euryarchaeota* (10 групп) и 8.9% - *Thaumarchaeota* (Marine Group I). Наиболее широко распространенные группы *Crenarchaeota* - Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG) и Marine Benthic Group B (MBG-B; также называемые Deep-Sea Archaeal Group, DSAG; Inagaki et al., 2003) составляющие 32% и 29.1% клонов, соответственно. Следующие по численности группы - South African Gold Mine Euryarchaeotal Group (SAGMEG; 7.3%), и Marine Benthic Group-D (MBG-D, 7.5%). Метаногены (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* и *Methanobacteriales*) и анаэробно окисляющие метан археи (ANME) менее представлены (2.6% клонов), тогда как термофильные археи (*Thermococcales*, *Methanococcales* и *Archaeoglobales*) составляют 5.3% клонов и были, главным образом, найдены в более глубоких отложениях (например, Cascadia Margin, Nankai Trough, Newfoundland Margin, - Inagaki et al., 2006; Nunoura et al., 2008; Roussel et al., 2008).

Проведенный анализ предполагает, что состав прокариот может быть связан с типом осадка или океанографической областью, по-видимому, отражая определенные геохимические и физические условия мест отбора проб, такие как содержание кислорода, сульфата, наличие гидратов метана, органический и неорганический углерод, минералогию воды и глубину осадка (Рис. 10). Поверхностные отложения (выше 2 mbsf) содержат разнообразные бактериальные и архейные сообщества (на уровне филума), с достоверной корреляцией у MG1/*Thaumarchaeota* ($P < 0.001$), *Epsilonproteobacteria* ($P < 0.05$) и *Planctomycetes* ($P < 0.001$), а также высокий процент *Chloroflexi*. Культивируемые представители *Thaumarchaeota* и *Planctomycetes* могут осуществлять окисление аммония аэробно или анаэробно, соответственно (Junier et al., 2010), что указывает на то, что нитрификация является важным метаболическим процессом в поверхностных осадках.

Поверхностные отложения холодных сипов с высокими показателями активности, и сильно восстановленными условиями состоят из различных микробных сообществ, связанных с циклами серы и метана, среди которых большинство бактерий составляют *Deltaproteobacteria* (класс содержит основные рода сульфат редукторов; Muyzer and Stams, 2008), и археи, принадлежащие к ANME и метаногенам (*Methanosarcinales*). Поверхность сипов коррелирует с представителями ANME ($P < 0.001$), а также *Epsilonproteobacteria* ($P < 0.005$), которые включает несколько известных литотрофных сероокисляющих видов (Hubert et al., 2012).

Напротив, библиотеки генов 16S рРНК из осадков богатых органикой шельфов и побережий (Рис. 10, главным образом побережье Перу Leg ODP 201) коррелируют с высоким процентом некультивируемых линий *Chloroflexi* (41.3%, $P < 0.01$) и MCG (62.7%, $P < 0.001$). Эти прокариоты с неизвестным метаболизмом, хотя возможно, что MCG

являются гетеротрофами (Biddle et al., 2006, Kubo et al., 2012). Кроме того, анализ геномов отдельных клеток (single cell genomics) показал, что у некоторых MCG архей есть способность деградировать детритные белки (Lloyd et al., 2013), тогда как другие исследования показали, что они могут включать ^{13}C -меченую глюкозу и ацетат (Takano et al., 2010; Webster et al., 2010). Они также очень разнообразны и широко распространены в подповерхностных отложениях, что указывает на важность этой группы в метаболизме органических веществ в осадках (Kubo et al., 2012; Lloyd et al., 2013). В части *Chloroflexi* сообщества осадков морского дна часто содержат несколько подгрупп: (1) линию *Chloroflexi*, ассоциированную с *Anaerolineae* (подфилум I), чьи культивируемые виды являются органогетеротрофами (Yamada et al., 2006), (2) *Dehalococcoidia* (подфилум II; Hugenholtz and Stackebrandt, 2004), который включает облигатных анаэробов, осуществляющих дыхание с помощью органических галогенидов, например, *Dehalococcoides mccartyi* (Löffler et al., 2013), а также (3) подфилум IV, который включает исключительно последовательности «некультивируемых» видов из различных местообитаний. Недавний анализ генома одной клетки некультивируемого представителя *Dehalococcoidia* из осадков залива Орхус (Дания) показал более широкие возможности метаболизма, чем у близких культивируемых представителей. В нем были выявлены многочисленные ферменты, участвующие в окислении жирных кислот и ароматических соединений, но что интересно, генетических детерминант процессов восстановления соединений хлора выявлено не было (Wasmund et al., 2014).

Донные осадки с газовыми гидратами достоверно коррелируют ($P < 0.001$) с фило типами Candidate division JS1 (43.6%) и MBG-B (DSAG; 44.3%) (Рис. 9), что подтверждается предыдущими сообщениями о доминировании этих специфических микробных сообществ в гидрат-содержащих осадках из побережья Тихого океана (Inagaki et al., 2006). Кроме того, повторное изучение осадков из Cascadia Margin Leg ODP, 146 сайта 889/890, в которых в отличие от других мест залегания гидратов первоначально было показано доминирование *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* (Marchesi et al., 2001), с использованием методов, разработанных впоследствии для осадков Leg ODP 201 (Webster et al., 2006), также показало, что в этих отложениях доминировали JS1 и новые линии архей. Эти результаты подчеркивают тот эффект, что используемые методики могут влиять на результаты исследований разнообразия микроорганизмов. Исследования осадков, содержащих гидраты из бассейна Ulleung (Японское море) также показали в числе доминирующих микроорганизмов представителей JS1 и MBG-B (Lee et al., 2013). Бактерии JS1 составляли также значительную часть бактериальных фило типов из приповерхностных осадков Мексиканского залива и побережья Чили (Mills et al., 2005;

Hamdan et al., 2012). Напротив, некоторые исследования показали, что отложения газовых гидратов в Индийском океане имеют очень низкую концентрацию клеток микроорганизмов, причем доминантами там являются *Firmicutes*, а археи обнаружены не были (Parkes et al., 2009; Briggs et al., 2012).

Хотя исследований микробных сообществ донных отложений из олиготрофных местообитаний, открытого океана и абиссальных бассейнов относительно немного, первоначальные результаты показали, что там доминируют *Chloroflexi* и *Planctomycetes* с сайто- и глубино-специфичными популяциями архей. Например, в отложениях из южной части Тихого океана и экваториальной зоны доминировали кренархеи MBG-A, тогда как в некоторых осадках из бассейна Fairway (сайт MD06-3028) - *Thaumarchaeota* линии MG1 (Roussel et al., 2009), в других (сайт MD06-3022) - новые *Euryarchaeota*, а в MD06-3027 (4.5 mbsf), как и в Peru Basin (9 mbsf) - MBG-B (Sørensen et al., 2004; Roussel et al., 2009).

Proteobacteria распространены в отложениях Северного Ледовитого океана наряду с группами архей MCG, MG1 и MBG-B (Forschner et al., 2009; Jorgensen et al., 2012). В сообществах архей других глубинных сайтов с низким содержанием органического вещества доминировали археи MCG и также бактерии *Chloroflexi*, например, в слоях вулканического пепла Охотского моря (Inagaki et al., 2003), карбонатных холмах из Porcupine Seabight (Webster et al., 2009; Hoshino et al., 2011), и турбидитных слоях Мексиканского залива (экспедиция IODP 308) (Nunoura et al., 2009).

В настоящее время ряд образцов глубинных морских осадков был исследован с использованием пиросеквенирования, которое показало, что в целом преобладают те же самые группы бактерий и архей, как в более ранних работах, использовавших секвенирование библиотек клонов (Hoshino et al., 2011; Jorgensen et al., 2012). Например, из осадков и глубоко захороненных коралловых карбонатов (экспедиция IODP 307) было получено приблизительно 16000-28000 бактериальных и архейных фрагментов последовательностей 16S рРНК на образец, при анализе которых было показано, что доминирующими прокариотическими филотипами являются MCG, SAGMEG и MBG-B для архей, а также *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, Candidate division OP1 и OP11/OD1 для бактерий (Hoshino et al., 2011). Схожее сообщество по доминантным группам было найдено Webster с соавторами (2009), с использованием PCR-DGGE анализа (MCG, SAGMEG, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* и Candidate division JS1). Аналогичные результаты были также получены при изучении V6 региона гена 16S рРНК бактерий и архей с помощью пиросеквенирования из ODP Leg 201 Peru Margin сайта 1228. Таким образом, полученные данные в результате секвенирования нового поколения совпадают с основными группами, идентифицированными в результате анализа библиотек клонов

выполненных с помощью секвенирования по Сэнжеру. Но секвенирование нового поколения позволяет на порядок лучше выявить микробное разнообразие и обнаружить минорные группы микроорганизмов, что в свою очередь дает микробиологам представление о «редкой биосфере» (Sogin et al., 2006). В глубинной биосфере эти редкие группы включают бактерии и археи, вовлеченные в сульфатредукцию и метаногенез. Они часто отсутствуют в первых работах по исследованиям гена 16S рРНК глубоких морских отложений (Fry et al., 2008). Информация по пиросеквенированию из Peru Margin сайта 1228 показала, что такие последовательности представлены в небольших количествах и близки к сульфатредуцирующим *Deltaproteobacteria*, метаногенным *Euryarchaeota* (порядки *Methanomicrobiales* и *Methanobacteriales*), и анаэробным метанотрофным археям (ANME).

Первый метагеномный анализ глубоких отложений биосферы показал, что бактерии доминируют в поверхностных отложениях (1 mbsf), а археи могут быть важным компонентом в более глубоких слоях осадка (50 mbsf, Biddle et al., 2008). Однако исследование метатранскриптома осадков в Peru Margin (5 - 159 mbsf, сайт 1229, Orsi et al., 2013) выявило, что археи заметно менее представлены, несмотря на их предыдущее обнаружение в этом месте (Biddle et al., 2006), тогда как доминирующими транскриптами были бактериальные (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*). Кроме того, это изучение метатранскриптома предполагает, что грибы являются активным компонентом отложений биосферы морского дна, поскольку на их долю приходится от 3 до 20% транскриптов.

Другие исследования биоразнообразия глубинной биосферы показали присутствие бактериальных спор (Lomstein et al., 2012) и бактериофагов (Engelhardt et al., 2011). Присутствие спор в отложениях морского дна согласуется с обнаружением *Firmicutes* в работах, использующих как методы культивирования, так и молекулярные подходы. Количество вирусных частиц в отложениях морского дна Porcupine Seabight (экспедиция IODP 307), также как и прокариотических клеток экспоненциально уменьшалось с увеличением глубины осадка (Middelboe et al., 2011). Было сделано предположение о том, что большинство вирусов существует в микро-местообитаниях, где они защищены от разрушения, потому что когда их смешали с осадком, то произошло быстрое уменьшение числа вирусных частиц. Возможно, эти защищенные вирусы могут сохраняться в течение сотен тысяч лет (Middelboe et al., 2011). Воздействие вирусов на биосферу морского дна все же остается невыясненным.

5. Разнообразие микроорганизмов озера Байкал

Байкал – самое глубокое и самое крупное пресное озеро мира. В озеро впадает более 300 рек и вытекает одна река - Ангара. Сезонные изменения температуры воды затрагивают водную толщу лишь до глубин 200-300 м. Байкальская вода отличается низким содержанием минеральных (96,4 мг/л) и органических веществ. По химическому составу воды Байкала относятся к слабоминерализованным мягким водам гидрокарбонатно-кальциевого состава. Ионный состав воды стабилен в пространстве и времени, распределение ионов по глубине однородно (Вотинцев, 1961; Falkner et al., 1991). Водная толща полностью перемешивается до придонных слоев, вследствие чего даже в придонных слоях воды концентрация кислорода не опускается ниже 6 мг/мл (Гранина и др., 2001). Толща осадков озера Байкал достигает 10 км в южном и центральном бассейнах и около 4 км в северном бассейне (Hutchinson et al., 1992). По данным японских ученых (Фудзии и др., 1994), современные скорости осадконакопления в Байкале, измеренные свинцово-цезиевым методом, равняются 0,16 мм в год в Северном Байкале, 0,6 мм в год в Среднем Байкале, 1,2-0,9 мм в год в районе дельты реки Селенги.

Донные осадки озера Байкал представляют собой специфическую среду обитания микроорганизмов. В донных отложениях преобладают восстановительные процессы, а вода озера содержит окислитель - кислорода. В зависимости от конкретных физико-химических условий в осадках развивается определенный тип микробного сообщества (Горленко и др., 1977). Основными определяющими факторами являются доступность источников энергии и наличие доноров и акцепторов электронов, в т.ч. кислорода. Температура, которая практически всегда равна 3-4°C, не является лимитирующим фактором развития донных микробиоценозов Байкала (Максимова и др., 1991).

В отсутствии окислителя большая часть органического вещества используется в процессе метаногенеза. Альтернативными процессами являются аэробное окисление органики и сульфатредукция. Содержание сульфата в Байкальской воде во много раз ниже, чем в морской, поэтому микробные сообщества в анаэробных донных осадках большинства районов Байкала являются метаногенными. Активная деятельность микроорганизмов цикла метана наблюдается в районах метановых сипов в районе дельты реки Селенги, в газогидрат-содержащих осадках и термальном поле в бухте Фролиха. При изменении условий среды наблюдается смена одного микробного сообщества другим. Так, в донных отложениях района расположения Байкальского целлюлозно-бумажного комбината активизируется деятельность сульфатредукторов и наблюдается смена метаногенного сообщества на сульфатредуцирующее (Намсараев, Земская, 2000).

В воде и донных осадках Байкала обнаружены различные группы фототрофных,

хемолитотрофных и гетеротрофных бактерий. В донных осадках с помощью стандартных микробиологических методов (микроскопии, иммунофлуоресценции и селективных сред) были выявлены *Methylosinus trichosporium*, *Methylomonas ihanica*, *Methylobacter bovis*, *Clostridium cellulobioparum*, *Azotobacter* sp., *Aquaspirillum* sp., *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Metallogenium*, *Flavobacterium* sp., *Micrococcus*, *Nocardia*, неспоронозные бациллярные микроорганизмы, актиномицеты, *Vibrio*, *Planococcus* и др. (Дагурова и др., 1998; Репин и др., 2001; Парфенова и др., 2006).

Изучение биоразнообразия микробного сообщества донных осадков озера Байкал молекулярными методами показало гораздо большее разнообразие микроорганизмов. Были найдены бактерии следующих групп: аэробная зона – *Holophaga/Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, альфа-протеобактерии, *Firmicutes* (*Clostridia*), *Cyanobacteria* (*Synechococcus*), *Actinobacteria* (*Streptomyces*), а также археи. В пробах воды оз. Байкал были выявлены *Caulobacter crescentus*, *Caulobacter subvibrioides*, *Flavobacterium ferrugineum*, *Escherichia coli*, *Bacillus mycoides* (Белькова и др., 1996). В анаэробной зоне были обнаружены представители *Desulfuromonales* (дельта-протеобактерии), *Sphingomonadales* (альфа-протеобактерии), *Burkholderiales* (бета-протеобактерии), *Pseudomonas* (гамма-протеобактерии) (Черницына, 2007). Большая часть бактерий не была идентифицирована на уровне вида, так как отличия от наиболее близких последовательностей из базы данных GenBank составили 3-15%, что может свидетельствовать о принадлежности бактерий к новым таксонам. На филогенетическом дереве такие последовательности образуют отдельные кластеры, что предположительно указывает на эндемичную природу соответствующих бактерий (Денисова и др., 1999).

Таким образом, исследованные осадки озера Байкал различаются разнообразием населяющих их микроорганизмов. Аэробная, микроаэрофильная и анаэробная зоны характеризуются своей «уникальной» структурой. Наиболее разнообразно сообщество аэробной зоны, наименее – анаэробных глубинных осадков, сформированных в плейстоцене (Черницына, 2007).

Микроорганизмы, ассоциированные с газовыми гидратами на озере Байкал.

Исследования последних десятилетий показали, что на дне озера Байкал имеются районы залегания газовых гидратов (Hutchinson, 1995). Байкал - единственный в мире пресный водоем, в котором были обнаружены гидраты. Они занимают достаточно обширные районы Южного и Среднего Байкала и, кроме того, имеются косвенные доказательства их разгрузки в водную толщу через каналы, регистрируемые в осадках с

помощью BSR (кажущаяся отражающая граница на сейсмических записях, каротажные характеристики) (Klerks et al., 2003; Egorov et al., 2003). В результате проведенных исследований в местах залегания газовых гидратов метана (Shubenkova et al., 2005), было показано, что состав микробного сообщества на различных горизонтах отличается. В поверхностном слое (0-5 см) обнаружены представители метанотрофных бактерий, из которых большой процент составили некультивируемые бактерии. С глубиной осадка (92-96 см) происходила смена микробного сообщества, уменьшался процент гомологии с известными последовательностями 16S рПНК. Авторы предполагают, что данные микроорганизмы могут быть эндемиками озера Байкал. На глубине 100-128 см были обнаружены последовательности 16S рПНК, родственные археям, но доминирующими оставались представители некультивируемых бактерий. Также проведенный анализ кристаллов газовых гидратов методом окраски по DAPI показал присутствие в них клеток микроорганизмов.

Микроорганизмы, ассоциированные с естественными выходами нефти на дне озера Байкал.

О наличии на озере Байкал естественных выходов нефти и газа на ограниченных участках акватории известно с конца XVIII века. Чистота вод озера Байкал позволяет предположить наличие интенсивных механизмов их очищения, в том числе и биологических. Выходы нефти крайне редко встречаются в озерах, одними из немногих примеров являются расположенное в африканском рифте глубоководное озеро Танганьика, на поверхность которого всплывают битумные шарики и жидкая нефть (Simoneit, 2000), и озеро Чапала в Мексике, в котором битумные массы образуют небольшие плавучие островки (Zárate-del Valle and Simoneit 2005).

В 2005 г. было обнаружено новое нефтепроявление в Среднем Байкале (м. Горевой Утес, Рис. 11), где из донных осадков в водную толщу поступает до 4 т. нефти в год. Исследования в 2005-2008 гг. показали, что размер пятна, где фиксируются углеводороды, не увеличивается (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007). Установлено, что нефть из района устья р. Большая Зеленовская представлена смесью углеводородов, подвергшихся глубокой деструкции. Нефть, отобранная в районе у м. Горевой Утес, представляет смесь n-алканов, идентифицированных как гомологи с длиной цепи от C11 до C33, что характерно для «сырой» и не биодеградированной нефти (Хлыстов и др., 2007).

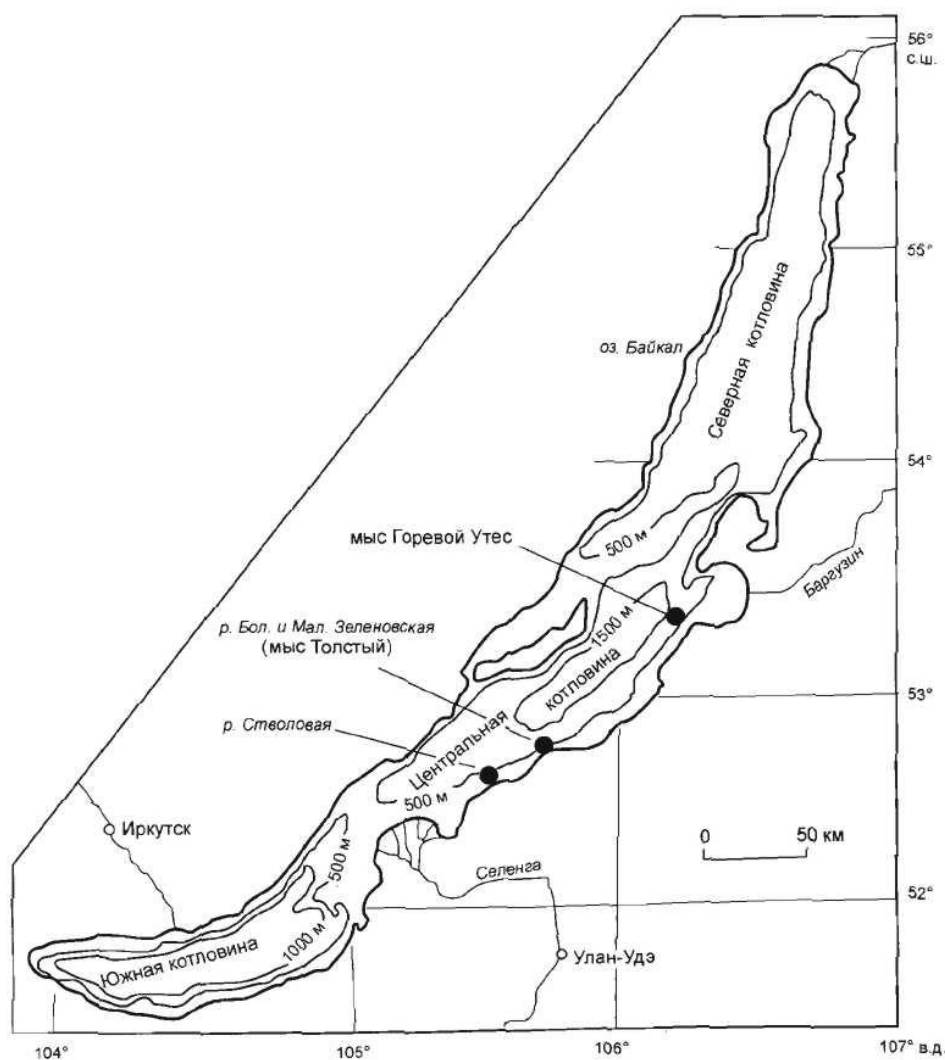


Рисунок 11. Расположение исследованных нефтепроявления в озере Байкал.

Исследования по распределению численности углеводородокисляющих микроорганизмов водной толщи и донных осадков проводятся в районе устья р. Большая Зеленовская с 2004 г. и в районе м. Горевой Утес с 2005 г. В этих районах отмечена высокая численность аэробных УВОМ (Павлова и др. 2008). Наибольшее количество УВОМ во все годы исследований отмечено в поверхностных пробах воды и поверхностных слоях донных осадков в зоне нефтяных пятен. Их количество в водной толще района устья р. Большая Зеленовская составило 2600 кл/мл в 2004 г., с заметным снижением на порядок в 2005 – 2006 гг. и незначительным повышением в 2007 г. Наибольшая численность УВОМ в донных осадках этого района равнялась 47×10^3 кл/г в 2004 г., 63×10^2 кл/г в 2005 г. Количество УВОМ в водной толще в районе м. Горевой Утес достигло 506 кл/мл в 2005 г., 1263 – 4228 кл/мл в 2006 г. и 2007 г., соответственно, численность УВОМ в поверхностных слоях воды варьировалась от 533 до 1671 кл/мл в 2008 г. Аналогичное распределение УВОМ отмечено для

донных осадков этого района. Наибольшая численность УВОМ в поверхностных слоях осадка составила 443×10^2 кл/г в 2005 г., в 2007 г. – 600×10^2 кл/г. В 2008 г. исследована численность и распределение микроорганизмов, анаэробно окисляющих нефть в донных осадках района м. Горовой Утес. Установлено, что их численность на два порядка ниже численности аэробных УВОМ в донных осадках и составляет 168 кл/г. В этих же районах было исследовано разнообразие культивируемых аэробных микроорганизмов и суммарного микробного сообщества.

