

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

(ТОИ ДВО РАН)

*На правах рукописи*

**Еськова Алёна Игоревна**

**СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИЕ И НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ  
ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ЯПОНСКОГО МОРЯ**

03.02.03. Микробиология

Диссертационная работа на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
**Пономарева Анна Леонидовна**

Владивосток - 2021

## Оглавление

Введение .....	5
Обзор литературы .....	12
Глава 1. Микробное разнообразие в донных отложениях морей и в местах нефте- и газопроявлений .....	12
1.1. Биоразнообразие микробных сообществ в морских донных отложениях.....	12
1.2. Биоразнообразие микробных сообществ нефтяных месторождений морей....	13
1.3. Биоразнообразие микробных сообществ газогидратных залежей и зон выходов флюидов в донных отложениях морей.....	16
1.4. Анаэробное окисление углеводородов. Роль сульфатредуцирующих бактерий в морских экосистемах .....	19
1.5. Биоразнообразие микробных сообществ донных отложений морей Дальнего Востока (Берингово, Охотское, Японское) и Японского моря в частности .....	21
Глава 2. Объекты исследования, материалы и методы.....	26
2.1 Район исследования .....	26
2.1.1. Геолого-гидрогеохимическая характеристика северной части Японского моря.....	26
2.1.2. Газогеохимические исследования донных отложений исследуемого района (по отчетам экспедиций ТОИ ДВО РАН).....	28
2.2. Материалы исследования .....	35
2.3. Методы исследования .....	37
2.3.1. Молекулярно-генетические методы.....	37
2.3.1.1. Определение наличия функциональных генов методом вложенной ПЦР в пробах донных отложений. Выделение суммарной ДНК из проб донных отложений.....	37
2.3.1.2. Выделение хромосомной ДНК .....	39
2.3.1.3. Высокопроизводительное секвенирование участка гена 16S рРНК.....	39
2.3.1.4. Определение геномных последовательностей.....	40
2.3.1.5. Определение спектра плазмид.....	40

2.3.2. Микробиологические методы.....	41
2.3.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования.....	41
2.3.2.2. Определение физиолого-биохимических свойств штаммов.....	42
2.3.2.3. Культивирование <i>Desulfosporosinus</i> sp. nov.....	44
2.3.2.4. Изучение субстратной специфичности <i>Desulfosporosinus</i> sp. nov.....	44
2.3.3. Химические методы .....	45
2.3.3.1. Определение степени биodeградации углеводов флуориметрическим и хромато-масс-спектрометрическими методами .....	45
2.3.3.2. Определение концентрации сероводорода .....	47
2.3.3.3. Определение сульфат-ионов в донных отложениях.....	47
2.3.3.4. Определение метиловых эфиров жирных кислот.....	49
2.3.3.5. Определение ионов двухвалентного железа .....	49
2.3.3.6. Анализ дыхательных хинонов .....	49
2.3.3.7. Методика определения нитритов с реактивом Грисса .....	50
2.3.4. Микроскопические методы.....	50
2.3.5. Филогенетический анализ.....	51
2.3.6. Статистическая обработка данных.....	53
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	54
3.1. Распределение функциональных биоиндикаторных генов аэробной и анаэробной биodeградации углеводов нефти в донных отложениях северной части Японского моря.....	54
3.2. Таксономическое разнообразие и физиологические свойства углеводородокисляющих бактерий, выделенных из верхней части окисленного слоя донных отложений в районах присутствия и отсутствия газогидратов в северной части Японского моря.....	56
3.2.1. Физиологические и биохимические свойства нефтеокисляющих штаммов, выделенных из донных отложений северной части Японского моря.....	62
3.2.2. Обнаружение функциональных генов аэробной и анаэробной деградации углеводов в нефтеокисляющих штаммах, выделенных из донных отложений северной части Японского моря.....	67

3.3. Углеводородокисляющая активность бактерий, выделенных из верхней части донных отложений северной части Японского моря.....	68
3.3.1. Особенности деструкции углеводов выделенными штаммами в аэробных и анаэробных условиях.....	70
Глава 4. Выделение углеводородокисляющих сульфатредуцирующих бактерий из донных отложений северной части Японского моря. Новый вид <i>Desulfosporosinus</i> sp.nov. SRJS8 .....	74
4.1. Выделение нового вида сульфатредуцирующей бактерии рода <i>Desulfosporosinus</i> .....	74
4.2. Геносистематические характеристики штамма.....	76
4.3. Морфология штамма <i>Desulfosporosinus</i> sp.nov.SRJS8 .....	77
4.4. Особенности роста при различной температуре, солености и pH.....	78
4.5. Рост культур на различных субстратах.....	78
4.6. Липидный анализ .....	80
4.7. Содержание менахинонов.....	81
4.8. Оценка способности к биodeградации углеводов <i>Desulfosporosinus</i> sp. nov. SRJS8.....	82
Заключение.....	84
Выводы .....	88
Список литературы .....	90
Приложение 1 .....	105
Приложение 2.....	106
Приложение 3.....	136
Приложение 4.....	137
Приложение 5.....	138

## Введение

Глубоководные донные отложения морей составляют большую часть поверхности Земли и представляют собой сложные системы, в которых происходит взаимодействие геологических, гидрогеологических, физико-химических и биологических процессов (Köster, Meyer-Reil, 2001). Морские отложения играют важную роль в круговороте веществ, в частности, в глобальном круговороте углерода и сопряженных с ним циклов (Kirkpatrick et al., 2019). Микроорганизмы, способные к использованию углеводов в качестве единственного источника углерода, являются неотъемлемой частью морской среды (Bian et al., 2015). В отношении к микробиологическому сообществу естественные газо - и нефтепроявления в морях могут рассматриваться как источники углерода и энергии для жизнедеятельности микроорганизмов.

Естественные газо - и нефтепроявления в морях – это сложное геологическое явление, которое оказывает ведущее средообразующее действие на формирование микробиомов морских донных отложений. В первую очередь, на бактерии, способные к окислению метана и других углеводов и сопряженных с ними в биогеохимических циклах сульфатредукторов (Беляев, 1981; Леин, Иванов, 2009). Сообщества микроорганизмов, встречающиеся в таких районах, обладают специфическими функциями и жестко структурированы как по глубине, так и по мере удаленности от сипа (от англ. seep – просачивание). Высокая экологическая пластичность и биоразнообразие углеводородокисляющих бактерий позволяют предположить возможность переключения их, в зависимости от условий, на потребление метана и других углеводов (Ehrlich et al., 2015).

Газогидраты – сравнительно новый тип углеводородной залежи, в котором, по оценкам специалистов, сосредоточены большие объемы газа (Обжиров и др., 2015). Они образуются в условиях благоприятного сочетания низких температур и высокого давления в морских донных отложениях при высоких концентрациях природного газа в пористой и трещиноватой осадочной среде и на поверхности дна. Существуют единичные сообщения о филумах некультивируемых микроорганизмов, обнаруживаемых только в районах открытия газогидратов

(Lanoil et al., 2001; Case et al., 2015). В районах газо-флюидных потоков на дне океана характерно одновременное действие множества факторов, и только использование методов биоиндикации позволяет оценить их суммарное воздействие на экосистему.

Основными методами в области биоиндикации в настоящее время являются фиксирование изменения свойств культивируемых форм биоиндикаторных групп бактерий и обнаружение функциональных генов, участвующих в биодegradации углеводов.

Существует большое количество работ по изучению аэробного и анаэробного окисления углеводов микроорганизмами, выделенными из нефтяных и газовых месторождений морей. По данным литературы, наиболее часто из нефтяных месторождений выделяют бактерии, относящиеся к типу Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria (Li et al., 2007; Silva et al., 2013).

Углеводы интенсивнее поддаются деструкции микроорганизмами в присутствии кислорода (Назина и др., 2020); однако в местах нефте- и газопроявлений доминирует анаэробная деструкция углеводов (Adams et al., 2013; Singh et al., 2017). По сообщению ряда авторов, основную роль в анаэробной деструкции органического вещества играют сульфатредуцирующие бактерии (Kniemeyer et al., 2007, Spiegelman et al., 2015).

На дальневосточные моря оказывают влияние нефтяные загрязняющие вещества как техногенного, так и природного происхождения (Журавель и др., 2004; Бузолева и др., 2008; Шакиров и др., 2019). Тем не менее, в литературе мало данных, касающихся исследований микробных сообществ, связанных с деструкцией углеводов нефти в донных отложениях. Чаще всего в донных отложениях исследуется микробное разнообразие в целом на основе изучения генетического материала и проводятся работы по исследованию микробиоты поверхностных вод (Бузолева и др., 2008) с целью выделения штаммов, использование которых возможно в биоремедиации в случае техногенного загрязнения углеводородами.

Северная часть Японского моря представляет особый интерес для исследования из-за особенностей геологического строения и как район обнаружения газогидратов в пределах юго-западного склона о. Сахалин (Шакиров и др., 2019). В районе северного замыкания глубоководной Центральной котловины Японского моря газогидраты еще не установлены, но отмечаются аномально высокие концентрации метана в газосодержащих слоях и сейсмические признаки газогидратоносных отложений (Шакиров и др., 2019). Разные условия в районах обнаружения и отсутствия газогидратов влияют на формирование микробиомов морских донных отложений. Обнаружение различий в культивируемом углеводородокисляющем микробиоме в районах присутствия и отсутствия газогидратов имеет большие перспективы в их использовании в качестве биоиндикаторов и для понимания микробных процессов, происходящих в донных отложениях.

**Цель работы:** исследование разнообразия культивируемых нефтеокисляющих и сульфатредуцирующих микроорганизмов и их физиологических свойств в верхней части восстановленного слоя донных отложений северной части Японского моря газогидратного и негазогидратного районов.

**Основные задачи** исследования:

1. Оценить встречаемость генов-биоиндикаторов деструкции углеводов с помощью вложенной ПЦР с праймерами, специфичными на функциональные гены, отвечающие за аэробное и анаэробное окисление углеводов, в газогидратном районе и в районе, где газогидраты обнаружены не были.

2. Получить накопительные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов; провести сравнительный анализ видового, физиологического и плазмидного разнообразия культивируемых нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из верхней части донных отложений северной части Японского моря в зависимости от присутствия газогидратов.

3. Изучить наличие функциональных генов аэробной и анаэробной деструкции углеводов в выделенных штаммах, культивируемых нефтеокисляющих микроорганизмов.

4. Выявить способность выделенных штаммов утилизировать углеводороды в аэробных и анаэробных условиях.

5. Оценить встречаемость генов *dsrB* в донных отложениях исследуемых районов. Получить накопительные культуры сульфатредуцирующих микроорганизмов, способных к деструкции углеводов. Дать полное описание чистой культуры, способной одновременно и к окислению углеводов, и к восстановлению сульфатов.

**Научная новизна.** Впервые проведено сравнение культивируемой нефтеокисляющей микробиоты в донных отложениях в зависимости от присутствия газогидратов. Выявлена приуроченность представителей семейства Nocardiaceae филума Actinobacteria к районам обнаружения газогидратов. Создана коллекция штаммов, способных к биодegradации нефти, выделенных из аномальных газовых полей в донных отложениях северной части Японского моря. Впервые для 38 выделенных бактерий родов *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* показана способность окислять углеводороды нефти как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Из донных отложений северной части Японского моря выделен новый вид сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfosporosinus*. Впервые у представителя рода *Desulfosporosinus* отмечена способность к дegradации углеводов.

**Связь работы с научными программами.** Работа выполнена в рамках темы Госзадания: 2019-2023, 0211-2021-0012 «Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, геохимических, геологических процессов и ресурсов Мирового океана», № гос. рег. АААА-А19-119122090009-2; при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-34-50075 «Сульфатредуцирующие и нефтеокисляющие бактерии донных отложений Японского моря и Татарского

пролива» (руководитель д.б.н., заведующая лабораторией анаэробных микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) Щербакова В.А.), в рамках программы академической мобильности «Всероссийский конкурс молодежных проектов стратегии социально-экономического развития «России – 2035»; в составе рабочей группы по газогидратам и потокам метана в Индо-Тихоокеанском регионе в Подкомиссии МОК по западной части Тихого океана Юнеско (WG007 IOCWESTAC), а также в рамках проекта, входящего в Десятилетие Наук об Океане под названием «Geosystems and mineral resources in the transition «Continent-Ocean» Zones and open ocean, (GEOMIR, Id 164), 2021-2030 (рук. д.г.-м.н. Шакиров Р.Б.).

**Практическая значимость.** Выделенные виды микроорганизмов могут быть использованы в биоремедиационных мероприятиях. Нефтеокисляющие бактерии представителей семейства Nocardiaceae могут выступать в роли биоиндикаторов газогидратов. Выделенные и описанные в работе новые штаммы микроорганизмов помещены в российскую (VKM) и зарубежную (NCBI) коллекции микроорганизмов и доступны для научной общественности как объекты для дальнейших исследований.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Видовое разнообразие, физиологические свойства и способность к биодegradации углеводородов, культивируемых нефтеокисляющих бактерий, выделенных из донных отложений в районе обнаружения газогидратов, имели существенные различия с микроорганизмами, выделенными в районе, где газогидраты не были обнаружены.

2. Представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* обладали способностью окислять нефть в аэробных и анаэробных условиях.

3. Новый вид культивируемой сульфатредуцирующей бактерии, отнесенный к роду *Desulfosporosinus*, способный к окислению углеводов в анаэробных условиях, выделен в районе залежей газогидратов.

**Личный вклад автора.** Разработка методов и экспериментальные исследования, представленные в диссертации, проводились как лично автором, так и при непосредственном участии автора. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, морских экспедициях, обработке экспериментальной информации, обсуждениях и опубликовании результатов.

**Достоверность полученных результатов подтверждается:** использованием современных средств регистрации и методов обработки результатов; воспроизводимостью полученных результатов при повторении условий экспериментов и сравнением результатов с данными других исследований.

**Апробация работы.** Материалы работы представлены на российских и международной конференциях: «Всероссийская научная конференция с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, ПГНИУ, 2021), «IX конференция молодых ученых «Океанологические исследования-2021» (Владивосток, ТОИ ДВО РАН, 2021), международная молодежная конференция Kazan Golovkinsky Stratigraphic Meeting: Sedimentary Earth Systems: Stratigraphy, Geochronology, Petroleum Resources – 2019 (Казань, КФУ, 2019).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ: 6 статей в журналах, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science, а также 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК РФ; 1 глава в монографии, зарегистрирован 1 РИД; отдельные фрагменты работы отражены в 4 тезисах докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 138 страницах, содержит 6 таблиц и

иллюстрирована 24 рисунками. Список литературы включает 127 наименований, из них 95 на иностранных языках.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за постоянную помощь, внимание и поддержку при выполнении работы научному руководителю – к.б.н., с.н.с. лаборатории комплексных исследований окружающей среды и минеральных ресурсов Пономаревой А.Л., д.г.-м. н., профессору Обжирову А.И., д.г.-м.н., доценту Шакирову Р.Б., к.х.н. Полонику Н.С., к.г.-м.н. Сырбу Н.С., м.н.с. Легкодимову А.А., м.н.с. Калгину В.Ю. Автор искренне благодарит всех коллег лаборатории газогеохимии и лаборатории комплексных исследований окружающей среды и минеральных ресурсов ТОИ ДВО РАН за активное участие в различных этапах работы. Автор признательна научному составу экспедиций ТОИ ДВО РАН за совместную работу и возможность получения необходимого материала. Особую признательность автор выражает д.б.н. Щербаковой В.А., к.б.н. Рыжмановой Я.В., Трубицину В.Э. и всем сотрудникам лаборатории анаэробных микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) за помощь в получении анаэробных сульфатредуцирующих бактерий, интересные идеи и ценные советы. Отдельную благодарность автор выражает д.м.н., профессору Мартыновой А.В., к.б.н. Богатыренко Е.А., к.б.н. Сидоренко М.Л., Ким А.В. за помощь при написании диссертации и конструктивную критику. Автор благодарен к.м.н. Кузнецовой Н.А. за помощь в определении спектра плазмид бактерий.

## Обзор литературы

### Глава 1. Микробное разнообразие в донных отложениях морей и в местах нефте- и газопроявлений

#### 1.1. Биоразнообразие микробных сообществ в морских донных отложениях

Распределение микроорганизмов в глубоководных средах обитания хорошо изучено от арктических донных отложений в Тихом океане (Li et al., 2009) до континентальной окраины Сибири (Bienhold et al., 2012), восточных отложений Южной Атлантики у побережья Анголы (Schauer et al., 2010) и покмарков юго-западной части Атлантического океана у побережья Бразилии (Giongo et al., 2015).

Таксономический состав микробных сообществ донных отложений различных акваторий Мирового океана показан в работе Хошино с соавторами (Hoshino et al., 2020) и отражает достаточно полную картину микроорганизмов, населяющих осадочные толщи. Для исследования микробного разнообразия ими были проанализированны пробы осадочных толщ с горизонтов до 678 м от поверхности морского дна. Анализ гена 16S рРНК показал, что в донных отложениях бактериальные и архейные сообщества отличаются в зависимости от содержания или отсутствия кислорода. Среди Archaea доминируют: Crenarchaeota, (включая Bathyarchaeia), Euryarchaeota, Asgardaeota. Euryarchaeota и Asgardaeota многочисленны в донных отложениях Балтийского моря. В некоторых образцах из Японского моря, Тихого океана, вблизи Перу и у полуострова Симокита представители Nadesarchaeaeota составляют более 70% сообщества архей, а их численность увеличивается с глубиной.

Среди Bacteria преобладают представители Proteobacteria, в том числе Alphaproteobacteria, Betaproteobacteriales (Gammaproteobacteria) и Firmicutes. В условиях отсутствия кислорода преобладают Atribacteria, Chloroflexi и Planctomycetes. Однако некоторые бескислородные осадочные толщи, например, в Бенгальском заливе, населены бактериальными

сообществами, обычно живущими в присутствии кислорода. При этом в пробах, полученных из моря Лаптевых, было обнаружено, что наибольшее число представителей отнесены к филуму Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria. На уровне классов распределение было следующим: Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria и Acidobacteria.

## **1.2. Биоразнообразие микробных сообществ нефтяных месторождений морей**

В Мировом океане в пределах семи регионов (Северный Ледовитый океан, Южная Атлантика, Северная Атлантика, восточная часть Индийского океана, западная часть Индийского океана, западная часть Тихого океана, восточная часть Тихого океана) установлено более 70 нефтегазоносных бассейнов или провинций. Давно известно, что микроорганизмы способны обитать в экстремальных условиях, включая глубоководные нефтяные месторождения (Sierra-Garcia et al., 2017), обычно характеризующиеся высокой температурой, высокими концентрациями солей, давлением, присутствием тяжелых металлов и органических растворителей (Youssef et al., 2009). К таким микроорганизмам могут относиться мезофильные и термофильные бактерии, а также археи, способные обладать потенциалом метаболизма органических и неорганических соединений (Magot et al., 2000). Следовательно, микроорганизмы, населяющие такие ниши, считаются адаптированными к суровым условиям и могут обладать ферментативными механизмами, представляющими интерес для науки или промышленности (Wentzel et al., 2013).

Изучение разнообразия микробных сообществ как в образцах нефти, так и в пробах донных отложений морей, связанных с местами нефтепроявлений, отражено в ряде исследований (Orphan et al., 2000; Kobayashi et al., 2012; Silva et al., 2013 и др.). В основном, представители, населяющие донные отложения, представлены бактериями (Wang et al., 2006; Tang et al., 2012), археями (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Tang et al., 2012); помимо бактерий и архей встречаются

грибы (Orsi et al., 2013; Ciobanu et al., 2014; Нечай и др., 2015), реже встречаются дрожжи (Рябцева и др., 2016).

Культивируемые углеводородокисляющие микроорганизмы месторождений морфологически разнообразны: среди них встречаются палочки как грамположительные (Salinas et al., 2004), так и грамотрицательные (Hao et al., 2004); кокки выделяют в чистую культуру реже (Li et al., 2007).

Так, в работе Silva et al., (2013) при исследовании микробного состава нефти бассейна Потигуар (Бразилия) методом выделения в чистую культуру были получены 23 штамма бактерий, способных к биодegradации углеводов в аэробных условиях. Штаммы отнесены к родам *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Georgenia*, *Sacharopolyspora*, *Kocuria*, *Tessaracoccus*, *Brevundimonas*, *Streptomyces*, *Roseomonas*, *Petrobacter*, *Acinetobacter*. Обнаружение таких представителей аэробных бактерий как *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, известных по литературе как бактерии, способные к окислению нефти, свидетельствует о наличии кислорода и о том, что его производство может быть связано с анаэробным бактериальным метаболизмом. Помимо выделения в чистую культуру в работе представлены данные анализа гена 16S рРНК образцов нефти этого же бассейна и были идентифицированы восемь основных бактериальных таксонов. Наиболее распространенный таксон Proteobacteria был представлен классами Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria и Deltaproteobacteria. Второй по численности филум Firmicutes был представлен классами Bacilli и Clostridia. Третьей группой был тип Deferribacteres, в который вошли род и некультивируемый Deferribacteres. Меньшая доля бактериальных филоотипов принадлежала типам Actinobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Bacteroidetes и Thermotogae (Silva et al., 2013).

Большое исследование по получению культивируемых форм микроорганизмов из нефтяных месторождений, как континентальных, так и морских, представлено в статье Grassia G.S. с соавторами (1996). Ими были изучены микроорганизмы нефтяных месторождений Австралии, Индонезии, Новой Зеландии, Великобритании, Соединенных Штатов Америки и Венесуэлы.

Были выделены и идентифицированы представители родов *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Fervidobacterium*, *Geotoga*, *Petrotoga*, *Thermotoga*, *Thermococcus*. Бактерии рода *Thermococcus*, способные расти при температуре 91°C, обнаружены только в Северном море. Представители *Thermoanaerobacter* и *Thermoanaerobacterium* (Firmicutes), *Petrotoga* и *Thermotoga* (*Thermotoga*) были отнесены авторами к постоянным обитателям нефтяных месторождений, так как они встречались во всех исследуемых пробах.

Микроорганизмы нефтяного месторождения Южный Эствуд (США) были исследованы Орфан с коллегами (Orphan et al., 2010). Учеными были обнаружены микроорганизмы родов *Geobacillus*, *Petvotoga*, *Methanobacterium*, *Thermoanaerobacter Desulfotomaculum*, *Anaerobaculum*. Температурный оптимум роста исследуемых бактерий отмечался при высоких температурах 70-75°C – именно такие температуры характерны для месторождений.

В Бенгальском заливе с глубины 2100 м были выделены изоляты, которые использовали в качестве единственного источника углерода углеводороды нефти. Полученные микроорганизмы принадлежали к *Oceanobacillus* sp., *Nesiotobacter* sp., *Ruegeria* sp., *Photobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Haererehalobacter* sp., *Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Pusonasbacter* sp. (Kumar et al., 2019).

Бактериальное разнообразие нефтяного месторождения Циньхуан (Желтое море) было изучено Ли с коллегами (Li et al., 2007). Сравнительный анализ полученных последовательностей показал, что обнаруженные бактерии и археи принадлежали к группам Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Thermotogae и Sphingobacteria. Большую часть этих групп представляли метаногенные археи, сульфатредуцирующие бактерии и другие облигатно анаэробные бактерии и археи. Несмотря на характерную для нефтяных резервуаров высокую температуру (65°C), были обнаружены бактерии, известные по литературе как бактерии, относящиеся к мезофильным микроорганизмам, такие как *Desulfothiovibrio*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*.

Perdido-Fold – месторождение, расположенное на северо-западе Мексиканского Залива, имеет 57 выходов нефти и газа (Rodríguez-Salazar et al.,

2021). При исследовании образцов донных отложений с поверхностного слоя (до 10 см глубиной) учеными получены 3155 родов, сгруппированных в 917 семейств. Преобладающими родами были *Thiopfundum*, *Cycloclasticus*, *Rhodovibrio*, *Nitrospira*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Colwellia*, *Dehalogenimonas*, *Desulfonatronum*, *Phycisphaera*, *Geoalkalibacter*, *Marinobacter*. К представителям, способным к деструкции нефти, отнесли *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter* и *Pelobacter*.

Филогенетический анализ сырой нефти и нефтяных пластов незатопляемого месторождения Ниибори (Японское море) показан в работе Kobayashi с коллегами (2012). Получена информация о 16 филотипах: 14 – принадлежали к группе Euryarchaeota и 2 – к группе Crenarchaeota. 9 типов, принадлежащих к Euryarchaeota, были представлены метаногенами. Необходимо также отметить присутствие представителей некультивируемых видов JS1. Как известно, JS1 – наиболее встречающаяся группа микроорганизмов (по анализу гена 16S рРНК) в пробах морских донных отложений (Webster et al., 2004; Hoshino et al., 2017), а также при исследовании биоразнообразия нефтяных резервуаров (Wang et al., 2014; Kobayashi et al., 2012).

### **1.3. Биоразнообразие микробных сообществ газогидратных залежей и зон выходов флюидов в донных отложениях морей**

Закономерная связь между нефтяными и газовыми проявлениями была выявлена еще на рубеже XIX и XX вв. и подтверждена многолетней практикой разработки известных морских месторождений (Аэрокосмический мониторинг..., 2012). В результате тектонических движений земной коры на морском дне образуются трещины, по которым происходит выход из более глубоких горизонтов и распределение на площади до нескольких сотен метров донных отложений углеводородов: газа и нефти (Judd, 2003). Этот процесс протекает на участке, составляющем более 10–15% от общей площади Мирового океана, в окраинных и внутриматериковых морях, где распространены нефтегазовые бассейны. Так как просачивания являются конечными пунктами путей миграции нефти и газа, их обнаружение на поверхности с высокой долей вероятности

подтверждает наличие углеводородов (Дегазация Земли..., 2010). Естественные выходы нефти и газа интегрируются в толщу воды, достигают поверхности, а затем, попадая в атмосферу, приводят к глобальным экологическим проблемам, а также к изменению климата (Rodríguez-Salazar et al., 2021).

В донных отложениях, связанных с просачиванием природных нефти и газа, микроорганизмы четко структурированы по глубине. Лимитирующими факторами развития микроорганизмов в донных отложениях являются количество органического вещества (Kallmeyer et al., 2012), его возраст (Walsh et al., 2016), наличие кислорода (Parkes et al., 2014). Также стоит отметить широкое изучение микробных сообществ, напрямую связанных с выходами метана в осадочных толщах. В таких сообществах преобладают таксоны микробов, осуществляющие анаэробное окисление метана (анаэробные метанооксиляющие археи (ANME)) и сульфатредуцирующие бактерии (Hinrichs et al., 1999; Orphan et al., 2001; Pop Ristova et al., 2015). Микроорганизмы, участвующие в анаэробном окислении углеводородов, в частности метана, и восстанавливающие различные соединения серы, располагаются в восстановленных осадках ниже слоя активной сульфатредукции (Parkes et al., 1990). Сульфатредуцирующие микроорганизмы распространяются в условиях отсутствия кислорода (Chanton et al., 2015) и участвуют в реакциях сульфат - и сероредукции (сульфидогенеза) (Jofgensen et al., 2019). На небольших глубинах в условиях присутствия кислорода отмечается большое разнообразие микроорганизмов.

Подтверждением этому распределению служит работа Куи с соавторами (Cui et al., 2019), в которой показано исследование микробного разнообразия донных отложений северной части Южно-Китайского моря в зонах выхода метана. Глубина отбора проб от поверхности воды составляла 798 метров; бурение происходило до 100 метров глубины ниже морского дна. При исследовании проб кернов молекулярно-генетическими методами с помощью секвенирования (Miseq, Illumina) были получены данные, показавшие, что на глубинах до 5 метров основными группами Bacteria были: Firmicutes, Chloroflexi, Deltaproteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria и JS1.

Clostridia, Bacteroidia (Bacteroidetes), Acidobacteria, Bacilli (Firmicutes) и Cyanobacteria наблюдались в более глубоких слоях. С глубиной отмечалось увеличение численности Desulfobacteraceae; к 5 метрам – увеличение численности ANME-1b. Наибольшая численность Archaea и Bacteria, участвующих в анаэробном окислении метана, встречалась на глубинах от 5 до 60 метров. За исключением бактерий, принадлежащих Firmicutes: их численность с глубиной уменьшилась.

Более глубокие слои донных отложений связаны с карбонатной минерализацией. Согласно информации в литературных источниках, в таких средах, как правило, преобладают таксоны микроорганизмов, осуществляющие процесс анаэробного окисления метана в сочетании с восстановлением различных соединений серы (AOM-SR), такие как ANME, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Helicobacteraceae и Thiotrichaceae (Marlow et al., 2014a, 2014b; Case et al., 2015).

При исследовании образца газового гидрата, полученного из донных отложений Мексиканского залива, было выявлено, что многочисленными в образце газового гидрата были представители Archaea ANME-1 ANME-2. Помимо Archaea 42 клон домена Bacteria принадлежали Firmicutes, а также 63 клон принадлежали Proteobacteria. Меньшее число последовательностей были отнесены к Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides и Thermus. 6 клонов на 98% были близки к представителям сульфатредуцирующих бактерий, в частности, к Desulfosarcinales и Syntrophus (Lanoil et al., 2001).