Филогенетическая структура суммарного микробного сообщества по данным анализа гена 16S рРНК включала представителей α -, β -, γ -, δ -протеобактерий, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (*Porphyromonadaceae*), *Verrucomicrobia*, *Chloroflexus*, *Gemmatimonadete*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Nitrospirales*, *Firmicutes* (*Bacillales*). Культивируемая его часть, способная использовать нефть и ее производные в качестве единственного источника углерода была представлена меньшим разнообразием, чем суммарное микробное сообщество и включала представителей α -, β -, γ -протеобактерий, *Actinobacteria* и *Firmicutes* (Ломакина и др., 2009). У культивируемых аэробных микроорганизмов, выделенных из двух районов нефтепроявлений на оз. Байкал было установлено наличие функциональных генов (*alk*), ответственных за синтез ферментов алкангидроксилаз, обеспечивающих окисление *n*-алканов сырой нефти в аэробных условиях. Для обнаружения *alk*-генов использовано 3 группы праймеров. У 76% культур УВОМ, выделенных из двух районов нефтепроявлений, обнаружены *alk* гены III группы, ответственные за утилизацию широкого спектра *n*-алканов. Это представители родов *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Novosphingobium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*. *Alk*-гены I группы, которые согласно Sei с соавторами (2003) имеются у микроорганизмов, деградирующих короткоцепочечные алканы (C6–C12) были детектированы у 12% культур УВОМ. В эту группу входят представители родов *Bosea*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*. *Alk*-гены II группы, разрушающие алканы с длиной цепи C12–C20 были обнаружены у 14% бактерии. Гены II группы были выявлены у представителей рода *Acinetobacter*. Двенадцать исследуемых штаммов одновременно имели положительную ПЦР-реакцию с праймерами на две группы *alk* генов. 12% исследованных штаммов показали отрицательную ПЦР-реакцию с праймерами на все три группы *alkB* генов. Это представители родов *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*. Были проведены лабораторные эксперименты с природным микробным сообществом, в которых

установлено, что нефть через 35-60 суток деградируется на 70-90%. На фоновой станции конверсия п-алканов не превышала 35%, и зависела от количества добавленной нефти. В эксперименте с чистыми культурами родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bosea* отмечена разная динамика потребления п-алканов. Установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. (№5) уже на 5 сутки деградировал п-алканы на 26%. За 36 суток эксперимента в присутствии данного штамма было разрушено 35% п-алканов нефти. В присутствии других штаммов содержание п-алканов в среде уменьшилось от 10 до 20%.

Таким образом, как показали ранее проведенные исследования районов естественных нефтепроявлений, в водной толще и донных осадках обитает динамическое микробное сообщество, которое обеспечивает самоочищение вод оз. Байкал от нефтяного загрязнения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Генно-инженерные операции

Среды, ферменты и реактивы

Бактерии *Escherichia coli* выращивали при 37°C в LB бульоне или на чашках с LB агаром. Антибиотики добавлялись в соответствующих концентрациях: ампициллин, 100 мкг/мл; канамицин, 50 мкг/мл. GoTaq ДНК полимераза (Promega), T4 DNA лигаза, фрагмент Кленова ДНК полимеразы, T4 полинуклеотид киназа (New England Biolabs) и рестрикционные ферменты (Promega, New England Biolabs, Fermentas, Sibenzyme) использовались согласно рекомендациям производителей. Все ПЦР-фрагменты были получены с помощью GoTaq ДНК полимеразы (Promega). Отбор рекомбинантов по цветному тесту на чашках с X-gal и ИПТГ осуществляли по методу (Sambrook et al., 1989).

Синтетические олигонуклеотиды

Для амплификации фрагментов генов 16S рРНК:

U341F	5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3'
U515R	5'- TTACCGCGGCKGCTGVCAC-3'
PRK341F	5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3'
PRK806R	5'- GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'

Для амплификации фрагментов генов McrA:

MCRf	5'-TAYGAYCARATHTGGYT-3'
MCRr	5'-ACRTTCATNGCRTARTT-3'

Для амплификации фрагментов генов AlkB:

Alk3f	5'-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-3'
Alk3r	5'-CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-3'

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Escherichia coli DH10B: (*araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697 Δ (*lac*)X74 *galU galK rpsL deoR* ϕ 80 *lacZ* Δ M15 *endA1 nupG recA1 mcrA* Δ (*mrr hsdRMS mcr BC*)). Бактерии выращивали в LB бульоне или чашках с LB агаром при 37°C. В случае необходимости в среды добавляли ампициллин (100 мкг/мл).

Для клонирования ПЦР фрагментов использовали плазмидный вектор pGEMT (Promega), являющийся производным pUC19.

Конструирование рекомбинантных плазмид

Все генно-инженерные операции с ДНК - субклонирование в плазмидные вектора, ПЦР-амплификацию, секвенирование, лигирование и т.п. проводили согласно общепринятым методикам (Sambrook et al., 1989).

Трансформация E. coli

Для трансформации использовали стандартную методику (Sambrook et al., 1989) со следующей модификацией: вместо буфера TFB использовали буфер следующего состава: CaCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, MnCl₂ 10 mM, HEPES 10 mM, pH 6.3.

Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК проводили в 1xTAE - буфере с использованием агарозы производства фирм Amresco и Sigma. В качестве маркеров для определения молекулярных масс фрагментов ДНК использовали *Hind*III рестрикционные фрагменты ДНК фага лямбда или GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовали стандартные методики, основанные на щелочном лизисе. Дополнительную очистку плазмидной ДНК в случае необходимости проводили при помощи наборов Qiagen или Promega следуя указаниям производителя.

2. Анализ состава микробных сообществ

Препараты метагеномной ДНК микроорганизмов из мест залегания гидратов метана озера Байкал

Препараты метагеномной ДНК из трех образцов биомассы (придонной воды, верхнего слоя осадков (0-2 см) и глубинных осадков (85-95 см) отобранных в районе залегания гидратов метана «Санкт-Петербург» с помощью подводного аппарата «Мир» летом 2009г. были выделены сотрудниками Лимнологического института СО РАН по методике Шубенковой и др (2005) и предоставлены нам для проведения молекулярного анализа состава микробных сообществ. Данные по физико-химическому составу газовых гидратов и битумных построек были предоставлены Т. И. Земской (ЛИН СО РАН).

Препараты метагеномной ДНК микроорганизмов из мест нефтепроявлений озера Байкал

В 2008-2009 гг. в ходе совместных экспедиций ЛИН СО РАН и Института океанологии им. П.П. Ширшова с помощью ГОА «Мир» в районе нефтепроявления у

мыса Горевой Утёс были отобраны образцы двух битумных построек (3 и 8). Глубина озера в этом районе 870 - 900 м, температура воды практически постоянна и составляет 3-4°C. Куски битума отделяли от построек манипуляторами и поднимали на борт исследовательского судна, где проводили их анализ. Препараты метагеномной ДНК были выделены сотрудниками лимнологического института в соответствии с методикой, описанной ранее Шубенковой и др (2005) и были представлены нам для молекулярного анализа состава микробного сообщества.

Амплификация переменных фрагментов генов 16S рРНК

Для амплификации переменных фрагментов гена 16S рРНК использовали ПЦР. Реакционная смесь для ПЦР включала ДНК-матрицу (0.01-0.1 мкг), буфер для GoTaq-полимеразы (Promega), $MgCl_2$, GoTaq-полимеразу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, и пару «универсальных» праймеров (концентрации реактивов в соответствии с рекомендациями производителя GoTaq-полимеразы). Полученные ПЦР фрагменты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для контроля возможного внешнего загрязнения перед проведением пиросеквенирования часть препарата клонировали в рGEMT, затем проводили секвенирование 5-10 клонов методом капиллярного электрофореза.

Создание библиотек метагеномной ДНК и ПЦР фрагментов переменных регионов гена 16S рРНК для секвенирования на геномном анализаторе GS FLX.

Методика конструирования библиотек ДНК в основном описана в методических рекомендациях «GS FLX Titanium General DNA Library Preparation Method Manual» (апрель 2009г.) и «Rapid Library Preparation Method Manual» (январь 2010г.) и разработанных фирмой Roche – производителем секвенатора GS FLX (схема приведена на рис. 12). В качестве исходного материала для приготовления библиотек использовали ПЦР фрагменты гена 16S рРНК.

Полученные ПЦР фрагменты переменных фрагментов генов 16S рРНК имели среднюю длину около 200 или 500 нт (в разных экспериментах). Фрагменты такой длины могут быть легко прочитаны на геномном анализаторе GS FLX, поэтому в соответствии с рекомендациями производителя, процедура фрагментации ДНК не проводилась.

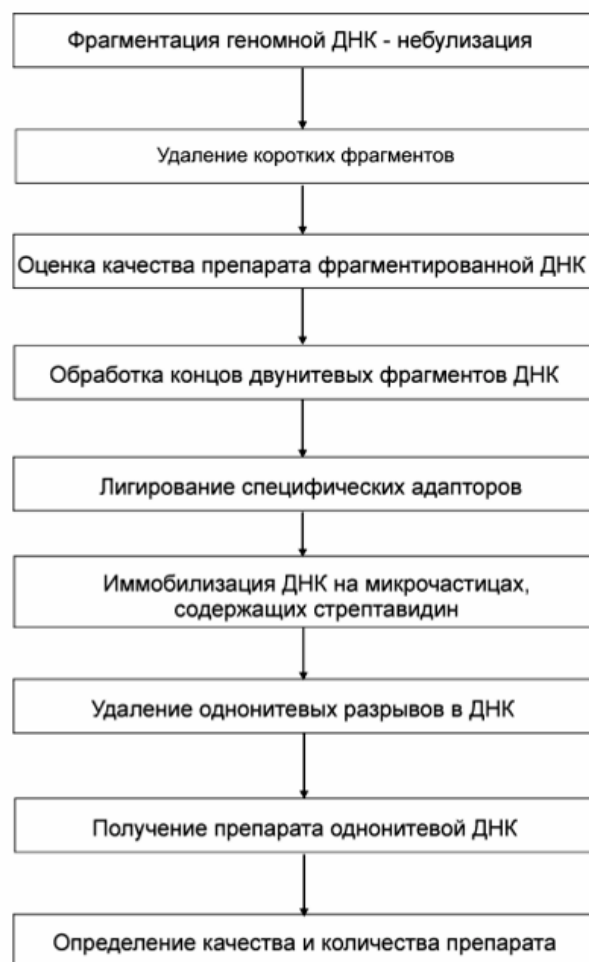


Рисунок 12. Методика приготовления библиотеки случайных фрагментов ДНК для секвенирования на GS FLX.

Пиросеквенирование на геномном анализаторе GS FLX

Для проведения клональной амплификации молекул ДНК из сконструированных библиотек, молекулы связывают с микрочастицами, таким образом, чтобы в среднем одна молекула ДНК была связана с одной частицей. Затем создают водно-масляные эмульсии, содержащие необходимые для проведения амплификации компоненты (полимеразу, буфер и др.). После ПЦР-амплификации образовавшиеся в микрокаплях (50-100 мкм диаметром) молекулы ДНК (около 10-30 млн копий на частицу) остаются связанными с микрочастицами. После удаления масла путем обработки эмульсий изопропанолом ДНК-содержащие микрочастицы были выделены и использованы для последующего пиросеквенирования на GS FLX. Эмульсионный ПЦР и очистку микрочастиц проводили в соответствии с методикой, описанной в GS FLX emPCR Method Manual (версия от января 2010г.) фирмы Roche.

Секвенирование препаратов ДНК осуществляли по протоколу GS FLX Sequencing Method Manual (ноябрь 2010г.) с использованием наборов реактивов с использованием наборов реактивов GS FLX Titanium sequencing kit. Статистика секвенирования приведена в Таблице 7.

Таблица 7. Результаты экспериментов по пиросеквенированию фрагментов генов 16S рРНК на GS FLX.

Образец	Использованные праймеры для амплификации	Число чтений фрагментов 16S рРНК
Придонная вода	U341F/U515R	29238
Поверхностный осадок (0-1 см.)	U341F/U515R	17387
Осадок с газовым гидратом (85-95 см.)	U341F/U515R	24977
Битумная постройка №3	PRK341F/PRK806R	11952
Битумная постройка №8	PRK341F/PRK806R	4031

Анализ последовательностей фрагментов генов 16S рРНК

Данные анализировали с помощью пакета программ RDP Classifier (Cole et al., 2009). На первом этапе полученные последовательности разделяли на бактериальные и архейные с помощью классификатора RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0, доступного на сайте (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). В дальнейшем последовательности бактерий и архей анализировали отдельно.

Анализ последовательностей переменных регионов 16S рРНК архей и бактерий проводили с помощью Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>), входящей в состав пакета программ RDP Classifier (Cole et al., 2009). На первом этапе анализируемые последовательности выравнивали с помощью INFERNAL aligner. Затем проводили кластерный анализ выровненных последовательностей с использованием программы Complete Linkage Clustering, входящей в состав пакета RDP Classifier. Кластеризацию проводили на разных уровнях, характеризующихся различными расстояниями между кластерами (от 0 до 0.3, с шагом 0.01) и, следовательно, соответствующих разным таксономическим уровням.

Для каждого кластера с помощью программы Dereplicate Request (RDP Classifier) была выбрана репрезентативная нуклеотидная последовательность, соответствующая “центру” кластера, т.е. имеющая минимальную сумму квадратов расстояний до других входящих в кластер последовательностей. Таксономическую классификацию репрезентативных последовательностей, представляющих кластер, проводили в результате их сравнения с базой данных нуклеотидных последовательностей GenBank по

протоколу BLASTN.

В случае обнаружения в базе данных последовательности 16S рРНК культивируемого микроорганизма, с которой анализируемая репрезентативная последовательность кластера имела не менее 95% идентичности, данный кластер относили к соответствующему роду.

При отсутствии такого культивируемого микроорганизма (или если репрезентативная последовательность имеет гомологию >95% с представителями двух и более разных «культивируемых» родов), таксономическую классификацию проводили в результате построения филогенетических деревьев, включающих репрезентативную последовательность и набор последовательностей 16S рРНК представителей различных линий бактерий или архей. Последовательности выравнивали с помощью программы ClustalX (Thompson et al., 1997), филогенетические деревья строили с использованием программы TREECON (Van de Peer and De Wachter, 1994) методом присоединения соседей (neighbour-joining, оценка расстояния методом Jukes and Kantor). Достоверность филогенетических деревьев оценивали методом бутстрапа по 100 репликам.

Для определения таксономической сложности сообществ наборы последовательностей 16S рРНК бактерий (или архей) анализировали с целью учета вероятных ошибок пиросеквенирования. Во-первых, с помощью программы AmpliconNoise (версия 1.22) (Quince et al., 2011) удаляли последовательности низкого качества; последовательности, различающиеся числом нуклеотидов, прочтенных в гомополимерных участках, группировали в один объединяющий их кластер, в дальнейшем рассматривавшийся как одна последовательность, повторенная соответствующее число раз. При этом из анализа были исключены короткие последовательности (длиной менее 160 нт. для бактерий и 135 нт. для архей), поскольку они с более высокой вероятностью содержат участки с низким качеством прочтения. Затем в соответствии с предложенным в работе (Behnke et al., 2011) методом из последующего анализа были исключены оставшиеся после применения AmpliconNoise последовательности, встречающиеся только один раз (синглтоны). Прошедшие фильтрацию последовательности использовали для определения биоразнообразия микроорганизмов изучаемых сообществ. Оценку таксономической сложности сообществ проводили с помощью построения кривых Rarefaction (одна из функций Pyrosequencing pipeline), иллюстрирующих зависимость числа детектированных филотипов (т.е. числа кластеров) от числа проанализированных последовательностей для различных уровней сходства нуклеотидных последовательностей (кластерных расстояний).

*Создание и анализ библиотек фрагментов генов *mcrA* и *alkB**

Для создания библиотеки фрагментов генов *mcrA* соответствующие фрагменты ДНК были амплифицированы с использованием праймеров MCRf и MCRr. Для создания библиотеки фрагментов генов *alkB* использовали праймеры Alk3fi Alk3r. Полученные ПЦР фрагменты клонировали в векторе pGEM-T (Promega, США), а затем определяли нуклеотидные последовательности независимых клонов на секвенаторе ABI3730 (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Микробное сообщество микроорганизмов ассоциированных с газовыми гидратами на дне озера Байкал

Для анализа биоразнообразия микроорганизмов ассоциируемых с местами залегания гидратов метана в ходе экспедиции летом 2009г сотрудниками Лимнологического института СО РАН с глубины около 1400 метров из района под названием «Санкт-Петербург» в центральном Байкале (St20 GC9; 52°52.8'N и 107°09.4'E) были отобраны образцы придонной воды, верхнего слоя осадков (0-2 см) и глубинных осадков (85-95 см). Отбор проб осадка проводили с помощью трубки (gravity corer). Длина отобранного керна составляла 95 см, видимый слой гидрата находился на глубине 85-89 см от поверхности (Рис. 13). Отбор пробы придонной воды проводили с глубоководного аппарата «Мир» с помощью шприца.



Рисунок 13. Гидраты метана в анализируемом керне.

В анализируемом керне St 23 GC 10 осадок представлен восстановленным с поверхности серым однородным алевропелитом с обводнением в трещинах; после вскрытия пузырился при дегазации. Поровые воды осадка по химическому составу гидрокарбонатно-кальциевые, содержание сульфата не превышало 15 мг/л и снижалось при увеличении глубины (Рис. 14). Содержание метана было минимально у поверхности и быстро увеличивается на глубине. Выделявшийся из гидратов газ представлял собой метан с небольшой примесью этана.

Сотрудниками Лимнологического института СО РАН были выделены препараты метагеномной ДНК из отобранных образцов воды и осадков и предоставлены нам для проведения молекулярного анализа состава микробных сообществ.

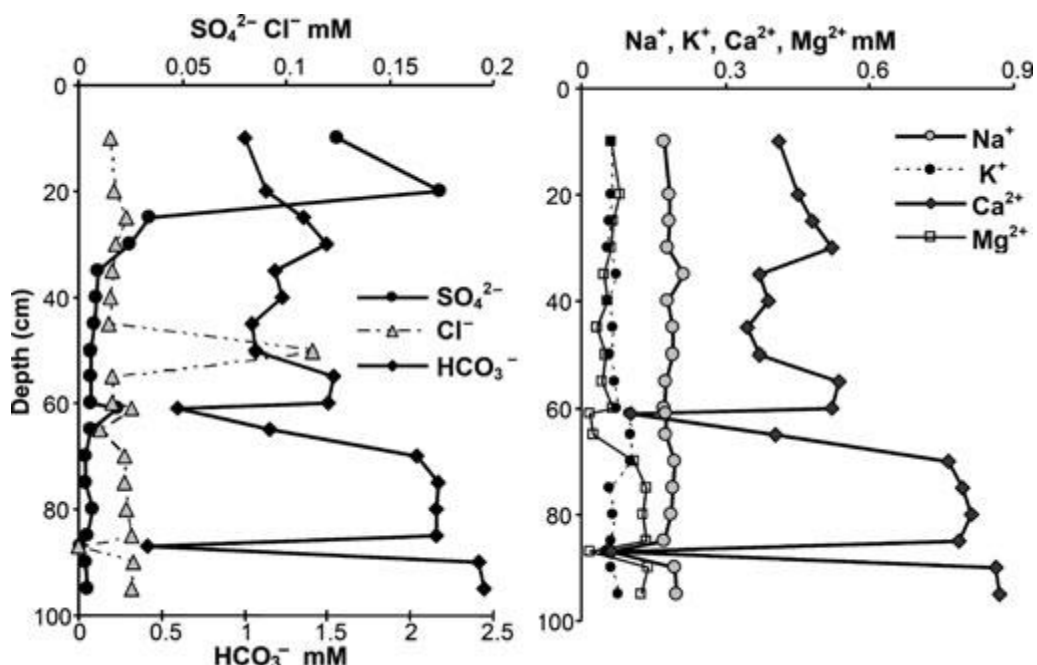


Рисунок 14. Химический состав поровых вод (данные Т.И. Земской, ЛИН СО РАН).

Относительное содержание и разнообразие бактерий и архей

Для проведения количественного анализа состава микробных сообществ мы использовали метод, основанный на пиросеквенировании V3 районов генов 16S рРНК (Sogin et al. 2006). Для амплификации последовательностей V3 регионов были использованы «универсальные» праймеры U341F и U515R. Пиросеквенирование полученного ПЦР фрагмента осуществляли по протоколу «shotgun library» (Roche) с использованием набора GS LR70 Sequencing Kit. В результате пиросеквенирования было определено 94978 независимых последовательностей фрагмента гена 16S рРНК. Большая часть чтений соответствовала полной длине ПЦР фрагмента.

Анализ проводили с использованием пакета программ RDP Classifier (Материалы и методы). На первом этапе полученные последовательности разделяли на бактериальные и архейные с помощью классификатора RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0, доступного на сайте (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). В дальнейшем «бактериальные» и «архейные» последовательности анализировали отдельно.

В результате пиросеквенирования V3 района гена 16S рРНК было определено 29668 последовательностей для образца из придонной воды (B1), из которых к бактериальным 16S рРНК было отнесено 28902 последовательности, к архейным – 336, а 430 последовательности не имели гомологии с 16S рРНК и были исключены из анализа. Таким образом, бактерии составляют большинство микроорганизмов в придонной воде. Доля архей составляет всего 1.1%, причем их наличие может быть обусловлено захватом

верхнего слоя осадка при отборе пробы придонной воды. Поэтому анализ состава сообщества придонной воды проводили только для бактерий. Для оценки сложности исследуемых сообществ и полноты объема полученных данных мы провели кластерный анализ и определили зависимость числа детектируемых OTU (Operational Taxonomic Units) при кластерных расстояниях 0.03 и 0.05 от количества анализируемых чтений (Rarefaction анализ). Построенные кривые rarefaction выходят на плато, подтверждая, что полученной в данной работе выборки достаточно для полного описания микробного сообщества (Рис. 15). Разнообразие бактериального сообщества придонной воды (Рис. 15, таблица 8) может быть оценено примерно в 450 видов (кластерное расстояние 0,03).

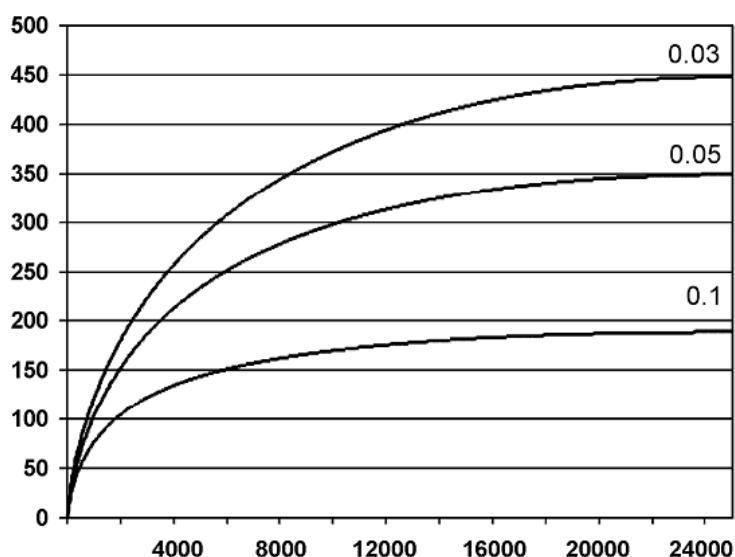


Рисунок 15. Rarefaction анализ микробного сообщества придонной воды. Показана зависимость числа детектируемых филотипов от числа анализируемых последовательностей 16S рРНК

Таблица 8. Разнообразие микробных сообществ на различных таксономических уровнях..

Образец		Количество чтений	Количество OTU для различных кластерных расстояний (0, 0.03 и 0.05)		
			0	0.03	0.05
Придонная вода (B1)	Бактерии	28902	849	448	349
	Археи	336	29	20	19
Верхний слой осадка (B2)	Бактерии	5576	332	193	144
	Археи	11811	340	171	134
Нижний слой осадка (B3)	Бактерии	18177	952	490	359
	Археи	6800	460	183	132

Таксономический состав микробного сообщества верхнего слоя осадка отличался от такового в придонной воде. Для образца из верхнего слоя осадка (B2) было определено 26938 последовательностей, из которых к бактериальным 16S рРНК было отнесено 5576 последовательности, к архейным – 11811, а остальные 9551 последовательности не имели гомологии с 16S рРНК и были исключены из анализа. Таким образом, археи доминируют в образце B2, составляя около 2/3 всех обнаруженных микроорганизмов. Разнообразие бактериального сообщества в верхнем слое осадков было меньше чем в придонной воде и сопоставимо с архейным компонентом (Табл. 8).