Карское море характеризуется высокими перспективами нефтегазоносности. На шельфе разведаны многочисленные нефтегазоносные структуры (Грамберг, 2000). Подробное описание микробных сообществ Карского моря представлено в диссертационной работе Мамаевой Е.В. (2015). В целом, работы, касающиеся микроорганизмов в донных отложениях и водной толще, проводились с целью подсчета численности на разных глубинах. С помощью метода массового параллельного секвенирования (Roche 454) Мамаевой Е.В. выявлено, что доминирующими были представители филумов Actinobacteria,

Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Bacteroidetes. Архейные сообщества характеризовались меньшим разнообразием и включали представителей филумов Thaumarchaeota и Crenarchaeota.

Исследование проб донных отложений западной части Южного Атлантического океана было отражено в работе Giongo с соавторами (2016). Данная область характеризуется просачиваниями метана, нефти и других углеводородных компонентов. Для анализа микробного разнообразия авторы охарактеризовали фрагменты гена 16S рРНК. Из 300 проанализированных клонов 288 последовательностей имели больше 95% идентичности с одной или несколькими известными последовательностями, зарегистрированными в GenBank, 179 из них принадлежали домену археи и 109 – бактериям. Представители домена Archaea были идентифицированы и принадлежали к типам Crenarchaeota, Euryarchaeota или Thaumarchaeota. Из всех исследуемых клонов 280 были отнесены к некультивируемым формам. Представители домена Bacteria принадлежали к Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria и Spirochetes. В филуме Proteobacteria преобладали Deltaproteobacteria, в этой группе доминировали сульфатредуцирующие бактерии.

#### **1.4. Анаэробное окисление углеводов. Роль сульфатредуцирующих бактерий в морских экосистемах**

Как уже показано в предыдущих главах, сульфатредуцирующим микроорганизмам предписана основная роль в анаэробной деструкции органического вещества и преобразовании морских осадков (Леин, Иванов, 2009). Первые опубликованные исследования о нахождении сульфатредуцирующих бактерий в нефтяных пластах датировались 1926 г., когда С. Эдсон с коллегами исследовали 67 образцов из нефтяных месторождений Калифорнии (Oliver, Magot, 2005). Позднее при бурении сверхглубокой скважины на Кольском полуострове в 70-х гг. XX в. на глубине 7500 м советскими учеными были найдены бактерии, разлагающие нефть в анаэробных условиях,

предположительно принадлежащие к сульфатредукторам; при повышении температуры количество этих бактерий возрастало (Галанин, 2012). В 1995 Rees с коллегами из нефтяного пласта Северного моря была выделена сульфатредуцирующая бактерия *Desulfacinum infernum* gen.nov.sp.nov. В. Кохран с соавторами (Cochrane et al., 1998) опубликовали данные об обнаружении мезофильных сульфатредуцирующих бактерий в нефтяном месторождении Ниниан в Северном море. В этом же году из донных отложений Тихого океана в районе газогидратных залежей на глубине 500 м были выделены бактерии, близкие к роду *Desulfovibrio*. Дж. Леу с коллегами (Leu et al., 1999) были выделены сульфатредуцирующие бактерии из нескольких нефтяных месторождений Северного моря, которые относились к роду *Desulfomicrobium*, и обладали способностью окислять бензоат и гексадекан.

Е.П. Розанова с коллегами (2001) из нефти и вод нефтяного месторождения в Южно-Китайском море выделили термофильные сульфатредуцирующие бактерии, которые были способны окислять *n*-алканы C<sub>12</sub> – C<sub>16</sub>. Позднее Котлар Н. с коллегами (Kotlar et al., 2011) показали, что в нефтяных резервуарах Норвежского моря преобладают сульфатредуцирующие бактерии, относящиеся к родам *Desulfurovibrionales*, *Desulfuromonadales*, *Campylobacteriales*. В работе (Bian et al., 2015) показана возможность анаэробной утилизации алканов нефти морскими сульфатредуцирующими бактериями. Цитируемые авторы полагают, что в нефтяных пластах анаэробная деструкция алканов происходит путем присоединения фумарата. В работе Кнйемеуер с соавторами (2007) при исследовании бескислородных отложений в районах выхода морских углеводородов выявлено, что деграция углеводородов связана с сульфатредуцирующим штаммом BUS5, который относится к *Deltaproteobacterium* в кластере *Desulfosarcina / Desulfococcus*. Также цитируемые авторы исследовали донные отложения Калифорнийского залива: тестировали различные температурные режимы (12, 28 и 60°C); оптимум роста был зафиксирован при температуре 28°C. Из всех предложенных углеводородов (метан, этан, пропан, *n*-бутан, изобутан) штамм использовал пропан и *n*-

бутан. Родственные виды *Desulfotomaculum* способны к анаэробной утилизации бензола в присутствии сульфата (Kleinsteuber et al., 2008; Laban et al., 2009; Herrmann et al., 2010).

На рис. 1 отражена степень изученности углеводородокисляющих и сульфатредуцирующих микроорганизмов (как культивируемых, так и по анализу гена 16 РНК) в районах естественных газо - и нефтепроявлений в Мировом океане (по литературным источникам).

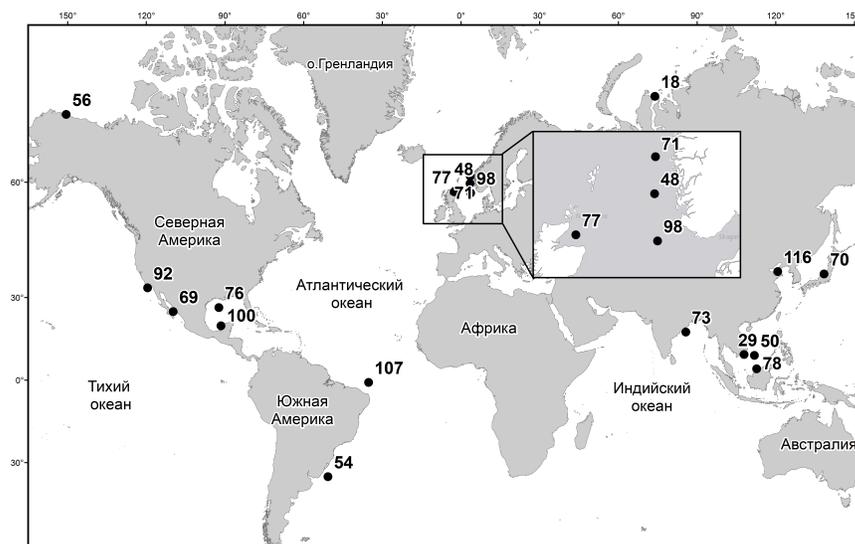


Рисунок 1. Описание распространения углеводородокисляющих и сульфатредуцирующих микроорганизмов в районах естественных газо - и нефтепроявлений в Мировом океане (цифрами указаны литературные источники).

### 1.5. Биоразнообразие микробных сообществ донных отложений морей Дальнего Востока (Берингово, Охотское, Японское) и Японского моря в частности

Микробные сообщества донных отложений юго-западной части Охотского моря были оценены культуральными и молекулярно-генетическими методами Inagaki с коллегами (2003). В чистую культуру был выделен и описан 181 штамм, а также получено 639 последовательностей гена 16S рРНК архей и 571 бактерий. 82% клонов были отнесены к подклассу GammaProteobacteria; доминирующими в

этом подклассе были *Halomonas*, *Methylophaga* и *Psychrobacter*. Подклассы *Acidobacteria* и *Acctinobacteria* встречались в меньшей степени. С увеличением глубины ученые отмечают появление метанотрофов класса I.

Исследование микроорганизмов донных отложений северной части Берингова моря представлено в работе Zeng et al. (2011). Авторы изучали 11 проб донных отложений с различных участков. По последовательностям гена 16S рРНК было выделено 16 бактериальных таксономических групп, принадлежащих к Alpha-, Beta-, Gamma-, Deltaproteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Nitrospirae, Verrucomicrobia, Chloroflexi, представители Latestibacteria (WS3) и Aminicenantes (OP8). Доминирующими были группы, принадлежащие к Deltaproteobacteria, чаще всего встречались сульфатредукторы отрядов Desulfobacterales (включая *Desulfonema*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus* и *Desulforhopalus*), Desulfuromonales и Desulfuromonadales (включая род *Desulfuromonas*).

Микробное разнообразие глубоководных проб донных отложений Японского моря было изучено Arakawa с соавторами (2005). Пробы донных отложений для исследования были отобраны на глубине 3064 м. В связи с чем микроорганизмы культивировали при различном давлении и разных температурах. В чистую культуру были выделены *Psychromonas* sp., *Moritella* sp., *Shewanella* sp. Штаммы идентифицировали по последовательности гена 16S рРНК. Данные изоляты способны расти при высоком давлении (50МПа), оптимум роста отмечен при 30-40 МПа. *Graciacola* sp., *Psychromonas* sp., *Shewanella* sp. и *Moritella* sp. обладали способностью к росту при низких температурах (4°C).

Получением культивируемых бактерий, выделенных из донных отложений Японского моря, занимаются сотрудники лаборатории микробиологии Тихоокеанского института биоорганической химии (ТИБОХ ДВО РАН). На базе института создана коллекция морских микроорганизмов.

В коллективных работах разных лет представлены как известные, так и впервые описанные штаммы бактерий. Например, выделен и описан штамм

*Oceanisphaera litoralis* gen. nov., sp. nov. (Романенко и др., 2003), описаны 4 новых вида *Psychrobacter* sp.nov. (Romanenko et al., 2004).

Нефтеокисляющие микроорганизмы исследованы в дальневосточных морях наиболее интенсивно. Обычно это связано с загрязнением нефтью поверхностных вод морей и использованием бактерий в процессах биоремедиации. Так, в статье Бузолевой Л.С. с соавторами (2008) описаны штаммы нефтеуглеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из прибрежных акваторий Японского (б. Золотой Рог и б. Находка) и Охотского (зал. Анива) морей, а также определены минимальные ингибирующие концентрации нефти для исследуемых штаммов.

В работе Репиной (Смирновой) М.А. (2009) при исследовании прибрежных вод юга о. Сахалин выделены в чистую культуру и собраны в коллекцию 67 штаммов микроорганизмов, которые обладают высокой способностью к утилизации основных углеводов: алканов, циклоалканов, ароматических соединений, и могут быть использованы для биоремедиации морской среды.

С аналогичной целью проведены исследования Дункай Т.И. с коллегами (2020), в результате которых создана коллекция, состоящая из 137 штаммов нефтеуглеводородокисляющих бактерий, выделенных из поверхностных вод Японского моря. Учеными изучены физиолого-биохимические свойства выделенных штаммов и оценен их рост на селективных средах с мазутом, дизелем и нефтью при разных температурах.

Двумя годами ранее Голозубовой Ю.С. с коллегами (2018) проведена работа по выделению из воды б. Находка (Японское море) бактерий рода *Micrococcus* и оценке способности к окислению нефти выделенными изолятами.

Как упоминалось ранее, сульфатредукция считается важным процессом в морских донных отложениях, а сульфатредуцирующие микроорганизмы играют важнейшую роль в круговороте углерода и серы; но изучение сульфатредуцирующих бактерий в донных отложениях дальневосточных морей проводится редко. Так, в 1995 году с глубины 500 м в отложениях Японского моря был выделен типовой штамм *Desulfovibrio profundus* (Parkes et al., 1995; Vale

et al., 1997), близкие к этому виду штаммы культивировали из морских отложений глубиной 222 м на окраине Каскадии в Тихом океане (Barnes et al., 1998).

Изоляты сульфатредуцирующих бактерий из морских глубин были получены из проб отложений Охотского моря, к северу от Японии (Inagaki et al., 2003).

В донных отложениях северной части Берингова моря обнаружены флотипы сульфатредукторов Deltaproteobacteria родов: *Desulfonema*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus* и *Desulforhopalus*, *Desulfuromonas* (Zeng et al., 2011). В 2017 году эти исследования были дополнены результатами пиросеквенирования воды и донных отложений северной части Берингова моря. Авторы отмечают нахождение анаэробных сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfocapsa*, а также рода *Desulfobulbus* (Zeng et al., 2017).

### **Заключение по обзору литературы**

Морские отложения являются уникальным местом обитания микроорганизмов. В зависимости от глубины, наличия кислорода, количества органического вещества и других факторов микроорганизмы, населяющие донные отложения, четко структурированы.

Таксономическое разнообразие донных отложений схоже в районах нефте- и газопроявлений. А именно: к поверхности морского дна преобладают аэробные представители бактерий разных родов и видов, принадлежащие к филумам: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria. С увеличением глубины обнаруживаются анаэробные сульфатредуцирующие бактерии; на очень больших глубинах, например, в зонах выхода метана, преобладают археи, осуществляющие анаэробное окисление метана в сочетании с сульфатредукторами, отвечающими за восстановление различных соединений серы.

Среди представителей, выделенных в чистые культуры, а также идентифицированных с помощью молекулярных методов, в нефтяных месторождениях морей обнаруживают как термофильные, так и мезофильные микроорганизмы, отнесенные к родам: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*,

*Bacillus* и др., что может свидетельствовать о «пластичности» данных видов и позволяет предположить возможность переключения их в зависимости от условий на потребление метана и других углеводов при различных условиях.

В анаэробных условиях при высоких концентрациях сульфатов основная роль в анаэробной деструкции органического вещества и преобразовании морских осадков предписана сульфатредуцирующим бактериям.

Изучение глобального круговорота углерода и сопряженных с ним циклов необходимо. Если во многих морях Мирового океана проводятся исследования распределения микроорганизмов, использующих углеводороды в качестве источника углерода и энергии и участвующих в преобразовании морских осадков, то в дальневосточных морях, а именно в Японском море, таких исследований крайне мало. Возникает необходимость изучения разнообразия культивируемых штаммов – деструкторов углеводов из районов, связанных с районами выходов нефти и газа, для понимания их участия в круговороте веществ, а также возможности использования их в качестве биоиндикаторов.

Таким образом, геомикробиологические морские исследования исключительно актуальны в наше время в связи с новыми национальными программами («Морские карбоновые полигоны», «Плавучий Университет» и др.), международными программами («Геосистемы и минеральные ресурсы переходных зон «континент-океан» и открытого океана»), в полной мере отвечают приоритетам Стратегии научно-технического развития РФ, критических технологий и способствуют адаптации общества к глобальным природным и антропогенным вызовам современности.

## **Глава 2. Объекты исследования, материалы и методы**

### **2.1 Район исследования**

#### **2.1.1. Геолого-гидрогеохимическая характеристика северной части Японского моря**

Японское море – полузамкнутое окраинное море, расположенное в переходной зоне от Евразийского континента к Тихому океану. Сангарским проливом оно соединяется с Тихим океаном, Цусимским – с Восточно-Китайским морем, проливами Лаперуза и Невельского – с Охотским морем. Подводной возвышенностью Ямато дно моря разделяется на котловины Центральную (Японскую) и Ямато (Родников и др., 2014).

Северная часть Японского моря, включающая южную часть Татарского пролива, находится в районе трансформного сочленения на стыке тектонических литосферных плит – Амурской и Охотской. Вследствие этого район, расположенный ближе к о. Сахалин, является сейсмотектонически активным. По границам плит проходят региональные зоны глубинных разломов, образуются впадины с накоплением мощной толщи осадков, в которых образовались нефтегазовые залежи (Обжиров и др., 2019). Район интересен исследователям из-за обнаружения газогидратов в пределах юго-западного склона о. Сахалин (Operation Report, 2013).

Впервые газогидраты в северной части Японского моря были открыты в рейсе 59 НИС «Академик М.А. Лаврентьев» в 2012 г. на юго-западном верхнем склоне о. Сахалин на глубине 322 м – близкой к критической для их существования в Мировом океане. В 2013–2015 гг. район распространения газогидратов был расширен. В газогидратоносном районе газовые «факелы» (гидроакустические аномалии в толще вод, формирующиеся благодаря восходящим потокам газовых пузырей) располагались на глубинах моря главным образом в интервале 100–300 м друг от друга, единичные обнаруживались до глубины 600 м. Газогидраты представлены, как правило, тонкими линзами и прослоями, а также изометричными включениями. Как было установлено в

других районах Мирового океана, оползневые и турбидитные осадочные толщи, распространенные в Южно-Татарском осадочном бассейне, часто являются коллекторами газогидратов (Шакиров и др., 2019). Этому также благоприятствуют текстурные особенности осадочных толщ, сформированных при таких процессах (повышенная пористость и проницаемость, особенности гидрохимического режима). Газогидратоносные осадки в северной части Японского моря представляли слои мощностью до 1 м, причем газогидраты сформированы преимущественно термогенным метаном со средним изотопным составом углерода около -43 ‰. Источником термогенного метана, вероятно, являются газо- и угленосные толщи с вкладом газов подстилающих отложений (Шакиров и др., 2016).

Район исследований расположен в северной части Японского моря и включает в себя два полигона. Первый характеризуется наличием газогидратов в пределах юго-западного склона о. Сахалин и второй расположен ближе к Центральной котловине Японского моря (район северного замыкания Центральной котловины). В этой части отмечены аномально высокие концентрации метана в газосодержащих слоях шельфовых районов (рис. 2).

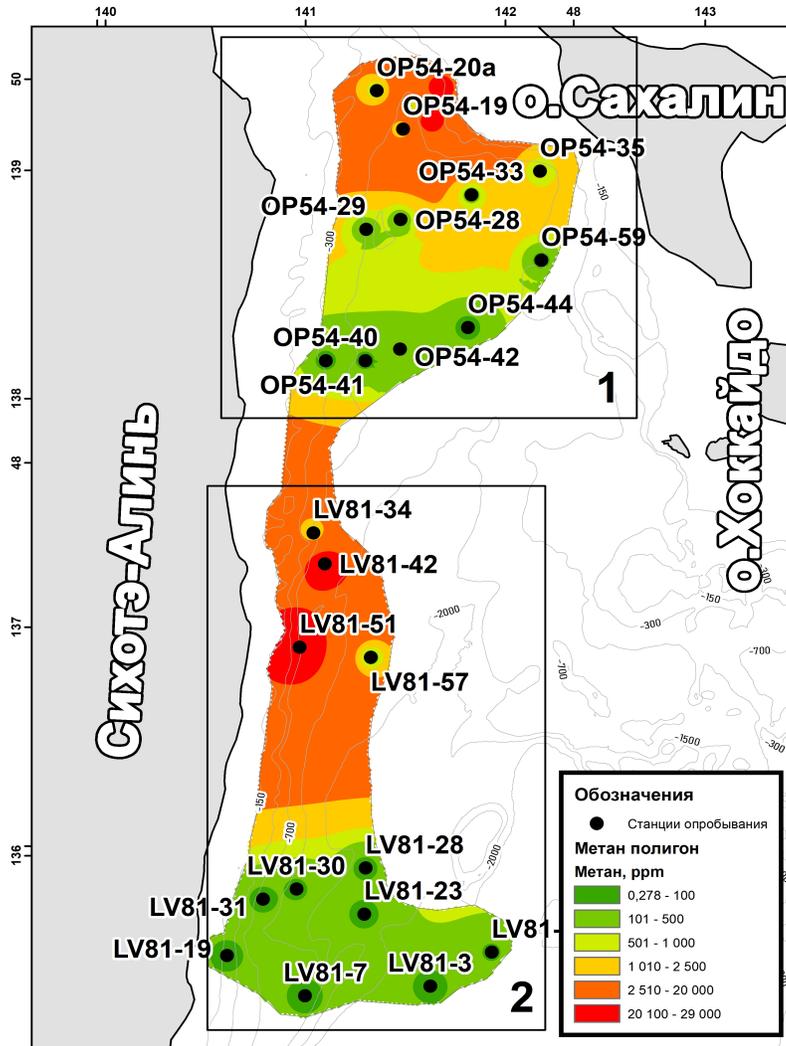


Рисунок 2. Содержание метана (ppm) в донных отложениях исследуемых районов северной части Японского моря

### 2.1.2. Газогеохимические исследования донных отложений исследуемого района (по отчетам экспедиций ТОИ ДВО РАН)

Из всех углеводородных газов метан является наиболее трудно удерживаемым породами, и большая их часть, исключая массивные залежи соли, способствуют медленному просачиванию метана. Накапливаясь в толще осадков высокопродуктивных зон, термогенный и микробный метан благодаря молекулярной диффузии или в виде пузырьков свободного газа мигрирует вверх к поверхности осадка. Иногда метан прорывается к поверхности дна, образуя в

поверхностных отложениях геоакустические аномалии, покмарки, метановые сипы и т.д. (Дмитриевский, Валяев, 2002).

Несмотря на то, что метан непрерывно образуется на океанических окраинах, накопление свободного газа (т.е. образование пузырьков) происходит не повсеместно. Пузырьки газа образуются на таких горизонтах осадка, где концентрация метана превышает насыщение при гидростатическом давлении окружающей среды. Глубина таких горизонтов, а следовательно, и концентрации насыщения метаном зависят от глубины моря.

Образование метана в донных отложениях морей или пресноводных водоемов может происходить в результате микробиологических процессов преобразования органического вещества или в результате термokatалитических процессов (Floodgate, Judd, 1992; Леин, Иванов, 2009).

Метан микробного происхождения характеризуется преобладанием метана и сопровождается небольшим содержанием гомологов – этана, пропана, бутана; их концентрация ниже на три порядка, чем концентрация метана (Whiticar, 1999). Этилен, пропилен и бутилен в донных отложениях являются промежуточными продуктами деструкции органического вещества (Fukuda et al., 1993). Термогенный метан, наоборот, может содержать значительные количества этана, пропана или бутана.

По данным лаборатории газогеохимии ТОИ ДВО РАН, полученным за период с 2012 по 2019 год, в ходе семи экспедиций (LV59, LV62, LV67, LV70, OP54, LV81, LV85) был проведен расчет регионального фонового показателя концентрации метана в поверхностных горизонтах (0-30 см) донных отложений северной части Японского моря. Всего в выборке было использовано 194 пробы из 106 трубок донного опробования. В результате этой оценки установлено, что для Южно-Татарского осадочного бассейна (северной части Японского моря) значения регионального фонового показателя концентраций метана в условиях практического отсутствия влияния природных факторов и техногенного воздействия составляет  $4 \text{ см}^3/\text{дм}^3 - 0,004 \text{ мл/л}$  (4 ppm).

Содержание газовой фазы в пробах осуществлялось при помощи газового хроматографа «КРИСТАЛЛЮКС-4000М» (ЗАО Метахром, г. Йошкар-Ола), снабженного пламенно-ионизационным детектором, двумя детекторами по теплопроводности и двумя металлическими набивными колонками (сорбенты NaуеSer D и NaX). Газ-носитель – гелий. Погрешность измерений составляет не более 5%. Пробоподготовка перед газохроматографическим анализом осуществлялась методом равновесных концентраций «HeadSpace». Расчет потоков метана в пробах донных отложений проводился по формуле (Yamamoto et al., 1976; Wiesenburg et al., 1979):

$$C = \frac{CH_4/100 * V_{газ} * V_{осадок} / V_{склянка} * V_{раствор}}{V_{осадок} * 1000} / (273 + t^0) * 273$$

Ниже приведены данные по содержанию газов и концентрации метана в пробах 23 исследуемых станций, представленных на рис. 2 (с севера на юг).

Станция OP54-19 GC характеризуется обнаружением метана, этилена, этана и пропана. Станция находится у юго-западной части контура Александровской антеклизы. Станция характеризуется повышенными значениями содержания метана (до 1000 ppm) с четким градиентом роста к забою керна.

Станция OP54-20a GC. Концентрации метана повышаются более чем в 2 раза по сравнению с другими станциями. Вдоль керна на них выявляется локальные особенности в распределении метана (рис. 3). Станция характеризуется

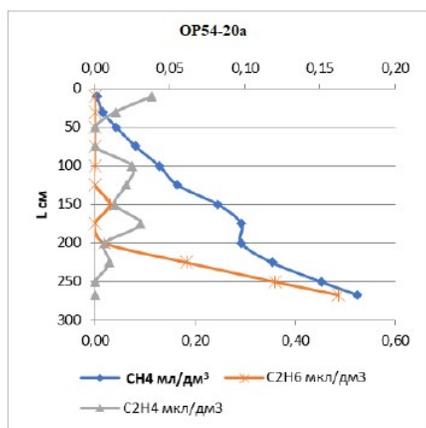


Рисунок 3. Диаграмма распределения углеводородных газов на станции OP54-20a GC.

обнаружением газогидратных залежей.

На станции ОР54-28 GC обнаружены метан, этилен, этан и пропилен. Пропилен равномерно распределен по керну (1,27-232,81 ppm). Пропан не обнаружен. Распределение газов на станции 28 GC в целом повторяет черты соседней, 29 станции, с теми же диапазонами концентраций метана практически при такой же длине керна.

Станция ОР54-29 GC. На этой станции содержание метана и этана плавно увеличивается от поверхности дна и до забоя керна, достигая значений 1 ppm и 235,81 ppm на горизонте 305 см соответственно. Помимо метана и этана на станции обнаружены пропилен и пропан. По всей длине керна определен пропилен, который распределен относительно равномерно с максимумом 230 ppm. Пропилен обнаружен на всех горизонтах, пропан только на двух в нижней части керна (300-500 ppm, 250-275 см).

На станции ОР54-33 GC наблюдается плавное нарастание содержаний метана до горизонта 200 см, затем резкое увеличение значений до 667 ppm на горизонте 270 см. Отмечается положительная корреляция между распределениями этана и этилена; диаграмма волнообразной формы с нарастанием значений концентраций обоих газов с глубиной. Пропан зафиксирован только на двух нижних горизонтах.

Станция ОР54-35 GC. Суммарные содержания углеводородных газов превышают значения на других станциях в три раза. Метан достигает значений 1687 ppm. В осадке обнаружен пропилен по всей длине керна в концентрациях 40-200 ppm.

Станция ОР54-40 GC. Обнаружены метан, этилен, этан и пропан. Метан равномерно распределен вниз по керну от поверхности до горизонта 200 см, не превышая концентрации 10 ppm; затем отмечается резкое повышение содержания до 16 ppm на горизонте 275 см. Распределение этана похоже на распределение метана; с горизонта 200 см. Его значение резко увеличивается до 260 ppm на горизонте 300 см. В керне также отмечен этилен на всех горизонтах с максимумом 160 ppm на горизонте 300 см и пропан (до 30 ppm).

Станция OP54-41GC. Содержания метана по керну возрастают примерно в 4 раза по сравнению со станцией 40GC. Этан так же, как и на предыдущей станции, растет от горизонта 200 см, до содержаний 800 ppm. Этилен обнаружен во всех пробах с максимумом до 100 ppm на горизонте 250 см. Концентрации пропана растут от горизонта 200 см, так же, как метан и этан, достигая максимума 400 ppm на горизонте 275 см. На станции отмечаются небольшие пики концентраций этана на горизонте 125 см. Вероятно, это связано со сменой литотипа осадка.

Станция OP54-42 GC. Обнаружены метан, этилен, этан и пропан. Содержание метана на этой станции резко увеличивается на всех горизонтах, достигая максимума 237 ppm на горизонте 300 см. Концентрации этана также вырастают примерно на порядок выше (максимум 280 ppm на горизонте 300 см), чем на станции 41 GC. Концентрации этилена и пропана, обнаруженных на всех горизонтах, не превышают значений 25 ppm.

Станция OP54-44 GC характеризуется обнаружением метана, этилена, этана и пропана. Содержание метана плавно растет от поверхности 1,02 ppm до 17,82 ppm на нижнем горизонте 300 см. Остальные углеводородные газы проявляют контрастную волнообразную изменчивость распределения по вертикали колонки осадка сильнее, чем на предыдущих станциях. Пики этана и этилена зафиксированы на горизонтах 30 см (этан 40 ppm), 100 см (этан 800 ppm), 200 см (этан 850 ppm), 250 см (этан 1050 ppm). Углекислый газ видимых корреляций с другими газами не показывает.

Станция OP54-59 GC. Обнаружены метан, этан и этилен. Метан плавно увеличивается с глубиной: 1 ppm (10 см) – 62 ppm (230 см). Отмечается появление этана с горизонта 100 см; его концентрация растет в диапазоне 20-400 ppm. Этилен зафиксирован не на всех горизонтах, он распределяется в диапазоне 10-50 ppm. Максимум этилена обнаружен в поверхностном слое осадка (50 ppm). Диапазон CO<sub>2</sub>: 1200-3900 ppm, максимум обнаружен в поверхностном слое осадка (до 10 см).

Для станции LV81-34 GC характерно возрастание метана с глубиной. Данная станция характеризуется аномально высокими концентрациями метана.