Набор данных для глубинного слоя осадков (B3) содержал 38372 чтений, из которых 18177 соответствовали бактериальным генам 16S рРНК и 6800 - архейным. Таким образом, в отличие от верхнего слоя осадка в глубинном слое доля бактерий составила более чем 70% микроорганизмов. Бактериальное сообщество в глубинном слое было более сложным по составу, тогда как разнообразие архей было приблизительно такое же, как в поверхностном осадке (Табл. 8).

Структура бактериального сообщества придонной воды

Анализ состава бактериального сообщества придонной воды проводили с помощью программы RDP Classifier путем сравнения последовательностей с базой данных генов 16S рРНК. Большая часть последовательностей имела высокую гомологию (больше 95% идентичности) с последовательностями 16S рРНК бактерий известных филогенетических групп и классифицировалась с высокой достоверностью (Рис. 16). Лишь около 5% бактериальных последовательностей не удалось отнести к определенным бактериальным филумам.

Большую часть сообщества составили бактерии класса *Gammaproteobacteria* (50.5% всех бактериальных последовательностей) и большинство из них принадлежали к семейству *Methylococcaceae* (43% всех бактерий, в основном род *Methylobacter*), известные представители которого являются метанотрофами 1 типа (McDonald et al., 2008), осуществляющими аэробное окисление метана (обзор Hanson & Hanson, 1996). Приблизительно 5,6% всех последовательностей были близки к семейству *Chromatiaceae* того же класса. Вторая по численности группа микроорганизмов – *Betaproteobacteria* (27%), главным образом, представленные типичными «водными» микроорганизмами из семейств *Comamonadaceae* (19,6%) и *Rhodocyclaceae*, а также метилотрофами семейства *Methylophilaceae*. Около 5,7% бактериальных последовательностей относились к классу

Deltaproteobacteria, хотя большинство из них были филогенетически удалены от известных видов. Около 7% бактерий относятся к филуму *Bacteroidetes*, они представлены родами *Flavobacterium*, *Paludibacter*, и различными *Sphingobacteriaceae*, которых неоднократно обнаруживали в Байкальской воде. Бактерии филума *Firmicutes*, в основном *Clostridia*, составляли около 2,1% микроорганизмов. Также были обнаружены представители *Epsilonproteobacteria*, филумов *Actinobacteria*, SR1, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Spirochaetes*, на долю которых приходилось менее 1% всех бактерий.

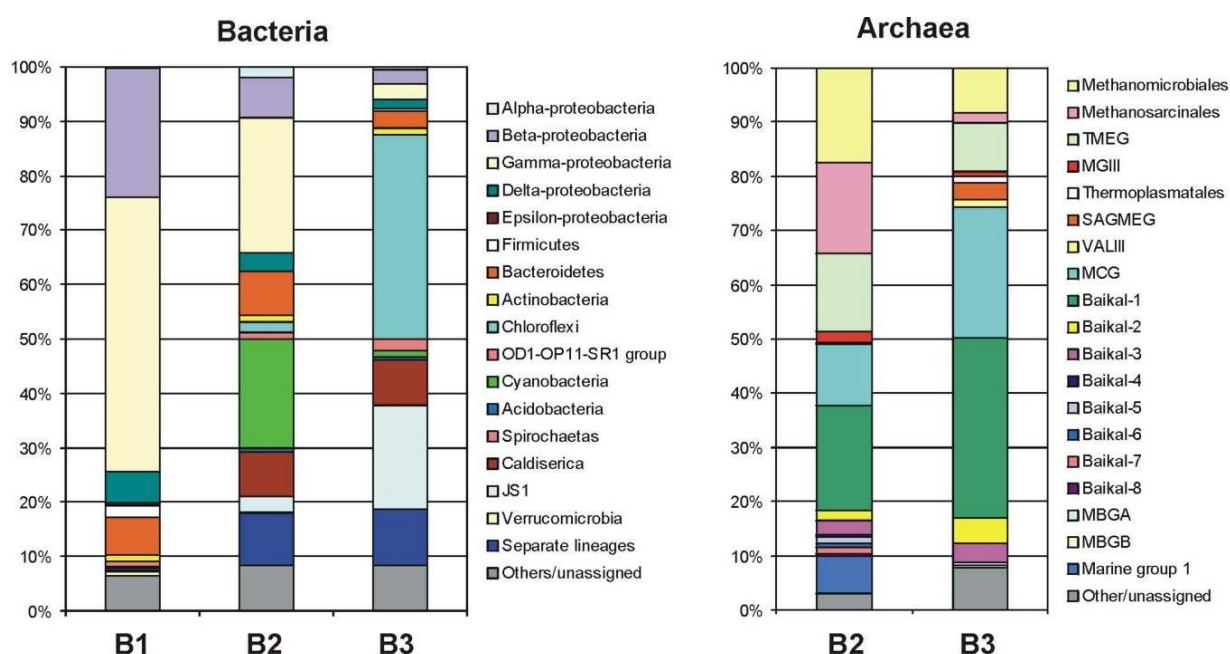


Рисунок 16. Филогенетическая структура сообществ, основанная на последовательностях V3 переменных участков 16S рНК.

Структура бактериального и архейного сообществ поверхностного слоя осадков

В отличие от бактерий из придонной воды, большая часть бактерий из донных осадков (как поверхностного, так и глубинного), оказалась филогенетически удаленной от известных видов. Более половины последовательностей не удалось классифицировать путем сравнения последовательностей с базой данных генов 16S рНК с помощью RDP Classifier. Поэтому для анализа состава бактериальных сообществ осадков был использован другой подход, - кластерный анализ. Последовательности 16S рНК выравнивали с помощью программы INFERNAL aligner (Nawrocki, Eddy, 2007). Затем проводили кластерный анализ для выровненных последовательностей с использованием программы Complete Linkage Clustering, входящей в состав пакета программ RDP Classifier. Кластеризацию проводили с расстоянием между кластерами 0.2, что позволяет исключить искусственное увеличение сложности сообщества, обусловленное

последовательностями с единичными заменами, которые могут являться следствием точечных ошибок амплификации и/или секвенирования.

На следующем этапе анализа для каждого кластера с помощью программы Dereplicate Request (RDP Classifier), была выбрана репрезентативная нуклеотидная последовательность, соответствующая «центру» кластера, т.е. такая последовательность имела минимальную сумму квадратов расстояний до других входящих в кластер последовательностей. Для верхнего слоя осадка такая выборка была сделана для 34 кластеров бактерий и 32 кластеров архей. Для глубинного осадка для бактерий отобрали 68 последовательностей, а для архей – 30. В целом, проанализированные кластеры объединяли в каждом сообществе более 90% всех просеквенированных последовательностей 16S рРНК.

Для таксономической классификации репрезентативных последовательностей, представляющих кластер, строили филогенетическое дерево, включающее эти последовательности и последовательности 16S рРНК представителей основных групп архей или бактерий. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы ClustalX (Thompson et.al. 1997). Филогенетические деревья были построены с помощью метода «присоединения соседей» (neighbour joining) с использованием программы TreeCon (Van de Peer and De Wachter, 1994). Достоверность филогенетических деревьев оценивали методом бутстрепа.

Полученные результаты (Рис. 16, табл. 9) показывают, что бактериальный компонент микробного сообщества включает как линии, обнаруженные в придонной воде, так и группы, специфичные для осадков. Среди первых обнаружены *Gammaproteobacteria* (24.9%, в основном метаноторофы *Methylobacter* spp.), *Betaproteobacteria* (7.4%, в основном метанол-окисляющие бактерии *Methylophilaceae*), *Deltaproteobacteria* (3.4%), *Alphaproteobacteria* (2.0%) и *Bacteroidetes* (8.1%). Неожиданным результатом оказалось то, что второй по численности (20.1%) группой бактерий в верхнем слое осадка оказались цианобактерии, которые были близки к *Synechococcus* spp. - фотосинтезирующим микроорганизмам, обычно размножающимся в поверхностных слоях воды. Напротив, доля цианобактерий в придонной воде составляла менее 0,5% бактериального сообщества. Представители трех других бактериальных филумов были найдены только в осадках, а не в придонной воде – *Caldiserica* (8.3%) (ранее известен как OP5), представители которого первоначально были обнаружены в геотермальных местообитаниях, а позднее в различных озерах и почвах (Mori et al., 2008), кандидатного филума JS1 (2.7%) и *Chloroflexi* (2.0%). В небольших количествах были обнаружены представители филумов *Actinobacteria* (2%), SR1 (1%), *Acidobacteria* (0,6%) и

Verrucomicrobia (0,4%). Около 10% бактерий были филогенетически удалены от известных микроорганизмов (гомология последовательностей 16S рРНК менее 90%), что не позволило провести их классификацию даже на уровне филума. Вероятно, эти бактерии представляют собой глубокие филогенетические ветви, специфичные для Байкала. Подчеркнем, что мы не обнаружили известные сульфатредуцирующие бактерии ни в придонной воде, ни в осадках.

В отличие от бактериального сообщества придонной воды и осадков лишь небольшая часть архейных последовательностей имела более чем 95% гомологию с генами 16S рРНК культивируемых архей и, таким образом, могла быть отнесена к известным родам. Остальные археи принадлежали к новым таксономическим ветвям. Вследствие этого для таксономической классификации строили филогенетические деревья, включающие репрезентативные последовательности кластеров и выборку последовательностей 16S рРНК представителей основных групп архей (Рис. 16, Табл. 9).

Доминирующей группой архей в верхнем слое осадка были метаногены, которые были представлены эуриархеями порядка *Methanomicrobiales* (17,4%), являющихся гидрогенотрофными метаногенами, и порядка *Methanosarcinales* (16,8%), включающего также ацетокластических метаногенов (обзор в Liu & Whitman, 2008).

Таблица 9. Таксономический состав микробных сообществ.

Таксономическая группа	Количество последовательностей 16S рРНК					
	образец В1		образец В2		образец В3	
Bacteria	шт	%	шт	%	шт	%
<i>Alpha-proteobacteria</i>	74	0,26%	105	1,88%	105	0,58%
<i>Beta-proteobacteria</i>	6845	23,68%	412	7,39%	466	2,56%
<i>Gamma-proteobacteria</i>	14608	50,54%	1391	24,95%	525	2,89%
<i>Delta-proteobacteria</i>	1652	5,72%	188	3,37%	281	1,55%
<i>Epsilon-proteobacteria</i>	122	0,42%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Firmicutes</i>	619	2,14%	0	0,00%	82	0,45%
<i>Bacteroidetes</i>	2037	7,05%	453	8,12%	589	3,24%
<i>Actinobacteria</i>	301	1,04%	63	1,13%	197	1,08%
<i>Chloroflexi</i>	43	0,15%	111	1,99%	6828	37,56%
OD1-OP11-SR1 group	225	0,78%	66	1,18%	398	2,19%
<i>Cyanobacteria</i>	105	0,36%	1119	20,07%	247	1,36%
<i>Acidobacteria</i>	101	0,35%	36	0,65%	88	0,48%
<i>Spirochaetas</i>	116	0,40%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Caldiserica</i>	12	0,04%	462	8,29%	1498	8,24%
JS1	0	0,00%	150	2,69%	3489	19,19%
<i>Verrucomicrobia</i>	203	0,70%	24	0,43%	0	0,00%
Separate lineages	0	0,00%	534	9,58%	1864	10,25%
Others/unassigned	1839	6,36%	462	8,29%	1520	8,36%

Сумма	28902	100 %	5576	100 %	18177	100 %
Archaea						
<i>Methanomicrobiales</i>	106	31,55%	2061	17,45%	569	8,37%
<i>Methanosarcinales</i>	119	35,42%	1984	16,80%	127	1,87%
TMEG	6	1,79%	1684	14,26%	596	8,76%
MGIII	0	0,00%	266	2,25%	77	1,13%
<i>Thermoplasmatales</i>	0	0,00%	0	0,00%	70	1,03%
SAGMEG	0	0,00%	0	0,00%	214	3,15%
VALIII	0	0,00%	23	0,19%	92	1,35%
MCG	0	0,00%	1349	11,42%	1643	24,16%
Baikal-1	23	6,85%	2266	19,19%	2257	33,19%
Baikal-2	6	1,79%	235	1,99%	328	4,82%
Baikal-3	5	1,49%	291	2,46%	241	3,54%
Baikal-4	0	0,00%	53	0,45%	0	0,00%
Baikal-5	0	0,00%	147	1,24%	0	0,00%
Baikal-6	0	0,00%	100	0,85%	0	0,00%
Baikal-7	2	0,60%	134	1,13%	0	0,00%
Baikal-8	0	0,00%	42	0,36%	0	0,00%
MBGA	0	0,00%	0	0,00%	30	0,44%
MBGB	0	0,00%	0	0,00%	26	0,38%
Marine group I	0	0,00%	817	6,92%	0	0,00%
<i>Halobacteriales</i>	25	7,44%	0	0,00%	0	0,00%
Other/unassigned	44	13,10%	359	3,04%	530	7,79%
Сумма	336	100%	11811	100 %	6800	100 %

Организмы, относящиеся к другим известным группам метаногенных архей, порядкам *Methanococcales*, *Methanobacteriales* и *Methanopyrales*, обнаружены не были. Представители группы 1 метаногенов (*Methanomicrobiales*) были близки к роду *Methanosphaerula* (95% идентичности на уровне последовательности 16S рРНК), тогда как группа 2 метаногенов (*Methanosarcinales*) была представлена линией, которая имеет удаленное родство с *Methanosaeta* (Рис. 17). Археи, близкородственные второй группе (97-98% идентичности 16S рРНК, таблица 10), были найдены в различных осадках рек и пресноводных озер, а также в осадках моря Лаптевых в Арктике (Koch et al., 2009). Подчеркнем, что байкальские археи на филогенетическом дереве кластеризовались именно с метаногенами, а не с филогенетически близкими группами архей, осуществляющих обратную реакцию, - анаэробное окисление метана (ANME-1, 2, 3) (Рис. 17).

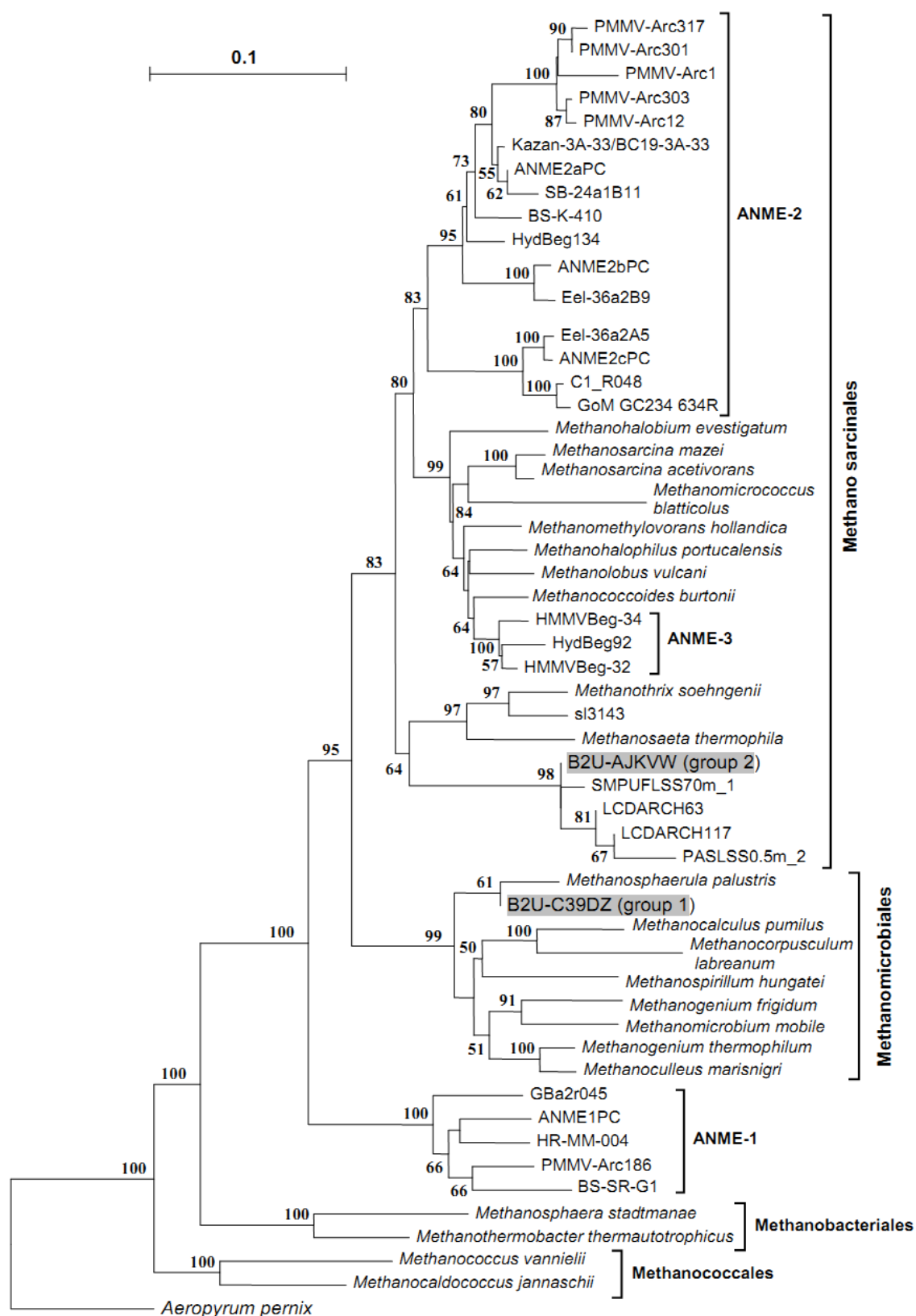


Рисунок 17. Филогенетическое дерево архей, построенное по последовательностям генов 16S рРНК, на котором представлены основные группы метаногенных и метан-окисляющих архей. Обнаруженные в нашей работе группы 1 и 2 метаногенов представлены последовательностями B2U-AJKVW и B2U-C39DZ, соответственно.

Таблица 10. Последовательности генов 16S рРНК из различных местообитаний, гомологичные последовательностям архей и бактерий, идентифицированных в этой работе.

Археи

Clone ID	Closest 16S rRNA sequence	GenBank ID	16S rRNA identity (%)	Site location and characteristics
<i>Methanomicrobiales</i>				
B2U-C39DZ	Uncultured archaeon clone MN2	HM625813	99%	nitrogen fertilized soil
	Uncultured Methanomicrobiales archaeon partial 16S rRNA gene, clone VidyB-16-A	FN679182	99%	lake sediments (Switzerland:Lake Geneva)
	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon clone OTRo_B1_20	GU257129	99%	freshwater sediment (Germany)
	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone LMussara_rib_14	FN432697	99%	lake sediments (Brazil:floodplain of Trombetas River, Lake Mussura)
	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon clone A_A6_OTU4	GQ221435	99%	formation water of the low temperature subsurface horizon in liquid radioactive wastes (LWR) storage zone (Russia: Sibera, Tomsk)
	Uncultured archaeon clone EOTU2	FJ896244	99%	sludge from anaerobic reactor inoculated with freezing pond sediment treating synthetic brewery wastewater
	Uncultured archaeon clone SOTU1	FJ887755	99%	freezing pond sediment which has been used as seed sludge of an anaerobic reactor treating synthetic brewery wastewater at 15 degrees
	Uncultured archaeon clone 7C-10	FJ479774	99%	Zoige wetland (Tibet)
<i>Methanosarcinales</i>				
B2U-AJKVW	Uncultured archaeon clone sl3143	EU244185	98%	river Leine sediment
	Uncultured archaeon clone LCDARCH117	EU247342	98%	Lake Coeur d'Alene sediment

	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule archaeon ARB5	AF293016	98%	freshwater sediment
	Uncultured methanogenic archaeon clone PASLSS0.5m_2	FJ982718	97%	submarine permafrost, Siberian Laptev Sea Area
	Uncultured archaeon clone SSA0101-9	HM159365	97%	Jing-Mei River (Taiwan)
TMEG				
B2U-BZZMP	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:ASN24	AB161351	100%	petroleum contaminated soil
	Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Hados.Water.Arch.9	AB355104	98%	surface water, Manzallah Lake (Egypt:Manzallah, Lake Manzallah)
	Uncultured archaeon clone TDA45	FJ793144	96%	Tao Dam hot spring (Thailand)
	Uncultured archaeon clone ACWCSP1A4	FJ705114	96%	WCS sediment (India)
	Uncultured euryarchaeote clone ZZ-arc-9-11-2	FJ156086	96%	anaerobic benzene-mineralizing consortium enriched from a contaminated aquifer (Germany: Zeitz)
MCG1				
B2U-BASBU	Uncultured crenarchaeote clone Pav-sed-520	GU135500	97%	sediment (37 cm) (France: Lake Pavin)
	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone LBatata_rib_21	FN432657	97%	lake sediments (Brazil:floodplain of Trombetas River, Lake Batata)
	Uncultured archaeon clone MD3044F-73	GQ926382	97%	deep-sea sediment (China)
	Uncultured methanogenic archaeon clone DTPLSS59.5m_23	FJ982751	97%	submarine permafrost, Siberian Laptev Sea Area
	Uncultured archaeon clone LCKS880A42	EF201714	97%	hypersaline lake (China: Lake Chaka)
	Uncultured crenarchaeote clone DSEP_29	HM991612	96%	display spring sediment (USA: Hot Springs National Park (HSNP))

SAGMEG				
B3U-EDKUN	Uncultured euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone DEBITS_11.2_1F7	AM883012	97%	terrestrial unconsolidated sediments at 31.98m depth (New Zealand:Waikato coalfields, North Island)
	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone S15A-MN136A	AJ583385	97%	ground water from a monitoring deep-well at a radioactive waste disposal site (Russia:Siberia, Tomsk-7)
	Uncultured euryarchaeote gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: A21-21_GoMY	AB476720	97%	sulfur containing freshwater source (Switzerland:inside the emergency tunnel of the Gotthard road tunnel)
	Uncultured archaeon clone ECS1-19	FJ200092	96%	mud wedge from East China Sea shelf (China)
	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone 42-AC9	AJ867781	96%	subsurface sediment (Ocean Drilling Program Leg 201, site 1229, 42.03 mbsf)
	Uncultured archaeon clone Ele_A_62	EF444670	96%	Eleftheres hot springs (Greece)
	Uncultured marine crenarchaeote clone MV1_4_5_H04	GU120491	95%	inside erupting mud volcano, temperature = 27.7 C (Trinidad and Tobago: Devil's Woodyard)
Baikal-1				
B2U-CG5LL	Uncultured crenarchaeote clone Pav-sed-502	GU135482	100%	sediment (1 cm) (France: Lake Pavin)
	Uncultured crenarchaeote clone OTRo_D1_40	GU257244	100%	freshwater sediment (Germany)
	Uncultured crenarchaeote clone Arch_AE_F09	FJ968102	99%	sulfur-rich water rising from Silurian-Devonian sedimentary rock (USA: Great Sulphur Spring, Monroe, Michigan)
	Uncultured archaeon clone mrR1.17	DQ310426	99%	Mackenzie River
	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone D64AR30R63	AM778352	95%	anoxic rice field soil (China)
B2U-ERFYI	Uncultured archaeon clone JMYA21_A3621	FJ810529	99%	coal tar waste-contaminated groundwater (Glens Falls, New York)
	Uncultured archaeon clone TC-TJ11	EF639617	96%	Lake Pontchartrain basin (USA: Southeastern Louisiana)
Baikal-2				
B2U-AXHCB	Uncultured archaeon clone LT-SA-A115	FJ755721	95%	sediment (China: Lake Taihu)