Скорее всего, данная станция находится в районе единого площадного газоматеринского источника, формирующего повышенные аномалии углеводородных газов в донных отложениях

Станция LV81-42 GC, расположенная на глубине 1381 метр континентального склона, представляет особый интерес. Глубина отобранной колонки составляет 131 см. Содержание метана растет с глубиной от 6 до 14700 ppm, этана – до 94 ppm, пропана – до 0,84 ppm. Из непредельных углеводородов присутствует только этилен в верхних горизонтах до 100 см, в концентрациях до 100 ppm. Содержание углекислого газа немного превышено в верхней части колонки, горизонт 0-10 см 276000 ppm и увеличивается с глубиной (горизонт 30-130 см – до 436000 ppm). Резкий скачок концентраций метана наблюдается с горизонта 100 см. Содержание метана на забое колонки является сверханомальным, а также присутствуют в больших концентрациях этан и пропан. Коэффициент корреляции пары метан-этан положительный ( $r=0,7$ ). Подобные содержания метана и его гомологов достаточны для образования в донных осадках газогидратных скоплений, а также позволяют говорить о наличии глубинного миграционного газового потока. Данная колонка была отобрана в зоне обнаруженных сейсмических аномалий донных отложений (газовых каналов типа «chimney»). Результаты анализов позволяют говорить об их активности в настоящий момент.

Станция LV81-51 GC характеризуется аномальным содержанием углеводородных газов и признаками возможного наличия газогидратов. Концентрации метана растут с глубиной от 2 до 97 ppm, этана до 93 ppm, пропана до 0,32 ppm. Из непредельных присутствует только этилен в верхнем горизонте 0-50 см в концентрациях до 4 ppm. Содержание углекислого газа повышено в верхней части колонки, горизонт 0-10 см (40 ppm) и увеличивается в нижней части (горизонт 100-150 см – до 57 ppm). Резкий скачок содержания метана наблюдается с горизонта 100 см. Газонасыщенность осадка растет с глубиной, наблюдались визуальные выделения газовых пузырьков в глубинном слое. Подобные аномалии метана, этана и пропана встречались нами в донных

отложениях, содержащих газогидраты, и могут быть индикатором их наличия в более глубоких горизонтах.

Станция LV81-57 GC. Содержание метана варьируется от 1 до 1400 ppm, этана – от 1 до 7 ppm, пропана – от 1 до 3 ppm, углекислого газа – от 22000 до 48000 ppm. Станция является глубоководной (глубина 1786 м). Характеризуется повышенным уровнем содержания всех исследуемых газов. Повышенное содержание по метану, этану, пропану и углекислому газу позволяет отнести эту станцию к району глубинной газофлюидной разгрузки.

На станциях LV81-28 GC, LV81-30 GC, LV81-31 GC отмечено повышенное содержание всех исследуемых газовых компонентов. Концентрации метана варьируют от 1 до 59 ppm, этилена от 100 до 450 ppm, этана от 100 до 1000 ppm, пропана от 100 до 0,06 ppm, CO<sub>2</sub> от 1100 до 6600 ppm. Пропилен в пробах не зафиксирован.

Станция LV81-23 GC. По содержанию углеводородных газов станция является фоновой. До 30 см отмечаются очень маленькие концентрации метана и повышенные концентрации CO<sub>2</sub>.

Станция LV81-19 GC считается станцией с фоновым содержанием метана. Содержание метана варьируется от 0,3 до 2 ppm.

На станции LV81-01 GC зафиксировано плавное увеличение концентраций метана с глубиной (от 0,5 до 1800 ppm); присутствие этана варьируется до 130 ppm и пропана – до 40 ppm. Непредельные углеводородные газы находятся в следовых количествах и отсутствуют ниже горизонта 175 см. Повышение концентраций этих компонентов может быть обусловлено активными процессами деструкции углеводородных газов в случае наличия глубинного подтока.

Содержание метана на станции LV81-03 GC не превышает значение 200 ppm.

Распределение метана в пробах донных отложений станции LV81-07 GC близко к фоновым значениям для северной части Японского моря и не превышает 30 ppm.

За обработку проб донных отложений на содержание газового состава и предоставление полученных данных автор выражает благодарность к.х.н. Полонику Н.С., Лифанскому Е.В., к.г.-м.н. Яцуку А.В., Швалову Д.С., Легкодимову А.А., к.г.-м.н. Сырбу Н.С.

## 2.2. Материалы исследования

Для изучения биоразнообразия микроорганизмов в донных отложениях, ассоциированных с разгрузкой газов, в работе использовали верхнюю часть восстановленного слоя донных отложений северной части Японского моря, отобранную в ходе рейсов ОР54 НИС «Академик А.И. Опарин» (2017), LV81 НИС «Академик А.М. Лаврентьев» (2018). Автор выражает благодарность начальнику экспедиций, зав. лабораторией гравиметрии ТОИ ДВО РАН, к.г.-м.н. Валитову М.Г.

Литологическая структура и высокая газонасыщенность районов исследования свидетельствует о непосредственном прохождении потока газа в кернах.

Были исследованы пробы донных отложений с 23 станций (рис.4), отличающиеся разными концентрациями метана. Опробование проводилось методом ударного малоглубинного бурения с помощью гравитационного пробоотборника из нержавеющей стали с внутренним диаметром 90 мм и длиной 420 см.

Отбор проб для микробиологического анализа проводили стерильными пластиковыми шприцами с отрезанными носиками. В работе использовали горизонты 5-30 см. Отобранные пробы хранили при - 30°C до начала анализов. Изучаемые донные отложения от поверхности морского дна до глубины 30 см характеризовались в основном алеврито-пелитовыми разностями с восстановленной однородной структурой от темно-оливкового до серо-зеленоватого цвета, часто с включениями гидротроилита (темные прослойки сульфидов железа в виде гидрогеля).

Объектами исследования также служили чистые и накопительные культуры аэробных и анаэробных нефтеокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий, полученные из образцов донных отложений исследуемых районов.

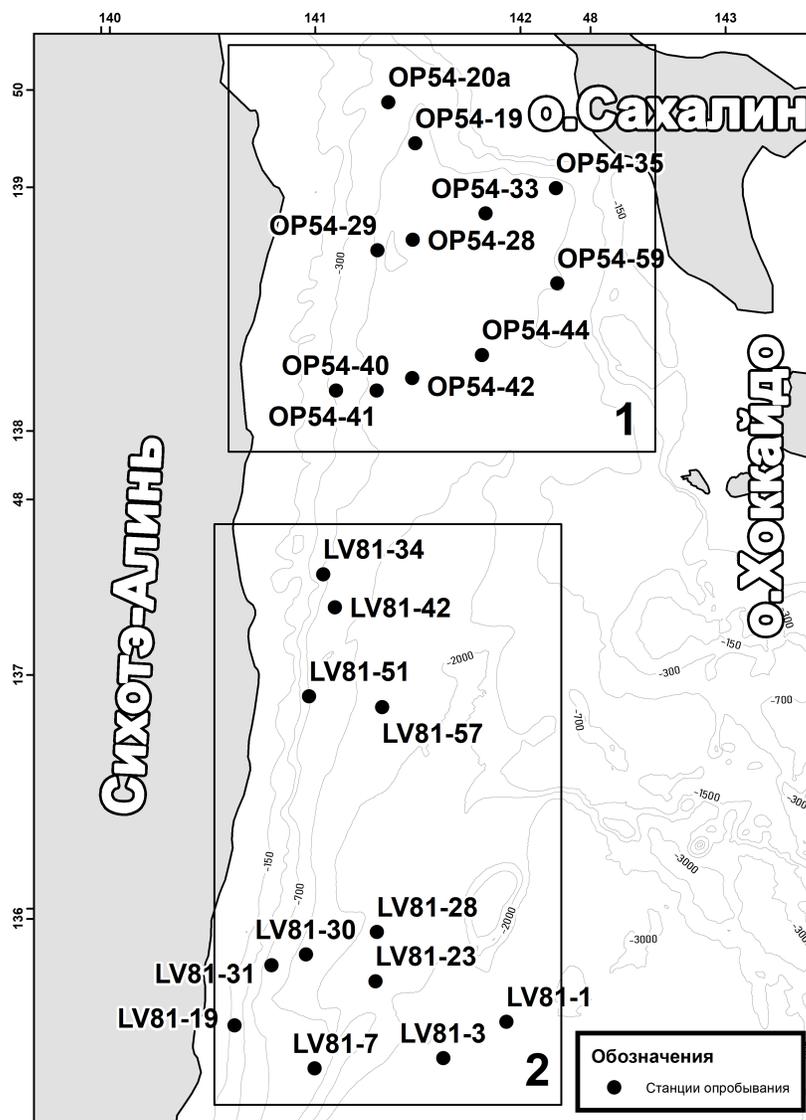


Рисунок 4. Карта-схема отбора проб. Станции условно разделены на 1–газогидратный и 2 – негазогидратный районы.

### Референс-штамм

В качестве референс-штамма использовали штамм сульфатредуцирующей бактерии *Desulfosporosinus lacus* STP12<sup>T</sup> (AJ582757) из Коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ (Брауншвейг, Германия) как ближайший гомолог по нуклеотидной последовательности.

## 2.3. Методы исследования

### 2.3.1. Молекулярно-генетические методы

#### 2.3.1.1. Определение наличия функциональных генов методом вложенной ПЦР в пробах донных отложений. Выделение суммарной ДНК из проб донных отложений

Для выделения суммарной ДНК из донных осадков использовали модифицированный метод, предложенный Мармуром (Marmur, 1961).

1-5 грамм осадка растирали в стерильной ступке 5 мин. для освобождения клеток от зерна. Далее осадок помещали в 1 мл ТЕ-буфера (10мМ Трис рН 8.0, 1мМ ЭДТА). К суспензии добавляли 20% раствор SDS до конечной концентрации 1-2%. Тщательно перемешивали на вортексе 5 минут. Полученную суспензию инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C в термостате. После инкубирования в каждую пробирку добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа, тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали 10 мин. при 15000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, снова добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа в соотношении 1:1, перемешивали и центрифугировали 10 мин. при 15000 об/мин. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, экстрагировали с равным объемом хлороформа и центрифугировали 10 мин. при 15000 об/мин. Далее добавляли 5М NaCl и 3 объема охлажденного 96% этанола, тщательно перемешивали и замораживали при -40°C минимум 2 часа. Вновь центрифугировали 15 мин. при 15000 об/мин. Излишки спирта отбирали, осадок ДНК подсушивали на воздухе.

Функциональные гены в штаммах и донных отложениях определяли методом «вложенной» ПЦР в реальном времени в два этапа, используя амплификатор Dtpriime-5 (ДНК-Технология). На первом этапе амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси с использованием 5-25 нг ДНК в качестве матрицы. Продукт, полученный на первом этапе, использовался в дальнейшей работе. На первом этапе использовали высококонсервативный участок 16S рРНК бактерий и архей V3-V4 (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG- 3', 3'-

GACTACHVGGGTATCTAATCC- 5') (Система праймеров Zymo Research). В качестве второй пары использовали праймеры для биоиндикации аэробной деструкции линейных углеводов *alkBB* (5'-GGTACGGSCAYTTCTACRTCGA- 3'; 3'- CGGRTTCGCGTGRTGRT- 5') (Tourova et al., 2018); анаэробной деструкции линейных углеводов *masD* (5' – GGHMCVTDBGTVTGGAC - 3'; 3' – RTCRTCRTTDCSSCAAYTTNGG - 5') (Gittel et al., 2015), анаэробной деструкции ароматических углеводов *bssA* (5' – ACGACGGYGGCATTCTC - 3', 3' – GCATGATSGGYACCGACA - 5') (Winderl et al., 2007); и сульфатредуцирующих бактерий *dsrB* (5' – CAACATCGTTCATACCCAGGG - 3', 3' – GTGTAGCAGTTACCGCA - 5') (Корнеева, 2015; Priha et al., 2013). Праймеры представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Праймеры, используемые в работе.

Название гена	Последовательность (5'-3')	Кодируемый белок	Источник
V3-V4_341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Высококонсервативный участок 16S рРнк бактерий и архей	Система праймеров Zymo Research
V3-V4_785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC		
11F	AGTTTGATCATGGCTCAG	Универсальный бактериальный праймер	Seki et al., 2015
1100R	GGGTTGCGCTCGTTG		
<i>alkBFB</i>	GGTACGGSCAYTTCTACRTCGA	Моноксигеназа, участвующая в аэробном разложении алканов	Tourova et al., 2018
<i>alkBRB</i>	CGGRTTCGCGTGRTGRT		
<i>masD</i> 1156a_1156F	GGHMCVTDBGTVTGGAC	1-метилалкилсукцинатсинтаза	Gittel et al., 2015
<i>masD</i> 1156a_2004Rmod	RTCRTCRTTDCSSCAAYTTNGG		
<i>bssAf</i>	ACGACGGYGGCATTCTC	$\alpha$ -субъединица бензилсукцинат синтетазы	Winderl et al., 2007
<i>bssAr</i>	GCATGATSGGYACCGACA		
<i>dsrB</i> _p2060F	CAACATCGTTCATACCCAGGG	$\beta$ -субъединица сульфитредуктазы	Корнеева, 2015; Priha et al., 2013
<i>dsrB</i> _4R	GTGTAGCAGTTACCGCA		

Протокол реакции для амплификации *alkBB* был следующим: начальная денатурация, 5 мин. при 94°C; 35 циклов по 30 сек. при 94°C, 30 сек. при 60°C и 30 сек. при 72°C; окончательная элонгация, 8 мин. при 72°C.

Протокол реакции для амплификации *masD*: денатурация 15 мин. при 95°C; 55 циклов по 30 сек. при 95°C; 30 сек. при 54°C; 30 сек. при 72°C; окончательная элонгация 10 мин. при 72°C. Протокол реакции для амплификации *bssA*: денатурация 5 минут при 94°C; 35 циклов по 45 сек. при 94°C; 30 сек. при 55°C; 60 сек. при 72°C; окончательная элонгация 10 мин. при 72°C. Протокол реакции для амплификации *dsrB* был следующим: начальная денатурация, 5 мин. при 95°C; 35 циклов по 60 сек. при 94°C, 60 сек. при 56°C и 60 с при 72 °C; окончательная элонгация, 10 мин. при 72°C.

### 2.3.1.2. Выделение хромосомной ДНК

Выделение и очистку хромосомной ДНК из чистых культур проводили по методу Marmur (1961), как описано выше.

### 2.3.1.3. Высокопроизводительное секвенирование участка гена 16S рРНК

ДНК нефтеокисляющих штаммов использовали в качестве матрицы для амплификации гипервариабельных районов (V3-V4) генов 16S рРНК с помощью универсальных бактериальных праймеров. Секвенирование ДНК проводилось в компании ООО «Синтол», г. Москва по методу Сэнгера с использованием набора BigDye v3.1. на генетическом анализаторе ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific). При секвенировании использовали универсальные бактериальные праймеры 11F-1100R. Полученные последовательности идентифицировали до вида или рода на уровне сходства больше 98%.

Секвенирование участка гена 16S рРНК сульфатредуцирующей бактерии проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 с

последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

#### 2.3.1.4. Определение геномных последовательностей

Для секвенирования генома клетки *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 были выращены на среде 195с в лаборатории анаэробных микроорганизмов (ИБФМ РАН). Секвенирование полного генома клетки сульфатредуцирующей бактерии проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН на Illumina NovaSeq. Для анализа генома использовали технологию: синтез библиотек 2\*100 kit KAPA Biosystems в соответствии с рекомендациями производителя. Выделение ДНК осуществлялось колоночным методом с осаждением на силикогель, используя Fast spin DNA kit, производства MP.

Величину сходства полногеномных последовательностей (ANI - Average nucleotide identity, %) рассчитывали с использованием онлайн-калькулятора на сайте <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index> (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2014). ДНК-ДНК гибридизацию *in silico* осуществляли с применением программного обеспечения GGDC 2.0 (Meier-Kolthoff et al., 2013) на сайте DSMZ.

#### 2.3.1.5. Определение спектра плазмид

Выделение плазмидной ДНК проводили щелочным методом по С. Kado и S. Liu (1981). Бактериальную массу нефтеокисляющих микроорганизмов наращивали в чашках Петри на агаризованной среде Ворошиловой-Диановой; сульфатредуцирующих – в пробирках Хангейта на анаэробно-приготовленной среде 195с. Нефтеокисляющие микроорганизмы культивировали в течение 20-24 часов при температуре 22°C. Накопление биомассы сульфатредуцирующих бактерий отмечалось спустя 7-10 суток культивирования при температуре 26°C. Небольшое количество культуры суспендировали в 20 мкл форезного буфера в пробирках объемом 1,5 мл. Затем к бактериальной суспензии добавляли 300 мкл лизирующего раствора. После полного лизиса пробирки с культурами прогревали

15 минут при температуре 65°C. Экстракцию белков проводили 250 мкл фенол-хлороформной смеси в соотношении 1:1. После центрифугирования в течение 15 минут при 14000 об/мин получали плазмидную ДНК в супернатанте. 50 мкл полученного препарата перед нанесением на гель смешивали в 5 мкл бромфенолового синего. Для проведения электрофореза использовали 0,7% агарозный гель. Разделение плазмид проводили в трис-боратной буферной системе в течение 2,5-3 часов при напряжении 5 V/см. Визуализацию плазмидной ДНК осуществляли путем окрашивания геля в течение 20 минут бромистым этидием в концентрации 0,5 мкг/мл и фотографированием результатов электрофореза в проходящем УФ-свете. Определение молекулярной массы исследуемых плазмид проводили в сравнении с подвижностью набора маркерных плазмид.

## 2.3.2. Микробиологические методы

### 2.3.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования

Для создания накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов использовали 3 среды:

- морскую аммонийную среду 1313 (Marine ammonium mineral salts) (г/л): NaCl – 20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0,2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,002, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0,003, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0,020, раствор микроэлементов SL-10 – 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,36, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,34, pH 7.2;
- морскую минеральную среду (Marine salt medium) (г/л): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 0,5, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,5, NaCl – 4,0, NH<sub>4</sub>Cl – 0,5, раствор микроэлементов SL-10 – 1;
- среду Ворошиловой-Диановой (1952) в модификации (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; CaCl<sub>2</sub> – 0,02, раствор микроэлементов SL-10, раствор витаминов по Волину – 10 мл (Wolin et al., 1963), FeCl<sub>2</sub> – 2 капли концентрированного раствора, искусственная морская

вода (г/л): NaCl – 27,5, MgCl<sub>2</sub> – 5,0, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 2,0, CaCl<sub>2</sub> – 0,5, KCl – 1,0, FeSO<sub>4</sub> – 0,001, pH 7.0-7.2.

Во все среды в качестве источника углерода добавляли 2% стерильной нефти марки ESPO.

Для создания накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий использовали:

- среду 63 (Desulfovibrio medium) следующего состава (г/л): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5; NH<sub>4</sub>Cl – 1,0; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0,1; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,0; дрожжевой экстракт – 0,1; раствор витаминов по Волину – 5 мл (Wolin et al., 1963); раствор микроэлементов SL-10 – 1 мл; лактат натрия – 3,0; резазурин 100 мкл, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>S – 0,03, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,05, аскорбиновая кислота – 0,1, pH 7.2-7.4;
- среду 195с (Desulfobacter medium): Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2; NH<sub>4</sub>Cl – 0,3; NaCl – 10; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 3,1; KCl – 0,5; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0,15; раствор селенита с вольфрамом – 1 мл; резазурин – 0,5 мл; дист. вода – 920 мл; раствор микроэлементов SL-10 – 1 мл; лактат натрия – 2,5; дист. вода – 10 мл; раствор витаминов по Волину – 10 мл (Wolin et al., 1963); Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O – 0,4; дист. вода – 10 мл, pH 7.2-7.4. Среду стерилизовали автоклавированием при 1 атм.

### 2.3.2.2. Определение физиолого-биохимических свойств штаммов

Окраску по Граму, КОН-тест, тесты на оксидазу, каталазу, определение окисления и ферментации глюкозы и другие стандартные биохимические тесты проводили согласно методикам (Лабинская, 2005; Нетрусов, 2005).

Температурный диапазон роста определяли по удельной скорости роста при 1; 6; 15; 22; 25; 30; 35; 37 °С.

Диапазон солености – по скорости роста при различных концентрациях NaCl (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50) г/л.

Для определения влияния pH среды, клетки культивировали при оптимальной температуре и солености на основной среде при различных

значениях pH: 5.7; 6.3; 6.6; 7.1; 7.3, 7.5; 7.7; 7.9. Значения pH регулировали  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  и буфером NaOH.

Для оценки амилолитической и протеолитической активности исследуемые штаммы высевали на агаризованную среду (Поляк и др., 2002) с добавлением 1,5% казеина или 1,5% крахмала. Культивирование микроорганизмов проводили при температуре 22°C трое суток. Для определения протеаз отмечали образование зон гидролиза субстрата вокруг посева бактерий; а в чашки с крахмальной средой добавляли раствор Люголя и фиксировали появление светлых колец вокруг колоний, свидетельствующее о наличии амилаз.

Для определения способности синтеза фермента – эстеразы использовали твины: 20 (эфир лауриновой кислоты), 60 (эфир стеариновой кислоты, 80 (эфир олеиновой кислоты) и тритон X-100. Посев культуры производили на агаризованную среду в чашки Петри с добавлением твин-субстратов в концентрациях: твин - 20 – 1%, остальные твины и тритон – 0,25%. Образование непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот вокруг колоний бактерий свидетельствовало о положительной реакции.

Способность утилизировать лактозу, галактозу, ксилозу, инозит, дульцит, глюкозу, рамнозу, мальтозу, сахарозу, маннозу, арабинозу, манит, глицерин с образованием кислоты изучали на средах Гисса (The Prokariotes, 1992).

Определение способности использовать карбоновые кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии проводили на агаризованной минеральной среде при 22°C. Использовали ряд карбоновых кислот: пальмитиновая кислота, щавелевая кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, малоновая кислота, салициловая кислота, молочная кислота. Концентрация субстратов в жидкой ростовой среде составляла 1 г/л. Появление роста бактерий свидетельствовало об использовании субстрата.

### 2.3.2.3. Культивирование *Desulfosporosinus* sp. nov.

Выделение чистых культур сульфатредуцирующих бактерий проводили методом десятикратных разведений на жидкой среде 195с в пробирках Хангейта с последующим высевом на плотную среду. Для получения плотной среды в основную среду добавляли агар в количестве 15 г/л. Инкубацию проводили в течение 4-5 недель в темноте, при температуре 26°C. Выросшие колонии выделяли из столбика агара с помощью острых стерильных игл и переносили в пенициллиновые флаконы с жидкой питательной средой для получения биомассы.

### 2.3.2.4. Изучение субстратной специфичности *Desulfosporosinus* sp. nov.

Рост *Desulfosporosinus* sp. nov. с использованием различных доноров электронов оценивали на питательной среде 195с, описанной выше, с сульфатом в качестве акцептора электронов, заменяя лактат на исследуемый субстрат. В работе использовали ацетат (10 мМ), аланин (10 мМ), бутират (5 мМ), этанол (10 мМ), метанол (10 мМ), глицерин (10 мМ), бутанол (10 мМ), пируват (10 мМ), формиат (20 мМ), глутамат (5 мМ), сукцинат (10 мМ), фумарат (5 мМ), трегалоза (2 мМ), малат (5 мМ), глутамин (5 мМ), глицин (10 мМ), L-пролин (10 мМ), арсенат (10 мМ), глюкозу (10 мМ), H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80% : 20%) + ацетат (2 мМ), бензоат (10 мМ), фруктозу (10 мМ), дрожжевой экстракт (1г/л), пептон (1г/л), казаминовые кислоты (1г/л), триптиказу (1г/л).

Способность роста *Desulfosporosinus* sp. nov. с использованием различных акцепторов электронов тестировали на среде 195с с лактатом, и с добавлением соответствующего акцептора электронов вместо сульфата: сульфит (10 мМ), тиосульфат (10 мМ), элементная сера (10 мМ), аморфное железо (III) (10мМ), цитрат железа (10 мМ), диметилсульфоксид (ДМСО) (10мМ), нитрат натрия (10 мМ).

Рост культур, способных к восстановлению серосодержащих соединений, определяли по образованию сероводорода по методике, описанной в гл.2.3.3.2, а

не содержащих серу – по оптической плотности, при длине волны 600 нм. Все опыты осуществляли в трех повторностях.

### **2.3.3. Химические методы**

#### **2.3.3.1. Определение степени биodeградации углеводородов флуориметрическим и хромато-масс-спектрометрическим методами**

Предварительный анализ степени биodeградации углеводородов проводили методом флуориметрического анализа, основанного на экстракции углеводородов гексаном из пробы и измерении интенсивности флуоресценции экстракта на анализаторе жидкости «Флюорат-02-Панорама» по стандартизированной методике (ПНД Ф 14.1:2:4.128-98). Для штаммов с наибольшей способностью к биodeградации проводили анализ на хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS 2010 Ultra (ТОИ ДВО РАН).

Лабораторную посуду для анализа подготавливали в соответствии с ПНД Ф 14.1:2:4.128-98 следующим образом: посуду предварительно отмывали водопроводной водой, затем в нее наливали приблизительно на 1/2 объема концентрированную серную кислоту, тщательно обмывали ею всю внутреннюю поверхность, затем кислоту выливали в специальный сосуд. Пипетки при помощи груши несколько раз заполняли кислотой выше метки, далее их тщательно промывали хлороформом для удаления остатков кислоты и дистиллированной водой (не менее 3 раз); высушивали.

Культивирование проводили в жидкой среде Ворошиловой-Диановой с содержанием 2% нефти при температуре 22°C. Экстракцию проводили с помощью трихлорметана (ХЧ, перегнанный). Каждый образец был экстрагирован 5 мл трихлорметана 3 раза. Из суммарного экстракта отбиралась аликвота объемом 1 мл. Перед проведением хромато-масс-спектрометрического анализа 1 мл аликвоты экстракта был разбавлен трихлорметаном в 4 раза.

Разделение компонентов осуществлялось на капиллярной колонке Ultra ALLOY-5 MS/HT (Frontier Lab., Япония; длина – 30 м, толщина фазы – 0,25 мкм,

диаметр – 0,25 мм, фаза – 5% дифенил, 95% диметилполисилоксан). В качестве газа-носителя использовался гелий марки 6.0. Растворенный в хлороформе образец (1 мкл) с помощью автосэмплера вводился в инжектор, нагретый до температуры 230°C (режим – splitless). Линейная скорость газа-носителя составляла 40 см/с, начальное давление газа – 66 кПа. Образцы хроматографировали в следующем режиме: изотермически в течение 7 мин. при 40°C, при градиенте температуры от 40 до 270°C со скоростью нагрева 4°C/мин, затем изотермически в течение 20 мин. при 270°C. Температура ионного источника составляла 200°C, температура интерфейса масс-спектрометра – 270°C. Диапазон сканирования масс-спектрометра – от 35 до 600 а.е.м с ионизацией электронным ударом при 70 эВ. Масс-фрагментограммы регистрировались по полному ионному току. Интерпретацию органических соединений проводили на основе сопоставления полученных масс-спектров с масс-спектрами соединений из библиотеки NIST 08. Расчет и интерпретация геохимических коэффициентов проводились после внутренней нормализации масс-фрагментограмм по полному ионному току (TIC).

На основании полученных данных проводилось полуколичественное определение линейных углеводородов с длиной цепи от C<sub>10</sub> до C<sub>21</sub> и изопреноидных соединений (фитан и пристан). Раннее воздействие микробной дегградации можно контролировать с помощью соотношений биоразлагаемых углеводородов к менее разлагаемым углеводородам. Изопреноидные углеводороды, как правило, более устойчивы к биодеградации, чем нормальные алканы, поэтому отношение суммы фитан+пристан к сумме соседних нормальных алканов C<sub>17</sub>+C<sub>18</sub> используется в качестве приблизительного индикатора состояния биодеградации (Waples, 1985).

Степень преобладания молекул с нечетным числом атомов углерода можно оценить с помощью индекса CPI – коэффициента нечетности, который представляет собой весовое отношение нечетных гомологов к четным.

Коэффициент нечетности CPI (carbon preference index) рассчитывали по формуле 1 (Zhanga et al., 1998):

$$CPI = \frac{2 \times (C_{11} + C_{13} + C_{15} + C_{17} + C_{19} + C_{21})}{(C_{10} + C_{12} + C_{14} + C_{16} + C_{18}) + (C_{14} + C_{16} + C_{18} + C_{20})}$$

### 2.3.3.2. Определение концентрации сероводорода

Сероводород определяли по методу Cline (1969): в пробирку объемом 10 мл вносили 1 мл раствора 2,4%  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ , добавляли 4-5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,2% N,N-диметил-1,4 фенилен-диаммоний-дихлорида, растворенного в 20%  $H_2SO_4$ . Затем в пробирку вносили 50 мкл 10%  $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ , доводили объем дистиллированной водой до 10 мл, перемешивали и оставляли на 10 минут. Оптическую плотность образца определяли на Фотоколориметре «Экотест 2020-4-PC» при 660 нм. Для получения калибровочной кривой использовали растворы  $Na_2S$  известной концентрации.

### 2.3.3.3. Определение сульфат-ионов в донных отложениях

Определение сульфат-ионов проводили комплексонометрическим методом (Аринушкина, 1979). В первую очередь, готовили водную вытяжку из образцов донных отложений. Для этого 10 г осадка помещали в колбу, к нему добавляли дистиллированную воду до 100 мл. Осадок суспендировали до однородного состояния при постоянном перемешивании. Осадок в воде отстаивали 8-12 часов; по истечении этого времени для дальнейшего исследования отбирали водную вытяжку с растворенными в ней сульфатами.

Для определения сульфат-ионов сначала проверяли содержание  $SO_4^{2-}$  в исследуемой вытяжке объемным методом. Градуированные образцы готовили следующим образом: в первую пробирку приливали 10 мл раствора  $K_2SO_4$ , во вторую и третью приливали 5 мл и 1 мл раствора, содержащего  $K_2SO_4$  соответственно. Вторую и третью пробирки доводили до объема 10 мл дистиллированной водой; во все пробирки добавляли по 2 капли  $HCl$  (1:1), затем приливали по 10 капель 10% хлористого бария, перемешивали. Сравнивали объем

выпавшего осадка  $BaSO_4$  с осадками  $BaSO_4$  в исследуемых водных вытяжках образцов. В зависимости от объема осадка в пробе вытяжки брали следующий объем исследуемого раствора: при содержании 1 мл – 50 мл и больше, при 5 мл – 25 мл, 10 мл – 5 мл и меньше. Объем водной вытяжки, взятый в соответствии с качественно-количественным испытанием, разбавляли дистиллированной водой до 50-100 мл, помещали индикаторную бумажку, пропитанную конго красным и приливали по каплям  $HCl$  до изменения окраски индикаторной бумажки в сине-фиолетовый цвет. Бумажки извлекали, доводили раствор до кипения и приливали 10 мл 0,01 М раствора  $BaCl_2$  для осаждения сульфат-ионов. Оставляли раствор на 1-2 часа до остывания, после приливали 2 капли малахитового зеленого и 5М раствор  $KOH$  до полного обесцвечивания малахитового зеленого. Вносили в полученный раствор несколько капель 0,1 % раствора флуорексона и титровали 0,1 М раствором комплексона III до смены окраски с желтовато-зеленой до оранжево-розовой.

По отдельной аликвотной части определяли концентрацию  $Ca^{2+}$ , чтобы вычесть концентрацию  $Ca^{2+}$  из результатов. Отдельно оттитровали то количество  $BaCl_2$ , которое взяли для осаждения сульфат-ионов.

Содержание  $SO_4$  вычисляли по формуле 2:

$$\%SO_4^{2-} = \frac{(a - (б - в)) * T_{SO_4^{2-}} * 100}{г}$$

а – количество комплексона III, затраченного на титрование  $BaCl_2$ , внесенного в раствор для осаждения сульфат-ионов;

б – количество мл комплексона III, затраченное на титрование избытка ионов  $Ba^{2+}$  вместе с  $Ca^{2+}$ ;

в – количество мл комплексона III, затраченное на титрование  $Ca^{2+}$ ;

$T_{SO_4^{2-}}$  – титр молярного раствора комплексона III, по  $SO_4$ ;

г – навеска пробы (донных отложений), соответствующая титруемой аликвотной части вытяжки.

#### **2.3.3.4. Определение метиловых эфиров жирных кислот**

Состав жирных кислот анализировали на хромато-масс-спектрометре 7890В + 5977В (Agilent Technologies, США) на базе ИБФМ РАН. Биомассу клеток сушили, омыляли (3,75 М NaOH / MeOH, 100°C, 30 мин.) и подвергали кислотному метанолизу (6 N HCl / MeOH, 80°C, 10 мин.). Продукты метанолиза экстрагировали смесью гексан: метил-трет-бутиловый эфир (1: 1 по массе) и обрабатывали щелочью (0,3 М NaOH, 5 мин.). Полученные продукты разделяли на капиллярной колонке с 5% фенилметилсиликоном HP-5MS (0,25 мм x 30 м) в температурном градиенте от 45 до 300°C при 40°C / мин. Жирные кислоты и другие липидные компоненты ионизировались электронным ударом и анализировались в режиме сканирования. Соединения идентифицировали с использованием библиотеки масс-спектрометров NIST17. Содержание жирных кислот определяли как процент от общей площади суммы пиков на масс-фрагментограмме по полному ионному току (TIC).

#### **2.3.3.5. Определение ионов двухвалентного железа**

Метод определения ионов Fe<sup>2+</sup> основан на экстракции ионов феррозином, который образует с двухвалентным железом стабильный комплекс (Lovley et al., 1986). 0,5 мл культуральной жидкости помещали в 3 мл 0,1% раствора феррозина, содержащего 50 мМ HEPES, pH 7.0. Через 1 мин. измеряли поглощение при 562 нм на спектрофотометре Spocol-221 на базе ИБФМ РАН.

#### **2.3.3.6. Анализ дыхательных хинонов**

Хиноны экстрагировали и очищали по методу Collins (1985) из лиофилизированных клеток. Клетки выращивали на среде 195с. К 2 г лиофилизованной биомассы добавляли 50 мл смеси хлороформ-метанол 2:1 (об/об) и встряхивали в течение 3 часов при температуре 12 °С. Экстракт фильтровали и упаривали досуха под вакуумом. Остаток растворяли в 0,2 мл смеси хлороформ: метанол 2:1 (об/об), наносили на пластинки «Silufol» F254

(10×20 см, «Kavalier», Чехословакия) на старте (отступив по 1 см снизу, слева и справа) в виде полосы шириной ~2 мм и хроматографировали в системе растворителей гексан-диэтиловый эфир 85:15 (об/об). Убихиноны имеют  $R_f \sim 0,4$ , менахиноны –  $\sim 0,7-0,8$ . Отмеченный в ультрафиолете (254 нм) участок хроматографического слоя снимали скальпелем и экстрагировали убихиноны 1 мл хлороформа. Экстракт центрифугировали (12 000g, 15 мин.), переносили в пробирку и упаривали в токе азота. Анализ хинонов проведен в ИБФМ РАН, г. Пущино при использовании масс-спектрометра «Finnigan» MX-1310 (Германия) в стандартных условиях прямым вводом пробы при температуре испарения образца 160 °С.

#### **2.3.3.7. Методика определения нитритов с реактивом Грисса**

Метод основан на способности нитритных ионов образовывать интенсивно окрашенные диазосоединения с первичными ароматическими аминами. При определении использовали реакцию с сульфаниловой кислотой и альфа-нафтиламином (реактив Грисса) с образованием розовой окраски. К 10 мл исследуемой культуры прибавляли 1 мл реактива Грисса или 50 мг его сухой навески. Выдерживали при комнатной температуре 20-25 минут.

#### **2.3.4. Микроскопические методы**

Морфологию клеток и чистоту выделенных культур изучали с помощью светового микроскопа Axiostar PLUS (Carl Zeiss, Германия) с фазовым контрастом при увеличении 100×3.5. Визуализацию морфологии сульфатредуцирующих бактерий в высоком разрешении проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа Evo 40 (Carl ZeissAG, Германия) на базе отделения электронной микроскопии «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН под руководством начальника Отдела электронной микроскопии Фомина Д. В. Съемка проводилась в режиме высокого вакуума при 2 кВ.

Из-за условий вакуума и воздействия пучка электронов важным условием является тщательная фиксация бактериальной взвеси и обезвоживание в серии растворов спирта. Непосредственно перед микроскопированием клетки сульфатредуцирующих бактерий из накопительных культур осаживали в пробирке объемом 1,5 мл при помощи центрифугирования 10 минут при 5000 оборотах. Осадок бактериальной взвеси переносили на специальную подложку. Фиксацию бактериальной взвеси на подложке проводили с использованием свежеприготовленного 2% раствора глутарового альдегида при низкой температуре (4°C) 2 часа. После фиксации пробы промывали в физиологическом растворе до трех раз по 10-15 минут. Для обезвоживания проб использовали серии концентраций этилового спирта (30%, 50%, 70%, 80%, 90%) по 10 минут для каждой концентрации. Окончательное обезвоживание проб проводили в 96% этаноле и оставляли подложки на воздухе до испарения спирта (Марданова и др., 2016).

Для устранения эффектов избыточного заряда перед сеансом электронной микроскопии производилось напыление графита на поверхность образцов с использованием аппарата QuorumTechnologies, Великобритания.

### **2.3.5. Филогенетический анализ**

Филогенетический анализ проводили путем поиска гомологичных последовательностей в Международном банке данных (GenBank) с помощью программы BLAST (Altschul, et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Полученные последовательности проверяли на наличие химер в программе Pintail 1.1. Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit, для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.su/clustal>). Филогенетические деревья строили с использованием метода ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) и с использованием пакета программ «Robust Phylogenetic analysis»,

представленных на сайте <http://www.phylogeny.fr/>. Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК выделенных штаммов нефтеокисляющих бактерий, а также полной геномной последовательности сульфатредуцирующей бактерии депонированы в базе данных GenBank.

Разнообразие выделенных штаммов на уровне родов определяли посредством индексов Шеннона и Симпсона (Одум, 1986).

Индекс Шеннона по численности (H) высчитывали по формуле 3:

$$H = - \sum \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

$n_i$  – общая численность родов или видов;

$N$  – общая численность.

Индекс доминирования Симпсона (C) рассчитывали по формуле 4:

$$C = \sum \left(\frac{n_i}{N}\right)^2$$

$C$  – мера доминирования Симпсона;

$n_i$  – общая численность особей рода или вида;

$N$  – общая численность.

Для оценки сходства и отличия таксономического состава по видам в исследуемых районах был рассчитан коэффициент Жаккара ( $K_j$ ) по формуле 5:

$$K_j = \frac{c}{a + b - c}$$

$a$  – количество видов первого района;

$b$  – количество видов второго района;

$c$  – количество общих видов для первого и второго районов.

Для визуализации сходств и отличий микробного разнообразия между газогидратным и негазогидратным районами строили диаграмму Венна.

### **2.3.6. Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Microsoft Office Excel 2007. Полученные данные являются результатами не менее трех независимых опытов. При статистической обработке определяли среднее арифметическое значение, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего. В работе использовали пакет программ ArcGIS 10.4 с использованием Geostatistical Analyst modul. Коэффициенты корреляции рассчитывали с использованием языка программирования R в IDE RStudio 3.3.1 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.1.1/>). Для оценки взаимосвязи между способностью таксономическими группами к утилизации субстратных источников и содержанием метана в донных отложениях была рассчитана корреляция Пирсона (r-Пирсона). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Корреляции с  $p$ -значением  $> 0,01$  не заполнялись, так как считались незначительными. Алгоритм расчета корреляции представлен в Приложении 1.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Распределение функциональных биоиндикаторных генов аэробной и анаэробной биodeградации углеводов нефти в донных отложениях северной части Японского моря

Исследование суммарной ДНК из образцов кернов осадочных отложений проводилось для обнаружения генов аэробного и анаэробного окисления углеводов. Определение функциональных генов проводили с помощью метода «вложенной» ПЦР в реальном времени в 2 этапа на амплификаторе Dpprime-5. На первом этапе использовали высококонсервативный участок 16S рРНК бактерий и архей V3-V4 в качестве второй пары использовали праймеры для биоиндикации.

*alkBB*-гены алкангидроксилазы являются разновидностью генов, кодирующих монооксигеназу, участвующую в аэробном разложении алканов. Алканы – это линейные насыщенные углеводороды, которые составляют значительную часть углеводов нефти и преобладают в морских отложениях. Бактериальное окисление алканов является самым встречаемым в природе; гены, участвующие в биоразложении алканов, обнаружены у бактерий, относящихся к разным филогенетическим группам. В нашем исследовании гены *alkBB* встречаются в пробах донных отложений обоих районов исследования (9 станций).

В условиях отсутствия кислорода наиболее вероятным механизмом деградации алканов в донных отложениях является присоединение алканов к фумарату с помощью метил-алкил сукцинат синтазы. В результате исследований суммарной ДНК образцов донных отложений по гену анаэробной деградации углеводов (*masD*) было выявлено, что в районе присутствия газогидратов (станции OP54-20a GC, OP54-19 GC, OP54-40 GC, OP54-41 GC, OP54-42 GC, OP54-59 GC) гены анаэробной деградации углеводов встречались чаще, чем в районе отсутствия газогидратов (рис. 6).

Исследование гена *bssA*, кодирующего бензилсукцинатсинтазу, ключевой фермент анаэробной деградации ароматических соединений, используется в качестве биомаркера анаэробной деградации углеводов в бескислородных морских отложениях (Acosta-González et al., 2013).

Гены, кодирующие  $\alpha$ -субъединицу бензилсукцинатсинтазы (*bssA*), как и гены *masD*, характерны для обоих районов исследования, но в газогидратном районе их встречаемость выше (4 станции).

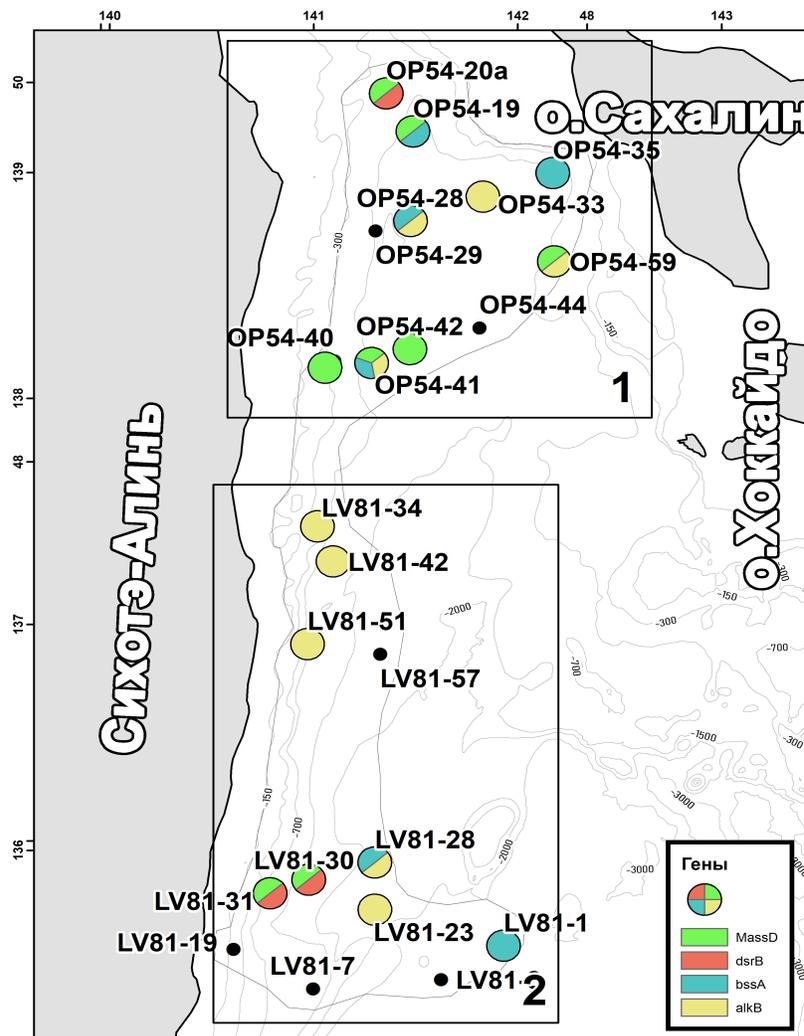


Рисунок 6. Распределение функциональных биоиндикаторных генов в донных отложениях северной части Японского моря.

В пробе, отобранной на станции OP54-41GC, обнаружены гены: *alkBB*, *bssA*, *masD*. Эта станция находится в сеймотектонически активном районе, характеризуется сменой литотипа осадков и неравномерными концентрациями метана, этана и пропана по всей длине керна, что может объяснять особенность обнаружения данных генов.

Таким образом, в газогидратном районе гены анаэробной деградации углеводов (*masD* и *bssA*) встречались чаще. Гены аэробной деградации (*alkBB*) характерны для обоих районов исследования.

### **3.2. Таксономическое разнообразие и физиологические свойства углеводородокисляющих бактерий, выделенных из верхней части окисленного слоя донных отложений в районах присутствия и отсутствия газогидратов в северной части Японского моря.**

Из 23 проб восстановленного слоя донных отложений северной части Японского моря, отобранных в районе обнаружения газогидратов и в районе, где газогидраты обнаружены не были, но отмечаются высокие концентрации метана, было создано в общей сложности 69 накопительных культур. Из накопительных культур была выделена коллекция из 55 штаммов чистых культур, обладающих способностью к окислению углеводов.

Идентификацию выделенных штаммов проводили при помощи секвенирования последовательности 16S рНК.

По результатам секвенирования гена 16S рНК (рис. 7) штаммы микроорганизмов, выделенных из донных отложений, принадлежали к филумам: Proteobacteria (Gammaproteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria.

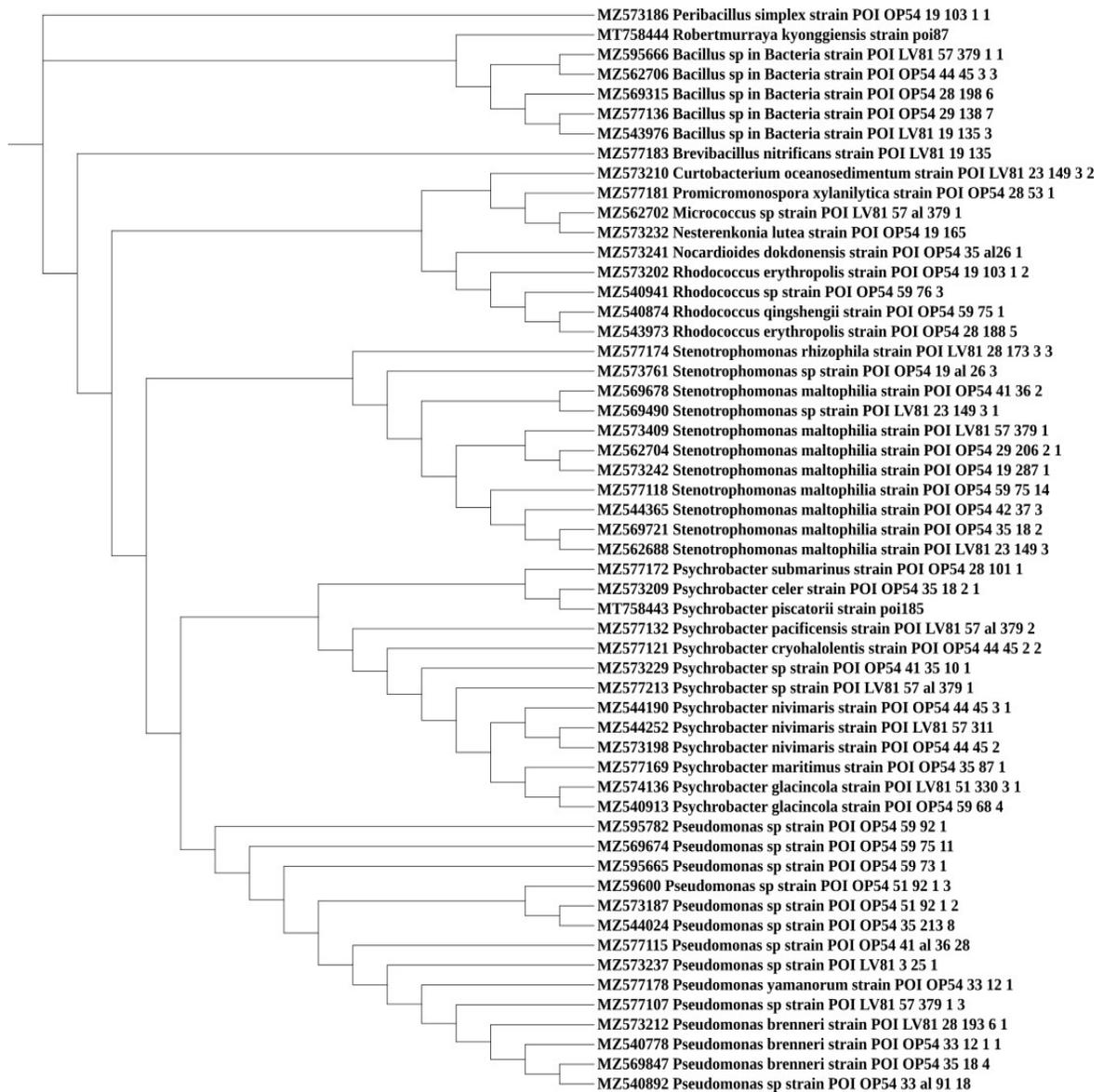


Рисунок 7. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, выделенных из донных отложений северной части Японского моря. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов.

Доля последовательностей, относящихся к филумам, Gammaproteobacteria составила 69%, Firmicutes – 14,5%, Actinobacteria – 16,5%. Все исследуемые штаммы были идентифицированы до рода или вида.

По одной из гипотез, широкая распространенность представителей филумов Proteobacteria и Actinobacteria в местах нефте- и газопроявлений, может объясняться наличием у них «адаптивного» метаболизма, позволяющего приспосабливаться к изменениям условий окружающей среды, происходящим в процессе диагенеза донных отложений и циркуляции флюидных потоков (Ciobanu et al., 2013).

Результаты сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с базой данных NCBI по протоколу BLAST свидетельствуют о том, что последовательности 16S рРНК, наиболее сходные с полученными, принадлежат микроорганизмам, способным к биодegradации углеводов в воде, донных отложениях, почве и других экосистемах.

Доминирующими были представители родов *Pseudomonas* (14 штаммов), *Psychrobacter* (13), *Stenotrophomonas* (11), *Bacillus* (5), *Rhodococcus* (4), к минорным родам относились: *Micrococcus* (1), *Nesterenkonia* (1), *Brevibacillus* (1), *Promicromonospora* (1), *Peribacillus* (1), *Robertmurraya* (1), *Curtobacterium* (1), *Nocardioides* (1).

В районе газогидратной залежи было выделено 37 штаммов, отнесенных к 9 родам, а в районе отсутствия газогидратов почти в 2 раза меньше (18, отнесенных к 8 родам). В районе обнаружения газогидратов преобладают представители рода *Pseudomonas* (31%), а в негазогидратном районе – *Psychrobacter* (28%). Процентное соотношение распределения выделенных штаммов микроорганизмов представлено на диаграммах (рис. 8).

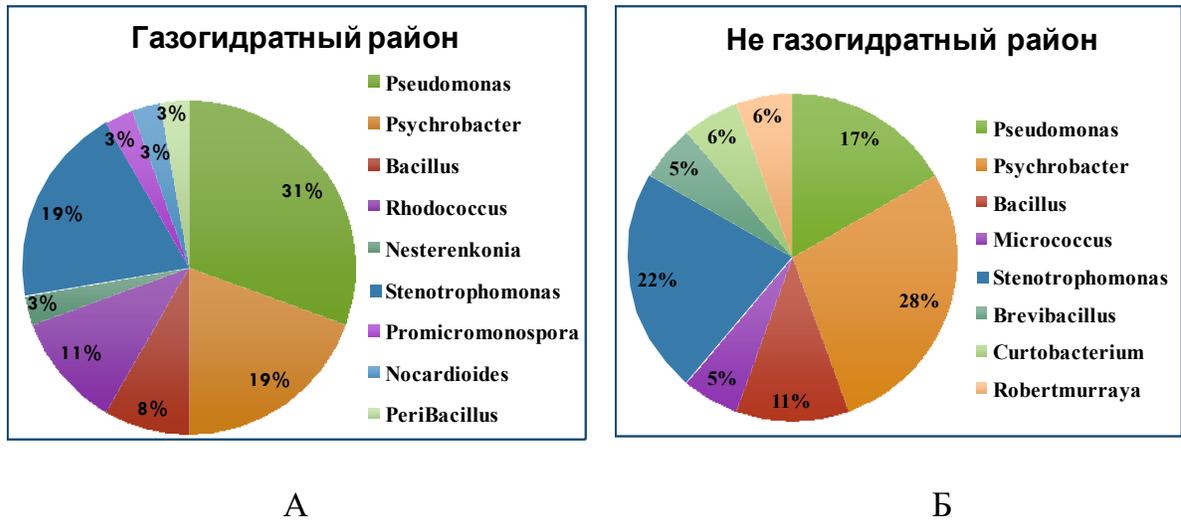


Рисунок 8. Диаграммы, отражающие разнообразие микроорганизмов в донных отложениях и процентное соотношение каждого рода. А – район проявления газогидратов; Б – газогидраты не обнаружены, но концентрации метана являются высокими. Диаграммы построены по результатам анализа библиотеки, полученной с помощью универсальных бактериальных праймеров 11f-1100r. Общее число выделенных штаммов из каждого района взято за 100%.

Штаммы, отнесенные к *Psychrobacter* и *Stenotrophomonas*, на полигоне с газогидратами составляли 22% и 19% соответственно. Доля бактерий рода *Bacillus*, выделенных из района отсутствия газогидрата, составила 17%, а из газогидратного района – 8%.

В районе аномальных газовых полей доля бактерий рода *Pseudomonas* составила 17%. Доля *Stenotrophomonas* в этом же районе – 22%.

Виды *Pseudomonas brenneri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Psychrobacter nivimaris*, *Psychrobacter glacincola* встречались во всех районах исследования.

Для характеристики биологического разнообразия принято использовать индексы альфа- и бета-разнообразия. Альфа-разнообразие – это разнообразие внутри сообщества организмов, включающее в себя по Мэгаррану (1992): количество таксонов и обилие этих таксонов. А бета-разнообразие – это разнообразие между сообществами.

Для оценки биологического разнообразия и доминирования для двух таксономических уровней – родов и видов – были рассчитаны индексы Шеннона и Симпсона (Таблица 2). Индекс Шеннона характеризует разнообразие и выравненность в структуре сообщества. Индекс Симпсона показывает степень доминирования определенных родов в структуре сообщества (Одум, 1986). Анализ полученных индексов показал, что показатель индекса разнообразия родов Шеннона в газогидратном районе немного ниже, чем в негазогидратном районе. Индекс Симпсона в газогидратном районе немного выше, чем в негазогидратном районе. На уровне родов исследуемые районы отличаются незначительным микробным разнообразием.

Таблица 2 - Значения основных индексов разнообразия в исследуемых районах северной части Японского моря

Район / индекс	Газогидратный район	Негазогидратный район
Индекс видового разнообразия Шеннона	1,848	1,875
Индекс доминирования Симпсона	0,191	0,179

Представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter* встречались в обоих районах исследования.

На диаграмме Венна (рис. 9) отражены общие и уникальные таксоны микроорганизмов, выделенные из газогидратного и негазогидратного районов. В газогидратном районе выявлено 5 уникальных родов. К ним отнесены представители родов *Rhodococcus*, *Nesterenkonia*, *Promicromonospora*, *Nocardioides*, *Peribacillus*. В негазогидратном районе к уникальным родам отнесены бактерии 4 родов: *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Robertmurraya*.

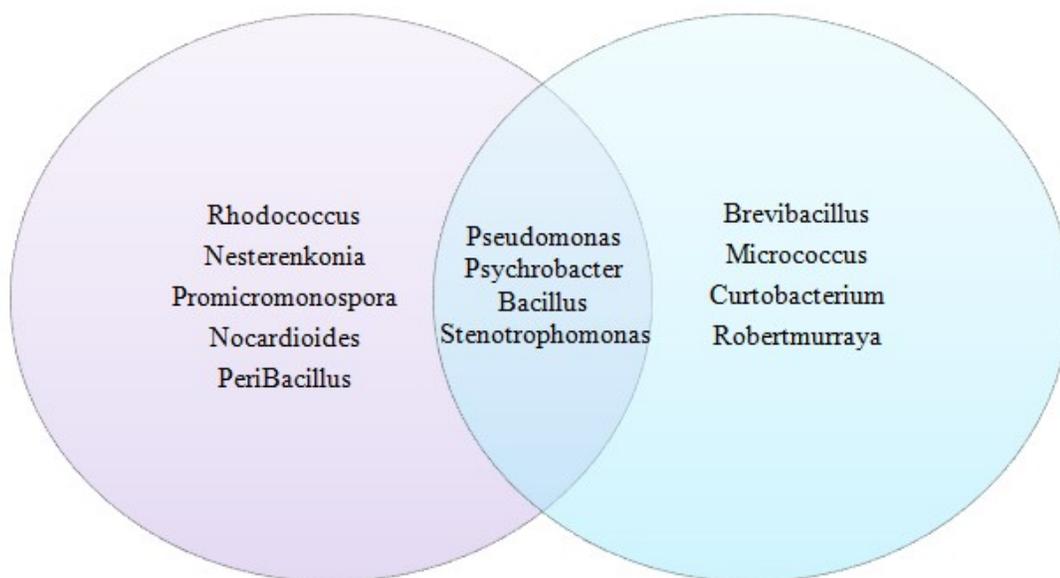


Рисунок 9. Диаграмма Венна. Слева – представители газогидратного района, справа – района, где газогидраты не обнаружены.

Для оценки сходства и отличия таксономического состава выделенных штаммов между исследуемыми районами был рассчитан коэффициент Жаккара. При сравнении количества видов газогидратного и негазогидратного районов коэффициент сходства Жаккара достаточно низкий (0,17), что говорит о большой разнице в таксономическом составе на уровне видов. Наибольшее число общих видов для двух исследуемых районов относится к филуму Gammaproteobacteria.

Все штаммы, относящиеся к филуму Actinobacteria, были уникальными для газогидратного района. При этом представители семейства Nocardiaceae встречались только в газогидратном районе. Семейство представлено пятью штаммами: *Nocardioides* – 1, *Rhodococcus* – 4, отнесенных к 2 родам.