	Uncultured archaeon clone LP30MA61	FJ901970	94%	biomat 30m deep in cenote La Palita (Mexico: Tamaulipas)
	Uncultured archaeon clone TC-BJ12	EF639623	94%	Lake Pontchartrain basin (USA: Southeastern Louisiana)
Baikal-3				
B2U-AYZ87	Uncultured archaeon clone Z195MC88	FJ485328	95%	wall biomat sample in El Zacaton at 195m depth phreatic sinkhole (Mexico)
	Uncultured crenarchaeote clone kLNP_Ar_2	AY731480	95%	groundwater
Baikal-4				
B2U-AONFS	Uncultured crenarchaeote partial 16S rRNA gene, clone DEBITS_11.2_1A37	AM883010	97%	terrestrial unconsolidated sediments at 31.98m depth (New Zealand:Waikato coalfields, North Island)
	Uncultured crenarchaeote clone DSEP_18	HM991601	95%	display spring sediment (USA: Hot Springs National Park (HSNP))
	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone LP2	FR668274	95%	hot spring microbial mat (China:Yunnan province)
	Uncultured Thermoprotei archaeon clone NRA16	HM041917	95%	produced fluid from Niiboli oilfield (Japan)
Baikal-7				
B2U-CG6Z8	Uncultured euryarchaeote clone CH1_S2_10	AY822001	96%	total DNA isolated from fresh water sediment, Dec. 2003, Chevreuse, France
Baikal-8				
B2U-AW8VZ	Uncultured archaeon 16S rRNA gene, clone N4-E5	FN691629	98%	1 m depth of Lake Llebre (Spain:Aiguestortes National Park)
Marine group I				
B2U-CLNH4	Uncultured archaeon clone 0.24M_772A	DQ340996	99%	deep anoxic hypersaline basin
	Archaeon enrichment culture clone CN150	HQ338109	98%	North Pacific Ocean water from depth of 150 m, ammonia oxidizing enrichment
	Uncultured archaeon clone 4A-125	FJ981586	98%	Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume B

	Uncultured archaeon clone FeLiveControl_A_68	GQ356877	98%	methane seep sediment
	Uncultured marine group I crenarchaeote clone SI021806_215DA	FJ615096	98%	Saanich Inlet, depth of 215m in anoxic marine fjord
	Uncultured crenarchaeote clone M400-43	EU791561	98%	MC118 400 m water column in the Gulf of Mexico

Бактерии

Clone ID	Closest 16S rRNA sequence	GenBank ID	16S rRNA identity (%)	Site location and characteristics
<i>Chloroflexi</i>				
B3U-DKDIU	Uncultured bacterium clone: AHH11B_159	AB588670	96%	holocene sediment, freshwater (Japan)
B3U-B9LS0	Uncultured Chloroflexi bacterium clone PL-D1_5_1_C02	GU120614	99%	natural Asphalt Lake, active mining area after excavator removed about upper 4 ft.
B3U-ALW6A	Uncultured bacterium clone MD2896-B179	EU385768	98%	subseafloor sediment of the South China Sea
	Uncultured bacterium clone ORI-860-18-P_S401-403_187B03	GU553697	98%	subseafloor sediment at the Yung-An Ridge (Taiwan)
	Uncultured bacterium clone DSH9B23	GU475351	98%	cold seep sediment (Pacific Ocean: South China Sea)
	Uncultured bacterium clone Ksed38	EU035903	98%	sediment from deep-sea coral reef off Norway
B3U-EYCLQ	Uncultured bacterium clone: OHKB2.37	AB094812	97%	subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk
	Uncultured bacterium clone: p760_b_1.38	AB305398	97%	marine hydrothermal sediments (Japan: Southern Okinawa Trough, Yonaguni Knoll IV)
B3U-D3684	Uncultured bacterium clone boHTK-8	FJ873282	97%	sediments from the Okhotsk Sea
B3U-DZNWH	Uncultured bacterium clone PC500-11B196	HQ434904	97%	South China Sea, sediments

	Uncultured bacterium clone ORI-860-26-P_S008-010_261B04	GU553736	97%	subseafloor sediment at the Yung-An Ridge (Taiwan)
	Uncultured bacterium clone 3051bac8-36	GU982893	97%	marine sediment from the Western Pacific Ocean (China)
B3U-EBZaq	Uncultured bacterium clone: AHH20B_139	AB588718	98%	holocene sediment, freshwater (Japan)
	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone VidyB-10	FN679291	97%	lake sediments (Switzerland:Lake Geneva)
B3U-A0AG4	Uncultured bacterium clone HWB2224-3-44	HM243989	96%	middle sediment from Honghu Lake
	Uncultured bacterium clone 3051bac1-75	GU982768	96%	marine sediment from the Western Pacific Ocean (China)
JS1				
B3U-BXYD4	uncultured bacterium clone SH050-1C4	AY781375	97%	sediment of a maar lake (China: Changchun)
	Uncultured bacterium clone ORS25C_g05	EF393005	97%	Ohio River sediments: Polychlorinated Biphenyl-spiked sediment incubated anaerobically at 25 degrees C
Caldiserica				
B3U-CPSXW	Uncultured bacterium clone LA07Ba25	GU133229	92%	toluene-degrading microcosm, tar-oil-contaminated aquifer sediment
B3U-BF21H	Uncultured bacterium clone LA07Ba05	GU133213	98%	toluene-degrading microcosm, tar-oil-contaminated aquifer sediment
	Uncultured bacterium clone A3-53-M13F-pUC	HM439885	98%	basal ice sample (Greenland)

Около 6.9% последовательностей 16S рРНК архей кластеризовались с группой кренархей Marine group 1, близкой к *Nitrosopumilus* spp. (93% идентичности). Эти аэробные автотрофные микроорганизмы широко распространены во всех морских местообитаниях и почвах, где играют важную экологическую роль, осуществляя окисление аммония до нитрита (Könneke et al., 2005; Leininger et al., 2006).

Остальные археи представляют некультивируемые линии. Около 14% последовательностей относятся к Terrestrial miscellaneous euryarchaeotal group (TMEG) (Takai et al., 2001), первоначально обнаруженной в шахтах Южной Африки, а затем в почве, морских и озерных осадках. Близкие к этой группе последовательности были обнаружены в почвах, загрязненных нефтью, и водных осадках (Таблица 10). Около 11,4% архей относятся к кренархеям линии MCG1, имеющей широкий ареал распространения, который включает почвенные и морские, горячие и холодные, поверхностные и подземные местообитания (Biddle et al., 2006; Teske, 2006). В частности, близкие клоны были обнаружены в осадках пресных водоемов во всем мире (Таблица 10). В небольших количествах в поверхностных осадках были обнаружены эуриархеи группы MGIII (2%).

Около 28% архей относятся к восьми группам кренархей, названным Baikal-1 – Baikal-8, филогенетически удаленным от ранее описанных групп. Наиболее многочисленной из этих групп является Baikal-1, на которую приходится 19,2% всех архейных последовательностей. Археи, близкие этой группе, широко распространены в пресноводных осадках (Таблица 10). Другие группы Baikal в большей степени отличаются от известных клонов, которые были также обнаружены в осадках (Табл. 10). Последовательности 16S рРНК двух линий (Baikal-5 и Baikal-6), на которые приходится суммарно около 2% архейных последовательностей, не имели близких гомологов в базах данных; вероятно эти группы эндемичны для Байкала.

Структура бактериального и архейного сообществ глубинного слоя осадков

В глубинном осадке (85-95 см.) бактерии составляли около 70% всех микроорганизмов. Лишь менее 5% бактериальных и архейных последовательностей имели более 95% гомологии с генами 16S рРНК культивируемых микроорганизмов, что подчеркивает новизну и необычность этого сообщества.

Состав бактерий глубинного слоя осадков существенно отличается от состава бактерий верхнего слоя и придонной воды (Рис. 16; Табл. 9). Большинство составляли представители филумов *Chloroflexi* (38% бактериальных последовательностей), JS1 и

Caldiserica, тогда как *Gammaproteobacteria* и *Cyanobacteria* были представлены в минорных количествах. Более 10% бактериальных последовательностей представляли глубокие филогенетические ветви и не были классифицированы даже на уровне филума.

Среди *Chloroflexi* большую часть составляли представители класса *Dehalococcoidetes* (субфилум II филума *Chloroflexi*), внутри которого байкальские образцы образовывали отдельный филогенетический кластер. Эти последовательности были отдаленно близки к каноническим *Dehalococcoides* spp. (91-96% идентичности 16S рРНК). *Dehalococcoides* являются анаэробными бактериями специализирующимися на трансформации различных хлорсодержащих органических соединений через восстановительное дехлорирование (Maymo-Gatell *et al.*, 1997). Эти организмы были обнаружены в различных анаэробных пресноводных и морских осадках (Kittelmann & Friedrich, 2008); клоны близкие к обнаруженной в данной работе линии *Chloroflexi* были найдены в похожих местообитаниях (Табл. 10).

Около 19% бактериальных последовательностей относились к кандидатному филуму JS1. Представители этой линии обнаруживались в глубинных и поверхностных морских осадках (Teske, 2006). Однако они также были найдены в различных других анаэробных местообитаниях, например в осадках, содержащих гидраты метана (Reed *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2006), морских и наземных грязевых вулканах (Alain *et al.*, 2006). В частности, члены бактерии филума JS1 были ключевыми представителями в морских образцах, содержащих гидраты метана, где они составляли более 50% клонов (Inagaki *et al.*, 2006). Ближайшие к байкальским бактериям JS1 организмы были обнаружены в различных пресноводных осадках (Табл. 10).

Филум *Caldiserica* (раньше известный как OP5) представлял около 8% бактериального сообщества. Бактерии этого филума первоначально были обнаружены в гидротермальных источниках (Hugenholtz *et al.*, 1998), но позднее они были найдены и в различных анаэробных местообитаниях, включая почвы арктических тундр (Liebner *et al.*, 2008).

В архейном сообществе глубинного слоя осадков помимо метаногенов доминировали некультивируемые линии (Рис. 16; Табл. 9). Среди метаногенов были обнаружены две группы, найденные и в верхнем слое осадков, однако их суммарная доля была ниже (10,3% против 34,2% всех архей, соответственно). В отличие от верхнего слоя осадка здесь *Methanomicrobiales* были доминирующей группой метаногенов (8,4%). *Euryarchaeota* были также представлены некультивируемыми группами TMEG (8,8%) и SAGMEG (3,4%). Вторая группа была первоначально обнаружена в глубокой золотодобывающей шахте Южной Африки (Takai *et al.*, 2001), но позднее эти археи были

найжены и в морских осадках с гидратами метана (Reed *et al.*, 2002), в морских осадках Охотского моря (Inagaki *et al.*, 2003) и на дне Тихого океана (Inagaki *et al.*, 2006). Ближайшие к байкальским археям SAGMEG клоны были обнаружены в различных осадках (Табл. 10).

Кренархеи нескольких групп, близких к линии MCG1, составляли 24,2% архейного сообщества. Они близки к археям линии MCG1, обнаруженным в верхнем слое осадка (B2). Из восьми линий кренархей, найденных в верхнем слое осадка, три линии (Baikal 1, 2 и 3) были также идентифицированы в глубинном слое. На долю этих «Байкальских» линий приходилась почти половина всех архей (41,5%), причем группа Baikal-1 являлась доминирующей в архейном сообществе (33,2% последовательностей).

Филогенетический анализ последовательностей McrA метаногенных архей

Принципиально важным для анализа путей биотрансформации метана является ответ на вопрос о том, являются ли археи «метаногенных» групп именно метаногенами или они родственны организмам, осуществляющими обратную реакцию, т.е. анаэробное окисление метана. Среди представителей порядка *Methanomicrobiales* окисляющие метан организмы ранее не были обнаружены, но две из трех групп ANME архей (ANME-2 и ANME-3), образуют отдельные ветви в порядке *Methanosarcinales*. Построенные нами филогенетические деревья последовательностей 16S рРНК показывают (Рис. 17), что байкальские метаногены не кластеризуются с ANME-2 или ANME-3, однако, мы провели дополнительное исследование этого вопроса.

Ключевым ферментом метаногенеза является метил-коэнзим М редуктаза (Mcr), субъединица А которой (McrA) используется как общий маркер метаногенных архей (Ermler *et al.*, 1997). Этот фермент присутствует как у метаногенов, так и у ANME – архей и используется в обоих процессах. Однако, различия в механизмах метаногенеза и окисления метана определяют и различия в аминокислотных последовательностях McrA у метаногенов и ANME – архей.

Для анализа последовательностей McrA мы амплифицировали фрагмент гена *mcrA* длиной около 490 нуклеотидов с помощью вырожденных праймеров (Springer *et al.*, 1995) из метагеномной ДНК приповерхностных осадков. Полученный фрагмент клонировали в плазмидном векторе pGEM-T, определяли нуклеотидные последовательности 33 независимых клонов. Соответствующие аминокислотные последовательности McrA анализировали, строя филогенетические деревья, включающие последовательности McrA из различных метаногенных и ANME-архей (Рис. 18).

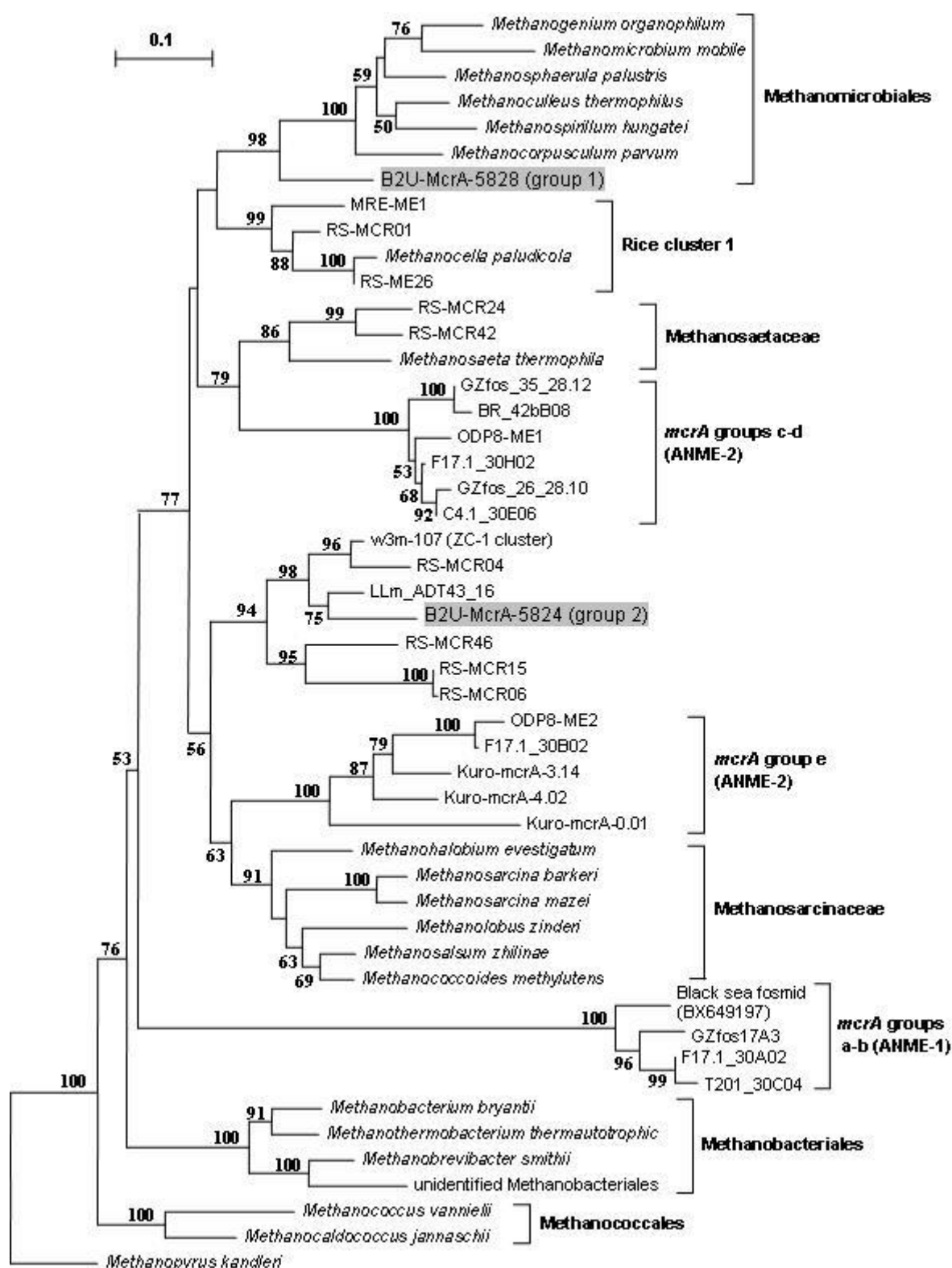


Рисунок 18. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей фрагмента McrA. Group 1 и group 2, - две группы последовательностей McrA архей, выделенных из верхнего слоя осадка.

Как и последовательности 16S рРНК метаногенов, последовательности фрагментов McrA архей образовали две группы, включающие 2 и 18 последовательностей. Первая

группа (MCR_group_1) кластеризовалась с McrA метаногенов порядка *Methanomicrobiales*. Вторая группа (MCR_group_2) образовывала филогенетическую ветвь, аффилированную с McrA метаногенов порядка *Methanosarcinales* и включающую также последовательности McrA метаногенных архей с рисовых полей Италии (RC-MCR46, RC-MCR06 и RC-MCR04; Lueders et al., 2001; Conrad et al., 2008) и высокогорных болот в горах Тибета (ZC1_w3m-10). В частности, метаногены линии ZC1, составляющие около 30% архей в болотах региона Zoige Тибета (Zhang et al., 2008), являются линией *Methanosarcinales*, адаптированной к холодным местообитаниям и использующим различные субстраты, включая водород и ацетат. Последовательности McrA из метаноокисляющих архей образовывали отдельные филогенетические ветви. Таким образом, проведенный анализ подтвердил наличие ключевого фермента метаногенеза, McrA, у архей, обитающих в донных осадках, и показал, что последовательность этого фермента сходна с последовательностями McrA метаногенных, но не метаноокисляющих архей.

2. Микробное сообщество микроорганизмов битумных холмов в естественных выходах нефти на дне озера Байкал.

В 2005 г. в глубоководном участке оз. Байкал, в районе мыса Горевой Утес, было открыто новое нефтепроявление (Хлыстов и др., 2007). Ежегодно поверхности озера достигает около 4 т нефти. Состав нефти свидетельствует о том, что она образовалась в период олигоцена – раннего миоцена из органического вещества, захороненного в осадках пресного водоема (Хлыстов и др., 2007; Каширцев и др., 2006). Донные осадки, отобранные в этом районе, содержали нефть, битум и гидраты метана (Хлыстов и др., 2009).

Район нефтепроявлений на дне Байкала у мыса Горевой Утес был исследован во время погружений глубоководных аппаратов «Мир» в ходе экспедиций 2008–2009 гг. В ходе обследования дна озера на глубине 800–900 метров были обнаружены битумные холмы (Хлыстов и др., 2009), образовавшиеся в местах выхода нефти. Эти объекты плотно заселены глубоководными беспозвоночными животными, плотность которых на порядок превышала плотность поселения контрольных участков дна (Хлыстов и др., 2009). Вероятно, это сообщество не зависит от поступления органических веществ из поверхностных слоев воды, а основано на деятельности микроорганизмов, осуществляющих биodeградацию углеводородов (Хлыстов и др., 2009).

Целью этой части работы был анализ разнообразия микробных сообществ двух битумных построек с помощью пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК.

Битумные постройки и их химический состав

Объектами исследования были две битумные постройки 8 и 3 (рис. 19). Постройка 8 достигала высоты 10 м и имела диаметр около 50 м. На периферии постройки имелись «факелы», свидетельствующие о выходе газа. Эта постройка имеет светло-коричневую окраску, очень неровную поверхность и рваные края. Верхние 1–2 см вещества постройки представлены твердым и хрупким материалом, более глубокие слои – темно-коричневым пластическим веществом, имеющим свойства битума.

Постройка 3 находилась в стороне от битумного холма 8, в районе выхода газовых «факелов» и имела конусовидную форму и меньшие размеры: ее высота составляла 1 м, диаметр – 1.5 м. В отличие от постройки 8, она была представлена вязким материалом темно-коричневого цвета, на ее вершине имелась вертикально стоящая трубка – «капельница», из которой периодически высачивались капли нефти.



Рисунок 19. Битумные постройки 3 (слева) и 8 (справа) в районе мыса Горевой Утес. Фотография сделана с глубоководного аппарата «Мир» и предоставлена д.б.н. Т.И. Земской (ЛИН СО РАН). Белые объекты – плоские черви и амфиподы.

В 2008–2009 гг. в ходе совместных экспедиций ЛИН СО РАН и Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН с помощью глубоководного аппарата «Мир» были отобраны образцы битумных построек 3 и 8. Пробы битума отделяли от построек манипуляторами и поднимали на борт исследовательского судна, где проводили их анализ. Кроме того, были отобраны пробы придонной воды с помощью бортового батометра (ст. 1), а также образцы донных осадков в районе построек с использованием бентосной трубки (ст. 2) и сачка (ст. 3).

Сотрудниками ЛИН СО РАН было определено содержание углерода в данных постройках, а также состав поровых вод. Содержание углерода в материале построек варьировало от 80 до 87%, водорода – от 12.3 до 13.3% и минерального вещества – до 1.1% (табл. 11).

Таблица 11. Химический состав материала битумных построек

Постройка	Элементы (%)		Минеральные вещества (%)	Содержание <i>n</i> -алканов (мг/г)	Содержание ПАУ (мг/г)
	С	Н			
3	80.3-82.4	12.3-13.4	1.1	770	0.98
8	85.8-87.2	12.3-13.0	< 0.1	150	0.29

На основании соотношений углерода и водорода ($C/H=6.7$), наличия в ИК спектрах полос поглощения групп CH_3 , CH_2 и $(CH_2)_x$, характерных для структур насыщенных углеводородов, органическое вещество построек идентифицировано как парафиновый нефтяной битум. В образцах построек n -алканы идентифицированы как гомологические ряды от $n-C_{13}$ до $n-C_{36}$ и их максимумы сдвинуты в область высокомолекулярных гомологов, в отличие от нефти, собранной с водной поверхности. Однако состав двух построек существенно различался. В материале постройки 3 n -алканы составляли около 77%, а в постройке 8 их доля составляла лишь 15%, а на хроматограммах присутствует пик нафтено-ароматических соединений, образующихся в результате биodeградации нефти. Меньшее количество n -алканов в материале постройки 8 коррелирует со сдвигом максимума гомологического ряда n -алканов в область высших парафинов (рис. 20). Вероятно, в постройке 8 сохранились лишь длинноцепочечные n -алканы, более устойчивые к биodeградации.

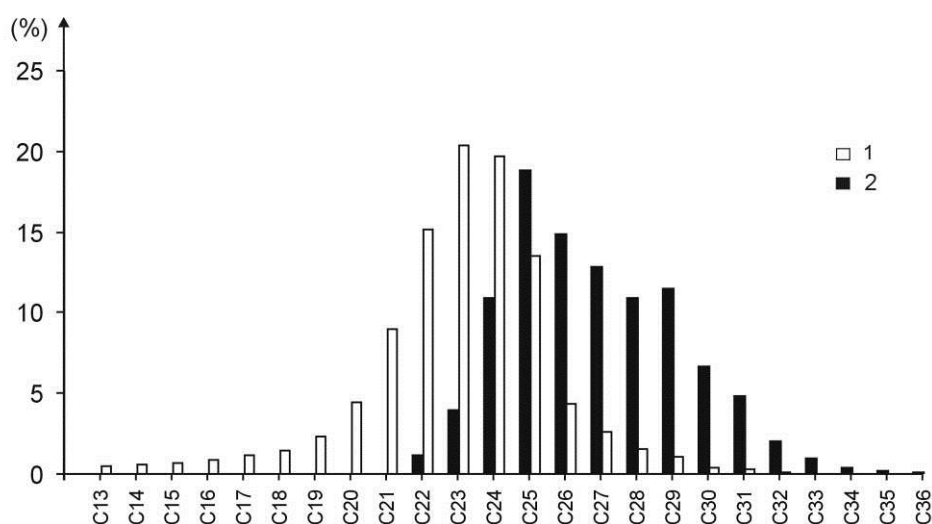


Рисунок 20. Доли (%) n -алканов с различной длиной цепи в материале построек (1 – постройка 3; 2 – постройка 8). Данные Т.И. Земской (ЛИН СО РАН).

Для битумной постройки 8 и прилегающих к ней донных осадков в ЛИИ СО РАН был определен состав поровых вод. По химическому составу эти воды являются гидрокарбонатно-кальциевыми и характеризуются низкой минерализацией (табл. 2). В частности, концентрации сульфата и, особенно, нитрата в поровых водах постройки ниже, чем в придонной воде, что может свидетельствовать о расходовании этих ионов в ходе биогеохимических процессов, протекающих в толще постройки. Содержание кислорода в придонной воде в районе битумных построек составляет около 7 мг/л (табл. 12), что создает условия для аэробного окисления углеводородов построек.

Таблица 12. Состав придонной воды, поровых вод донных отложений и битумной постройки 8.

Проба	Содержание ионов (мг/л)								O ₂ (мг/л)	pH
	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺		
Придонная вода (ст. 1)	66.90	1.31	0.84	2.37	4.25	2.64	16.1	0.61	6.9	7.47
Постройка 8	67.29	0.77	0.00	1.20	4.41	2.39	17.8	0.21	ND	ND
Поровая вода из осадка между постройками (ст. 2), глубина 0-1 см	45.90	1.33	0.00	3.71	4.67	2.58	11.2	0.32	ND	ND
Поровая вода из осадка между постройками (ст. 2), глубина 8-10 см	49.55	0.41	0.00	3.56	2.4	1.81	13.3	0.63	ND	ND
Поровая вода из осадка между постройками (ст. 3), глубина 0-2 см	24.40	0.78	0.00	8.90	2.61	1.95	8.8	0.13	ND	ND

ND, - не анализировали

Бактерии микробных сообществ битумных построек

Для молекулярно-биологических анализов отбирали внутренние части построек с соблюдением асептических условий. Сотрудниками ЛИН СО РАН были выделены препараты метагеномной ДНК из данных битумных построек и предоставлены нам для проведения молекулярного анализа состава микробных сообществ. Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего вариабельные участки V3–V6, использовали «универсальные» праймеры PRK341F и PRK806R. Пиросеквенирование полученного ПЦР фрагмента осуществляли на геномном анализаторе GS FLX с использованием набора GS LR70 Sequencing Kit.

В результате пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК было определено 11952 последовательности для постройки 3 и 4031 – для постройки 8. В результате кластерного анализа было установлено, что библиотека 16S рРНК микробного сообщества постройки 3 содержала 5370 последовательностей бактерий и 4520 – архейных последовательностей. Для постройки 8 количество идентифицированных последовательностей бактерий и архей составляло 2240 и 1405 соответственно. Данные по филогенетическому составу сообществ представлены в таблице 13.

Таблица 13. Филогенетическое разнообразие бактерий и архей микробных сообществ битумных построек

Таксономическая группа	Доля в сообществе (%) *	
	постройка 3	постройка 8
<i>Bacteria</i>		
<i>Alphaproteobacteria</i>	26.9	11.2
<i>Acetobacteraceae</i>	-	1.2
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	6.7	3.4
<i>Caulobacteraceae</i>	0.4	2.8
<i>Rhodobacteraceae</i>	5.0	1.6
<i>Sphingomonadaceae</i>	1.0	1.7
«Некультивируемые» группы	13.8	0.5
<i>Betaproteobacteria</i>	30.5	39.7
<i>Aquabacterium</i>	3.2	1.7
<i>Burkholderiaceae</i>	-	10.9
<i>Comamonadaceae</i>	6.6	2.5
<i>Methylibium</i>	5.2	-
<i>Rhodocyclaceae</i>	0.4	8.5
«Некультивируемые» группы	14.4	15.4
Прочие	0.7	0.7
<i>Gammaaproteobacteria</i>	6.3	19.4
<i>Methylobacter</i>	0.6	-
<i>Pseudomonas</i>	-	17.2
Прочие	5.7	2.2
<i>Deltaproteobacteria</i>	1.5	5.6
<i>Geobacter</i>	-	0.5
<i>Syntrophobacter</i>	-	0.5
<i>Syntrophus</i>	0.6	4.6
Прочие	0.9	-
<i>Epsilonproteobacteria</i>	-	4.0
<i>Actinobacteria</i>	7.9	5.8
<i>Cellulomonas</i>	-	3.0
<i>Nocardia</i>	6.6	-
Прочие	1.3	2.8
<i>Bacteroidetes</i>	13.2	1.6
<i>Acidobacteria</i>	1.1	6.2
TM7	3.9	1.2
<i>Caldiserica</i>	-	1.8
<i>Firmicutes</i>	-	1.1
<i>Verrucomicrobia</i>	1.4	-
<i>Chlorobi</i>	1.2	-
<i>Spirochaetes</i>	1.7	-
Прочие бактерии	4.4	2.4
<i>Archaea</i>		
<i>Methanosarcinales</i>	58.8	27.7
<i>Methanimicrobiales</i>	25.2	55.9
<i>Methanobacteriales</i>	15.4	16.4
TMEG	0.6	-

* от всех последовательностей генов 16S рРНК бактерий или архей, соответственно

Среди идентифицированных по последовательностям генов 16S рРНК бактерий микробного сообщества постройки 8 (рис. 21) абсолютное большинство составляют протеобактерии классов *Betaproteobacteria* (39.7% бактериальных последовательностей), *Gamma*proteobacteria (19.5%), *Alphaproteobacteria* (11.2%), *Deltaproteobacteria* (5.6%) и *Epsilon*proteobacteria (4.1%). Минорными компонентами сообщества являются *Actinobacteria* (5.8%), *Acidobacteria* (6.2%), *Caldiserica* (1.8%), *Bacteroidetes* (1.7%), TM7 (1.2%) и *Firmicutes* (1.1%).

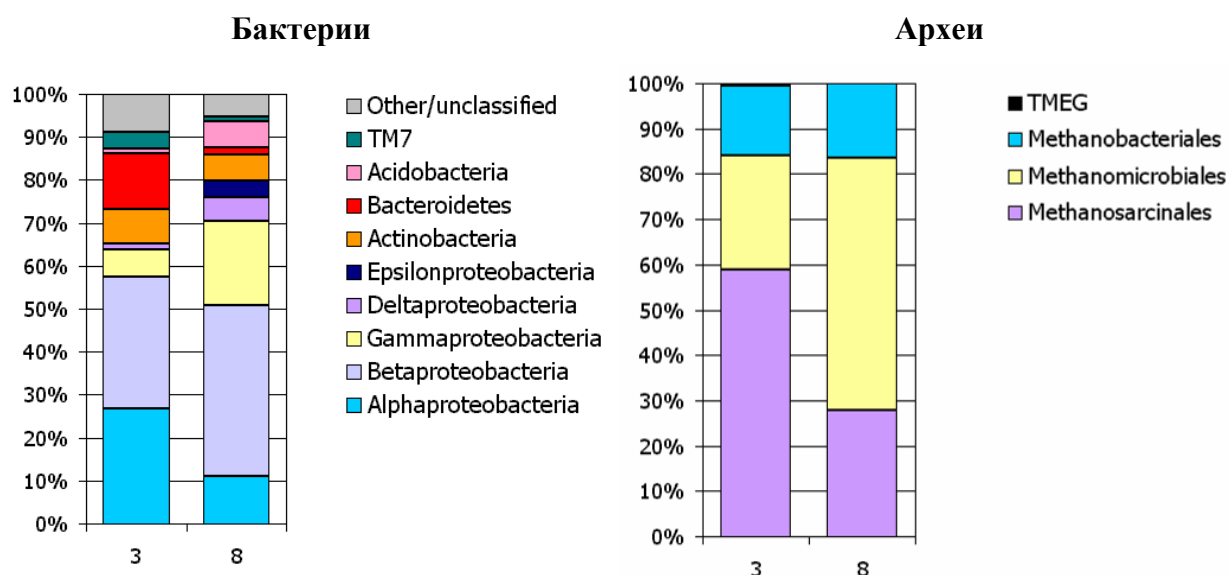


Рисунок 21. Состав микробных сообществ битумных построек, определенный в результате анализа последовательностей генов 16S рРНК.

Среди бета-протеобактерий были обнаружены представители семейств *Rhodocyclaceae* (рода *Zoogloea*, *Georgfuchsia* и *Dechloromonas*), *Burkholderiaceae* (рода *Burkholderia*, *Cupriavidus* и *Ralstonia*), *Comamonadaceae* (*Acidovorax* и *Delftia*) и рода *Aquabacterium*. Способность к деградации алканов в аэробных условиях показана для бактерий родов *Burkholderia* и *Ralstonia*. Почти половина выявленных генов 16S рРНК бета-протеобактерий принадлежат некультивируемым представителям семейства *Rhodocyclaceae*. Близкие последовательности 16S рРНК (98–99% идентичности) были обнаружены при анализе микробных сообществ почв, активного ила, подземных вод и осадков, загрязненных углеводородами (Accession numbers FQ659272, FQ660535, JX271909, JQ919631, JX012267).

Известно, что некоторые бета-протеобактерии могут осуществлять анаэробную

деградацию ароматических соединений и алканов, используя в качестве акцептора электронов нитрат (Widdel, Rabus, 2001). Однако, известные деградирующие углеводороды денитрифицирующие бета-протеобактерии, которые относятся к группе *Azoarcus-Thauera* (Rabus et al., 1999), обнаружены не были.

Второй по численности группой бактерий являются гамма-протеобактерии, абсолютное большинство которых относится к роду *Pseudomonas* (17%). Многие бактерии этого рода способны осуществлять аэробную деградацию углеводородов. Например, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 может использовать даже длинноцепочечные (C₁₈–C₂₈) *n*-алканы (Smits et al., 2002). Среди альфа-протеобактерий обнаружены в основном аэробные гетеротрофы, некоторые из которых, а именно представители родов *Sphingomonas* (1.1%), *Sphingobium* (0.6%), *Caulobacter* (2.8%), способны деградировать ароматические углеводороды. Еще одна группа, для которой показана способность деградировать *n*-алканы и некоторые ароматические соединения, это умеренно термофильные аэробные фирмикуты рода *Geobacillus* (около 1% последовательностей 16S рРНК), часто выделяемые из нефтяных резервуаров (Nazina et al., 2001).

Дельта-протеобактерии составляли около 5.6% бактерий постройки 8. Сульфатредуцирующие бактерии этого класса широко распространены в нефтяных резервуарах (Magot et al., 2000), среди них описаны и штаммы, способные осуществлять анаэробную деградацию ароматических соединений и *n*-алканов (Aeckersberg et al., 1991). Однако, среди дельта-протеобактерий не были найдены известные сульфатредукторы; большинство последовательностей 16S рРНК принадлежало бактериям родов *Syntrophus* (4.6%), *Syntrophobacter* (0.5%) и *Geobacter* (0.5%). Представители первых двух родов являются анаэробными бактериями, характеризующимися синтрофным метаболизмом, при котором деградация органических соединений (жирные кислоты, сахара, углеводороды и др.) оказывается термодинамически выгодной, только если концентрация образующегося при брожении молекулярного водорода поддерживается на очень низком уровне в результате его потребления микроорганизмом-партнером, например, метаногенной археей (Schink, 1997). В частности, описана конверсия гексадекана в метан консорциумом, включающим бактерии *Syntrophus* и метаногенные археи (Zengler et al., 1999; Anderson, Lovley, 2000). Бактерии рода *Geobacter* могут осуществлять анаэробную деградацию ароматических углеводородов, сопряженную с восстановлением оксида железа (III) (Lovley et al., 1989).

Микробное сообщество постройки 3, через которую высачивается нефть, включает те же основные группы бактерий, как и в постройке 8, но их соотношение и видовой состав существенно отличались. Как и в постройке 8, бета-протеобактерии являются

наиболее многочисленной группой (30.5% последовательностей 16S рПНК бактерий), причем почти половину также составляют представители «некультивируемой» линии, присутствующие и в постройке 8. Однако среди выявленных бета-протеобактерий практически отсутствовали представители семейств *Burkholderiaceae* (включает бактерии, осуществляющие аэробную деградацию углеводов – см. выше) и *Rhodocyclaceae*, но были обнаружены метилотрофные бактерии рода *Methylibium*, способные окислять ароматические углеводороды (Nakatsu et al., 2006).

Альфа-протеобактерии составляли значительную долю бактериального сообщества постройки 3 (26.9% всех бактерий). Около половины (13.8% всех бактерий) альфа-протеобактерий относилась к нескольким «некультивируемым» линиям, отсутствовавшим в постройке 8, остальные представляли семейства *Bradyrhizobiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Rhodobacteraceae* и *Sphingomonadaceae*. В отличие от постройки 8, в постройке 3 обнаружено значительно меньше гамма-протеобактерий (6.3%), причем бактерии рода *Pseudomonas* не были выявлены. В меньших количествах в сообществе постройки 3 были представлены дельта-протеобактерии (6.3%, причем синтрофные бактерии составляли меньшинство) и *Acidobacteria* (1.1%). *Actinobacteria* составляли около 8% сообщества и были представлены в основном родом *Nocardia*, способным аэробно окислять алканы.

Наиболее заметным отличием сообществ двух битумных построек является большая доля (13.2%) выявленных по генам 16S рПНК бактерий филума *Bacteroidetes* в сообществе постройки 3. Почти все они принадлежали микроорганизмам нескольких некультивируемых линий. Близкие к ним последовательности 16S рПНК были выделены при изучении микробных сообществ почв и озерных осадков (FR667317, AB658249, EU978785).

Структура архейных сообществ битумных построек

В библиотеках генов 16S рПНК обоих сообществ были обнаружены последовательности архей, принадлежащих метаногенам порядков *Methanosarcinales*, *Methanimicrobiales* и *Methanobacteriales* (табл. 3). Обнаруженные *Methanosarcinales* были представлены одной группой, близкой к ацетокластическим метаногенам рода *Methanosaeta* (98-99% идентичности по 16S РНК), использующим ацетат для образования метана. Две другие группы последовательностей принадлежали метаногенам, использующим водород (Liu, Whitman, 2008), - *Methanimicrobiales* (несколько групп, близких к *Methanoregula boonei*, *Methanosphaerula palustris* и *Methanospirillum hungatei*) и *Methanobacteriales* (99% идентичности с *Methanobacterium* sp.). Помимо метаногенов, в сообществе постройки 3 в небольших количествах были обнаружены эуриархеи

«некультивируемой» линии TMEG, которые были найдены и в гидрат-содержащих осадках.

Археи порядков *Methanosarcinales* и *Methanimicrobiales* были обнаружены нами и при исследовании осадков озера Байкал в местах залегания гидратов метана (см выше). Представители *Methanimicrobiales*, обнаруженные в гидрат-содержащих осадках и в битумных постройках, относятся к филогенетически близким линиям, а метаногены порядка *Methanosarcinales* относятся к разным группам, - к роду *Methanosaeta* в битумных постройках и отдельной «некультивируемой» линии в гидрат-содержащих осадках.

Принципиально важным для анализа путей биотрансформации метана является ответ на вопрос о том, принадлежат ли выявленные последовательности архей метаногенам или ANME организмам, осуществляющим обратную реакцию анаэробного окисления метана. Обнаруженные нами последовательности генов 16S рРНК архей не принадлежали археям групп ANME-1, ANME-2 и ANME-3. Однако, для независимого подтверждения мы провели филогенетический анализ альфа субъединицы метил-коэнзим М редуктазы (McrA). В составе библиотеки клонов фрагментов генов McrA, полученной для битумной постройки 3, выявлены три группы последовательностей (рис. 22). Первая группа (4 клон) принадлежала представителям порядка *Methanomicrobiales*, вторая (5 клонов) – археям порядка *Methanobacteriales*, и третья (3 клон) – *Methanosaetaceae*. Таким образом, филогенетический анализ последовательностей как 16S рРНК, так и McrA подтверждает принадлежность обнаруженных архей к метаногенным, а не метан-окисляющим группам.

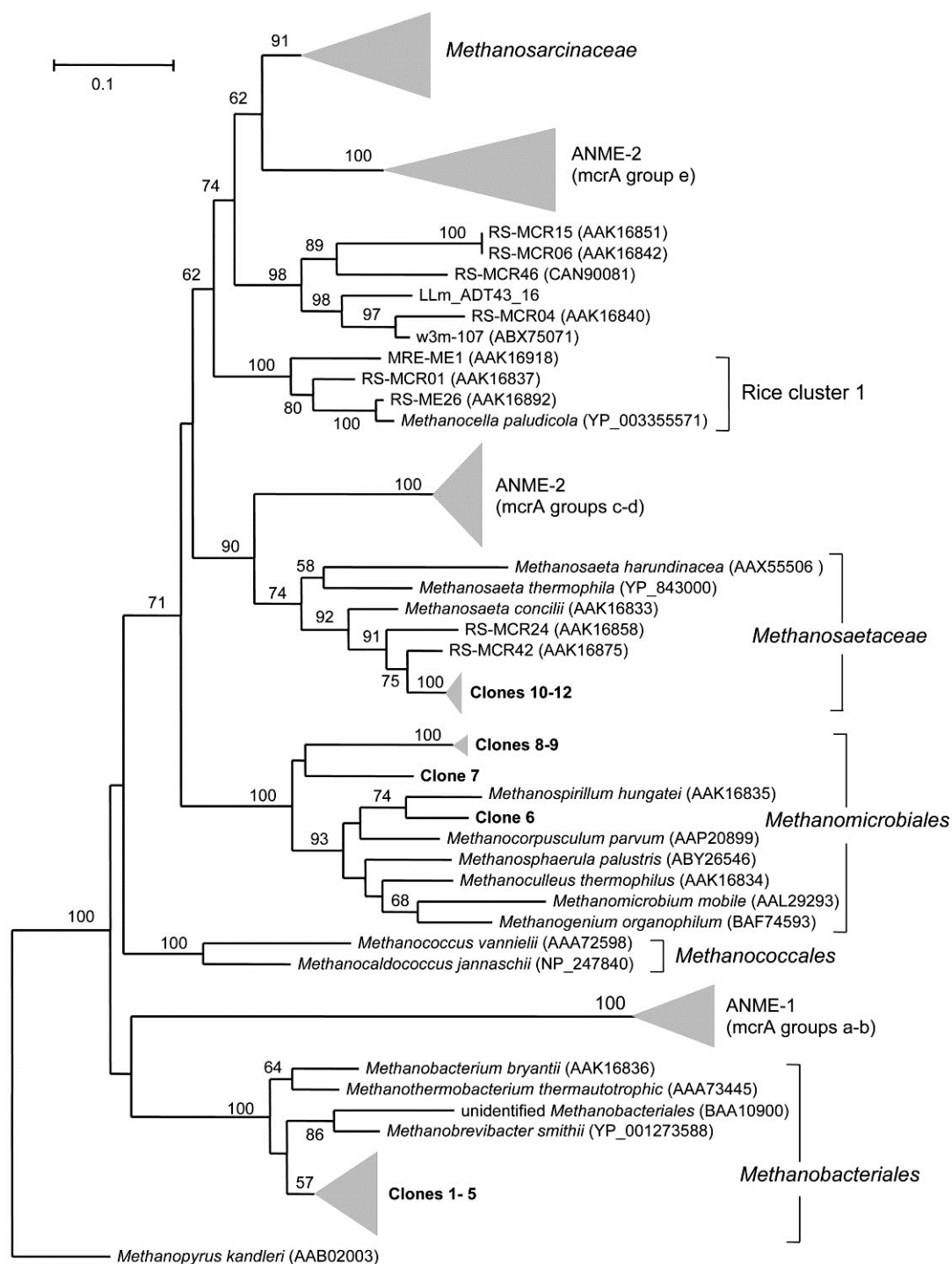


Рисунок 22. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей фрагментов гена *McrA* полученных в данной работе (Clone), и представителей известных метаногенных и ANME линий архей. Дерево построено методом neighbor-joining, в качестве внешней группы использован ген *Methanopyrus kandleri*. Цифры у ветвей указывают бутстреп-поддержку (100 реплик), показаны только значения более 50%. Шкала соответствует 0.1 замене на сайт. Номера последовательностей в GenBank указаны в скобках после названий организмов или клонов.

Идентификация генов алкан-гидроксилаз (alkB)

Алкан-гидроксилазы являются ключевыми ферментами в процессах аэробного окисления углеводородов (van Beilen et al., 2003). Поэтому мы провели эксперимент по детекции *alkB* генов с помощью ПЦР, чтобы затем идентифицировать соответствующие им микроорганизмы. Необходимо подчеркнуть, что в отличие от гена *mcrA*, гены *alkB* более разнообразны, что делает практически невозможным создание «универсальных» праймеров для их детекции (Kohn et al., 2002). Однако, обнаружение последовательности, близкой к *alkB* известного микроорганизма, будет свидетельствовать о возможности деградации *n*-алканов присутствующими в сообществе бактериями. Из 11 выявленных последовательностей фрагментов *alkB*, полученных из метагенома постройки 3, шесть имели высокую гомологию с генами *alkB* актинобактерий рода *Nocardia*, одна – с геном *alkB* бактерий рода *Burkholderia*, что может свидетельствовать об участии этих групп в аэробной деградации алканов в битумных постройках. Остальные последовательности были гомологичны генам *alkB* некультивируемых бактерий или не имели близких гомологов в базах данных.

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Микробные сообщества гидрат-содержащих осадков

Был определен состав микробных сообществ мест залегания газовых гидратов, до этого охарактеризованных только для морских гидрат-содержащих осадков. Ключевыми биогеохимическими процессами, отражающими структуру микробных сообществ, являются метаногенез и аэробное окисление метана. Полученные нами данные показывают, что микробное сообщество придонной воды в районе залегания гидратов метана примерно на половину состоит из аэробных метанотрофных гамма-протеобактерий рода *Methylobacter*. Другая подгруппа метилофильных бактерий, бета-протеобактерии рода *Methylophilus*, были представлены в минорных количествах. Такая структура бактериальной популяции согласуется с процессами аэробного окисления метана, выходящего из осадка в воду. Археи составляют лишь 1% последовательностей 16S рНК и в основном были представлены метаногенами, источником которых может быть осадок, попавший в образец придонной воды при отборе проб.

Влияние процессов, связанных с аэробным окислением метана на состав микробного сообщества придонной воды, подтверждается также сравнением полученных результатов с данными по молекулярному анализу состава микробного сообщества придонной воды Байкала в районе, не содержащем гидратов, описанными в работе (Zakharova et al., 2013). По результатам анализа 16S рНК методом пиросеквенирования было установлено, что в сообществе доминируют представители *Proteobacteria* (41.9%) и *Actinobacteria* (16%); существенно меньшие доли составляли *Acidobacteria* (6.9%), *Cyanobacteria* (5%), *Bacteroidetes* (4.7%), *Firmicutes* (2.8%), *Nitrospira* (1.6%), и *Verrucomicrobia* (1%), при этом около 19% последовательностей не были классифицированы даже на уровне филума. Среди бета-протеобактерий (около 14%) значительную часть, как и в нашей работе, составляли представители порядка *Burkholderiales*. Состав гамма-протеобактерий, на которые приходилось 17.2% последовательностей, существенно отличался: большинство составляли *Halomonadaceae* (8.3%), в то время как в придонной воде в области залегания газовых гидратов среди гамма-протеобактерий доминировали метанотрофы порядка *Methylococcales* и представители порядка *Chromatiales*, не обнаруженные в работе (Zakharova et al., 2013).