Таким образом, из 55 штаммов 37 были выделены в газогидратном районе (9 родов), в негазогидратном районе было выделено 18 штаммов (8 родов). Представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter* встречались в обоих районах исследования. В газогидратном районе к уникальным отнесены: *Rhodococcus*, *Nesterenkonia*, *Promicromonospora*, *Nocardioides*, *Peribacillus*. В негазогидратном районе – *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Robertmurraya*. На уровне родов исследуемые районы отличаются

незначительным микробным разнообразием. Но отмечено таксономическое разнообразие на уровне видов.

### 3.2.1. Физиологические и биохимические свойства нефтеокисляющих штаммов, выделенных из донных отложений северной части Японского моря

Изучение способности выделенными штаммами ферментировать различные субстраты проводилось традиционными методами (Лабинская, 2005; Нетрусов, 2005). Полный перечень проведенных тестов представлен в Приложении 2. В результате исследований было выявлено, что микроорганизмы, выделенные из района, где газогидраты не обнаружены, потребляют меньшее разнообразие субстратных источников, чем микроорганизмы, выделенные с полигона, где отмечено присутствие газогидратов. Наибольшая разница наблюдалась по потреблению лактата и сукцината штаммами (рис. 10). Лактат усваивался микроорганизмами, выделенными в газогидратной районе в 2 раза интенсивнее, чем сукцинат.

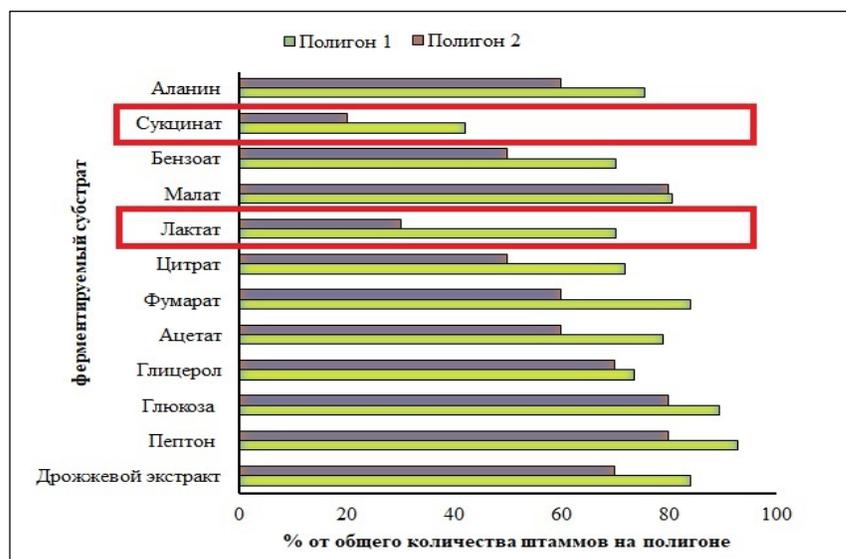


Рисунок 10. Субстратная специфичность исследуемых нефтеокисляющих штаммов. Полигон 1 – газогидратный район; полигон 2 – негазогидратный район.

Для оценки взаимосвязи между способностью таксономическими группами к утилизации субстратных источников и содержанием метана в донных отложениях была рассчитана корреляция Пирсона (рис. 11, 12, 13, 14А). Значение коэффициента корреляции отражено на шкале и может варьироваться от -1 до 1 (-1 указывает на отрицательную корреляцию: это означает, что каждый раз, когда «х» увеличивается, «у» уменьшается; 0 означает, что связи между двумя переменными нет («х» и «у»); 1 указывает на положительную корреляцию: это означает, «у» увеличивается с «х»). На графике рамкой выделены полученные результаты корреляций признаков. Синий цвет свидетельствует о положительной корреляции, а красный – об отрицательной. Размер круга отражает размер коэффициента корреляции.

Как следует из представленных данных на диаграмме, существует отрицательная корреляция между использованием штаммами сахаров в качестве источника углерода и энергии со значениями метана в донных отложениях (рис. 11). Твин-эстеразная активность была обнаружена у 5 штаммов из всех выделенных изолятов. Была отмечена положительная корреляция утилизации твина - 80 с максимальным содержанием метана (рис. 12). Использование штаммами аминокислот (рис. 13) отрицательно коррелирует со значениями метана.

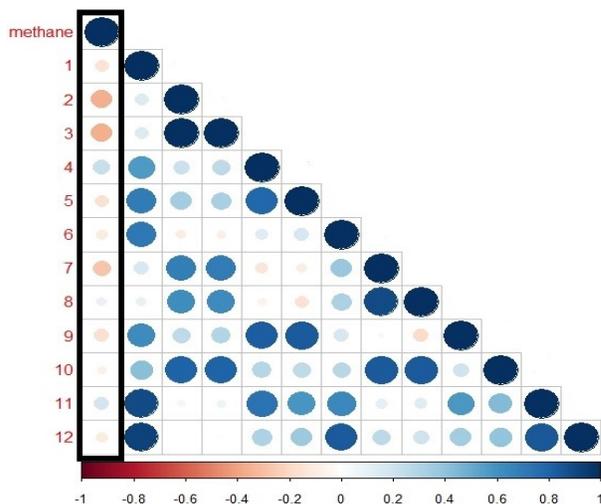


Рисунок 11. График корреляции сахаров с концентрацией метана. Обозначения: 1 – лактоза, 2 – галактоза, 3 – ксилоза, 4 – инозит, 5 – дульцит, 6 – арабиноза, 7 – сахароза, 8 – манит, 9 – глицерин, 10 – глюкоза, 11 – рамноза, 12 – мальтоза. Рамкой выделены полученные результаты корреляций признаков.

Рисунок 12. График корреляции твинов и тритона с концентрацией метана. Обозначения: 1 – твин - 20, 2 – твин - 60, 3 – твин - 80, 4 – тритон X-100. Рамкой выделены полученные результаты корреляций признаков.

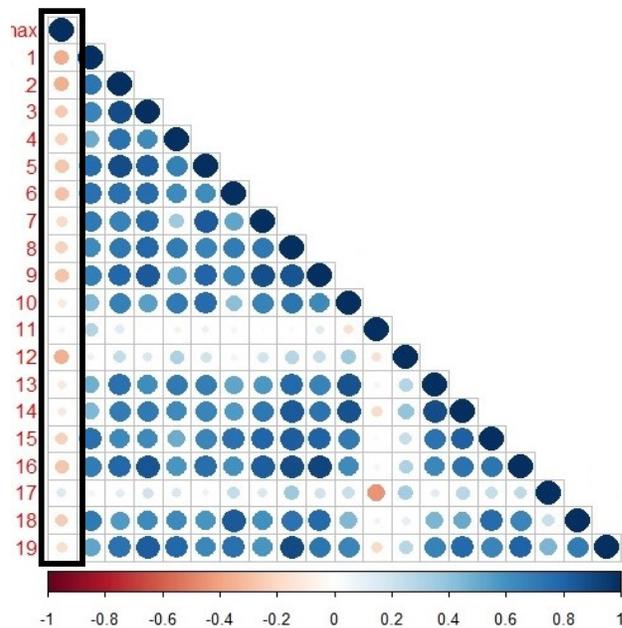
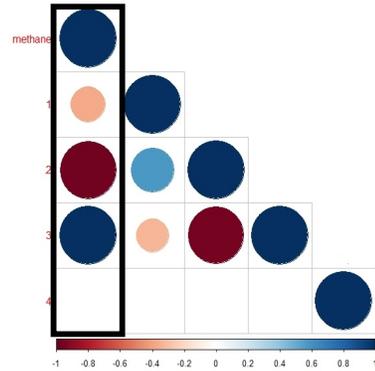


Рисунок 13. График корреляции аминокислот с концентрациями метана. Обозначения: 1 – аминокислотная кислота, 2 – фенилаланин, 3 – орнитин, 4 – аспарагин, 5 – лизин, 6 – аспарагиновая кислота, 7 – аланин, 8 – пролин, 9 – треонин, 10 – валин, 11 – триптофан, 12 – аргинин, 13 – лейцин, 14 – метионин, 15 – серин, 16 – изолейцин, 17 – глутамин, 18 – глутаминовая кислота, 19 – тирозин. Рамкой выделены полученные результаты корреляций признаков.

Но как видно на рис. 14А, отмечается положительная корреляция между способностью к деструкции карбоновых кислот и отсутствием газогидратов. Но положительная корреляция лактата с концентрацией метана отмечена в негазогидратном районе. Как показано ранее, наибольшее число штаммов, использующие в качестве субстрата лактат, выделены из района присутствия газогидратов (рис 14Б).

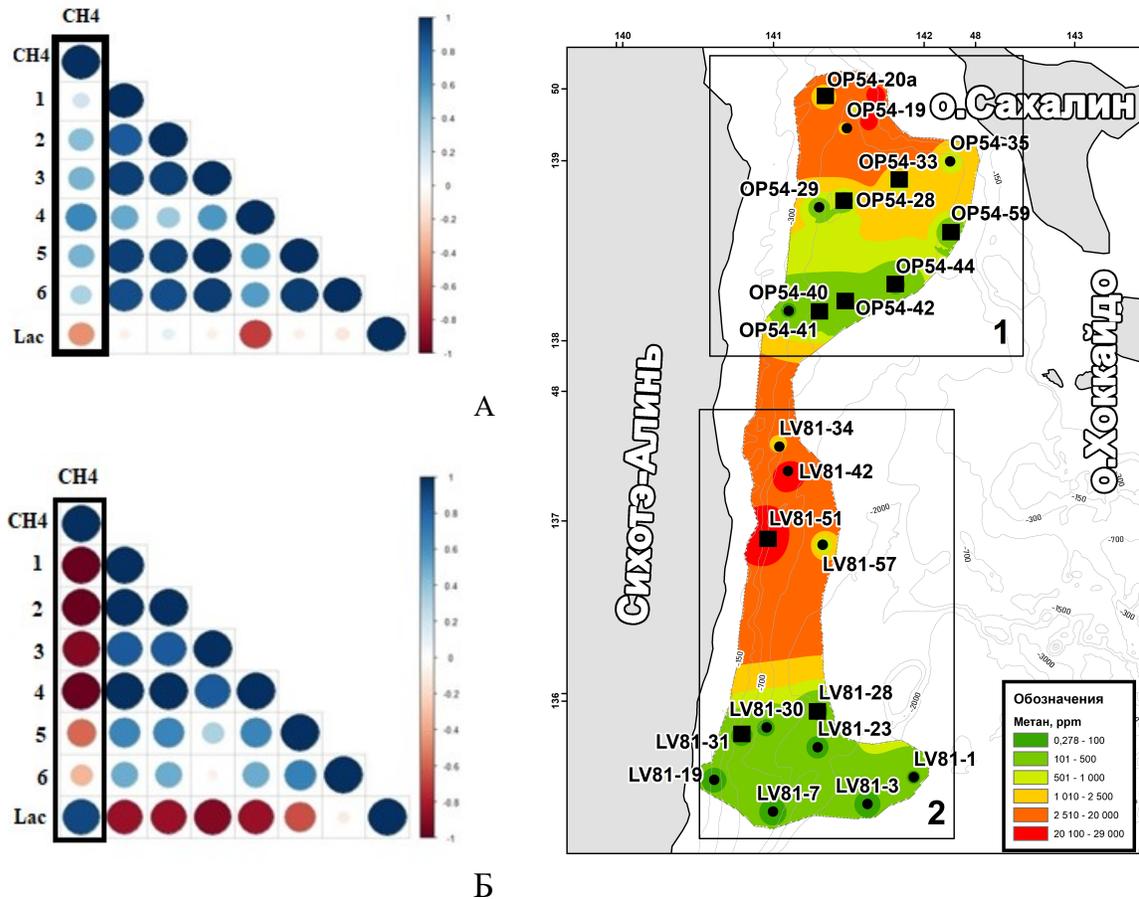


Рисунок 14, А, Б. Графики коррелот корреляции способности к утилизации карбоновых кислот с содержанием метана в донных отложениях. Обозначения: 1 – пальмитиновая кислота, 2 – щавелевая кислота, 3 – янтарная кислота, 4 – лимонная кислота, 5 – малоновая кислота, 6 – салициловая кислота, 7 – молочная кислота. Карта с обозначением станций, на которых выделены нефтеокисляющие штаммы, способные к утилизации лактата. А – газогидратный район; Б – негазогидратный район

Следующим этапом исследования было изучение плазмид. Известно, что на плаزمидах часто локализованы гены, кодирующие способность к биодegradации органических соединений или устойчивость к изменяющимся условиям окружающей среды (Измалкова и др., 2005). Для выявления механизмов адаптационной устойчивости у микроорганизмов донных отложений, связанных с районами выходов газо-флюидных потоков, а также определения признака дегradации углеводородов нефти у исследуемых микроорганизмов, был осуществлен плазмидный скрининг щелочным методом. Было обнаружено, что большинство нефтеокисляющих штаммов содержали 1 легкую плазмиду массой

18 МДа. Но на 3 станциях: OP54-29 GC, OP54-44 GC, OP54-59 GC, расположенных в районе газогидратных залежей обнаруживались штаммы, имеющие 2 плазмиды (рис. 15). Плазмиды были обнаружены у штаммов, принадлежащих к родам *Stenotrophomonas* (*Stenotrophomonas maltophilia* POI OP54-59/75-14 *Stenotrophomonas maltophilia* POI OP54-59/ 206-2(1)), *Bacillus* (*Bacillus* sp. POI OP54-45-3(2), *Psychrobacter* (*Psychrobacter nivimaris* POI OP54-44/ 45-2, *Psychrobacter cryohalolentis* POI OP54-44/45-2 (2)). По данным литературы, *Stenotrophomonas maltophilia*, бактерии рода *Bacillus* (Borah, Yadav, 2014; Mulani et al., 2017) обладают способностью к окислению углеводов, но исследование на выявление плазмид у представителей этих групп не проводились.

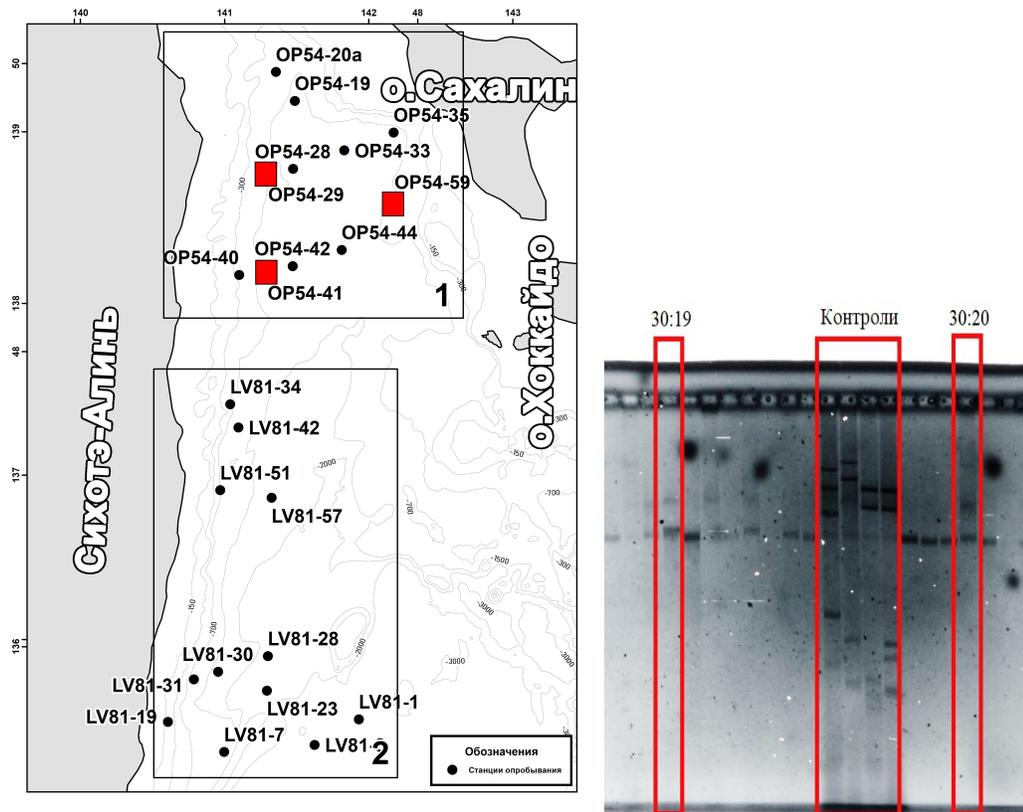


Рисунок 15. На карте красным квадратом отмечены станции, на которых были выделены нефтеокисляющие штаммы с двумя плазмидами массой 20, 30 МДа; справа – электрофореграмма плазмидных ДНК нефтеокисляющих штаммов: красной рамкой выделены дорожки 15-18 – контроль, 10 и 22 – штаммы с двумя плазмидами.

Таким образом, штаммы, выделенные из газогидратного района, обладали меньшей способностью к утилизации углеводных источников, чем штаммы

негазогидратного района. Но положительная корреляция потребления субстратов со значениями метана отмечена в негазогидратном районе. Плазмиды молекулярной массой 30:20 МДа встречались в штаммах родов *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Psychrobacter*. Штаммы выделены из донных отложений газогидратного района.

### 3.2.2. Обнаружение функциональных генов аэробной и анаэробной деградации углеводов в нефтеокисляющих штаммах, выделенных из донных отложений северной части Японского моря

В 18 из 55 исследуемых штаммах были зафиксированы функциональные гены *alkBB* и/или *bssA*, отвечающие за биодegradацию углеводов (рис. 16). Наибольшее количество штаммов с *alkBB* встречали в газогидратном районе. По данным литературы, гены, участвующие в биоразложении алканов встречались у бактерий родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* и др. Впервые *alkBB* выделен из *Rhodococcus ruber* SP2B (Amouric et al., 2010). В нашем исследовании гены *alkBB* обнаружены у штаммов родов *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Psychrobacter*, *Bacillus*. У двух штаммов *Psych. piscatorii* poi185 и *Stenotrophomonas* sp. POI LV81-23/149-3(1) в негазогидратном районе было обнаружено 2 гена одновременно *alkBB* и *bssA* (Приложение 3). Ген *bssA* кодирует фермент бензилсукцинатсинтетазу А, который участвует в процессе анаэробного окисления ароматических углеводов.

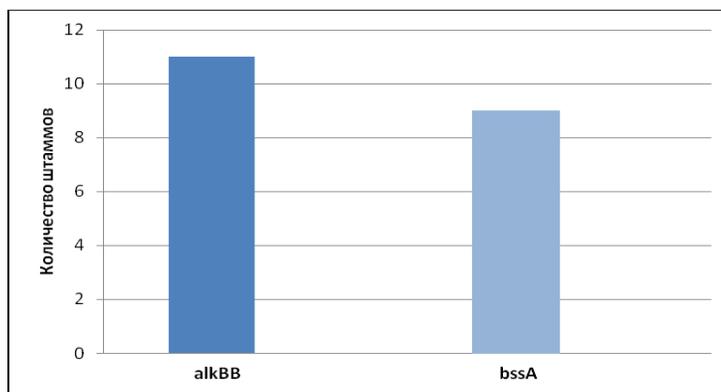


Рисунок 16. Функциональные гены аэробной и анаэробной деградации углеводов у нефтеокисляющих штаммов.

В газогидратном районе у исследуемых штаммов ген *bssA* встречался у 25%, а ген *alkBB* – 27,7% штаммов от общего числа. Штаммы, у которых были зафиксированы 2 гена, на этом полигоне не обнаружены.

Таким образом, в газогидратном районе гены аэробной и анаэробной деградации углеводов в штаммах встречались чаще по сравнению со штаммами, выделенными из негазогидратного района.

### **3.3. Углеводородокисляющая активность бактерий, выделенных из верхней части донных отложений северной части Японского моря**

Оценку способности к биодegradации углеводов исследуемыми штаммами проводили с помощью флуориметрического анализа. Отбирали штаммы, у которых степень биодegradации углеводов за 7 дней превышала 60%. Этим методом из 55 штаммов были отобраны 8: 4 из газогидратного района (*Nes. lutea* POI OP54-19/165, *Pseudomonas* sp. POI OP54-59/92-1-2, *Noc. dokdonensis* POI OP54-35/al26-1, *Prom. xylanilytica* POI OP54-28/53-1) и 4 из района с аномальным содержанием метана (*Micrococcus* sp. POI LV81-57/al 379-1, *Sten. rhizophila* POI LV81-28/173-3(3), *Bac. kyonggiensis* poi87, *Psych. piscatorii* poi185). К уникальным для своего района родам относятся *Nes. lutea* POI OP54-19/165, *Noc. dokdonensis* POI OP54-35/al26-1.

Среди отобранных штаммов проводили более глубокий анализ их способности к биодegradации углеводов с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Степень деструкции насыщенных углеводов штаммами рассчитывалась по отношению суммы фитана и пристана к гептадекану и октадекану и по убыли нефтепродуктов с помощью флуориметрического метода. В газогидратном районе степень деструкции углеводов была ниже, чем в районе аномальных газовых полей континентального склона. Индекс нечетности (CPI), рассчитанный по формуле 1 (Zhanga et al.,1998), уменьшился с 1,23 до показателей близких к 1 в районе отсутствия газогидратов. В районе с газогидратами только у *Noc. dokdonensis* POI OP54-35/al26-1 наблюдается снижение описываемого индекса до 1,13. *Nes. lutea* POI OP54-19/165 в

незначительной степени утилизировали четные углеводороды, поэтому значения СРІ увеличивается до 1,27.

Штаммы, выделенные из района обнаружения газогидратов, в значительной степени использовали углеводороды от C<sub>12</sub> до C<sub>17</sub>.

В зависимости от района, из которого были изолированы штаммы, наибольшие различия во всех рассчитанных биомаркерных индексах наблюдали между парами штаммов *Nes. lutea* POI OP54-19/165 – *Pseudomonas* sp. POI OP54-59/92-1-2 и *Psych. piscatorii* poi185 – *Rob. kyonggiensis* poi87. Оставшиеся 4 штамма были близки друг к другу независимо от места выделения.

Все штаммы, выделенные в газогидратном районе, практически не были способны к биодegradации углеводородов с длиной цепи выше C<sub>20</sub>. Убыль углеводородов в культуральной среде составляла от 28,37 до 1,32% от исходного значения (таблица 3). В районе аномальных газовых полей этот же показатель варьировался от 55,72 до 90,46%. Независимо от района все штаммы хорошо окисляли углеводороды с длиной цепи от C<sub>14</sub> до C<sub>16</sub>. Уменьшение содержания декана *Sten. rhizophila* POI LV81-28/173-3(3) и *Sten. rhizophila* POI LV81-28/173-3(3) и 4 штаммами из района обнаружения газогидратов происходило в диапазоне от 51,2 до 62,51%. Штаммы *Psych. piscatorii* poi185 и *Rob. kyonggiensis* poi87 утилизировали декан на 71,4 и 83,27% от исходного соответственно.

Таблица 3 - Показатели биодеструкции углеводородов исследуемыми штаммами в аэробных условиях

Штамм	Степень деструкции насыщенных УВ	Убыль углеводородов в % от исходного количества*	СРІ	$\frac{(C_{12} + \dots + C_{17})}{(C_{18} + \dots + C_{21})}$
Сырая нефть (исходные показатели)	0,90		1,23	9,24
Газогидратный район				
<i>Nes. lutea</i> POI OP54-19/165	3,14	<b>59,88</b>	1,27	3,63

<i>Pseudomonas</i> sp. POI OP54-59/92-1-2	3,06	60,10	1,22	2,61
<i>Noc. dokdonensis</i> POI OP54-35/al26-1	6,21	72,69	1,13	2,50
<i>Prom. xylanilytica</i> POI OP54-28/53-1	5,58	71,83	1,22	2,71
Аномальные газовые поля				
<i>Micrococcus</i> sp. POI LV81-57/al 379-1	6,27	79,57	1,23	3,76
<i>Sten. rhizophila</i> POI LV81-28/173-3(3)	5,83	73,85	1,20	3,71
<i>Rob. kyonggiensis</i> poi87	<b>9,04</b>	84,66	1,16	9,14
<i>Psych. piscatorii</i> poi185	<b>14,47</b>	<b>89,83</b>	<b>0,99</b>	7,98

Примечание: данные, полученные с помощью флуориметрического анализа

Таким образом, в негазогидратном районе степень деструкции углеводородов, как и процент убыли углеводородов, были выше, чем в газогидратном районе. Штаммы, выделенные в газогидратном районе, использовали углеводороды от  $C_{12}$  до  $C_{17}$  и практически не были способны к биодegradации углеводородов с длиной цепи выше  $C_{20}$ .

### 3.3.1. Особенности деструкции углеводородов выделенными штаммами в аэробных и анаэробных условиях

Для определения способности выделенными штаммами деструкции углеводородов нефти в анаэробных условиях использовали среду Ворошиловой-Диановой (соленость 35‰) с содержанием 2% нефти в качестве единственного источника углерода. Из всех выделенных штаммов способностью к деградации углеводородов в аэробных и анаэробных условиях обладали 38 штаммов родов:

*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* (рис. 17).

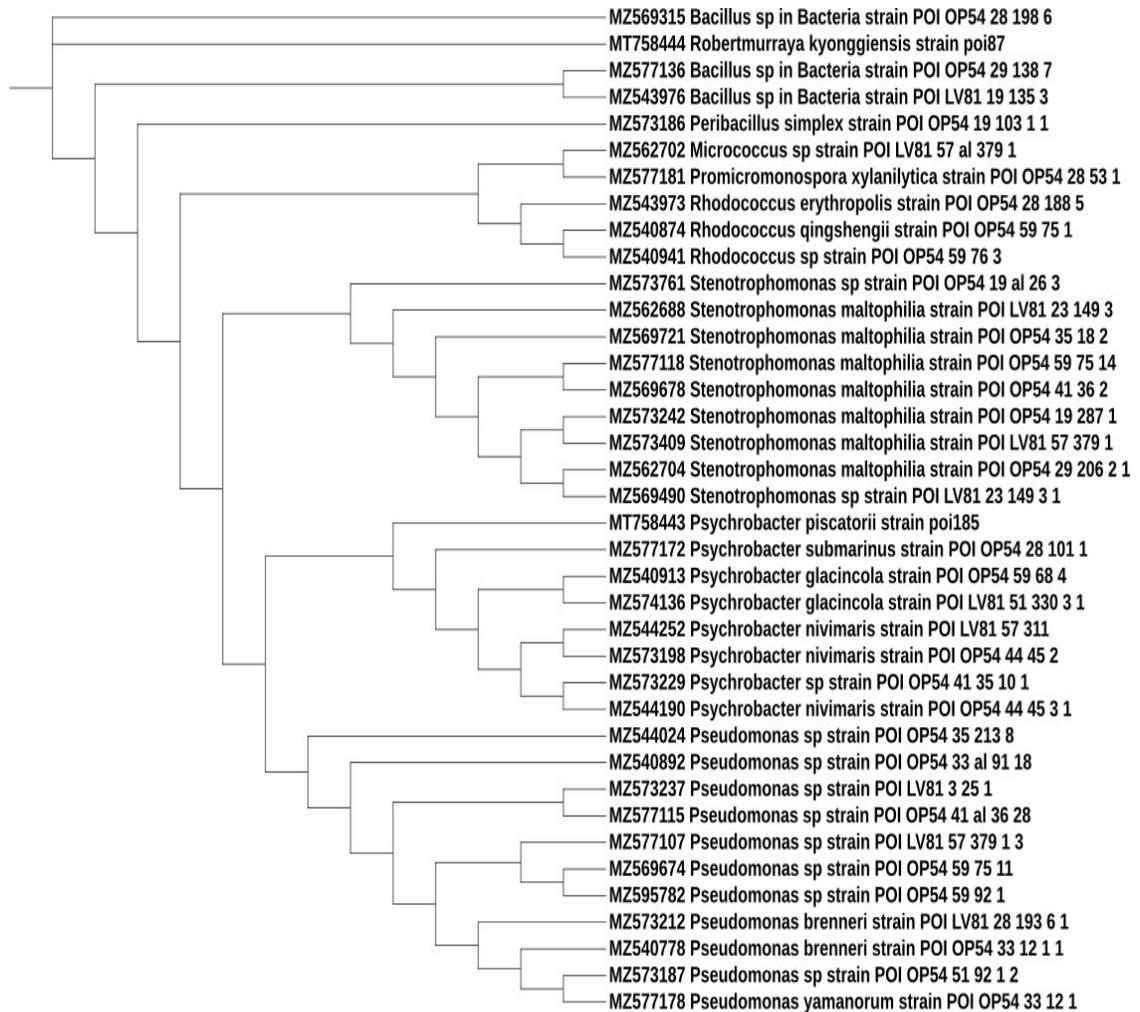


Рисунок 17. Филогенетическое древо микроорганизмов, способных к окислению углеводов в аэробных и анаэробных условиях.

В газогидратном районе способностью к деградации углеводов нефти в анаэробных условиях обладали 26 штаммов (70,2% от всех выделенных штаммов в этом районе); в негазогидратном – 12 штаммов обладали этой способностью (66,6% от всех выделенных штаммов в этом районе).

Все исследуемые штаммы родов *Pseudomonas*, *Bacillus* обладали способностью к деструкции углеводов в аэробных и анаэробных условиях; бактерии родов *Psychrobacter* и *Stenotrophomonas* обладали этой способностью, но в меньшей степени (рис. 18).

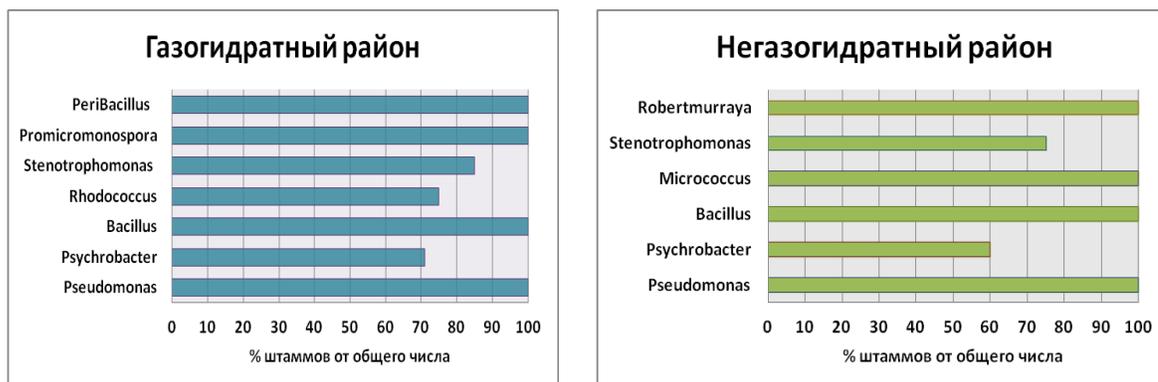


Рисунок 18. Количество штаммов (%), способных к аэробному и анаэробному окислению углеводов по родам.

Процент уникальных штаммов, обладающих способностью к окислению углеводов в аэробных и анаэробных условиях, выделенных из газогидратного района, составил 62%. В негазогидратном районе этой способностью обладало 50% уникальных штаммов.

До настоящего исследования нет опубликованной информации о способности к окислению углеводов нефти в аэробных и анаэробных условиях микроорганизмами исследуемых родов. За исключением исследования Гайдамака с соавторами (2020), в котором показана способность бактерий рода *Rhodococcus* к окислению углеводов в условиях отсутствия кислорода.

В аэробных и анаэробных условиях деградация линейных углеводов нефти происходила по-разному (рис. 19). Например, в аэробных условиях *Robertmurraya kyonggiensis* poi87, как и *Psychrobacter piscatorii* poi185, в наибольшей степени окислял углеводороды C<sub>17</sub> – C<sub>21</sub>. В анаэробных условиях, наоборот, интенсивнее происходило окисление углеводов C<sub>9</sub> – C<sub>13</sub> в случае обоих штаммов (утилизация углеводов нефти составила более 30%).

Увеличение длины цепи углеводов приводило к резкому снижению степени утилизации. *Psych. piscatorii* poi185 в анаэробных условиях в наибольшей степени окислял нонан (100%).

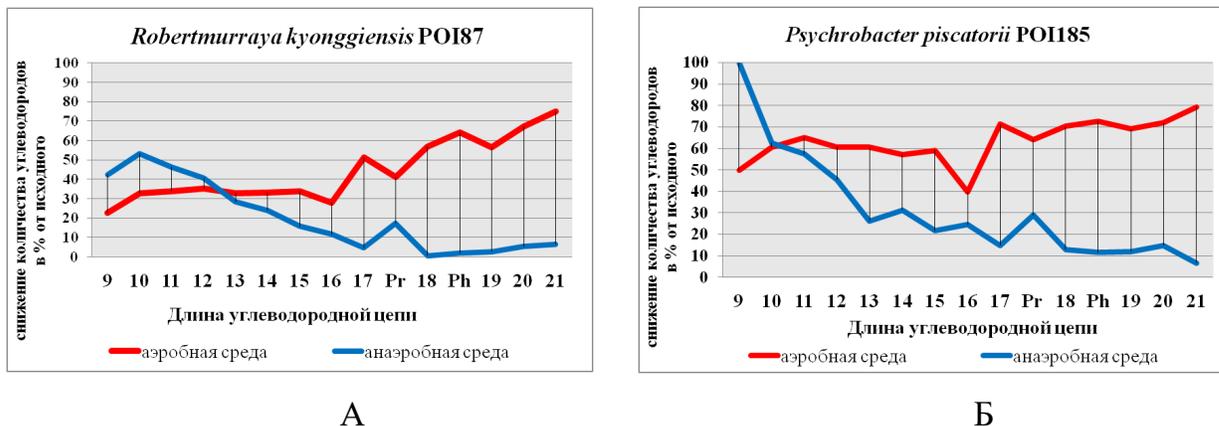


Рисунок 19. Дегградация углеводов нефти в аэробных и анаэробных условиях *Robertmurraya kyonggiensis* poi87 (А) и *Psychrobacter piscatorii* poi185 (Б)

Таким образом, нами впервые показана способность штаммов, отнесенных к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora*, к деструкции углеводов нефти в анаэробных условиях. Установлено, что в аэробных и анаэробных условиях дегградация линейных углеводов нефти происходит по-разному.

## **Глава 4. Выделение углеводородокисляющих сульфатредуцирующих бактерий из донных отложений северной части Японского моря. Новый вид *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8**

### **4.1. Выделение нового вида сульфатредуцирующей бактерии рода *Desulfosporosinus***

Для исследования наличия сульфатредуцирующих бактерий в донных отложениях исследуемых районов использовали ген *dsrB* как универсальный генетический маркер (Bagwell et al., 2009). Этот ген кодирует  $\beta$ -субъединицу диссимиляционной (би) сульфитредуктазы – ключевого фермента метаболизма всех сульфат- и сульфитредуцирующих микроорганизмов (Корнеева, 2015). Гены – индикаторы сульфатредуцирующих микроорганизмов (*dsrB*) зафиксированы в донных отложениях обоих районов исследования, на станциях, находящихся на континентальном склоне (OP54-20a GC, LV81-30 GC, LV81-31GC).

Для выделения и идентификации углеводородокисляющих сульфатредуцирующих микроорганизмов было создано 46 накопительных культур на анаэробно приготовленных средах. Температура культивирования составляла 26°C, время культивирования 1-1,5 месяца. В накопительных культурах фиксировали образование сероводорода в качестве индикатора процесса сульфатредукции.

Образование сероводорода было обнаружено в 17% всех исследуемых проб. Станции, на которых был зафиксирован данный процесс, располагались вдоль континентального склона (рис. 20).

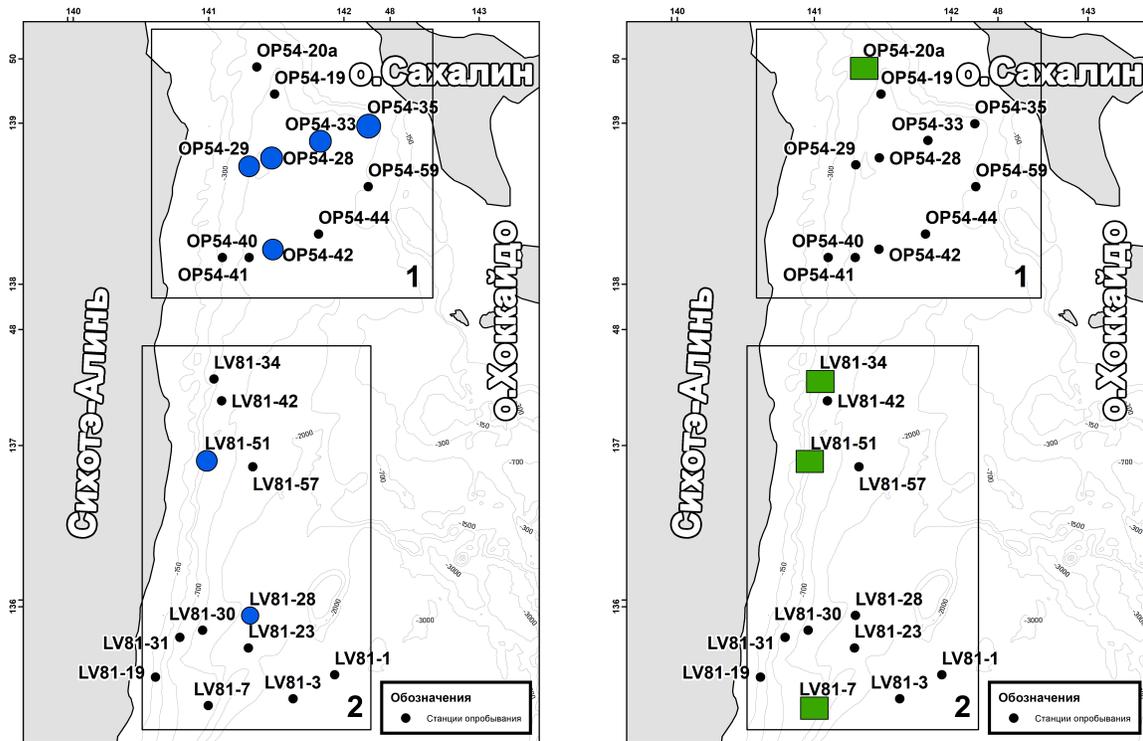


Рисунок 20. Синим цветом отмечены станции с повышенным содержанием сульфатов; зеленым – станции, в пробах которых зафиксирован процесс сульфатредукции.

При положительной реакции на сероводород производили десятикратные разведения с последующим высевом на среду того же состава, что и для накопительных культур, только с добавлением агара. Инкубировали в течение 4-5 недель. Выросшие колонии были точечные, округлые, черного цвета, матовые, с ровными краями, гладкие.

Из донных отложений станции OP54-20a GC с глубины 592 метра от поверхности моря был выделен штамм SRJS8, принадлежащий к роду сульфатредуцирующих бактерий *Desulfosporosinus*.

На основании филогенетического анализа почти полной нуклеотидной последовательности гена 16S рНК (1628 п.о.) ближайшим соседом с 98,5% сходства является *Desulfosporosinus lacus* STP 12<sup>T</sup> (AJ582757) – бактерия, выделенная из донных отложений озера Штехлин, Германия (Ramamoorthy et al., 2006) (рис. 21). Этот штамм был выписан в качестве референс-штамма из

Коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ (Брауншвейг, Германия).

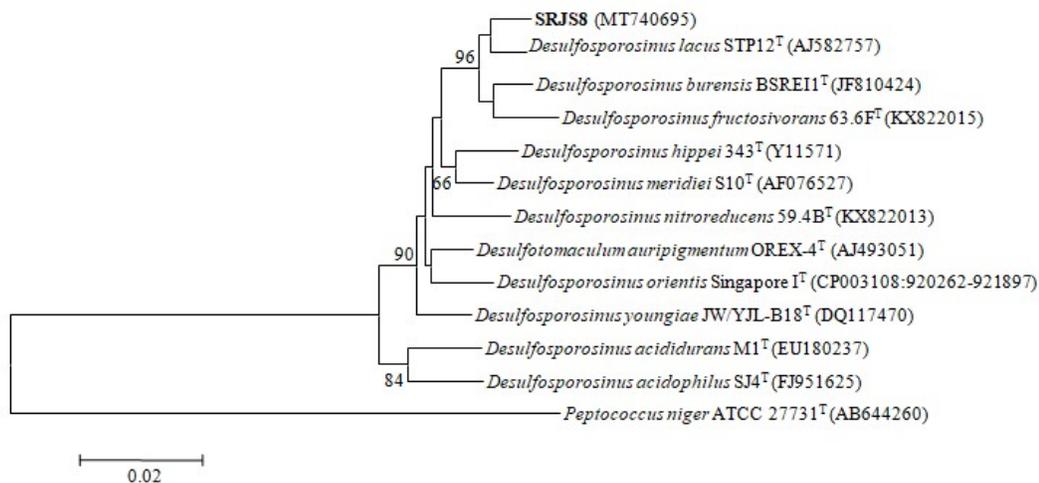


Рисунок 21. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма SRJS8 среди ближайших гомологов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода «neighbour-joining». Длина масштабной линейки: 2 замены на 1000 нуклеотидов. Данные «bootstrap»-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Полученная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма SRJS8 была депонирована в GenBank под номером MT740695.2, а также во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКР) ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН под номером В-3540. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма SRJS8 представлена в Приложении 4.

#### 4.2. Геносистематические характеристики штамма

Последовательность генома штамма SRJS8 определяли с использованием платформы Illumina NovaSeq. Содержание Г+Ц в ДНК исследуемого штамма SRJS8 составило  $42,08 \pm 0,3\%$ . При парных сравнениях Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) значения  $d_0$ ,  $d_4$  и  $d_6$  ДНК-ДНК ( $d_{DDH}$ ) гибридизации не

превышали 57,4% (таблица 4). Поскольку эти значения ниже 70% (пороговое значение для определения нового вида), штамм SRJS8 представляет новый вид рода *Desulfosporosinus*.

Средняя идентичность нуклеотидов (ANI) геномов штамма SRJS8 с референс-штаммом *Desulfosporosinus lacus* DSM 15449 была определена с использованием ANI-калькулятора (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani>) и составила 86,7% (Таблица 4). Поскольку значение ANI значительно ниже значения межвидового барьера (94-96%), принадлежность штамма SRJS8 к новому виду подтверждается.

Таблица 4 - Значения сходства по последовательности генома, значения ANI и dDDH штамма *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 с его близкородственным видом *Desulfosporosinus lacus*.

Вид	№ штамма в NCBI	ANI (%)	dDDH (%)
<i>Desulfosporosinus</i> sp. nov. SRJS8	JAJDOO010000000		
<i>Desulfosporosinus lacus</i> DSM 15449	NZ_FQXJ01000000	86,7	57,4

На основании вышеприведенных результатов нами был предложен новый вид *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8. Диагноз предложенного нового вида представлен в разделе Приложение 5.

Полногеномная последовательность задепонирована в GenBank под регистрационным номером JAJDOO010000000.

#### 4.3. Морфология штамма *Desulfosporosinus* sp.nov.SRJS8

Микроскопические исследования показали, что бактерия имеет форму палочки (рис. 22 А), подвижна. Характерно наличие терминальной эндоспори (рис. 22 Б).

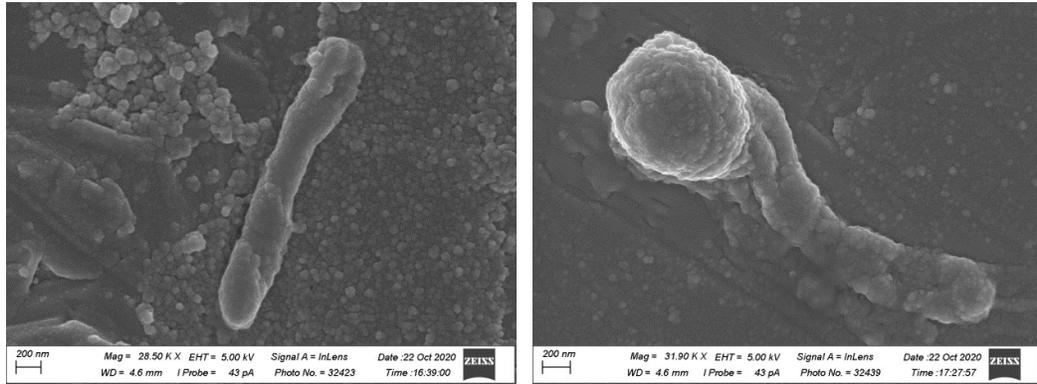


Рисунок 22. А – Морфология *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8; Б – образование эндоспоры (Сканирующий электронный микроскоп, увеличение 28,5\* и 30,9). Длина масштабной линейки – 200 нм

#### 4.4. Особенности роста при различной температуре, солености и pH

Выделенный штамм нового вида является облигатным анаэробом, рост которого отмечен в диапазоне температур 20-30°C (при оптимуме 25°C) и в интервале pH: 6-8 (оптимумом 7,17-7,26). Штамм оптимально рос в среде с содержанием NaCl от 0 до 10 г/л (оптимальным содержанием NaCl было 2 г/л).

#### 4.5. Рост культур на различных субстратах

Исследуемый штамм *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 в присутствии сульфата способен использовать ацетат (20 мМ), формиат (10 мМ), фумарат (10 мМ), этанол (10 мМ), метанол (10 мМ), лактат (20 мМ), дрожжевой экстракт (1 г/л) в качестве источника углерода и донора электронов. *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 не использовал аланин, глицерин, сукцинат, малат, бензоат, цитрат и глюкозу. Помимо сульфата как конечного акцептора электронов штамм *Desulfosporosinus* sp.nov.SRJS8 использовал тиосульфат, но не использовал элементную серу и сульфит.

Таблица 5 - Изучение способности культуры *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 использовать различные доноры/акцепторы электронов (в сравнении с ближайшими гомологами).

Субстратная специфичность	<i>Desulfosporosinus</i> sp.nov. SRJS8	<i>D. lacus</i> (Ramamoorthy et al., 2006)	<i>D. fructosivorans</i> (Vandieken et al., 2017)	<i>D. burensis</i> (Mayeux et al., 2013)
Трегалоза	+	н/д	н/д	н/д
Нитрат натрия	+	н/д	н/д	-
Фумарат (донор)	+	+	+	-
Фумарат (акцептор)	-	-	-	-
Дрожжевой экстракт	+	+	н/д	+
Пептон	+	-	н/д	н/д
Ацетат H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	+	+	н/д	н/д
ДМСО	н/д	н/д	+	н/д
Арсенат	-	-		н/д
Сульфит	-	+	+	+
Тиосульфат	+	+	+	+
Сульфат	+	+		+
Глутамин	-	н/д	н/д	н/д
Глицин	-	н/д	н/д	н/д
Лактат	+	+	+	-
Сера	-	-	+	-
Бутанол	-	н/д	н/д	-
Глицерин	-	+	+	+
Метанол	+	+	н/д	+
Бутират	-	+	н/д	н/д
Этанол	+	+	+	-
Аланин	-	н/д	н/д	н/д
Бензоат	-	-	н/д	-
Малат	-	-	+	-
Сукцинат	-	-	н/д	-
Формиат	+	+	н/д	+

Триптиказа	-	н/д	н/д	н/д
Казаминовые кислоты	-	н/д	н/д	н/д
Фруктоза	-	н/д	+	+
Глюкоза	-	-	н/д	-
Ацетат	+	-	н/д	-
Пируват	+	+	н/д	+
L-Пролин	-	н/д	н/д	н/д
Цитрат железа	-	н/д	н/д	-
Глутамат	-	н/д	н/д	н/д
Железо аморфное	-	н/д	н/д	н/д
Железо (III)	-	н/д	н/д	-

Примечание: н/д – нет данных

#### 4.6. Липидный анализ

Изучение профилей жирных кислот выделенного штамма *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 показало, что доминирующими жирными кислотами являются пальмитоолеиновая (C16:1), гексадекановая (C16:0), iC15:0 миристиновая (C14:0) (таблица 6), а минорными компонентами – C15:0, iC17:0, C17:1, aC17:0, C18:1, C18:0.

У референс-штамма преобладающими жирными кислотами в клетках являются: пальмитоолеиновая (C16:1), гексадекановая (C16:0), C18:1*cis*11.

Таблица 6 - Состав жирных кислот штамма *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 в сравнении с референс-штаммом. Представлены значения в процентах от общего количества. Полужирным начертанием выделены доминирующие жирные кислоты.

Жирная кислота	<i>Desulfosporosinus</i> sp. nov. SRJS8	Референс-штамм <i>D. lacus</i> (Ramamoorthy et al., 2006)
C14:0	<b>18.100</b>	3.7
iC15:0	<b>12.481</b>	0.3
C15:0	1.019	н/д
C16:1	<b>38.789</b>	<b>26.3</b>
C16:0	<b>12.830</b>	<b>15.1</b>
iC17:0	1.853	н/д
C17:1	6.262	0.6
aC17:0	0.502	н/д
C18:1	5.338	<b>16.7</b>
C18:0	0.922	3.6
Другие	1.903	3

Примечание: н/д – нет данных

#### 4.7. Содержание менахинонов

Менахинон (витамин К) – терпеноидный липид, локализованный в мембранах бактериальных клеток, который играет важную роль в транспорте электронов в дыхательной цепи. С помощью дифференциального СО-спектрального анализа цитоплазматической фракции клеток штамма *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 был получен пик при длине волны 649 нм, свидетельствующий о наличии СО-связывающего цитохрома с в клетках бактерий. Менахинон МК-7 присутствовал в клетках исследуемого штамма (рис.

23). Менахинон МК-7 свойственен для представителей рода *Desulfosporosinus* (Spring, Rosenzweig, 2006).

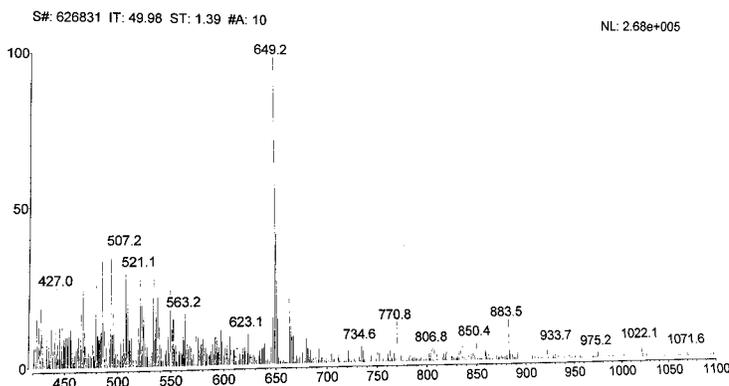


Рисунок 23. Масс-фрагментограмма менахинона МК-7

#### 4.8. Оценка способности к биодegradации углеводов *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8

Сульфатредуцирующие бактерии часто выделяют из нефти и вод нефтяных месторождений морей (Leu et al., 1999; Kotlar et al., 2011; Bian et al., 2015). Бактерии, способные к анаэробной деструкции углеводов и восстановлению сульфатов, относят к родам: *Desulfurovibrionales*, *Desulfuromonadales*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina* и др. По данным базы данных LPSN, в настоящее время представителей рода *Desulfosporosinus* насчитывается 13 видов. Только два представителя рода – *Desulfosporosinus fructosivorans* и *Desulfosporosinus nitroreducens* выделены из донных отложений Балтийского моря (Vandieken et al., 2017).

При оценке способности к деградации углеводов *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 и референс-штамма *Desulfosporosinus lacus* было выявлено, что *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 интенсивнее окислял углеводороды нефти, чем *D. lacus* (рис. 24).

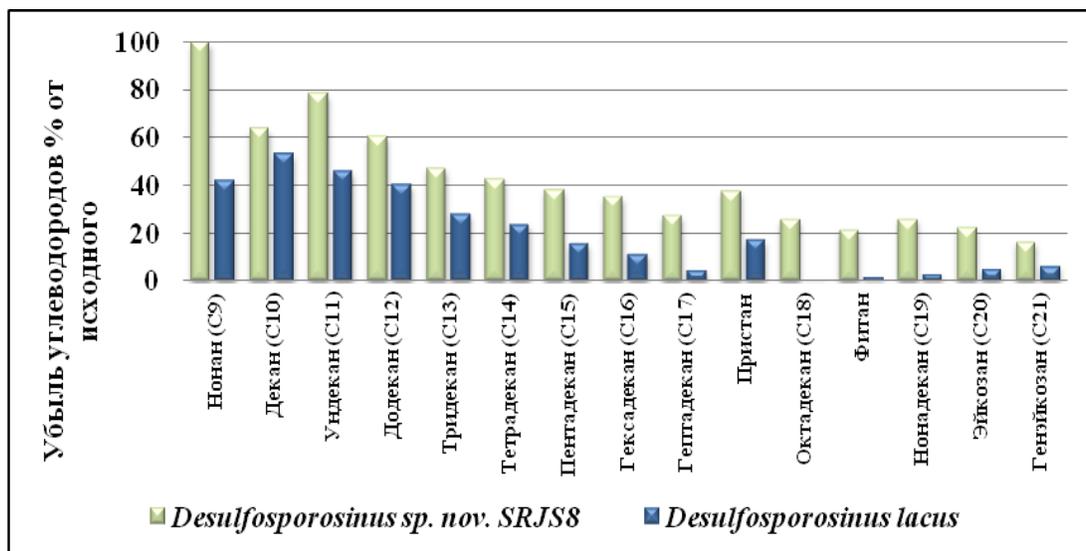


Рисунок 24. Степень биодegradации углеводов исследуемыми штаммами *Desulfosporosinus sp.nov.SRJS8* и *D. lacus*

Менее всего штамм использовал генэйкозан (3% потребления). В большей степени *Desulfosporosinus sp. nov. SRJS8* окислял нондекан (100%). В литературе нет упоминаний о потреблении бактериями рода *Desulfosporosinus* нондекана и генэйкозана. Как видно из графика, референс-штамм обладает меньшей способностью к деструкции углеводов.

Таким образом, нами впервые выделена бактерия рода *Desulfosporosinus* из донных отложений Японского моря в районе, связанном с выходом газо-флюидных потоков, также впервые проведены исследования способности к окислению углеводов бактериями рода *Desulfosporosinus*.

## Заключение

Северная часть Японского моря является уникальным районом, где были обнаружены самые мелководные газогидраты в Мировом океане. Газогидраты были найдены на глубине моря 322 метра и есть предпосылки их обнаружения на еще меньших глубинах в Татарском проливе. Газогидраты в осадочных отложениях этого района залегают близко ко дну и обнаруживаются прямыми методами до горизонта 5-6 м ниже поверхности дна. Район скопления газогидратов характеризуется проявлениями многочисленных газовых «факелов», что указывает на активный газогеохимический режим придонной среды. Район относится к западной газогеохимической провинции Охотоморского региона. В зоне перехода от южной части Татарского пролива к Центральной котловине и на континентальном склоне газогидраты не обнаружены, но отмечаются аномальные концентрации метана и перспективные структуры концентрирования газов в осадочной толще. Возможно, газогидраты здесь присутствуют, но на больших глубинах в осадках и не оказывают влияния на микробиом поверхностного слоя донных отложений. Таким образом, выявлены новые геомикробиологические индикаторы приповерхностных газогидратных скоплений, которые являются наиболее перспективным объектом с точки зрения исследования их влияния на подводные экосистемы и использования как возможного энергетического ресурса будущего. Следовательно, микробное сообщество в данных районах исследования является уникальным и обладает рядом таксономических и физиологических особенностей, которые обусловлены присутствием или отсутствием малоглубинных газогидратов. В результате исследований образцов суммарной ДНК донных отложений газогидратного и негазогидратного районов было выявлено, что в районе активных газо-флюидных потоков над аномальными газовыми полями гены анаэробной деградации углеводов встречались чаще, чем в районе, где газогидраты обнаружены не были. В пробе, отобранной на станции OP54-41GC, обнаружены гены аэробной и анаэробной биодеградации углеводов. Оценка микробного разнообразия молекулярно-генетическими методами совместно с изучением тинкториальных, морфологических и

физиолого-биохимических свойств бактерий позволили показать существенные отличия на уровне таксонов и использования субстратных источников штаммами, выделенными из районов присутствия и отсутствия газогидратов. Бактериальное сообщество углеводородокисляющих бактерий в донных отложениях, по данным анализа 16S рРНК, сформировано тремя филумами: Firmicutes, Proteobacteria и Actinobacteria, что подтверждается литературными данными. Наибольшее число общих видов для двух исследуемых районов относится к филуму Proteobacteria, классу Gammaproteobacteria. Показано, что в исследованных образцах донных отложений доминируют представители родов *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*. Установлено, что в газогидратном районе преобладают представители рода *Pseudomonas* (31%), а в негазогидратном – *Psychrobacter* (28%). Представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter* встречались во всех районах исследования. Выявлена приуроченность представителей семейства Nocardiaceae филума Actinobacteria к районам обнаружения газогидратов. Выявлена корреляция между способностью к деструкции карбоновых кислот и их производных и отсутствием газогидратов. На станциях, расположенных в районе газогидратных залежей, обнаруживались 5 штаммов, имеющие 2 плазмиды. Получено, что гены аэробной деструкции и/или гены, отвечающие за биodeградацию ароматических углеводов, встречались у штаммов, выделенных в газогидратном районе. У двух штаммов – *Psychrobacter piscatorii* poi185 и *Stenotrophomonas* sp. POI LV81-23/149-3(1) было обнаружено два гена одновременно: *alkBB* и *bssA*. При оценке убыли углеводов нефти наибольшие значения фиксировали у *Psych. piscatorii* poi185 (штамм выделен в негазогидратном районе), она составила 89,82%. Наименьший показатель был у *Nes. lutea* POI OP54-19/165 – 59,8%, изолированный в районе обнаружения газогидратов. Было получено, что степень деструкции насыщенных углеводов штаммами в газогидратном районе была ниже, чем в районе, где газогидраты обнаружены не были. Значительное понижение нечетности нефти CPI с 1,23 до показателей близких к 1 также наблюдали в негазогидратном районе исследования.