Структура микробного сообщества верхнего слоя осадка отражает совокупность различных метаболических процессов на границе содержащей кислород воды и осадка, находящегося в бескислородных условиях. Бактериальное сообщество включает как анаэробных метанотрофов, так и «водные» бактерии филума *Bacteroidetes*, которые могут

содержаться в воде, циркулирующей между водной толщей озера и порами в верхнем слое осадка, а также линии бактерий, характерные для осадков (*Chloroflexi*, JS1, *Caldiserica*). Неожиданным стало обнаружение в верхних слоях осадка большого числа цианобактерий, которые отсутствовали в придонной воде и глубинных осадках. Микроскопический анализ, проведенный в ЛИН СО РАН, выявил клетки цианобактерий с характерной автофлуоресценцией, наблюдались делящиеся клетки. Хорошая сохранность цитоплазмы и формы клеток дают основание полагать, что цианобактерии являются живыми и развиваются на этой глубине в отсутствии света, осуществляя гетеротрофный метаболизм, хотя и не исключена вероятность поступления их с фекальными пеллетами зоопланктона.

Археи составили около двух третей микроорганизмов в приповерхностном слое донных осадков. Эуриархеи порядков *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales* составляли около трети архей. При анализе генов 16S рРНК и *mcrA* было показано, что эти линии микроорганизмов относятся к метаногенным, а не к анаэробно окисляющим метан линиям. Эти данные согласуются с пресноводной природой местообитания, характеризующегося низкой концентрацией сульфатов. Это соответствует отсутствию сульфатредукции, которая могла бы конкурировать с метаногенезом, и анаэробного окисления метана, связанного с сульфатредукцией. Таким образом, в отличие от морских и других богатым сульфатом экологических ниш, в озере Байкал метаногенез может происходить даже в верхних слоях осадка. Экологически важной группой архей, обнаруженной только в верхнем слое осадка является Marine group I, на которую приходится около 7% последовательностей 16S рРНК архей. Культивируемые организмы этой линии архей являются аэробными автотрофами, окисляющими аммоний до нитрита. Оставшаяся часть архей была представлена различными некультивируемыми линиями кренархей. Пути их метаболизма в основном неизвестны, за исключением группы MCG1, представители которой являются гетеротрофными анаэробами, которые утилизируют сложные органические субстраты (Teske & Sorensen, 2008), включая ароматические соединения (Meng et al., 2014).

Состав библиотеки клонов 16S рРНК показал, что в глубинном слое осадка, непосредственно прилегающем к гидратам, большинство сообщества составляли бактерии, хотя доля архей была существенна. Бактерии филумов *Chloroflexi*, JS1 и *Caldiserica* были доминирующими группами в этом сообществе. В морских осадках, содержащих газовые гидраты, больше половины последовательностей приходилось на JS1, тогда как представители филума *Chloroflexi* доминировали в осадках с высоким содержанием органических веществ в отсутствии гидратов (Inagaki et al., 2006).

Обнаруженные бактерии филума *Chloroflexi* были родственны группе *Dechlorococcoidetes*, осуществляющей восстановительное дехлорирование. Присутствие хлорорганических соединений (напр. гексахлорбензен, тетрахлорэтен, диоксин, хлорфенол и тп) обычно ассоциируется с промышленными загрязнениями, хотя природные источники таких соединений тоже известны, например морские водоросли (Häggblom et al., 2003). Если *Chloroflexi* найденные в осадках Байкала также способны использовать галогены в процессах анаэробного дыхания, то они должны зависеть от водорода, образуемого микроорганизмами, сбраживающими органику. Так как энергия Гиббса восстановительного дехлорирования (от -130 до -180 кДж/моль на молекулу хлора) выше, чем при метаногенезе, бактерии, осуществляющие восстановительное дехлорирование, должны успешно конкурировать с метаногенами (Dolfing, 2003; Tas et al., 2010). Такая конкуренция может объяснять снижение доли метаногенных архей в глубинном слое осадка по сравнению с верхним слоем (10,3 и 34,2% архей, соответственно).

Микробное сообщество гидрат-содержащих осадков озера Байкал отличается от сообществ в районах залегания гидратов в морских осадках. Анализируя донные осадки в районах Перу и Cascadia Margins, Inagaki et al. (2006) обнаружили, что прокариотические сообщества в морских осадках главным образом состоят из бактерий, и только в одном гидрат-содержащем районе археи составляли 30% прокариот. Как и в озере Байкал, в морских гидрат-содержащих осадках доминировали бактерии филумов JS1 и *Chloroflexi* (Inagaki et al., 2006). Архейные компоненты морских и байкальских сообществ сильно отличались. В морских осадках фракция архей уменьшается с глубиной, составляя менее 0.01% всего прокариотического сообщества во всех образцах, в которых были обнаружены гидраты метана (Inagaki et al., 2006). Архейные сообщества гидрат-содержащих образцов в основном были представлены группой deep-sea archaeal group (DSAG, также известной как Marine Benthic Group B). Археи линии DSAG были доминирующей группой в гидрат-содержащих осадках во впадине Нанхай (Reed et al., 2002) и Охотском море (Inagaki et al., 2003). Археи DSAG были доминирующей группой в зоне сульфатредукции, расположенной выше гидратов, что указывает на роль этих архей в процессах восстановления сульфата и анаэробного окисления метана (Inagaki et al., 2006). Следует особо отметить, что Inagaki et al. (2006) обнаружили лишь небольшое число последовательностей генов 16S рРНК и mcrA метаногенов в гидрат-содержащих морских осадках, что оставляет открытым вопрос о микробном источнике метана.

В целом, полученные данные о составе микробных сообществ согласуются с гипотезой о биогенном происхождении гидратов метана в Байкале. Изотопный состав газа из гидрат содержащих осадков района «Санкт-Петербург» ($\delta^{13}\text{C}_{\text{cp.}} = -63,6\text{‰}$; $\delta\text{D} (\text{CH}_4) = -$

282‰), также указывает на микробиологическое происхождение метана (Egorov *et al.*, 2010). Результаты молекулярного анализа состава микробных сообществ позволяют предложить следующую схему экологических взаимосвязей микроорганизмов, приводящую к образованию метана (Рис. 23). Первичная продукция органических веществ осуществляется в верхних слоях воды фотосинтезирующими организмами, - цианобактериями и водорослями. Отмершие фотосинтетики, а также зоопланктон, осаждаются на дно водоема. В придонной воде одна часть органики окисляется аэробными гетеротрофными бактериями (например, бета-протеобактериями), а часть образует осадок, который в дальнейшем анаэробно сбраживается до органических кислот, водорода и углекислого газа. Эти процессы могут осуществляться различными группами бактерий и архей, обнаруженными в верхнем слое осадка, в том числе бета-протеобактериями, представителями *Bacteroidetes*, *Caldiserica*, археями групп MCG, TMEG и «Байкальских» групп Baikal 1-8. Образовавшиеся в результате сбраживания органики ацетат и водород являются субстратами для роста метаногенных архей, представляющих порядки *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*. Затем метан может либо подниматься вверх, и потребляться в придонных слоях воды аэробными метанотрофными гамма-протеобактериями, либо сохраняется в виде гидратов.

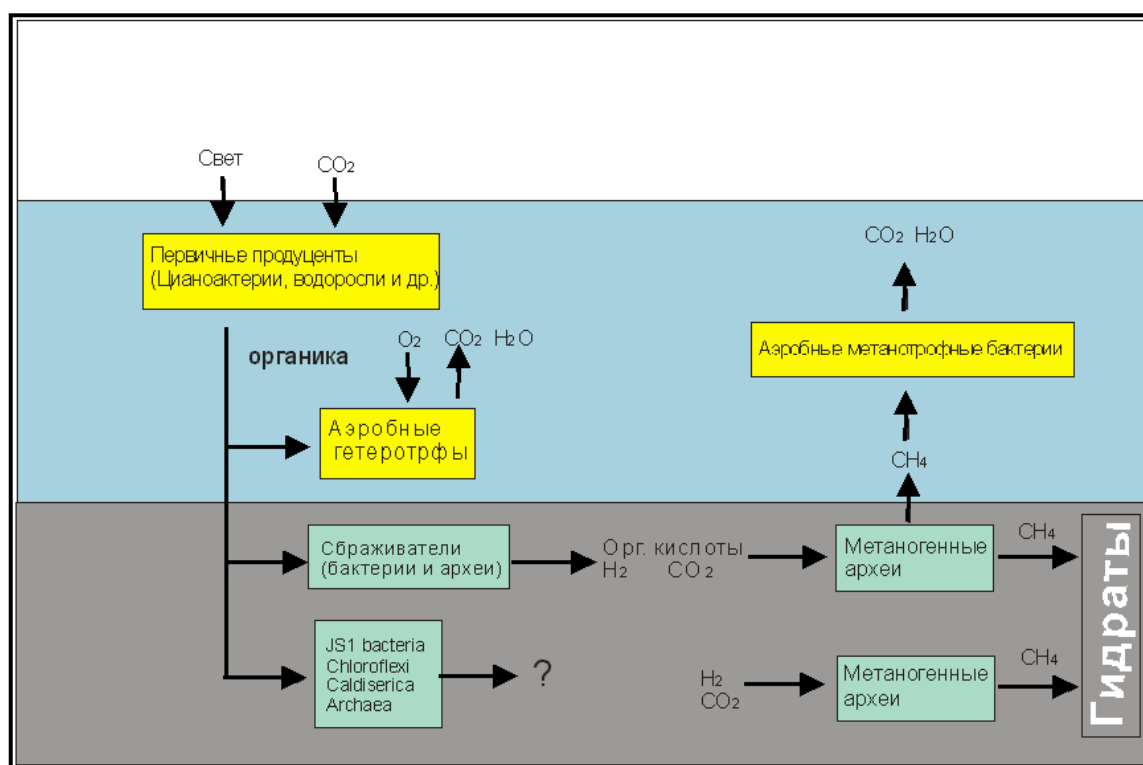


Рисунок 23. Схема трофических взаимосвязей между микроорганизмами различных групп и процессов образования гидратов метана в Байкале.

Образование гидрата является способом «вывода» метана из экосистемы, снимающим эффект ингибирования метаногенеза продуктом реакции. Гидраты являются одним из конечных продуктов синтеза и переработки биомассы в Байкале, что позволяет классифицировать их как возобновляемый источник энергии. В отличие от обычных газовых месторождений, образование гидратов метана происходит в настоящее время и является одним из механизмов не только образования месторождений энергоносителей, но и ограничения поступления парниковых газов в атмосферу.

2. Микробные сообщества битумных построек

Другим результатом работы является определение состава микробного сообщества битумных построек озера Байкал. Наличие таких построек в местах выходов нефти является одной из особенностей озера Байкал. Выходы нефти крайне редко встречаются в озерах, одними из немногих примеров являются расположенное в африканском рифте глубоководное озеро Танганьика, на поверхность которого всплывают битумные шарики и жидкая нефть (Simoneit et al., 2000), и озеро Чапала в Мексике, в котором битумные массы образуют небольшие плавучие островки (Zárate-del Valle, Simoneit, 2005). Молекулярный анализ микробных сообществ таких объектов ранее не проводился.

Материал битумных построек служит источником углерода и энергии для обитающих в них микроорганизмов, однако, лимитирующим фактором в использовании *n*-алканов является доступность акцепторов электронов, в качестве которых могут использоваться кислород, нитрат, сульфат, оксиды железа и марганца. В анаэробных условиях деградация углеводородов может осуществляться и синтрофными ассоциациями, в которых бактериальный партнер деградирует углеводороды с образованием ацетата и водорода, которые затем используются метаногенными археями.

По-видимому, отобранные для анализа образцы построек наряду с анаэробной зоной содержали и участки, контактирующие с содержащей кислород озерной водой (вблизи трещин и т.п.) и, следовательно, находящиеся в аэробных или микроаэрофильных условиях. При анализе последовательностей генов 16S рРНК микробных сообществ обеих построек были выявлены различные группы бактерий, для которых показана способность к аэробной деградации ароматических углеводородов и *n*-алканов. Состав этих групп в библиотеках построек существенно отличался. Так, в библиотеке постройки 8 преобладали последовательности генов 16S рРНК бактерий родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*, которые практически отсутствовали в библиотеке постройки 3, в которой, напротив, были обнаружены актинобактерии рода *Nocardia*. Вероятно, это обусловлено различием материала постройки 8, содержащей наиболее устойчивые к биodeградации длинноцепочечные *n*-алканы, и материала постройки 3, в которой процессы биodeградации углеводородов были менее выражены. Однако в обоих сообществах менее половины микроорганизмов составляли бактерии, для которых документирована способность осуществлять аэробное окисление *n*-алканов. Возможно, в процессе аэробной деградации углеводородов участвуют также некультивируемые представители альфа-, бета-протеобактерий и *Bacteroidetes*, на которые приходится около 40% и 16% последовательностей 16S рРНК бактерий в библиотеках постройки 3 и постройки 8 соответственно. В пользу этого предположения свидетельствует обнаружение близких

последовательностей 16S рРНК некультивируемых бактерий в различных загрязненных углеводородами экосистемах, а также обнаружение нами генов *alkB*, не принадлежащих известным группам бактерий.

Лишь небольшая часть идентифицированных последовательностей генов 16S рРНК бактерий относится к группам, для которых показана способность к анаэробной деградации углеводов, что, видимо, является следствием низкой доступности альтернативных кислороду акцепторов электронов – нитрата и сульфата. Известные сульфатредуцирующие бактерии и бета-протеобактерии группы *Azoarcus–Thauera* (Rabus et al., 1999), способные деградировать углеводороды, обнаружены не были. В небольших количествах были обнаружены бактерии, способные осуществлять анаэробную деградацию ароматических углеводов, сопряженную с восстановлением оксида железа Fe(III) – бета протеобактерии *Georgfuchsia* (0.9% в постройке 8 и 0.4% в постройке 3) и дельта-протеобактерии *Geobacter*. В отсутствие альтернативных акцепторов электронов в анаэробной зоне битумных построек процессы биodeградации углеводов могут осуществляться синтрофным сообществом, включающим дельта-протеобактерии рода *Syntrophus* и метаногенные археи. Предполагается, что синтрофия может являться основным механизмом биodeградации углеводов в подземных нефтяных резервуарах (Jones et al., 2008). Наши данные показывают, что аналогичные процессы могут протекать и в битумных постройках на дне оз. Байкал.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность за разнообразную помощь в выполнении работы своим коллегам Гумерову В.М., Белецкому А.В., Ракитину А.Л., Куприянову В.В. и всем другим, кто помогал в работе;

Николаю Викторовичу Равину за ценные советы и замечания на разных этапах работы, за обсуждение результатов и плодотворные научные дискуссии;

Тамаре Ивановне Земской и сотрудникам Лаборатории микробиологии углеводов Лимнологического института Сибирского отделения РАН - за предоставленные препараты геномной ДНК со дна озера Байкал и физико-химические характеристики образцов;

Автор выражает глубокую благодарность за постоянную поддержку и помощь своему научному руководителю доктору биологических наук Марданову Андрею Владимировичу.

ВЫВОДЫ

- 1) В придонной воде озера Байкал в районе залегания гидратов метана преобладают гамма-протеобактерии, из которых большинство составляют метанотрофные бактерии семейства *Methylococcaceae*. Археи составляют менее 1% прокариот.
- 2) В поверхностном слое осадка (0-1 см) в районе залегания гидратов метана среди бактерий преобладают гамма-протеобактерии, *Cyanobacteria*, *Bacteriodetes*, *Caldiserica* и бета-протеобактерии. Археи в основном представлены метаногенами, относящимися к порядкам *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*, а также группами, не имеющими культивируемых представителей.
- 3) В глубинном слое осадков (85-95 см) в районе залегания гидратов метана преобладающими группами бактерий являются *Chloroflexi*, JS1 и *Caldiserica*. Более 90% архей представляют глубокие филогенетические ветви, не имеющие культивируемых представителей, часть из найдены только в Байкале.
- 4) В микробных сообществах битумных построек в районах природных выходов нефти на дне Байкала обнаружены группы протеобактерий и актинобактерий, способных осуществлять аэробное окисление алканов.
- 5) В анаэробной зоне битумных построек процессы биodeградации углеводов могут осуществляться синтрофным сообществом, включающем дельта-протеобактерии и метаногенные археи. Сульфатредукторы и бета-протеобактерии группы *Azoarcus-Thauera*, способные анаэробно деградировать углеводороды, в микробных сообществах битумных построек не обнаружены.
- 6) Анализ последовательностей 16S рРНК и гена А-субъединицы метил-коэнзим М редуктазы показал, что обнаруженные в гидрат-содержащих осадках и битумных постройках археи относятся к группам, представители которых осуществляют метаногенез, а не анаэробное окисление метана.
- 7) Данные о структуре исследованных микробных сообществ подтверждают гипотезу о биогенном происхождении гидратов метана в озере Байкал.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kadnikov VV, Mardanov AV, Beletsky AV, Shubenkova OV, Pogodaeva TV, Zemskaya TI, Ravin NV, Skryabin KG. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. // *FEMS Microbiol Ecol*. 2012. V.79, P. 348-358.
2. Kadnikov V.V., Lomakina A.V., Likhoshvai A.V., Gorshkov A.G., Pogodaeva T.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V. Composition of the microbial communities of bituminous constructions at natural oil seeps at the bottom of lake Baikal. // *Microbiology*. 2013. V. 82, No.3, P. 373–382.
3. Mardanov A.V., Kadnikov V.V., Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V. (2010) Molecular analysis of microbial communities associated with gas hydrates of Lake Baikal. Abstracts of The 10th International conference on gas in marine sediments, Listvyanka, Russia, p. 56-57.
4. Кадников В. В., Марданов А. В. (2010) Анализ состава микробного сообщества, ассоциированного с газовыми гидратами озера Байкал методами высокопроизводительной геномики. Тезисы 14-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пушино, т.2, с. 229.
5. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V. (2011) Analysis of microbial community structure suggests the biological origin of gas hydrates in the sediments of freshwater Lake Baikal. Abstracts of the 11th International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology BAGECO-11, Corfu, Greece, p. 123.
6. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V. (2011) Microbial communities of methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. Abstracts of the 8th International Symposium of Subsurface Microbiology, Garmisch-Partenkirchen, Germany, p. 46.
7. Кадников В. В., Марданов А. В. (2011) Экология микроорганизмов мест залегания углеводородов в озере Байкал. Тезисы 15-й международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пушино, с. 345-346.
8. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V. (2012) Molecular analysis of microbial communities of hydrocarbon-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. Abstracts of the 14th International Symposium on Microbial Ecology - ISME14, Copenhagen, Denmark. p. 494-495.
9. Кадников В.В., Марданов А.В., Равин Н.В. (2013) Пиросеквенирование фрагментов генов 16S рибосомной РНК как метод высокочувствительной детекции

микроорганизмов-индикаторов загрязнений окружающей среды. Тезисы международной конференции "Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред", Москва, с. 86.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна // отв. ред. Тимошкин О. А. — Новосибирск: «Наука» - 2001, Т.1., Кн. 1, 832 с.
2. Барышникова Л.М., Грищенко В.Г., Аринбасаров М.У. Шкидченко А.Н., Боронин А.М. Биodeградация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде // Прикл. Биохимия и микробиология – 2001, 37(5), 542-548
3. Белькова Н.Л., Денисова Л.Я., Манакова Е.Н., Зайчиков Е.Ф., Грачев М.А. Видовое разнообразие глубоководных микроорганизмов озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // Докл. РАН. – 1996, 348(5), 692-695.
4. Вотинцев К.К. Гидрохимия озера Байкал // К. К. Вотинцев ; Академ, наук СССР, Сиб. отд, вост.- сиб. филиал, труды Байк. лимн. ст. М.: Изд-во АН СССР. -1961, 20, 302 с.
5. Гольмшток А.Я., Дучков А.Д., Хатчинсон Д.Р. и др. Оценки теплового потока на озере Байкал по сейсмическим данным о нижней границе слоя газовых гидратов // Геология и геофизика – 1997, 10, 1677-1691.
6. Горленко В.М. Экология водных микроорганизмов // – М: Наука - 1977, 289 с.
7. Гранина Л.З., Каллендер Е., Ломоносов И.С., Матц В.Д. Аномалии состава поровых вод донных осадков Байкала // Геология и геофизика – 2001, 42, 362-372.
8. Дагурова О.П., Козырева Л.П. , Намсараев Б.Б. Участие микроорганизмов мелководных осадков озера Байкал в процессах самоочищения // Водные ресурсы Байкальского региона: проблемы формирования на рубеже тысячелетий: Материалы науч.-практ. конф. – Иркутск - 1998, 1, 187-188.
9. Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулохонов И.И., Зайчиков Е.Ф. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // Микробиология – 1999, 68(4), 475-483.
10. Земская Т.И., Намсараев Б.Б., Парфенова В.В., Ханаева Т.А., Голобкова Л.П., Гранина Л.З. Микроорганизмы донных осадков оз. Байкал и экологические условия среды // Экология – 1997, 1, 40-44.
11. Истомин В.А. Якушев В.С. Газовые гидраты в природных условиях // - М.: Недра. - 1992, 236 с.
12. Каширцев В.А., Конторович А.Э., Москвин В.И., Данилова В.П., Меленевский В.Н. Терпаны нефтепроявлений озера Байкал // Нефтехимия – 2006, 46(4), 243-250.
13. Конторович А.Э., Каширцев В.А., Москвин В.И., Бурштейн Л.М., Земская Т.И., Костырева Е.А., Калмычков Г.В., Хлыстов О.М. Нефтегазоносность отложений озера Байкал // Геология и геофизика – 2007, 48(12), 1346-1356.

14. Лаптева Н. А. Видовая характеристика гетеротрофных бактерий в озере Байкал // Микробиология – 1990, 59(3), 499-506.
15. Ломакина А.В., Павлова О.Н., Шубенкова О.В., Земская Т.И. Разнообразие культивируемых аэробных микроорганизмов в районах естественных выходов нефти на озере Байкал // Изв. РАН. Сер. биол. – 2009, 5, 515-523.
16. Луста, К. С., Намсараев, Б. Б. Целлюлозоразлагающие природные ассоциации донных осадков пресного озера // Микробиология – 1988, 57(5), 835-840.
17. Максимова, Э.А., Сергеева И.А., Максимов В.Н. Микробиоценозы донных отложений Байкала // Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та. – 1991, 160 с.
18. Назина Т.Н., Шестакова Н.М., Григорьян А.А., Михайлова Е.М., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Циньсян Фен, Фангтиан Ни, Беляев С.С. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология – 2006, 75(1), 70-81.
19. Намсараев Б.Б., Земская Т.И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал // Новосибирск, “Гео”, - 2000, 160 с.
20. Нетрусов А. Н. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А. Н. Нетрусов, Е. А. Бонч – Осмоловская, В. М. Горленко и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», -2004, 272 с.
21. Павлова О.Н., Земская Т.И., Горшков А.Г., Косторнова Т.Я., Хлыстов О.М., Парфенова В.В. Сравнительная характеристика микробных сообществ двух районов естественных нефтепроявлений озера Байкал // Изв. РАН. Сер. биол. – 2008, 3, 333-340.
22. Парфенова В.В., Белькова Н.Л., Денисова Л.Я. Зайчиков Е.Ф., Максименко С.Ю., Захарова Ю.Р., Поддубняк Н.Ю., Моложавая О.А., Никулина И.Г. Изучение видового состава культивируемых гетеротрофных микроорганизмов оз. Байкал // Биология внутр. вод – 2006, 1, 8–15.
23. Репин В.Е., Торок Т., Кузьмин М.И. Биоразнообразие микроорганизмов глубинных донных осадков озера Байкал // Геология и геофизика – 2001, 42(1–2), 231–234.
24. Соловьев В.А. Газогидратоносность недр Мирового Океана // Газовая промышленность – 2001, 12, 19-23.
25. Черницына С.М., Земская Т.И., Воробьева С.С., Шубенкова О.В., Хлыстов О.М., Косторнова Т.Я. Сравнительный молекулярный анализ микробного сообщества в голоценовых и плейстоценовых осадках из района Посольской банки (озеро Байкал) // Микробиология – 2007, 76(1), 116-125.