Впервые для 38 видов бактерий родов *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* показана способность окислять углеводороды нефти как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Получено, что все исследуемые штаммы родов *Pseudomonas*, *Bacillus* обладали способностью к деструкции углеводородов в аэробных и анаэробных условиях. Бактерии родов *Psychrobacter* и *Stenotrophomonas* обладали этой способностью, но в меньшей степени. Установлено, что в газогидратном районе 62% уникальных для этого района штаммов обладали способностью к окислению углеводородов в аэробных и анаэробных условиях. В негазогидратном районе этой способностью обладало 50% уникальных штаммов. В аэробных и анаэробных условиях деградация линейных углеводородов нефти происходила по-разному. В аэробных условиях штаммы *Robertmurraya kyonggiensis* роi87 и *Psychrobacter piscatorii* роi185 в наибольшей степени окисляли углеводороды C<sub>17</sub> – C<sub>21</sub>. В анаэробных условиях, наоборот, интенсивнее происходило окисление углеводородов C<sub>9</sub> – C<sub>13</sub> в случае обоих штаммов (утилизация составила более 30%).

В условиях полного отсутствия кислорода деструкция углеводородов осуществляется сульфатредуцирующими бактериями. Из донных отложений северной части Японского моря в районе обнаружения газогидратов выделен новый вид сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfosporosinus*.

Последовательность генома штамма SRJS8 определяли с использованием платформы Illumina NovaSeq. Содержание Г+Ц в ДНК исследуемого штамма SRJS8 составило  $42,08 \pm 0,3\%$ . При парных сравнениях Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) значения d0, d4 и d6 ДНК-ДНК (dDDH) гибридизации не превышали 57,4%. Средняя идентичность нуклеотидов (ANI) геномов *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 с референс-штаммом *Desulfosporosinus lacus* DSM 15449 составила 86,7%. На основании секвенирования генома, ДНК-ДНК гибридизации (dDDH) и по средней идентичности нуклеотидов (ANI) выделенный штамм был отнесен к новому виду *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8.

Штамм *Desulfosporosinus* sp.nov.SRJS8 имеет форму палочки, подвижен. Характерно наличие терминальной эндоспоры. Выделенный штамм нового вида бактерии рос при температурах +20, 25 и 30 °С. Температурный оптимум был отмечен при +25 °С. Оптимальным содержанием в среде NaCl было 2 г/л. Оптимальный pH для роста: 7,17-7,26. При исследовании физиолого-биохимических свойств было выявлено, что *Desulfosporosinus* sp.nov.SRJS8 ферментировал ацетат, формиат, фумарат, этанол, метанол, лактат, дрожжевой экстракт и не использовал аланин, глицерин, сукцинат, малат, бензоат, цитрат и глюкозу. Изучение профилей жирных кислот выделенного штамма *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 и его референс-штамма показало, что доминирующими жирными кислотами у обоих исследуемых штаммов являются жирные кислоты C16:1, C16:0. Помимо отмеченных жирных кислот в клетке *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 преобладали также жирные кислоты iC15:0 C14:0.

Впервые у представителя рода *Desulfosporosinus* отмечена способность к деградации углеводов. Показано, что *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 обладал большей способностью к биodeградации нефти, чем *D. lacus*. В большей степени *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 окислял нондекан (100%), в меньшей – генэйкозан (3%).

## Выводы

1. Оценка встречаемости генов-биоиндикаторов деструкции углеводов с помощью «вложенной» ПЦР в пробах донных отложений показала, что в газогидратном районе северной части Японского моря преобладали гены анаэробной деструкции: *bssA* и *masD*.

2. Из донных отложений 23 станций северной части Японского моря было выделено 55 штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, которые были отнесены к родам *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Brevibacillus*, *Promicromonospora*, *Peribacillus*, *Robertmurraya*, *Curtobacterium*, *Nocardioides*. Представители семейства *Nocardiaceae* обнаружены только в газогидратном районе.

3. Исследование физиолого-биохимических свойств штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов выявило, что бактерии, выделенные из района залежей газогидратов, обладали способностью ферментировать большее разнообразие углеводов субстратов, чем бактерии, выделенные из негазогидратного района. Отмечена корреляция между способностью к деструкции карбоновых кислот и их производных и отсутствием газогидратов. Показано, что 5 из 55 исследуемых штаммов имели 2 плазмиды с молекулярной массой 30:20 МДа. Данные штаммы были обнаружены на станциях, расположенных в районе залежей газогидратов.

4. Изучение наличия функциональных генов аэробной и анаэробной деструкции штаммов показало, что с наибольшей частотой в изолятах встречались гены аэробной деструкции углеводов *alkBB* и гены *bssA*, ответственные за анаэробную деструкцию ароматических углеводов. Показано, что наибольшее количество штаммов с *alkBB* встречались в газогидратном районе.

5. Степень биodeградации углеводов у штаммов, выделенных из донных отложений в районе, где газогидраты обнаружены не были, выше, чем

у штаммов, выделенных в газогидратном районе. Наибольшие различия наблюдаются при утилизации углеводов с длиной цепи выше C<sub>19</sub>.

6. 38 штаммов родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* обладали способностью к деградации углеводов в аэробных и анаэробных условиях. Все исследуемые штаммы родов *Pseudomonas*, *Bacillus* обладали способностью к деструкции углеводов в аэробных и анаэробных условиях. Частота встречаемости штаммов, способных к окислению углеводов в аэробных и анаэробных условиях, в обоих районах приблизительно одинакова.

7. Анаэробные накопительные культуры, в которых было зафиксировано образование сероводорода, получены из проб донных отложений станций, расположенных вдоль континентального склона. Эти станции характеризуются пониженными концентрациями сульфатов в донных отложениях и обнаружением биоиндикаторного гена сульфатредукторов *dsrB*.

8. Впервые выделен новый вид сульфатредуцирующих бактерий *Desulfosporosinus* sp.nov.SRJS8 в пробе донных отложений станции OP54-20a GC, расположенной в районе газогидратных залежей. Впервые отмечена способность представителя рода *Desulfosporosinus* к деструкции углеводов.

### Список литературы

1. Аринушкина, Е.В. Руководство по химическому анализу почв. 2-е изд. – М.: изд-во МУ, 1970. – 488 с.
2. Аэрокосмический мониторинг объектов нефтегазового комплекса; под ред. В. Г. Бондура – М.: Научный мир, 2012. – 558 с.
3. Беляев, С.С. Роль метанобразующих и сульфатредуцирующих бактерий в процессах деструкции органического вещества / С.С. Беляев, А.Ю. Лейн, М.В. Иванов // Геохимия. –1981. – №3. – С.473–445.
4. Бузолева, Л.С. Биологические свойства морских нефтеуглеводородоокисляющих бактерий из прибрежных акваторий дальневосточных морей с разным характером загрязнения / Л.С. Бузолева, М.А. Смирнова, И.П. Безвербная // Известия ТИНРО. – 2008. – Т 155. – С. 210–218.
5. Ворошилова, А.А. Окисляющие нефть бактерии – показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях / А.А. Ворошилова, Е.В. Дианова // Микробиология. –1952.– Т. XXI, вып. 4. – С. 408–415.
6. Гайдамака, С.Н. Влияние акцептора электронов на скорость деградации углеводородных загрязнений грунтов бактериями рода *Rhodococcus* в анаэробных условиях / С.Н. Гайдамака, М.А. Гладченко, В.П. Мурыгина // Химическая физика. – 2020. – Т. 39, № 2. – С.85–92.
7. Галанин, А.В. Литобиосфера Земли [Электронный ресурс] / А.В. Галанин. – 2012. – Режим доступа: <http://ukhtoma.ru/litobiosphere.html>.
8. Голозубова, Ю.С. Нефтеокисляющие свойства бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из воды бухты Находка Японского моря / Ю.С. Голозубова, Л.С. Бузолева, А.В. Ким, Е.А. Богатыренко // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: Материалы V Международной научно-технической конференции. В 2-х частях, Владивосток, 22–24 мая 2018 года. – Владивосток: Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет. – 2018. – С. 68–69.

9. Грамберг, И.С. Арктический шельф – будущее нефтегазовой промышленности России / И.С. Грамберг, О.И. Супруненко // Арктика на 113 пороге третьего тысячелетия (ресурсный потенциал и проблемы экологии). – СПб.: Наука. – 2000. – С. 133–144.
10. Дегазация Земли: геотектоника, геодинамика, геофлюиды; нефть и газ; углеводороды и жизнь. Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения академика П.Н. Кропоткина, 18–22 октября 2010 г. (Отв. ред. ак. А.Н. Дмитриевский, д.г.-м.н. Б.М. Валяев). М.: ГЕОС. – 2010. – С. 712.
11. Дмитриевский, А.Н. Природа, ресурсы и значимость гидратов природного газа / А.Н. Дмитриевский, Б.М. Валяев // Газовая пром-сть. – 2002. – № 11. – С. 22–25.
12. Дункай, Т.И. Нефтеокисляющий потенциал бактерий поверхностных вод Японского моря / Т.И. Дункай, Е.А. Богатыренко, А.В. Ким, Д.В. Дашков // Технические и естественные науки: сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 26 декабря 2020 года. – Санкт-Петербург: Частное научно-образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Гуманитарный национальный исследовательский институт «Нацразвитие». – 2020. – С. 11–12.
13. Журавель, Е.В. Микробная индикация загрязнения прибрежных вод Охотского моря и Авачинской бухты / Е.В. Журавель, И.П. Безвербная, Л.С. Бузолева // Биология моря. – 2004. – Т. 30, № 2. – С. 138–142.
14. Измалкова, Т.Ю. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* / Т.Ю. Измалкова, О.И. Сазонова, С.Л. Соколов, И.А. Кошелева, А.М. Воронин // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – С. 70–78.
15. Корнеева, В.А. Биоразнообразие сульфатредуцирующих бактерий в кислород-содержащих водах Черного и Балтийского морей: автореферат дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Корнеева Валерия Алексеевна. – Москва, 2015. – 25 с.

16. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина и др. – М.: Медицина, 2005.– 616 с.
17. Леин А.Ю. Биогеохимический цикл метана в океане / А.Ю. Леин, М.В. Иванов; отв. ред. А.П. Лисицын; Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. – М.: Наука, 2009. – 576 с.
18. Мамаева, Е.В. Исследование природных микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского Залива и Гыданской бухты: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Мамаева Елена Васильевна. – Иркутск, 2016. – 154 с.
19. Марданова, А.М. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие / А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова // Казань. – К(П)ФУ. – 2016. – С. 42.
20. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02» ПНД Ф 14.1:2:4.128–98. – 2012.
21. Мэгарран, Э. Экологическое разнообразие и его измерение: Пер. с англ. – М.: Мир, 1992. – 184 с.
22. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студентов высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд-во «Академия», 2005. – 608 с.
23. Нечай, Н.Л. Микромицеты–деструкторы углеводов / Н.Л. Нечай, А.А. Какижманова, Т.С. Еремеккалиев // Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2015. –Т. 2.– С. 370–372.
24. Обжиров, А.И. Потоки метана и газогидраты в Охотском море / А.И. Обжиров, Ю.А. Телегин, А.В. Болобан // Подводные исследования и робототехника. – 2015. –№ 1(19). – С. 56–63.
25. Одум, Ю. Экология: В 2–х т. Т. 2. Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 376 с.
26. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич // Санкт–Петербург.– 2002. – 80 с.

- 27.Репина (Смирнова), М.А. Нефтеуглеводородокисляющие микроорганизмы прибрежных вод юга острова Сахалин: дис. канд. ... биол. наук: 03.00.16 / Репина (Смирнова) Мария Андреевна. – Владивосток, 2009. – 149 с.
- 28.Родников, А.Г. Геодинамические модели глубинного строения регионов природных катастроф активных континентальных окраин / А.Г. Родников, Л.П. Забаринская, В.А. Рашидов, Н.А. Сергеева // М.: Научный мир. – 2014. – 172 с.
- 29.Розанова, Е.П. Микробиологические процессы в высокотемпературном нефтяном месторождении / Е.П. Розанова, И. А. Борзенков, А.Л. Тарасов и др. // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 118–127.
- 30.Рябцева, Н.Д. Изучение каталитических процессов микробного окисления нефтяных углеводородов / Н.Д. Рябцева, В.С. Никитина, М.И. Абдуллин, Р.Ф. Багаутдинов, А.А. Кадиров // Вестник Башкирского ун-та. – 2016. – № 2. – С. 308–313.
- 31.Шакиров, Р.Б. Особенности распределения гелия и водорода на юго-восточном и юго-западном склоне о. Сахалин (по результатам 59 рейса НИС «Академик М.А. Лаврентьев», 2012 г.) / Р.Б. Шакиров, Н.С. Сырбу, А.И. Обжиров // Литология и полезные ископаемые. – 2016. – № 1. – С. 1–14.
- 32.Шакиров, Р.Б. О газогидратах окраинных морей Восточной Азии: закономерности генезиса и распространения (обзор) / Р.Б. Шакиров, А.И. Обжиров, М.В. Шакирова, Е.В. Мальцева // Геосистемы переходных зон. – 2019. – Т. 3, № 1.– С. 65–106.
- 33.Acosta–González, A. Diversity of benzylsuccinate synthase–like (*bssa*) genes in hydrocarbon–polluted marine sediments suggests substrate–dependent clustering / A. Acosta–González, R. Rosselló–Móra, S. Marqués // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – V. 79, № 12. – P. 3667–3676.
- 34.Adams, M.M. Anaerobic oxidation of short–chain alkanes in hydrothermal sediments: potential influences on sulfur cycling and microbial diversity / M.M. Adams, A.L. Hoarfrost, A. Bose, S.B. Joye, P.R. Girguis // Frontiers in microbiology. – 2013. – V. 4. – P. 110.

35. Altschul, S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // *Nucleic acids research*. – 1997. – V. 25, № 17. – P. 3389–3402.
36. Amouric, A. Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber* strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete / A. Amouric, M. Quéméneur, V. Grossi, P.P. Liebgott, R. Auria, L. Casalot // *Journal of applied microbiology*. – 2010. – V. 108, № 6. – P. 1903–1916.
37. Arakawa, Sh. Diversity of piezophilic microorganisms in the closed ocean Japan Sea / Sh. Arakawa, Yu. Nogi, T. Sato, Y. Yoshida, R. Usami, Ch. Kato // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2006. – V. 70, № 3. – P. 749–752.
38. Bagwell, C.E. Direct analysis of sulfate reducing bacterial communities in gas hydrate-impacted marine sediments by PCR-DGGE / C.E. Bagwell, M. Formolo, Q. Ye, C.M. Yeager, T.W. Lyons, C.L. Zhang // *J. Basic. Microbiol.* – 2009. – V. 49, № 1. – P. 87–92.
39. Bale, S.J. *Desulfovibrio profundus* sp. Nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea / S.J. Bale, K. Goodman, P.A. Rochelle, J.R. Marchesi, J.C. Fry, A.J. Weightman, R.J. Parkes // *International journal of systematic bacteriology*. – 1997. – V. 47, № 2. – P. 515–521.
40. Bian, X.-Yu. Insights into the anaerobic biodegradation pathway of n-alkanes in oil reservoirs by detection of signature metabolites / X.-Yu. Bian, S.M. Mbadinda, Y.-F. Liu, R.Q. Ye, J.-D. Gu, B.-Zh. Mu // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 1–12.
41. Bienhold, C. The energy-diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments / C. Bienhold, A. Boetius, A. Ramette // *The ISME journal*. – 2012. – V. 6, № 4. – P. 724–732.
42. Bonch-Osmolovskaya, E.A. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir / E.A. Bonch-Osmolovskaya, M.L. Miroshnichenko, A.V. Lebedinsky, N.A. Chernyh, T.N. Nazina, V.S. Ivoilov,

- S.S. Belyaev, E.S. Boulygina, Y.P. Lysov, et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 6143–6151.
43. Borah, D. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain / D. Borah, R.N.S. Yadav // *Egyptian Journal of Petroleum.* – 2017. – V. 26, № 1. – P. 181–188.
44. Case, D.H. Methane seep carbonates host distinct, diverse, and dynamic microbial assemblages / D.H. Case, A.L. Pasulka, J.J. Marlow, B.M. Grupe, L.A. Levin, V.J. Orphan // *Mbio.* – 2015. – V. 6, № 6. – P. e01348–15
45. Chanton, J. Using natural abundance radiocarbon to trace the flux of petrocarbon to the seafloor following the Deepwater Horizon oil spill / J. Chanton, T. Zhao, B.E. Rosenheim, S. Joye, S. Bosman, Ch. Brunner, K.M. Yeager, A.R. Diercks, D. Hollander // *Environmental Science and Technology.* – 2015. – V. 49, № 2. – P. 847–854.
46. Ciobanu, M.–C. Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin / M.–C. Ciobanu, G. Burgaud, A. Dufresne, A. Breuker, V. Rédou, S. Ben Maamar, F. Gaboyer, O. Vandenabeele–Trambouze, J.S. Lipp, A. Schippers, P. Vandenkoornhuyse, G. Barbier, M. Jebbar, A. Godfroy, K. Alain // *ISME J.* – 2014. – V. 8, № 7. – P. 2352–2352.
47. Cline, J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // *Limnol. Oceanogr.* – 1969. – V.14. – P. 444–458.
48. Cochrane, W.J. Studies on the thermophilic sulfatereducing bacteria from a souring North Sea oil field / W.J. Cochrane, P.S. Jones, P.F. Sanders, D.M. Holt, M.J. Mosley // *SPE Journal.* – 1988. – № 18368. – P. 301–316.
49. Collins, M.D. Analysis of isoprenoid quinines // *Methods in Microbiology.* – 1985. – V. 18. – P. 329–366.
50. Cui, H. Microbial diversity of two cold seep systems in gas hydrate–bearing sediments in the South China Sea / H. Cui, X. Su, F. Chen, M. Holland, Sh. Yang, J. Liang, P. Su, H. Dong, W. Hou // *Marine Environmental Research.* – 2019. – V.144. – P. 230–239.

51. Ehrlich, H.L. Ehrlich's Geomicrobiology / H.L. Ehrlich, D.K. Newman, A. Kappler // Boca Raton: CRC Press. – 2015. – 649 p.
52. Fukuda, H. Ethylene production by microorganisms / H. Fukuda, T. Ogawa, S. Tranase // Adv. Microb. Physiol. – 1993. – V. 35. – P. 275–306.
53. Gao, X. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge / X. Gao, W. Gao, Zh. Cui, B. Hana, P. Yangc, Ch.Suna, Li Zheng // Marine Pollution Bulletin. – 2015. – V. 97, № 1–2. – P. 373–380.
54. Giongo, A. Discovery of a Chemosynthesis-based Community in the Western South Atlantic Ocean / A. Giongo, T. Haag, T. Simao, R. Medina-Silvo // Marine and Petroleum Geology. – 2015. – V. 112. – P. 45–56.
55. Gittel, A. Ubiquitous presence and novel diversity of anaerobic alkane degraders in cold marine sediments / A. Gittel, J. Donhauser, H. Røy, P.R. Girguis, B.B. Jørgensen, K.U. Kjeldsen // Frontiers in microbiology. – 2015. – V. 6. – P. 1414.
56. Grassia, G.S. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high-temperature petroleum reservoirs / G.S. Grassia, K.M. Mclean, P. Glenat, J. Bauld, A. J. Sheehy // FEMS Microbiology Ecology. – 1996. – V. 21, № 1. – P. 47–58.
57. Hao, R. Crude-oil-degrading thermophilic bacterium isolated from an oil field / R. Hao, A. Lu, G. Wang // Canadian Journal of Microbiology. – 2004. – V. 50, № 3. – P. 175–182.
58. Herrmann, S. Functional characterization of an anaerobic benzene-degrading enrichment culture by dna stable isotope probing / S. Herrmann, S. Kleinsteuber, A. Chatzinotas, S. Kuppardt, T. Lueders, H.–H. Richnow, C. Vogt // Environ. Microbiol. – 2010. – V. 12. – P. 401–411.
59. Hinrichs, K.–U. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments / K.–U. Hinrichs, J.M. Hayes, S.P. Sylva, P.G. Brewer, E.F. DeLong // Nature. – 1999. – V. 398. – P. 802–805.
60. Hoshino, T. Atribacteria from the seafloor sedimentary biosphere disperse to the hydrosphere through submarine mud volcanoes / T. Hoshino, T. Toki, A. Ijiri, Y.

- Morono, H. Machiyama, J. Ashi, K. Okamura, F. Inagaki // *Frontier Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 11–35.
61. Hoshino, T. Global diversity of microbial communities in marine sediment / T. Hoshino, H. Doi, G. Uramoto, L. Wörmer, R.R. Adhikari, N. Xiao, Yu. Morono, S. D'Hondt, K. Hinrichs, F. Inagaki // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V. 117, № 44. – P. 27587–27597.
62. Inagaki, F. Microbial Communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk / F. Inagaki, M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto, K. Aoki, K. H. Nealson, K. Horikoshi // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 69, № 12. – P. 7224–7235.
63. Jørgensen, B.B. The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments / B.B. Jørgensen, A. J. Fidlay, A. Pellerin // *Frontiers In Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 1–27.
64. Judd, A.G. The global importance and context of methane escape from the seabed // *Geo-Marine Letters*. – 2003. – V. 23. – P. 147–154.
65. Kado, C.I. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid / C.I. Kado, S.T. Liu // *Journal of Bacteriology*. – 1981. – V. 145. – P. 1365–1373.
66. Kallmeyer, J. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment / J. Kallmeyer, R. Pockalny, R.R. Adhikari, D.C. Smith, S. D'Hondt // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109, № 40. – P. 16213–16216.
67. Kirkpatrick, J.B. Microbial selection and survival in subseafloor sediment / J.B. Kirkpatrick, E.A. Walsh, S. D'Hondt // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10, № 10. – P. 1–15.
68. Kleinsteuber, S. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions / S. Kleinsteuber, K.M. Schleinitz, J. Breitfeld, H. Harms, H.-H. Richnow, C. Vogt // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2008. – V. 66. – P. 143–157.

69. Kniemeyer, O. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria / O. Kniemeyer, F. Musat, S.M. Sievert, K. Knittel, H. Wilkes, M. Blumenberg et al. // *Nature*. – 2007. – V. 449. – P. 898–901.
70. Kobayashi, H. Phylogenetic diversity of microbial communities associated with the crude-oil, large-insoluble-particle and formation-water components of the reservoir fluid from a non-flooded high-temperature petroleum reservoir / H. Kobayashi, K. Endo, S. Sakata, D. Mayumi, H. Kawaguchi, M. Ikarashi, Y. Miyagawa, H. Maeda, K. Sato // *Journal Bioscience and Bioengineering*. – 2012. – V. 113. – P. 204–210.
71. Kotlar, H.K. High coverage sequencing of DNA from microorganisms living in an oil reservoir 2.5 kilometres subsurface / H.K. Kotlar, A. Lewin, J. Johansen, M. Throne-Holst, T. Haverkamp, S. Markussen et al. // *Environmental Microbiology Reports*. – 2011. – V. 3, № 6. – P. 674–681.
72. Köster, M. Characterization of carbon and microbial biomass pools in shallow water coastal sediments of the southern Baltic Sea (Nordreügensche Bodden) / M. Köster, L. Meyer-Reil // *Marine Ecology Progress Series*. – 2001. – V. 214. – P. 25–41.
73. Kumar, A.G. Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium / A.G. Kumar, N. Nivedha Rajan, R. Kirubakaran, G. Dharani // *Marine Pollution Bulletin*. – 2019. – V. 146. – P. 741–750.
74. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – V. 35, № 6. – P. 1547–1549.
75. Laban, N.A. Anaerobic benzene degradation by gram-positive sulfate-reducing bacteria / N.A. Laban, D. Selesi, C. Jobelius, R.U. Meckenstock // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2009. – V. 68. – P. 300–311.
76. Lanoil, B.D. Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates / B.D. Lanoil, R. Sassen, M.T. La Duc, S.T. Sweet, K.H. Nealson // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67, № 11. – P. 5143–5153.
77. Leu, J.Y. The same species of sulphate-reducing *Desulfomicrobium* occur in different oil field environments in the North Sea / J.Y. Leu, C.P. McGovern-Traa,

- A.J. Porter, W.A. Hamilton // *Letters in Applied Microbiology*. – 1999. – V. 29, № 4. – P. 246–252.
- 78.Li, H. Phylogenetic diversity of the archaeal community in a continental high temperature, water-flooded petroleum reservoir / H. Li, S.Z. Yang, B.Z. Mu // *Current Microbiology*. – 2007. – V. 55, № 5. – P. 382–388.
- 79.Li, H. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean / H. Li, Y. Yu, W. Luo, Y. Zeng, B. Chen / *Extremophiles: life under extreme conditions*. – 2009. – V. 13, № 2. – P. 233–246.
- 80.Lovley, D.R. Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac River / D. R. Lovley, E.J.P. Phillips // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – V. 52. – P.751–757.
- 81.Magot, M. Microbiology of petroleum reservoirs / M. Magot, B. Ollivier, B.K. Patel // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2000. – № 77. – P. 103–116.
- 82.Waples, D.W. *Geochemistry in Petroleum Exploration* / Boston: D. Reidel Publ. Comp. – 1985. – 232 p.
- 83.Marlow, J.J. Carbonate-hosted methanotrophy represents an unrecognized methane sink in the deep sea / J.J. Marlow, J.A. Steele, W. Ziebis, A.R. Thurber, L.A. Levin, V.J. Orphan // *Nature Communications*. – 2014a. – V. 5. – P. 1–12.
- 84.Marlow, J.J. Microbial abundance and diversity patterns associated with sediments and carbonates from the methane seep environments of Hydrate Ridge, OR / J.J. Marlow, J.A. Steele, D. Case, S.A. Connon, L.A. Levin, V.J. Orphan // *Frontiers in Marine Science*. – 2014b. – V. 1. – P. 1–16.
- 85.Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms / J. Marmur // *Journal of Molecular Biology*. – 1961. – V. 3. – P. 208–218.
- 86.Mayeux, B. *Desulfosporosinus burensis* sp. nov., a spore-forming, mesophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep clay environment / B. Mayeux, M.–L. Fardeau, B.–J. Manon, L. Casalot, A. Vinsot, M. Labat // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – V. 63, № 2. – P. 593–598.

87. Meier–Kolthoff, J.P. Genome sequence–based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions / J.P. Meier–Kolthoff, A.F. Auch, H.–P. Klenk, M. Göker // *BMC Bioinformatics*. – 2013. – V. 14. – P. 60–60.
88. Mulani, N. Biodegradation of crude oil using marine *Bacillus* species from Vadinar Coast, Gujarat, India / N. Mulani, A. B. Fulke, E. D’souza, A. Ram, A. Maloo, F. Sayed, S. N. Gajbhiye // *Current science*. – 2017. – V. 112, № 3. – P. 569–576.
89. Oliver, B. *Petroleum Microbiology* / B. Oliver, M. Magot // ASM Press New York. – 2005. – 365 p.
90. Operation Report of Sakhalin Slope Gas Hydrate Project 2012, R/V Akademik M.A. Lavrentyev, cruise 59 / Eds Y.K. Jin, H. Shoji, A. Obzhirov, B. Baranov. Korea: Korea Polar Research Institute, 2013. – 163 p.
91. Orphan, V.J. Comparative analysis of methane–oxidizing archaea and sulfate–reducing bacteria in anoxic marine sediments / V.J. Orphan, K.U. Hinrichs, W. Ussler, C.K. 3rd Paull, L.T. Taylor, S.P. Sylva, J.M. Hayes, E.F. Delong // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67, № 4. – P. 1922–1934.
92. Orphan, V.J. Geochemical influence on community structure and microbial processes in high temperature oil reservoirs / V.J. Orphan, S.K. Goffredi, E.F. Delong, J.R. Boles // *Geomicrobiology Journal*. – 2010. – V. 20, № 4. – P. 295–311.
93. Orsi, W.D. Gene expression in the deep biosphere / W.D. Orsi, V.P. Edgcomb, G.D. Christman, J.F. Biddle // *Nature*. – 2013. – V. 499, № 7457. – P. 205–208.
94. Parkes, R.J. A review of prokaryotic populations and processes in sub–seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions / R.J. Parkes, B. Cragg, E. Roussel G. Webster, A. Weightman, H. Sass // *Marine Geology*. – 2014. – V. 352. – P. 409–425.
95. Pop Ristova, P. Bacterial diversity and biogeochemistry of different chemosynthetic habitats of the REGAB cold seep (West African margin, 3160 m water depth) / P. Pop Ristova, F. Wenzhöfer, A. Ramette, M. Zabel, D. Fischer, S. Kasten, A. Boetius // *Biogeosciences*. – 2012. – V. 9. – P. 5031–5048.