26. Фудзии С., Накамура Т., Каваи Т., Сакаи Х. Скорости осадконакопления в озере Байкал // Байкал – природная лаборатория для исследования изменений окружающей среды и климата: Тез. докл. – 1994, 2, 59.
27. Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В. и др. Нефть в озере мирового наследия // Докл. академии наук – 2007, 414(5), 656-659.
28. Хлыстов О.М., Земская Т.И., Ситникова Т.Я., Механикова И.В., Кайгородова И.А., Горшков А.Г., Тимошкин О.А., Шубенкова О.В., Черницына С.М., Ломакина А.В., Лихошвай А.В., Сагалевич А.М., Москвин В.И., Пересыпкин В.И., Беляев Н.А., Слипенчук М.В., Тулохонов А.К., Грачев М.А. Донные битумные постройки и населяющая их биота по данным обследования озера Байкал с глубоководных обитаемых аппаратов “Мир” // Доклады Академии наук – 2009, 428(5), 682–685.
29. Шестакова Н.М. Филогенетическое разнообразие и активность микроорганизмов высокотемпературных нефтяных пластов // Автореферат дисс. канд. биол. наук, Москва. -2007, 26 с.
30. Шубенкова О.В., Земская Т.И., Черницына С.М., Хлыстов О.М., & Трибой Т.И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // Микробиология – 2005, 74(3), 370-377.
31. Acinas S.G., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Pharino C., Ceraj I., Distel D.L., & Polz M.F. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community // Nature – 2004, 430(6999), 551-554.
32. Aeckersberg F., Bak F., Widdel F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium // Archives of Microbiology – 1991, 156(1), 5-14.
33. Aeckersberg F., Rainey F. A., Widdel F. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions // Archives of Microbiology – 1998, 170, 5, 361-369.
34. Alain K., Holler T., Musat F., Elvert M., Treude T., & Krüger M. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon- discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania // Environmental microbiology - 2006, 8(4), 574-590.
35. Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // Appl Environ Microbiol. – 1990, 56, 1919-1925.

36. Amann R.I., Ludwig W. and Schleifer K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiological Reviews* – 1995, 59, 143-169.
37. Anders H.J., Kaetzke A., Kämpfer P., Ludwig W., & Fuchs G. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria // *International journal of systematic bacteriology* – 1995, 45(2), 327-333.
38. Anderson R.T., Lovley D.R. Hexadecane decay by methanogenesis // *Nature* - 2000, 404, 722-723.
39. Baker G., Cowan D.A. 16 S rDNA primers and the unbiased assessment of thermophile diversity // *Biochemical Society Transactions*. – 2004, 32, 218-221.
40. Basen M., Krüger M., Milucka J., Kuever J., Kahnt J., Grundmann O., Meyerdierks A., Widdel F., Shima S. Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane // *Environ Microbiol.* - 2011, 13(5), 1370-1379.
41. Beal E. J., House C.H., & Orphan V. J. Manganese-and iron-dependent marine methane oxidation // *Science* – 2009, 325(5937), 184-187.
42. Behnke A., Engel M., Christen R., Nebel M., Klein R.R., Stoeck T. Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions // *Environ Microbiol.* – 2011, 13, 340-349.
43. Beller H.R., Edwards E.A. Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture // *Appl Environ Microbiol.* - 2000, 66, 5503-5505.
44. Bidle K.A., Kastner M., & Bartlett D.H. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B) // *FEMS microbiology letters* – 1999, 177(1), 101-108.
45. Biddle J.F., Lipp J.S., Lever M.A., Lloyd K.G., Sørensen K.B., Anderson R., Fredricks H.F., Elvert M., Kelly T.J., Schrag D.P., Sogin M.L., Brenchley J.E., Teske A., House C.H., Hinrichs K.U. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2006, 7, 103(10), 3846-3851.
46. Biddle J.F., Fitz-Gibbon S., Schuster S.C., Brenchley J.E., & House C.H. Metagenomic signatures of the Peru Margin seafloor biosphere show a genetically distinct environment // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2008, 105(30), 10583-10588.

47. Birch L.D., Bachofen R. Microbial production of hydrocarbons // In Biotechnology. Vol 6b. Special Microbial Processes. Edited by Rehm HJ, Reed G. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft -1988, 71-99.
48. Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C. J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jorgensen B. B., Witte U., Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // *Nature* – 2000, 407, 623–626.
49. Boll M., Heider J. Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C–H-bond activation in the absence of oxygen // *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. – Springer Berlin Heidelberg, 2010, 1011-1024.
50. 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 Y.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, 69(10), 6143-6151.
51. Briggs B.R., Inagaki F., Morono Y., Futagami T., Huguet C., Rosell-Mele A., Lorenson T.D., Colwell F.S. Bacterial dominance in subseafloor sediments characterized by methane hydrates // *FEMS Microbiol Ecol.* - 2012, 81(1), 88-98.
52. Brodkorb D., Gottschall M., Marmulla R., Lüddecke F., & Harder J. Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes // *Journal of biological chemistry* – 2010, 285(40), 30436-30442.
53. Brown W.V., Rose H.A., Lacey M.J., Wright K. The cuticular hydrocarbons of the giant soil-burrowing cockroach *Macropanesthia rhinoceros* Saussure (Blattodea: Blaberidae: Geoscapheinae): analysis with respect to age, sex and location // *Comp Biochem Physiol B.* – 2000, 127, 261-277.
54. Cai L., Ye L., Tong A.H.Y., Lok S., & Zhang T. Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets // *PloS one* – 2013, 8(1), e53649.
55. Chakraborty R., O'Connor S.M., Chan E., & Coates J.D. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB // *Applied and environmental microbiology* – 2005, 71(12), 8649-8655.
56. Chandler D., Li S., Spadoni C., Drake G., Balkwill D., Fredrickson J., Brockman F. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment // *FEMS Microbiol Ecol.* – 1997, 23, 131-144.
57. Chen J., Henderson G., Grimm C.C., Lloyd S.W., Laine R.A. Termites fumigate their nest with naphthalene // *Nature* – 1998, 392, 558-559.

58. Coates J.D., Michaelidou U., Bruce R.A., O'Connor S.M., Crespi J.N., & Achenbach, L.A. Ubiquity and diversity of dissimilatory (per) chlorate-reducing bacteria // *Applied and Environmental Microbiology* – 1999, 65(12), 5234-5241.
59. Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // *Nucleic Acids Res.* -2009, 37(Database issue), D141-145.
60. Conrad R., Klose M., Noll M., Kemnitz D. & Bodelier P.L.E. Soil type links microbial colonization of rice roots to methane emission // *Glob Chang Biol.* – 2008, 14, 657-669.
61. Crabtree R.H. Aspects of methane chemistry // *Chemical reviews* – 1995, 95(4), 987-1007.
62. Cragg B.A., Parkes R.J., Fry J.C., Herbert R.A., Wimpenny J.W.T., & Getliff J.M. Bacterial biomass and activity profiles within deep sediment layers // In Suess, E., von Huene, R., et al., *Proc. ODP, Sci. Results* – 1990, 112, 607-619.
63. Cragg B.A., Harvey S.M., Fry J.C., Herbert R.A., & Parkes R.J. Bacterial biomass and activity in the deep sediment layers of the Japan Sea, Hole 798B // *Proc. Ocean Drilling Prog. Sci. Results* - 1992, 127(128), 761-776.
64. Cravo-Laureau C., Matheron R., Joulain C., Cayol J.L., & Hirschler-Réa A. *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum* // *International journal of systematic and evolutionary microbiology* - 2004, 54(5), 1639-1642.
65. Cravo-Laureau C., Matheron R., Cayol J.L., Joulain C., & Hirschler-Réa A. *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an n-alkane-and n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium // *International journal of systematic and evolutionary microbiology* - 2004, 54(1), 77-83.
66. Daly K., Sharp R.J. and McCarthy A. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria // *Microbiology* – 2000, 146, 1693-1705.
67. Davidova I.A., Duncan K.E., Choi O.K., & Suflita J.M. *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov., an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium // *International journal of systematic and evolutionary microbiology* - 2006, 56(12), 2737-2742.
68. De Rosa S., Milone A., Kujumgiev A., Stefanov K., Nechev I., Popov S. Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/Alteromonas*, associated with the sponge *Dysidea fragilis* // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* - 2000, 126(3), 391-396
69. Dennis M., Kolattukudy P.E. A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO // *Proc Natl Acad Sci USA* - 1992, 89, 5306-5310.

70. Devereux R., Kane M.D., Winfrey J. and Stahl D.A. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria // *Syst Appl Microbiol.* – 1992, 15, 601-609.
71. Dolfig J. Thermodynamic considerations for dehalogenation // In *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*. Haggblom M.M., and Bossert I.D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers – 2003, 89–114.
72. Dunfield P.F., Yuryev A., Senin P., Smirnova A.V., Stott M.B., Hou S., Ly B., Saw J.H., Zhou Z., Ren Y., Wang J., Mountain B.W., Crowe M.A., Weatherby T.M., Bodelier P.L., Liesack W., Feng L., Wang L., Alam M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia // *Nature* – 2007, 6, 450(7171), 879-882.
73. Durbin A.M., Teske A. Archaea in organic-lean and organic-rich marine subsurface sediments: an environmental gradient reflected in distinct phylogenetic lineages // *Frontiers in microbiology* – 2012, 3, 168.
74. Dyksterhouse S.E., Gray J.P., Herwig R.P., Lara J.C., & Staley J.T. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments // *International Journal of Systematic Bacteriology* - 1995, 45(1), 116-123.
75. Egorov V.N., Polikarpov G.G., Gulin S.B., Artemov Yu.G., Stokozov N.A., and Kostrova S.K. Modern Concepts of the Ecological Role of Methane Seeps at the Bottom of the Black Sea // *Tez. Dokl. XV Mezhdunar. Shkoly Morskoi Geologii (XV Int. School on Marine Geology, Abstracts)*, - 2003, 1, 315–316.
76. Egorov A.V., Nigmatulin R.I., Rimskii-Korsakov N.A., Rozhkov A.N., Sagalevich A.M., Chernyaev E.S., Granin N.G., Zemskaya T.I., Khlystov O.M. & Kalmichkov G.V. Gas hydrate hills on the bottom of Lake Baikal // *10th International Conference on Gas in Marine Sediments* - 2010, 102-103
77. Ehrenreich P., Behrends A., Harder J., & Widdel F. Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria // *Archives of microbiology* - 2000, 173(1), 58-64.
78. Engelhardt T., Sahlberg M., Cypionka H., & Engelen B. Induction of prophages from deep-subseafloor bacteria // *Environmental microbiology reports* - 2011, 3(4), 459-465.
79. Ermler U., Grabarse W., Shima S., Goubeaud M., & Thauer R. K. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation // *Science* - 1997, 278(5342), 1457-1462.
80. Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J., van Alen T., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., Op den Camp H.J., Janssen-Megens

- E.M., Francoijs K.J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S., Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // *Nature* - 2010, 25, 464(7288), 543-548.
81. Falkner K. K., Measures C. I., Herbelin S. E., Edmond J. M., Weiss R. F. The major and minor element geochemistry of Lake Baikal // *Limnology and Oceanography* -1991, 36(3), 413-423.
 82. Ficker M., Krastel K., Orlicky S., & Edwards E. (1999). Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium // *Applied and Environmental microbiology* – 1999, -65(12), 5576-5585.
 83. Fischer-Romero C., Tindall B.J., Jüttner F. *Tolumonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediment of a freshwater lake // *Int J Syst Bacteriol.* -1996, 46, 183-188.
 84. Forschner S.R., Sheffer R., Rowley D.C., & Smith D.C. Microbial diversity in Cenozoic sediments recovered from the Lomonosov Ridge in the Central Arctic Basin // *Environmental microbiology* - 2009, 11(3), 630-639.
 85. Foss S., Harder J. *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol, and eucalyptol) nitrate // *Syst Appl Microbiol.* - 1998, 21(3), 365-73.
 86. Foss S., Heyen U., Harder J. *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, alpha-pinene, 2-carene, and alpha-phellandrene) and nitrate // *Syst Appl Microbiol.* - 1998, 21(2), 237-244.
 87. Fry J.C., Parkes R.J., Cragg B.A., Weightman A.J., & Webster G. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere // *FEMS microbiology ecology* – 2008, 66(2), 181-196.
 88. Galushko A., Minz D., Schink B., & Widdel F. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium // *Environmental microbiology* - 1999, 1(5), 415-420.
 89. Gieg L. M., Duncan K. E., Suflita J. M. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas // *Applied and environmental microbiology* – 2008, 74(10), 3022-3029.
 90. Gieg L.M., Davidova I.A., Duncan K.E., & Suflita J.M. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields // *Environmental microbiology* - 2010, 12(11), 3074-3086.
 91. Golyshin P.N., Chernikova T.N., Abraham W.R., Lünsdorf H., Timmis K.N., & Yakimov M.M. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel

- marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons // *International journal of systematic and evolutionary microbiology* - 2002, 52(3), 901-911.
92. Gorgen G., Boland W. Biosynthesis of 1-alkenes in higher plants: stereochemical implications. A model study with *Carthamus tinctorius* (Asteraceae) // *Eur J Biochem.* - 1989, 185, 237-242.
 93. Grabowski A., Nercessian O., Fayolle F., Blanchet D., & Jeanthon C. Microbial diversity in production waters of a low- temperature biodegraded oil reservoir // *FEMS microbiology ecology* - 2005, 54(3), 427-443.
 94. Gray N.D., Sherry A., Larter S.R., Erdmann M., Leyris J., Liengen T., Beeder J., Head I.M. Biogenic methane production in formation waters from a large gas field in the North Sea // *Extremophiles* -2009, 13(3), 511-519.
 95. Gray N.D., Sherry A., Hubert C., Dolfing J., & Head I.M. Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments: remediation, heavy oil formation, and energy recovery // *Advances in applied microbiology* - 2010, 72, 137-161.
 96. Grbić-Galić D., Vogel T.M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures // *Applied and Environmental Microbiology* – 1987, 53(2), 254-260.
 97. Hallam S.J., Putnam N., Preston C., Detter J., Rokhsar D. Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics // *Science* – 2004, 305, 1457–1462.
 98. Hamdan L.J., Sikaroodi M., & Gillevet P.M. Bacterial community composition and diversity in methane charged sediments revealed by multitag pyrosequencing // *Geomicrobiology Journal* - 2012, 29(4), 340-351.
 99. Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // *Microbiological reviews* – 1996, 60(2), 439-471.
 100. Harayama S., Kishira H., Kasai Y., Shutsubo K. Petroleum biodegradation in marine environments // *J Mol Microbiol Biotechnol.* - 1999, 1, 63-70.
 101. Harder J. Anaerobic degradation of isoprene-derived compounds // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* – Springer Berlin Heidelberg, 2010, 957-962.
 102. Harder J., Foss S. Anaerobic formation of the aromatic hydrocarbon p-cymene from monoterpenes by methanogenic enrichment cultures // *Geomicrobiol J.* - 1999, 16, 295-306.
 103. Harms G., Rabus R., Widdel F. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria // *Arch Microbiol.* - 1999, 172, 303-312.
 104. 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, 29, 500(7464), 567-570.

105. Head I.M., Jones D.M., & Larter S.R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil // *Nature* - 2003, 426(6964), 344-352.
106. Head I.M., Jones D.M., & Röling W.F. Marine microorganisms make a meal of oil // *Nature Reviews Microbiology* - 2006, 4(3), 173-182.
107. Heider J., Fuchs G. Thauera Macy, Rech, Auling, Dorsch, Stackebrandt and Sly 1993, 139 VP emend. Song, Young and Palleroni 1998, 893 // *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. – Springer US, 2005, 907-913.
108. Heinnickel M.L., Kaser F.M., Coates J.D. Hydrocarbon degradation coupled to metal reduction // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. – Springer Berlin Heidelberg, 2010, 947-955.
109. Häggblom M.M., Ahn Y.B., Fennell D.E., Kerkhof L.J., & Rhee S.K. Anaerobic dehalogenation of organohalide contaminants in the marine environment // *Advances in applied microbiology* - 2003, 53, 61.
110. Holmes D.E., Risso C., Smith J.A., & Lovley D.R. Genome-scale analysis of anaerobic benzoate and phenol metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus* // *The ISME journal* - 2012, 6(1), 146-157.
111. Hoshino T., Morono Y., Terada T., Imachi H., Ferdelman T.G., & Inagaki F. Comparative study of subseafloor microbial community structures in deeply buried coral fossils and sediment matrices from the challenger mound in the porcupine seamount // *Frontiers in microbiology* - 2011, 2, 231.
112. Huber J.A., Welch D.B.M., Morrison H.G., Huse S.M., Neal P.R., Butterfield D.A., & Sogin M.L. Microbial population structures in the deep marine biosphere // *Science* - 2007, 318(5847), 97-100.
113. Hubert C.R., Oldenburg T.B., Fustic M., Gray N.D., Larter S.R., Penn K., Rowan A.K., Seshadri R., Sherry A., Swainsbury R., Voordouw G., Voordouw J.K., Head I.M. Massive dominance of Epsilonproteobacteria in formation waters from a Canadian oil sands reservoir containing severely biodegraded oil // *Environ Microbiol.* – 2012, 14(2), 387-404.
114. Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L., & Pace N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring // *Journal of Bacteriology* - 1998, 180(2), 366-376.
115. Hugenholtz P., Stackebrandt E. Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass Sphaerobacteridae in the phylum Actinobacteria to the class Thermomicrobia (emended description) in the phylum Chloroflexi (emended description) // *International journal of systematic and evolutionary microbiology* – 2004, 54(6), 2049-2051.

- 116.Huse S.M., Dethlefsen L., Huber J.A., Welch D.M., Relman D.A., & Sogin M.L. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing // PLoS genetics - 2008, 4(11), e1000255.
- 117.Hutchinson D.R., Golmshtok A.J., Zonenshain L.P., Moore T.C., Scholz C.A., & Klitgord K.D. Depositional and tectonic framework of the rift basins of Lake Baikal from multichannel seismic data // Geology - 1992, 20(7), 589-592.
- 118.Hutchinson R.D., Lee M.N., Scholz C.A. Golmshtok A.J., Jonson A.H. Lake Baikal: Gas hydrate character in an active rift lake // EOS - 1995, 76, 163.
- 119.Inagaki F., Suzuki M., Takai K., Oida H., Sakamoto T., Aoki K., Nealson K.H. & Horikoshi K. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk // Applied and Environmental Microbiology - 2003, 69(12), 7224-7235.
120. Inagaki F., Nunoura T., Nakagawa S., Teske A., Lever M., Lauer A., Suzuki M., Takai K., Delwiche M., Colwell F.S., Nealson K.H., Horikoshi K., D'Hondt S., Jørgensen B.B. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006, 21, 103(8), 2815-2820.
- 121.Iversen N., Jørgensen B.B. Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark) // Limnol. Oceanogr. – 1985, 30(5), 944-955.
- 122.Jannasch H.W., Wirsen C.O. Deep-sea microorganisms: in situ response to nutrient enrichment // Science – 1973, 180(4086), 641-643.
123. 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., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs // Nature - 2008, 10, 451(7175), 176-180.
- 124.Jørgensen B.B., Boetius A. Feast and famine—microbial life in the deep-sea bed // Nature Reviews Microbiology – 2007, 5(10), 770-781.
125. Jorgensen S.L., Hannisdal B., Lanzén A., Baumberger T., Flesland K., Fonseca R., Ovreås L., Steen I.H., Thorseth I.H., Pedersen R.B., Schleper C. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2012, 16, 109(42), E2846-2855.
126. Junier P., Molina V., Dorador C., Hadas O., Kim O.S., Junier T., Witzel J.P., Imhoff J.F. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment // Appl Microbiol Biotechnol. - 2010, 85(3), 425-440.

127. Keijser B.J., Zaura E., Huse S.M., van der Vossen J.M., Schuren F.H., Montijn R.C., ten Cate J.M., Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults // *J. Dent. Res.* - 2008, 87, 1016-1020.
128. Khelifi N., Grossi V., Hamdi M., Dolla A., Tholozan J.L., Ollivier B., & Hirschler-Réa A. Anaerobic oxidation of fatty acids and alkenes by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* // *Applied and environmental microbiology* - 2010, 76(9), 3057-3060.
129. Kirchman D.L., Cottrell M.T., Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes // *Environ. Microbiol.* - 2010, 12, 1132-1143.
130. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., & Trevors J. T. Methods of studying soil microbial diversity // *Journal of microbiological methods* - 2004, 58(2), 169-188.
131. Kittelmann S. & Friedrich M.W. Novel uncultured Chloroflexi dechlorinate perchloroethene to transdichloroethene in tidal flat sediments // *Environ Microbiol* – 2008, 10, 1557–1570.
132. Klerks Ya., Zemskaya T.I., Matveeva T.V., Khlystov O.M., Grachev M.A., Namsaraev B.B., Dagurova O.P., Golobokova L.P., Vorob'eva S.S., Pogodaeva T.P., Granin N.G., Kalmychkov G.V., Ponomarchuk V.A., Shoji H., Mazurenko L.L., Kaulio V.V., and Solov'ev V.A. Methane Hydrates in the Surface Layer of Deep-Water Sediments of Lake Baikal // *Dokl. Akad. Nauk*, 2003, 393(6), 822–826.
133. Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annual review of microbiology* – 2009, 63, 311-334.
134. Kniemeyer O., Fischer T., Wilkes H., Glöckner F.O., & Widdel F. Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium // *Applied and environmental microbiology* - 2003, 69(2), 760-768.
135. Kniemeyer O., Musat F., Sievert S.M., Knittel K., Wilkes H., Blumenberg M., Michaelis W., Classen A., Bolm C., Joye S.B., Widdel F. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria // *Nature* – 2007, 18, 449(7164), 898-901.
136. Koch K., Knoblauch C., Wagner D. Methanogenic community composition and anaerobic carbon turnover in submarine permafrost sediments of the Siberian Laptev Sea // *Environmental microbiology*. – 2009, 11(3), 657-668.
137. Kohno T., Sugimoto Y., Sei K., Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria // *Microbes and Environments* – 2002, 17(3), 114–121

- 138.Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A.
Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature* – 2005,
437(7058), 543-546.
- 139.Krause L., Diaz N. N., Edwards R. A., Gartemann Karl-Heinz, KrömekeH., Neuweiger H.,
Pühler A., Runte K. J., Schlüter A., Stoye J., Szczepanowski R., Tauch A. and Goesmann A.
Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community
isolated from a biogas reactor // *J. Biotechnology* - 2008, 136, 91-101
- 140.Kunin V., Engelbrektson A., Ochman H., Hugenholtz P. Wrinkles in the rare biosphere:
pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates // *Environ.
Microbiol.* – 2010, 12, 118-123
- 141.Kvenvolden K.A. A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate // *Organic
Geochemistry* - 1995, 23, 997–1008.
- 142.Kubo K., Lloyd K.G., Biddle J.F., Amann R., Teske A., & Knittel K. Archaea of the
Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine
sediments // *The ISME journal* - 2012, 6(10), 1949-1965.
- 143.Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. *Desulfobacula* Rabus, Nordhaus, Ludwig and Widdel
2000b, 1415 VP (Effective publication: Rabus, Nordhaus, Ludwig and Widdel 1993, 1450)
emend. Kuever, Könneke, Galushko and Drzyzga 2001, 176 // *Bergey's Manual® of
Systematic Bacteriology.* – Springer US, 2005, 968-969.
- 144.Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. *Desulfosarcina* Widdel 1981, 382 VP (Effective
publication: Widdel 1980, 382) // *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.* –
Springer US, 2005, 981-984.
- 145.Lake L.W. *Enhanced Oil Recovery* // Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1989.
- 146.LaMontagne M.G., Leifer I., Bergmann S., Van De Werfhorst L.C., & Holden P.A.
Bacterial diversity in marine hydrocarbon seep sediments // *Environmental microbiology* -
2004, 6(8), 799-808.
- 147.Leahy J.G., & Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment //
Microbiological reviews - 1990, 54(3), 305-315.
- 148.Lee J.W., Kwon K.K., Azizi A., Oh H.M., Kim W., Bahk J.J., Lee D.H. & Lee J.H.
Microbial community structures of methane hydrate-bearing sediments in the Ulleung
Basin, East Sea of Korea // *Marine and Petroleum Geology* - 2013, 47, 136-146.
- 149.Liebner S., Harder J., Wagner D. Bacterial diversity and community structure in polygonal
tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia // *International Microbiology* –
2008, 11(3), 195-202.

150. Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils // *Nature* - 2006, 17, 442(7104), 806-809.
151. Li D., Hendry P. Microbial diversity in petroleum reservoirs // *Microbiol Aust.* - 2008, 29, 25-27.
152. Liu Y., Whitman W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2008, 1125(1), 171-189.
153. Lloyd, K. G., Albert, D. B., Biddle, J. F., Chanton, J. P., Pizarro, O., & Teske, A. Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep // *PLoS One* – 2010, 5(1), e8738.
154. Lloyd K.G., Schreiber L., Petersen D.G., Kjeldsen K.U., Lever M.A., Steen A.D., Stepanauskas R., Richter M., Kleindienst S., Lenk S., Schramm A., Jørgensen B.B. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins // *Nature*. 2013, 11, 496(7444), 215-218.
155. Lomstein B.A., Langerhuus A.T., D'Hondt S., Jørgensen B.B., & Spivack A.J. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment // *Nature* - 2012, 484(7392), 101-104.
156. Lovley D.R., Baedeker M.J., Lonergan D.J., Cozzarelli I.M., Phillips E.J., & Siegel D.I. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction // *Nature* - 1989, 339(6222), 297-300.
157. Lovley D. R., Lonergan D. J. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15 // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1990, 56(6), 1858-1864.
158. Löffler FE, Yan J, Ritalahti KM, Adrian L, Edwards EA, Konstantinidis KT, Müller JA, Fullerton H, Zinder SH, Spormann AM. *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, 63(Pt 2), 625-635.
159. Lueders T., Chin K-J, Conrad R. & Friedrich M. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage // *Environ Microbiol* – 2001, 3, 194-204.

- 160.Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M.P., Smalla K., Torsvik V., & Nannipieri P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms // *Biology and Fertility of Soils* - 2004, 40(6), 363-385.
- 161.McDonald I.R., Bodrossy L., Chen Y., & Murrell J.C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs // *Applied and Environmental Microbiology* - 2008, 74(5), 1305-1315.
- 162.Magot M., Ollivier B., & Patel B.K. Microbiology of petroleum reservoirs // *Antonie van Leeuwenhoek* - 2000, 77(2), 103-116.
- 163.Marchesi J.R., Weightman A.J., Cragg B.A., Parkes R.J., & Fry J.C. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis // *FEMS Microbiology Ecology* - 2001, 34(3), 221-228.
- 164.Martens C.S., Berner R.A. Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments // *Science* – 1974, 185(4157), 1167-1169.
- 165.Martini A.M., Budai J.M., Walter L.M., Schoell M. Microbial generation of economic accumulations of methane within a shallow organic-rich shale // *Nature* - 1996, 383, 155-158.
- 166.Maymo-Gatell X., Chien Y.T., Gossett J.M., & Zinder S.H. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethane // *Science* - 1997, 276(5318), 1568-1571.
- 167.McKay W.A., Turner M.F., Jones B.M.R., Halliwell C.M. Emissions of hydrocarbons from marine phytoplankton – some results from controlled laboratory experiments // *Atmosph Environ.* - 1996, 30, 2583-2593.
- 168.Mehboob F., Junca H., Schraa G., & Stams A.J. Growth of *Pseudomonas chloritidismutans* AW-1T on n-alkanes with chlorate as electron acceptor // *Applied microbiology and biotechnology* - 2009, 83(4), 739-747.
- 169.Mehboob F., Weelink S., Saia F.T., Junca H., Stams A.J.M., Schraa G. Microbial degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons with (per)chlorate as electron acceptor / In: Timmis KN (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* // Springer, Berlin - 2010, 935–945.
- 170.Meng J., Xu J., Qin D., He Y., Xiao X., & Wang F. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses // *The ISME journal* – 2014, 8(3), 650-659.

171. Meyerdierks A., Kube M., Kostadinov I., Teeling H., Glöckner F.O., Reinhardt R., & Amann R. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group // *Environmental microbiology* - 2010, 12(2), 422-439.
172. Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel V., Blumenberg M., Knittel K., Gieseke A., Peterknecht K., Pape T., Boetius A., Amann R., Jørgensen B.B., Widdel F., Peckmann J., Pimenov N.V., Gulin M.B. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane // *Science* – 2002, 9, 297(5583), 1013-1015.
173. Middelboe M., Glud R. N., Filippini M. Viral abundance and activity in the deep sub-seafloor biosphere // *Aquatic Microbial Ecology* – 2011, 63(1), 1-8.
174. Milkov A.V., Dickens G.R., Claypool G.E., Lee Y.-J., Borowski W.S., Torres M.E., Xu W., Tomaru H., Tréhu A.M., Schultheiss P. Co-existence of gas hydrate, free gas, and brine within the regional gas hydrate stability zone at the southern summit of Hydrate Ridge (Oregon margin): evidence from prolonged degassing of a pressurized core // *Earth and Planetary Science Letters* - 2004, 222, 829–843.
175. Miller S.R., Strong A.L., Jones K.L., Ungerer M.C. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2009, 75, 4565–4572.
176. Mills H.J., Martinez R.J., Story S., & Sobecky P.A. Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA-and RNA-derived clone libraries // *Applied and environmental microbiology* - 2005, 71(6), 3235-3247.
177. Morasch B., Richnow H.H., Schink B., & Meckenstock R.U. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects // *Applied and Environmental Microbiology* - 2001, 67(10), 4842-4849.
178. Morasch B., Schink B., Tebbe C.C., & Meckenstock R.U. Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum* // *Archives of microbiology* - 2004, 181(6), 407-417.
179. Musat F., Galushko A., Jacob J., Widdel F., Kube M., Reinhardt R., Wilkes H., Schink B., Rabus R. Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria // *Environ Microbiol.* - 2009, 11(1), 209-219.
180. Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems // *Current Opinion in Microbiology* – 1999, 2(3), 317-322.
181. Muyzer G., Waal E.C. and Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl Environ Microbiol.* – 1993, 59, 695-700.

182. Muyzer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008, 6(6), 441-454.
183. Nakatsu C.H., Hristova K., Hanada S., Meng X.Y., Hanson J.R., Scow K.M., Kamagata Y. *Methylibium petroleiphilum* gen. nov., sp. nov., a novel methyl tert-butyl ether-degrading methylotroph of the Betaproteobacteria // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006, 56(Pt 5), 983-989.
184. Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. Microbial diversity and soil functions // *European Journal of Soil Science* - 2003, 54(4), 655-670.
185. Nawrocki E.P., Eddy S.R. Query-Dependent Banding (QDB) for Faster RNA Similarity Searches // *PLoS Comput. Biol.* – 2007, V.3, e56.
186. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001, 51(Pt 2), 433–446.
187. Nemati M., Jenneman G.E., & Voordouw G. Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs // *Biotechnology and bioengineering* - 2001, 74(5), 424-434.
188. Newberry C.J., Webster G., Cragg B.A., Parkes R.J., Weightman A.J., & Fry J.C. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190 // *Environmental Microbiology* - 2004, 6(3), 274-287.
189. Nunoura T., Inagaki F., Delwiche M.E., Colwell F.S., & Takai K. Subseafloor microbial communities in methane hydrate-bearing sediment at two distinct locations (ODP Leg204) in the Cascadia Margin // *Microbes Environ* - 2008, 23(4), 317-325.
190. Nunoura T., Soffientino B., Blazejak A., Kakuta J., Oida H., Schippers A., & Takai K. Subseafloor microbial communities associated with rapid turbidite deposition in the Gulf of Mexico continental slope (IODP Expedition 308) // *FEMS microbiology ecology* - 2009, 69(3), 410-424.

191. Oremland R. S., Polcin S. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments // *Applied and Environmental Microbiology* – 1982, 44(6), 1270-1276.
192. Oremland R.S. Biogeochemistry of methanogenic bacteria / In *Biology of Anaerobic Microorganisms* // Edited by Zehnder A.J.B. New York: John Wiley & Sons; 1988, 641-705.
193. Orcutt B.N., Sylvan J.B., Knab N.J., & Edwards K.J. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor // *Microbiology and Molecular Biology Reviews* - 2011, 75(2), 361-422.
194. Orphan V., Taylor L., Hafenbradi D., Delong E. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs // *Appl Environ Microbiol.* – 2000, 66, 700-711.
195. Orsi W.D., Edgcomb V.P., Christman G.D., & Biddle J.F. Gene expression in the deep biosphere // *Nature* - 2013, 499(7457), 205-208.
196. Parkes R.J., Cragg B.A., Fry J.C., Herbert R.A., Wimpenny J.W.T., Allen J.A., & Whitfield M. Bacterial Biomass and Activity in Deep Sediment Layers from the Peru Margin (and Discussion) // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* - 1990, 331(1616), 139-153.
197. Parkes R.J., Cragg B.A., Bale S.J., Getliff J.M., Goodman K., Rochelle P.A., Fry J.C., Weightman A.J. & Harvey S.M. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments // *Nature* - 1994, 371(6496), 410-413.
198. Parkes R.J., Cragg B.A., Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review // *Hydrogeology Journal.* – 2000, 8(1), 11-28.
199. Parkes R.J., Sellek G., Webster G., Martin D., Anders E., Weightman A.J., & Sass H. Culturable prokaryotic diversity of deep, gas hydrate sediments: first use of a continuous high- pressure, anaerobic, enrichment and isolation system for subseafloor sediments (DeepIsoBUG) // *Environmental microbiology* - 2009, 11(12), 3140-3153.
200. Parkes R.J., Cragg B., Roussel E., Webster G., Weightman A., & Sass H. A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions // *Marine Geology* - 2014.
201. Paull C.K., Chanton J.P., Neumann C.A., Coston J.A., Martens C.S., & Showers W. Indicators of methane-derived carbonates and chemosynthetic organic carbon deposits: examples from the Florida // Escarpment. *Palaios* - 1992, 7(4), 361-375.
202. Pernthaler A., Dekas A.E., Brown C.T., Goffredi S.K., Embaye T., & Orphan V.J. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and

- metagenomics // *Proceedings of the National Academy of Sciences* - 2008, 105(19), 7052-7057.
203. Pilloni G., von Netzer F., Engel M., & Lueders T. Electron acceptor- dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar- oil- contaminated aquifer by Pyro- SIP // *FEMS microbiology ecology* - 2011, 78(1), 165-175.
 204. Prosser J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms // *Plant and Soil*. – 2002, 244(1-2), 9-17.
 205. Quince C., Lanzen A., Curtis T.P., Davenport R.J., Hall N., Head I.M., Read L.F., Sloan W.T. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data // *Nat Methods*. - 2009, 6, 639–641.
 206. Quince C., Lanzen A., Davenport R.J., Turnbaugh P.J. Removing noise from pyrosequenced amplicons // *BMC Bioinformatics* - 2011, 12, 38.
 207. Rabus R., Nordhaus R., Ludwig W., & Widdel F. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium // *Applied and environmental microbiology* - 1993, 59(5), 1444-1451.
 208. Rabus R. Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1 // *Appl Microbiol Biot.* – 2005, 68, 580–587.
 209. Rabus R., Wilkes H., Schramm A., Harms G., Behrends A., Amann R., Widdel F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of Proteobacteria // *Environ. Microbiol.* – 1999, 1, 145–157.
 210. Ranjard L., Poly F., Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment // *Research in Microbiology* – 2000, 151(3), 167-177.
 211. Reeburgh W.S. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments // *Earth and Planetary Science Letters* – 1976, 28(3), 337-344.
 212. Reeburgh W.S. Anaerobic methane oxidation: rate depth distributions in Skan Bay sediments // *Earth and Planetary Science Letters* – 1980, 47(3), 345-352.
 213. Reed D.W., Fujita Y., Delwiche M.E., Blackwelder D.B., Sheridan P.P., Uchida T., & Colwell F.S. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin // *Applied and Environmental Microbiology* - 2002, 68(8), 3759-3770.
 214. Reinhold-Hurek B., Hurek T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus*

- gen. nov., sp. nov. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2000, 50(2), 649-659.
- 215.Reinhold-Hurek B., Tan Z., Hurek T. Azoarcus Reinhold-Hurek, Hurek, Gillis, Hoste, Vancanneyt, Kersters and De Ley 1993b, 582 VP //Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. – Springer US, 2005, 890-901.
 - 216.Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A., Farmerie W.G., Triplett E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // ISME J. - 2007, 1, 283-290
 - 217.Roussel E.G., Bonavita M. A.C., Querellou J., Cragg B.A., Webster G., Prieur D., & Parkes R.J. Extending the sub-sea-floor biosphere // Science - 2008, 320(5879), 1046-1046.
 - 218.Roussel E.G., Sauvadet A.L., Chaduteau C., Fouquet Y., Charlou J.L., Prieur D., & Bonavita M.A.C. Archaeal communities associated with shallow to deep subseafloor sediments of the New Caledonia Basin // Environmental microbiology - 2009, 11(9), 2446-2462.
 - 219.Rueter P., Rabus R., Wilkest H., Aeckersberg F., Rainey F.A., Jannasch H.W., & Widdel, F. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria // Nature - 1994, 372(6505), 455-458.
 - 220.Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA – 1989.
 - 221.Scheller S., Goenrich M., Thauer R.K., & Jaun B.M. Methyl-Coenzyme M Reductase from Methanogenic Archaea: Isotope Effects on the Formation and Anaerobic Oxidation of Methane // J Am Chem Soc. – 2013, 135(40), 14975-14984.
 - 222.Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997, 61, 262–280.
 - 223.Schirmer A., Rude M.A., Li X., Popova E., del Cardayre S.B. Microbial Biosynthesis of Alkanes // Science – 2010, 329, 559-562.
 - 224.Schreiber L., Holler T., Knittel K., Meyerdierks A., & Amann R. Identification of the dominant sulfate- reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME- 2 clade // Environmental microbiology - 2010, 12(8), 2327-2340.
 - 225.Sei K., Sugimoto Y., Mori K., Maki H., Kohno T. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes // Environ Microbiol. – 2003, 5(6), 517-522
 226. Selesi D., Meckenstock R.U. Anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon biphenyl by a sulfate-reducing enrichment culture // FEMS microbiology ecology – 2009, 68(1), 86-93.

227. Shelobolina E.S., Vrionis H.A., Findlay R.H., & Lovley D.R. *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation // International journal of systematic and evolutionary microbiology - 2008, 58(5), 1075-1078.
228. Shinoda Y., Akagi J., Uchihashi Y., Hiraishi A., Yukawa H., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N. Anaerobic degradation of aromatic compounds by magnetospirillum strains: isolation and degradation genes // Biosci Biotechnol Biochem. – 2005, 69(8), 1483-1491.
229. Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Chernitsyna S.M., Khlystov O.M., Triboi T.I. The first results of an investigation into the phylogenetic diversity of microorganisms in southern Baikal sediments in the region of subsurface discharge of methane hydrates // Microbiology - 2005, 74(3), 314–320
230. Simoneit B.R.T., Aboul-Kassim T.A.T., Tiercelin J.J. Hydrothermal petroleum from lacustrine sedimentary organic matter in the East African Rift // Appl. Geochem. – 2000, 15, 355-368.
231. Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Beilen J.B. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria // J. Bacteriol. – 2002, 184, 1733–1742.
232. So C.M., Young L.Y. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes // Applied and Environmental Microbiology – 1999, 65(7), 2969-2976.
233. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2006, 8, 103(32), 12115-12120.
234. Song B., Häggblom M.M., Zhou J., Tiedje J.M., & Palleroni N.J. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluovorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. // International journal of systematic bacteriology - 1999, 49(3), 1129-1140.
235. Söhngen N.L. Benzin, petroleum, paraffinöl und paraffin als kohlenstoff-und energiequelle für mikrobe // Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. – 1913, 37, 595-609.
236. Sørensen K.B., Lauer A., Teske A. Archaeal phylotypes in a metal- rich and low activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201, Site 1231 // Geobiology. – 2004, 2(3), 151-161.
237. Spormann A.M., Widdel F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes and other hydrocarbons in anaerobic bacteria // Biodegradation. – 2000, 11, 85-105
238. Springer E., Sachs M.S., Woese C.R., & Boone D.R. Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family

- Methanosarcinaceae // International journal of systematic bacteriology - 1995, 45(3), 554-559.
- 239.Staats M., Braster M., Röling W.F.M. Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume // Environmental microbiology – 2011, 13(5), 1216-1227.
 - 240.Swannell R.P.J., Lee K., McDonagh M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation // Microbiol. Rev. - 1996, 60, 342-365.
 - 241.Takai K., Moser D.P., DeFlaun M., Onstott T.C., & Fredrickson J.K. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines // Applied and Environmental Microbiology - 2001, 67(12), 5750-5760.
 - 242.Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Nomaki H., Morono Y., Inagaki F., Kitazato H., Hinrichs K.-U. & Ohkouchi N. Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea // Nature Geoscience - 2010, 3(12), 858-861.
 - 243.Tas N., van Eekert M.H.A., de Vos W.M. & Smidt H. The little bacteria that can – diversity, genomics and ecophysiology of ‘Dehalococcoides’ spp. in contaminated environments // Microbial Biotechnology – 2010, 3, 389–402.
 - 244.Taupp M., Constan L., Hallam S.J. The biochemistry of anaerobic methane oxidation // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. – Springer Berlin Heidelberg, 2010, 887-907.
 - 245.Teske A.P. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys // Geomicrobiology Journal – 2006, 23(6), 357-368.
 - 246.Teske A., Sørensen K.B. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? // The ISME journal. – 2008, 2(1), 3-18.
 - 247.Thauer R.K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson // Microbiology - 1998, 144, 2377-2406.
 - 248.Theron J., Cloete T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments // Critical Reviews in Microbiology – 2000, 26(1), 37-57.
 - 249.Tierney M., Young L. Y. Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. – Springer Berlin Heidelberg, 2010, 925-934.
 - 250.Tissot BP, Welte DH: Petroleum formation and occurrence. 2nd Edition. 1984, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 - 251.Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res. – 1997, 24, 4876–4882.

252. Tor J.M., Lovley D.R. Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe (III) reduction by *Ferroglobus placidus* // *Environmental microbiology* – 2001, 3(4), 281-287.
253. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest // *Nature* – 2006, 444, 1027-1031.
254. Tyson R.V. *Sedimentary organic matter*. London: Chapman & Hall; 1995.
255. van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment // *Oil Gas Sci. Technol.* – 2003, 58, 427–440.
256. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Appl. Biosci.* – 1994, 10, 569-570.
257. Urukawa H., Kita-Tsukamoto K., Ohwada K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis // *Microbiology.* – 1999, 145, 3305-3315.
258. Wardlaw G.D., Arey J.S., Reddy C.M., Nelson R.K., Ventura G.T., & Valentine D.L. Disentangling oil weathering at a marine seep using GC× GC: Broad metabolic specificity accompanies subsurface petroleum biodegradation // *Environmental science & technology* - 2008, 42(19), 7166-7173.
259. Wasmund K., Schreiber L., Lloyd K.G., Petersen D.G., Schramm A., Stepanauskas R., Jørgensen B.B., Adrian L. Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface *Dehalococcoidia*, phylum *Chloroflexi* // *ISME J.* – 2014, 8(2), 383-97.
260. Webster G., Parkes R.J., Fry, J. C., & Weightman, A. J. Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments // *Applied and environmental microbiology* - 2004, 70(9), 5708-5713.
261. Webster G., Parkes R.J., Cragg B.A., Newberry C.J., Weightman A.J., & Fry J.C. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin // *FEMS microbiology ecology* - 2006, 58(1), 65-85.
262. Webster G., Blazejak A., Cragg B.A., Schippers A., Sass H., Rinna J., Tang X., Mathes F., Ferdelman T.G., Fry J.C., Weightman A.J., Parkes R.J. Subsurface microbiology and biogeochemistry of a deep, cold-water carbonate mound from the Porcupine Seabight (IODP Expedition 307) // *Environ Microbiol.* – 2009, 11(1), 239-257.
263. Webster G., Rinna J., Roussel E.G., Fry J.C., Weightman A.J., & Parkes R.J. Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK, revealed by stable- isotope probing // *FEMS microbiology ecology* - 2010, 72(2), 179-197.

264. Weelink S.A.B., Van Doesburg W., Saia F.T., Rijpstra W.I.C., Röling W.F.M., Smidt H. & Stams A.J.M. A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor // *FEMS Microbiol Ecol* – 2009, 70, 575–585.
265. Whelan J.K., Oremland R.S., Tarafa M., Smith R., Howarth R.W., & Lee C. Evidence for sulfate-reducing and methane-producing microorganisms in sediments from sites 618, 619, and 622 // *Initial Reports Deep Sea Drilling Project Leg* - 1986, 96, 767-775.
266. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: the unseen majority // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1998, 95, 12, 6578-6583.
267. Widdel F., Grundmann O. Biochemistry of the anaerobic degradation of non-methane alkanes // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. – Springer Berlin Heidelberg – 2010, 909-924.
268. Widdel F., Musat F. Energetic and other quantitative aspects of microbial hydrocarbon utilization // *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. – Springer Berlin Heidelberg – 2010, 729-763.
269. Widdel F., Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons // *Current Opinion in Biotechnology* - 2001, 12, 259–276.
270. Wilkinson E.R. California offshore oil and gas seeps // *California Division of Oil and Gas* – 1972, 5, 11.
271. Yagi J.M., Suflita J.M., Gieg L.M., DeRito C.M., Jeon C.O., & Madsen E.L. Subsurface cycling of nitrogen and anaerobic aromatic hydrocarbon biodegradation revealed by nucleic acid and metabolic biomarkers // *Applied and environmental microbiology* - 2010, 76(10), 3124-3134.
272. Yakimov M.M., Golyshin P.N., Lang S., Moore E.R., Abraham W.R., Lünsdorf H., & Timmis K.N. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium // *International Journal of Systematic Bacteriology* - 1998, 48(2), 339-348.
273. Yamada T., Sekiguchi Y., Hanada S., Imachi H., Ohashi A., Harada H., & Kamagata Y. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi* // *International journal of systematic and evolutionary microbiology* - 2006, 56(6), 1331-1340.

274. Yoshioka H., Maruyama A., Nakamura T., Higashi Y., Fuse H., Sakata S., & Bartlett D.H. Activities and distribution of methanogenic and methane- oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin // *Geobiology* - 2010, 8(3), 223-233.
275. Zakharova Y.R., Galachyants Y.P., Kurilkina M. I., Likhoshvay A.V., Petrova D.P., Shishlyannikov S.M., Ravin N.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V. & Likhoshvay Y.V. The Structure of Microbial Community and Degradation of Diatoms in the Deep Near-Bottom Layer of Lake Baikal // *PLoS ONE* - 2013, 8(4).
276. Zárate-del Valle P.F., Simoneit B.R.T. Hydrothermal bitumen generated from sedimentary organic matter of rift lakes – Lake Chapala, Citala Rift, Western Mexico // *Appl. Geochem.* – 2005, 20, 2343-2350.
277. Zedelius J., Rabus R., Grundmann O., Werner I., Brodkorb D., Schreiber F., Ehrenreich P., Behrends A., Wilkes H., Kube M., Reinhardt R., Widdel F. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environ Microbiol Rep.* 2011;3(1):125-135.
278. Zengler K., Richnow H.H., Rosselló-Mora R., Michaelis W., Widdel F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms // *Nature* - 1999, 401, 266-269.
279. Zhang G., Tian J., Jiang N., Guo X., Wang Y. & Dong X. Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I // *Environ Microbiol* – 2008, 10, 1850–1860.
280. Zhou J., Fries M. R., Chee-Sanford J. C., & Tiedje J. M. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. // *International journal of systematic bacteriology* - 1995, 45(3), 500-506.