96. Priha, O. Application of denaturing high-performance liquid chromatography for monitoring sulfate-reducing bacteria in oil fields / O. Priha, M. Nyyssönen, M. Bomberg, A. Laitila, J. Simell, A. Kapanen, R. Juvonen // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79, № 17. – P. 5186–5196.
97. Ramamoorthy, S. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments / S. Ramamoorthy, H. Sass, H. Langner, P. Schumann, R.M. Kroppenstedt, S. Spring, J. Overmann, R.F. Rosenzweig, // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2006. – V. 56, № 12. – P. 2729–2736.
98. Rees, G.N. *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a petroleum reservoir International / G.N. Rees, G.S. Grassia, A.J. Sheehy, P.P. Dwivedi, B.K. C. Patel // *Journal of Systematic Bacteriology*. – 1995. – V. 45, № 1. – P. 85–89.
99. Rodríguez-R., L.M. Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species / L.M. Rodríguez-R., K.T. Konstantinidis // *Microbe*. – 2014. – V. 9, № 3. – P. 111–118.
100. Rodríguez-Salazar, J. Bacteria from the southern Gulf of Mexico: baseline, diversity, hydrocarbon-degrading potential and future applications / J. Rodríguez-Salazar, A. Loza, K. Ornelas-Ocampo, R.M. Gutierrez-Rios, L. Pardo-López // *Frontiers in Marine Science*. – 2021. – V. 8. – P. 1–23.
101. Romanenko, L.A. *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan / L.A. Romanenko, A.M. Lysenko, M. Rohde, V.V. Mikhailov, E. Stackebrandt // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – V. 54, № 5. – P. 1741–1745.
102. Romanenko, L.A. *Oceanisphaera litoralis* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium from marine bottom sediments / L.A. Romanenko, P. Schumann, N.V. Zhukova, M. Rohde, V.V. Mikhailov, E. Stackebrandt // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2003. – V. 53, № 6. – P. 1885–1888.
103. Salinas, M.B. *Mahella australiensis* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from an Australian oil well / M.B.

- Salinas, M.L. Fardeau, P. Thomas, J.-L. Cayol, B.K.C. Patel, B. Ollivier // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – V. 54, № 6. – P. 2169–2173.
104. Schauer, R. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean / R. Schauer, C. Bienhold, A. Ramette, J. Harder // *ISME*. – 2010. – V. 4. – P. 159–170.
105. Seki, T. Distribution and isolation of strains belonging to the order Solirubrobacterales / T. Seki, A. Matsumoto, S. Ōmura, Y. Takahashi // *The Journal of Antibiotics*. – 2015. – V. 68. – P. 763–766.
106. Sierra-Garcia, I.N. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales / I.N. Sierra-Garcia, B.M. Dellagnezze, M.R. Chaves, N. Gray, V.M. Oliveira // *Extremophiles*. – 2017. – V. 21. – P. 211–229.
107. Silva, T.R. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields / T.R. Silva, L.C.L. Verde, E.V. Santos Neto, V.M. Oliveira // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2013. – V. 81. – P. 57–70.
108. Singh, R. Anaerobic oxidation of ethane, propane, and butane by marine microbes: A Mini Review/ R. Singh, M. S. Guzman, A. Bose // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 23, № 8. – P.20–56.
109. Spiegelman, D. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities / D. Spiegelman, G. Whissell, C.W. Greer // *Can. Journal of Microbiology*. – 2005. – V. 51. – P. 355–386.
110. Spring, S. The Genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*: Taxonomy / S. Spring, F. Rosenzweig // *The Prokaryotes*. – 2006. – V. 4. – P 771–786.
111. Tang, Y.Q. Microbial communities in long-term, water-flooded petroleum reservoirs with different in situ temperatures in the Huabei Oilfield, China / Y.Q. Tang, Y. Li, J.Y. Zhao, Ch.-Q. Chi, Li-X. Huang, H.-P. Dong, X.-L. Wu // *PLOS One*. – 2012. – V. 7. – P. e33535.

112. The Prokariotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, application. Second ed. / Ed. Balows A. et. al. Baltimore: Springer-Verlag, 1992. 1155 p.
113. Tourova, T. Diversity of the *alkB* Genes of n-Alkane Biodegradation in Thermophilic Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria of the Genera *Geobacillus*, *Parageobacillus*, and *Aeribacillus* / T. Tourova, D. Sokolova, E. Semenova, A. Poltarau, T. Nazina // *Microbiology*. – 2018. – V. 87. – P. 301–307.
114. Vandieken, V. *Marinisporobacter balticus* gen. nov., sp. nov., *Desulfosporosinus nitroreducens* sp. nov. and *Desulfosporosinus fructosivorans* sp. nov., new spore-forming bacteria isolated from subsurface sediments of the Baltic Sea / V. Vandieken, H. Niemann, B. Engelen, H. Cypionka // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2017. – V. 67, № 6. – P. 1887–1893.
115. Walsh, E.A. Relationship of bacterial richness to organic degradation rate and sediment age in subseafloor sediment / E.A. Walsh, B. Kirkpatrick, R. Pockalny, J. Sauvage // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2016. – V. 82, № 16. – P. 4994–4999.
116. Wang, L. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes / L. Wang, Y. Tang, S. Wang, Ru-L. Liu, Mu-Z. Liu, Y. Zhang, F.-L. Liang, L. Feng // *Extremophiles*. – 2006. – V. 10. – P. 347–356.
117. Wang, L.Y. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches / L.Y. Wang, W.J. Ke, X.B. Sun, J.F. Liu, J.D. Gu, B.Z. Mu // *Applied Microbiology Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – P. 4209–4221.
118. Webster, G. Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep mari / G. Webster, R.J. Parkes, J.C. Fry, A.J. Weightman // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. – P.5708–5713.

119. Whiticar, M.J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chem. Geology*. – 1999. – V. 161, № 1–3. – P. 291–314.
120. Wiesenburg, D.A. Equilibrium solubility of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and seawater / Wiesenburg D.A., Guinasso N.L. // *J. of Chemical & Engineering Data*. – 1979. – V. 24, № 4. – P. 356–360.
121. Winderl, C. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (*bssA*) genes as a functional marker / C. Winderl, S. Schaefer, T. Lueders // *Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 9, № 4. – P.1035–1046.
122. Wolin, E.A. Formation of methane by bacterial extracts / E.A. Wolin, M.J. Wolin, R.S. Wolfe. // *J. Biol. Chem.* – 1963. – V. 238. – P. 2882–2886.
123. Yamamoto, S. Solubility of methane in distilled water and seawater / S. Yamamoto, J. B. Alcauskas, T. E. Crozier // *J. of Chemical & Engineering Data*. – 1976. – V. 21, № 1. P. 78–80.
124. Youssef, N. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities / N. Youssef, M.S. Elshahed, M.J. Mcinerney // *Advances in Applied Microbiology*. – 2009. – V. 66. – P. 141–251.
125. Zhanga, Z. Leaf wax lipids as paleovegetational and paleoenvironmental proxies for the Chinese Loess Plateau over the last 170 kyr / Z. Zhanga, M. Zhao, G. Eglinton, H. Lu, C.–Y. Huang // *Organic Geochemistry*. – 1998. – V. 28. – P. 217–237.
126. Zeng, Y. Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering / Y. Zeng, Y. Zou, B. Chen, J. M. Grebmeier, H. Li, Yo. Yu, T. Zheng // *Sea Polar Biology*. – 2011. – V. 34. – P.907–919.
127. Zeng, Y–X. Prokaryotic community composition in Arctic Kongsfjorden and Sub–Arctic northern Bering Sea sediments as revealed by 454 pyrosequencing / Y–X. Zeng, Y. Yu, H–R. Li, W. Luo // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 2498.

## Приложение 1

Алгоритм для построения корреляционных диаграмм

```
Strain <- read.table(file = «filename.csv», row.names = 1, sep = «;», header =  
TRUE)  
corStrain <- cor(Strain)  
corrplot(corStrain, type = «lower», method = «number»)  
corrplot(corStrain, type = «lower», method = «circle»)
```

## Приложение 2

Тинкториальные, морфологические и физиолого–биохимические свойства нефтеокисляющих штаммов, полученных из донных отложений северной части Японского моря

Зарегистри– рованный штамм	Морфология	Окраска по Граму	КОН	Каталаза	Оксидаза	Тип метаболизма	Мочевина	Цитрат Na	Казеин	Амилаза
Свойство										
MZ540778 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI OP54–33/12– 1(1)	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	+	–
MZ573198 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54–44/45– 2	кокки	–	–	+	+	O+/F–	+	+	+	+
MZ573186 <i>Peribacillus simplex</i> strain POI OP54–19/103–1(1)	палочки	+	+	–	–	O+/F+	–	–	+	+
MZ573209 <i>Psychrobacter celer</i> strain POI OP54–35/18–2(1)	кокки	–	–	+	+	O+/F–	+	–	–	+
MZ540874 <i>Rhodococcus qingshengii</i> strain POI OP54–59/75– 1	кокки	+	+	+	–	O+/F–	–	–	–	–
MZ573210 <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> strain POI LV81– 23/149–3(2)	палочки	+	+	+	+	O+/F–	–	–	+	+
MZ540892 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 33/al 91–18	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	+	–

MZ573212 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI LV81– 28/193–6(1)	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	–
MZ573229 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI OP54– 41/35–10(1)	кокки	–	–	+	+	O+/F–	+	+	+	+
MZ573232 <i>Nesterenkonia lutea</i> strain POI OP54–19/165	кокки	+	+	+	–	O+/F–	+	–	+	+
MZ540913 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI OP54–59/68– 4	кокки, палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	+	–	+
MZ573237 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81– 3/25–1	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	–
MZ540941 <i>Rhodococcus</i> sp. strain POI OP54– 59/76–3	палочки, кокки	+	+	+	–	O+/F–	+	+	+	+
MZ543973 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain POI OP54– 28/188–5	палочки, кокки	+	+	+	–	O+/F–	+	+	+	+
MZ543976 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 19/135–3	палочки	+	+	+	+	O+/F+	–	+	+	–
MZ544024 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 35/213–8	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	–
MZ595665 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/73–1	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	–
MZ544190 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54–44/45– 3(1)	кокки, палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	+	–	+

MZ544252 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI LV81–57/311	кокки, палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	+	–	+
MZ544365 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54–42/37–3	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+
MZ573241 <i>Nocardioides dokdonensis</i> strain POI OP54–35/al26–1	палочки	+	+	+	–	O+/F+	+	+	–	–
MZ595666 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81–57/379–1(1)	палочки	+	+	+	+	O+/F+	–	+	+	–
MZ573242 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54–19/287–1	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+
MZ595782 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54–59/92–1	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	–
MZ573409 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI LV81–57/379–1	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+
MZ573761 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI OP54–19/al 26–3	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+
MZ562688 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI LV81–23/149–3	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+

MZ562702 <i>Micrococcus</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379–1	кокки	+	+	+	–	O+/F–	–	–	–	–
MZ562704 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54– 29/206–2(1)	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+
MZ59600 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(3)	палочки	–	–	+	+	O+/F –	–	–	–	–
MZ562706 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54–44/45– 3(3)	палочки	+	+	+	+	O+/F +	–	+	+	–
MZ574136 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI LV81– 51/330–3(1)	кокки	–	–	+	+	O+/F –	+	+	–	+
MZ577107 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81– 57/379–1(3)	палочки	–	–	+	+	O+/F –	–	–	–	–
MZ577115 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 41/al 36–28	палочки	–	–	+	+	O+/F –	–	–	–	–
MZ577118 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54–59/75– 14	палочки	–	–	+	–	O+/F –	–	–	–	+
MZ577121 <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain POI OP54– 44/45–2 (2)	кокки, палочки	–	–	+	+	O+/F –	–	+	–	+

MZ577132 <i>Psychrobacter pacificensis</i> strain POI LV81-57/al 379 (2)	кокки	-	-	+	+	O+/F-	+	-	+	+
MZ577136 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54- 29/138-7	палочки	+	+	+	+	O+/F+	-	+	+	-
MZ577169 <i>Psychrobacter maritimus</i> strain POI OP54-35/87- 1	кокки	-	-	+	+	O+/F-	-	-	-	+
MZ569490 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI LV81-23/149- 3(1)	палочки	-	-	-	-	O+/F-	-	-	-	+
MZ569847 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI OP54-35/18- 4	палочки	-	-	+	+	O+/F-	-	-	-	-
MZ569674 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54- 59/75-11	палочки	-	-	+	+	O+/F-	-	-	-	-
MZ573202 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain POI OP54- 19/103-1(2)	палочки, кокки	+	+	+	-	O+/F-	-	-	-	-
MZ569721 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-35/18- 2	палочки	-	-	+	-	O+/F-	-	-	-	+
MZ569678 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-41/36- 2	палочки	-	-	+	-	O+/F-	-	-	-	+

MZ573187 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(2)	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–		–
MZ569315 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54– 28/198–6	палочки	+	+	+	+	O+/F+	–	+	+	–
MZ577172 <i>Psychrobacter</i> <i>submarinus</i> strain POI OP54– 28/101–1	кокки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	+
MZ577174 <i>Stenotrophomonas</i> <i>rhizophila</i> strain POI LV81– 28/173–3(3)	палочки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	+
MZ577178 <i>Pseudomonas</i> <i>yamanorum</i> strain POI OP54–33/12– 1	палочки	–	–	+	+	O+/F–	–	–	–	–
MZ577181 <i>Promicromonospo</i> <i>ra xylanilytica</i> strain POI OP54– 28/53–1	палочки	+	+	+	+	O+/F–	+	+	–	+
MZ577183 <i>Brevibacillus</i> <i>nitrificans</i> strain POI LV81–19/135	палочки	+	+	+	–	O+/F–	+	–	+	–
MZ577213 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379 (1)	кокки	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	–
MT758444 <i>Robertmurraya</i> <i>kyonggiensis</i> strain poi87	палочки	+	+	+	+	O+/F–	–	–	–	+
MT758443 <i>Psychrobacter</i> <i>piscatorii</i> strain poi185	коккоба циллы	–	–	+	–	O+/F–	–	–	–	–

## Продолжение приложения 1

Штамм Субстрат	Пальми- тиновая кислота	Щавеле- вая кислота	Янтарная кислота	Лимонная кислота	Малоно- вая кислота	Салици- ловая кислота	Молочная кислота
MZ540778 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI OP54-33/12- 1(1)	+	-	-	+	-	-	-
MZ573198 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54-44/45- 2	-	-	-	-	-	-	+
MZ573186 <i>Peribacillus simplex</i> strain POI OP54-19/103-1(1)	-	-	+	+	-	-	-
MZ573209 <i>Psychrobacter celer</i> strain POI OP54-35/18-2(1)	-	-	-	-	-	-	-
MZ540874 <i>Rhodococcus qingshengii</i> strain POI OP54-59/75- 1	-	-	+	+	-	-	+
MZ573210 <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> strain POI LV81- 23/149-3(2)	-	-	-	-	-	-	-
MZ540892 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54- 33/al 91-18	+	-	-	+	-	-	-
MZ573212 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI LV81- 28/193-6(1)	+	-	-	+	-	-	+
MZ573229 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI OP54- 41/35-10(1)	-	-	-	-	-	-	+
MZ573232 <i>Nesterenkonia lutea</i> strain POI OP54-19/165	-	-	-	+	-	-	-

MZ540913 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI OP54-59/68-4	-	-	-	-	-	-	-
MZ573237 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81-3/25-1	+	-	-	-	-	-	-
MZ540941 <i>Rhodococcus</i> sp. strain POI OP54-59/76-3	-	-	+	+	-	-	+
MZ543973 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain POI OP54-28/188-5	-	-	+	+	-	-	+
MZ543976 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81-19/135-3	-	-	-	-	-	-	-
MZ544024 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54-35/213-8	+	-	-	+	-	-	-
MZ595665 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54-59/73-1	+	-	-	+	-	-	+
MZ544190 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54-44/45-3(1)	-	-	-	-	-	-	-
MZ544252 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI LV81-57/311	-	-	-	-	-	-	-
MZ544365 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-42/37-3	+	-	-	-	-	-	+
MZ573241 <i>Nocardioides dokdonensis</i> strain POI OP54-35/a126-1	-	-	-	+	-	-	-

MZ595666 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 57/379–1(1)	–	–	–	–	–	–	–
MZ573242 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54– 19/287–1	–	–	–	+	–	–	+
MZ595782 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/92–1	+	–	–	–	–	–	–
MZ573409 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI LV81– 57/379–1	–	–	–	–	–	–	+
MZ573761 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI OP54–19/al 26–3	–	–	–	+	–	–	+
MZ562688 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI LV81– 23/149–3	–	–	–	–	–	–	+
MZ562702 <i>Micrococcus</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379–1	–	–	+	–	–	–	–
MZ562704 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54– 29/206–2(1)	–	–	–	+	–	–	+
MZ59600 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(3)	+	–	–	–	–	–	–
MZ562706 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54–44/45– 3(3)	–	–	–	–	–	–	–
MZ574136 <i>Psychrobacter</i> <i>glacincola</i> strain POI LV81– 51/330–3(1)	–	–	–	–	–	–	+

MZ577107 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81– 57/379–1(3)	+	+	+	–	–	–	–
MZ577115 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 41/al 36–28	+	–	–	–	–	–	–
MZ577118 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54–59/75– 14	–	–	–	+	–	–	+
MZ577121 <i>Psychrobacter</i> <i>cryohalolentis</i> strain POI OP54– 44/45–2 (2)	–	–	–	–	–	–	+
MZ577132 <i>Psychrobacter</i> <i>pacificensis</i> strain POI LV81–57/al 379 (2)	–	–	–	–	–	–	–
MZ577136 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54– 29/138–7	–	–	–	–	–	–	–
MZ577169 <i>Psychrobacter</i> <i>maritimus</i> strain POI OP54–35/87– 1	–	–	–	–	–	–	+
MZ569490 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI LV81–23/149– 3(1)	–	–	–	–	–	–	–
MZ569847 <i>Pseudomonas</i> <i>brenneri</i> strain POI OP54–35/18– 4	–	–	–	–	–	–	–
MZ569674 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/75–11	–	–	–	–	–	–	–

MZ573202 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain POI OP54-19/103-1(2)	-	-	+	+	-	-	+
MZ569721 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-35/18-2	-	-	+	-	+	-	+
MZ569678 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-41/36-2	-	-	-	-	-	-	-
MZ573187 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54-51/92-1(2)	-	-	-	-	-	-	-
MZ569315 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54-28/198-6	+	-	-	-	-	-	+
MZ577172 <i>Psychrobacter submarinus</i> strain POI OP54-28/101-1	-	-	-	-	-	-	+
MZ577174 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain POI LV81-28/173-3(3)	-	-	-	-	-	-	+
MZ577178 <i>Pseudomonas yamanorum</i> strain POI OP54-33/12-1	-	-	+	-	-	-	+
MZ577181 <i>Promicromonospora xylanilytica</i> strain POI OP54-28/53-1	+	-	+	-	-	-	-
MZ577183 <i>Brevibacillus nitrificans</i> strain POI LV81-19/135	-	-	-	-	-	-	-
MZ577213 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI LV81-57/al 379 (1)	-	-	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы

MT758444 <i>Robertmurraya kyonggiensis</i> strain poi87	–	–	–	–	–	–	–
MT758443 <i>Psychrobacter piscatorii</i> strain poi185	–	–	–	–	–	–	–

Продолжение приложения 1

Штамм / Субстрат	Твин– 20	Твин – 40	Твин – 60	Твин – 80	Тритон – X 100
MZ540778 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI OP54–33/12– 1(1)	+	+	–	+	–
MZ573198 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54–44/45– 2	–	+	+	+	+
MZ573186 <i>Peribacillus simplex</i> strain POI OP54–19/103–1(1)	+	–	–	+	–
MZ573209 <i>Psychrobacter celer</i> strain POI OP54–35/18–2(1)	–	+	+	+	–
MZ540874 <i>Rhodococcus qingshengii</i> strain POI OP54–59/75– 1	+	–	–	+	+

MZ573210 <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> strain POI LV81–23/149–3(2)	+	–	–	+	–
MZ540892 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54–33/al 91–18	+	+	–	+	–
MZ573212 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI LV81–28/193–6(1)	+	+	–	+	–
MZ573229 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI OP54–41/35–10(1)	–	+	+	–	+
MZ573232 <i>Nesterenkonia lutea</i> strain POI OP54–19/165	+	–	–	+	+
MZ540913 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI OP54–59/68–4	+	+	–	+	–
MZ573237 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81–3/25–1	+	+	–	+	–
MZ540941 <i>Rhodococcus</i> sp. strain POI OP54–59/76–3	–	–	–	+	+
MZ543973 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain POI OP54–28/188–5	–	–	–	+	+

MZ543976 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 19/135–3	–	+	+	–	–
MZ544024 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 35/213–8	+	–	–	+	–
MZ595665 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/73–1	+	–	–	+	–
MZ544190 <i>Psychrobacter</i> <i>nivimaris</i> strain POI OP54–44/45– 3(1)	+	+	+	+	–
MZ544252 <i>Psychrobacter</i> <i>nivimaris</i> strain POI LV81–57/311	+	+	+	+	–
MZ544365 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54–42/37– 3	+	–	–	+	–
MZ573241 <i>Nocardioides</i> <i>dokdonensis</i> strain POI OP54– 35/al26–1	+	+	+	+	–
MZ595666 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 57/379–1(1)	–	+	+	–	–

MZ573242 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54– 19/287–1	+	–	–	+	+
MZ595782 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/92–1	+	+	–	+	–
MZ573409 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI LV81– 57/379–1	+	–	–	+	+
MZ573761 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI OP54–19/al 26–3	+	–	–	+	+
MZ562688 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI LV81– 23/149–3	+	–	–	+	+
MZ562702 <i>Micrococcus</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379–1	+	–	–	+	–
MZ562704 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54– 29/206–2(1)	+	–	–	+	+
MZ59600 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(3)	+	–	–	+	–

MZ562706 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54-44/45- 3(3)	-	+	+	-	-
MZ574136 <i>Psychrobacter</i> <i>glacincola</i> strain POI LV81- 51/330-3(1)	+	+	+	+	+
MZ577107 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81- 57/379-1(3)	-	-	-	+	-
MZ577115 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54- 41/al 36-28	+	-	-	+	-
MZ577118 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54-59/75- 14	+	-	-	-	+
MZ577121 <i>Psychrobacter</i> <i>cryohalolentis</i> strain POI OP54- 44/45-2 (2)	-	+	+	+	+
MZ577132 <i>Psychrobacter</i> <i>pacificensis</i> strain POI LV81-57/al 379 (2)	-	+	+	+	+

MZ577136 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54– 29/138–7	–	+	+	+	–
MZ577169 <i>Psychrobacter</i> <i>maritimus</i> strain POI OP54–35/87– 1	–	+	+	+	+
MZ569490 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI LV81–23/149– 3(1)	+	–	–	–	–
MZ569847 <i>Pseudomonas</i> <i>brenneri</i> strain POI OP54–35/18– 4	+	+	–	+	–
MZ569674 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/75–11	+	+	–	+	–
MZ573202 <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> strain POI OP54– 19/103–1(2)	–	–	–	+	+
MZ569721 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54–35/18– 2	+	–	–	–	+
MZ569678 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> strain POI OP54–41/36– 2	+	–	–	–	–

MZ573187 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(2)	+	–	–	+	–
MZ569315 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54– 28/198–6	–	+	+	+	–
MZ577172 <i>Psychrobacter</i> <i>submarinus</i> strain POI OP54– 28/101–1	–	+	+	+	–
MZ577174 <i>Stenotrophomonas</i> <i>rhizophila</i> strain POI LV81– 28/173–3(3)	+	–	–	–	–
MZ577178 <i>Pseudomonas</i> <i>yamanorum</i> strain POI OP54–33/12– 1	+	+	–	+	–
MZ577181 <i>Promicromonospo</i> <i>ra xylanilytica</i> strain POI OP54– 28/53–1	–	+	–	+	+
MZ577183 <i>Brevibacillus</i> <i>nitrificans</i> strain POI LV81–19/135	–	+	+	–	–
MZ577213 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379 (1)	–	+	+	+	–

Продолжение таблицы

MT758444 <i>Robertmurraya</i> <i>kyonggiensis</i> strain poi87	-	+	+	+	-
MT758443 <i>Psychrobacter</i> <i>piscatorii</i> strain poi185	-	+	+	+	-

Продолжение приложения 1

Штамм / субстрат	лактоза	галактоза	ксилоза	инозит	дульцит	L-арабиноза	сахароза	маннит	глицерин	L-глюкоза	D-рамноза	мальтоза
MZ540778 <i>Pseudomonas</i> <i>brenneri</i> strain POI OP54-33/12- 1(1)	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
MZ573198 <i>Psychrobacter</i> <i>nivimaris</i> strain POI OP54-44/45- 2	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
MZ573186 <i>Peribacillus</i> <i>simplex</i> strain POI OP54-19/103-1(1)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
MZ573209 <i>Psychrobacter</i> <i>celer</i> strain POI OP54-35/18-2(1)	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
MZ540874 <i>Rhodococcus</i> <i>qingshengii</i> strain POI OP54-59/75- 1	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
MZ573210 <i>Curtobacterium</i> <i>oceanosedimentum</i> strain POI LV81- 23/149-3(2)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

MZ540892 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 33/al 91–18	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ573212 <i>Pseudomonas</i> <i>brenneri</i> strain POI LV81– 28/193–6(1)	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ573229 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI OP54– 41/35–10(1)	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–
MZ573232 <i>Nesterenkonia</i> <i>lutea</i> strain POI OP54–19/165	–	+	+	–	–	+	+	+	–	+	–	+
MZ540913 <i>Psychrobacter</i> <i>glacincola</i> strain POI OP54–59/68– 4	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–
MZ573237 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81– 3/25–1	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ540941 <i>Rhodococcus</i> sp. strain POI OP54– 59/76–3	+	+	–	+	–	+	+	–	+	+	–	+
MZ543973 <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> strain POI OP54– 28/188–5	+	+	–	+	–	+	+	–	+	+	–	+
MZ543976 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 19/135–3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MZ544024 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 35/213–8	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ595665 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/73–1	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–

MZ544190 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54-44/45-3(1)	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
MZ544252 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI LV81-57/311	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
MZ544365 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-42/37-3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
MZ573241 <i>Nocardioides dokdonensis</i> strain POI OP54-35/al26-1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
MZ595666 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81-57/379-1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MZ573242 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-19/287-1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
MZ595782 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54-59/92-1	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
MZ573409 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI LV81-57/379-1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
MZ573761 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI OP54-19/al 26-3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
MZ562688 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI LV81-23/149-3	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+

MZ562702 <i>Micrococcus</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379–1	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+	–	+
MZ562704 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 29/206–2(1)	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
MZ59600 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(3)	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ562706 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54–44/45– 3(3)	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
MZ574136 <i>Psychrobacter</i> <i>glacincola</i> strain POI LV81– 51/330–3(1)	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–
MZ577107 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81– 57/379–1(3)	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ577115 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 41/al 36–28	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ577118 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 59/75–14	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	+
MZ577121 <i>Psychrobacter</i> <i>cryohalolentis</i> strain POI OP54– 44/45–2 (2)	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–
MZ577132 <i>Psychrobacter</i> <i>pacificensis</i> strain POI LV81–57/al 379 (2)	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–



MZ577172 <i>Psychrobacter submarinus</i> strain POI OP54– 28/101–1	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–
MZ577174 <i>Stenotrophomona s rhizophila</i> strain POI LV81– 28/173–3(3)	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+
MZ577178 <i>Pseudomonas yamanorum</i> strain POI OP54–33/12– 1	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
MZ577181 <i>Promicromonospo ra xylanilytica</i> strain POI OP54– 28/53–1	+	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
MZ577183 <i>Brevibacillus nitrificans</i> strain POI LV81– 19/135	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–
MZ577213 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379 (1)	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	–
MT758444 <i>Robertmurraya kyonggiensis</i> strain poi87	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	+
MT758443 <i>Psychrobacter piscatorii</i> strain poi185	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–

Продолжение приложения 1

Штамм Субстрат	Аминоуксн. кислота	Фенилаланин	Орнитин	Аспарагин	Лизин	Аспарагиновая кислота	Аланин	Пролин	Треонин	Валин
MZ540778 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI OP54–33/12– 1(1)	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+

MZ573198 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54-44/45-2	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
MZ573186 <i>Peribacillus simplex</i> strain POI OP54-19/103-1(1)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
MZ573209 <i>Psychrobacter celer</i> strain POI OP54-35/18-2(1)	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
MZ540874 <i>Rhodococcus qingshengii</i> strain POI OP54-59/75-1	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
MZ573210 <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> strain POI LV81-23/149-3(2)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MZ540892 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54-33/al 91-18	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
MZ573212 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI LV81-28/193-6(1)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
MZ573229 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI OP54-41/35-10(1)	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
MZ573232 <i>Nesterenkonia lutea</i> strain POI OP54-19/165	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
MZ540913 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI OP54-59/68-4	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+

MZ573237 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81– 3/25–1	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ540941 <i>Rhodococcus</i> sp. strain POI OP54– 59/76–3	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+
MZ543973 <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> strain POI OP54– 28/188–5	–	+	–	+	+	–	+	+	–	+
MZ543976 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 19/135–3	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+
MZ544024 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 35/213–8	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ595665 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/73–1	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ544190 <i>Psychrobacter</i> <i>nivimaris</i> strain POI OP54–44/45– 3(1)	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
MZ544252 <i>Psychrobacter</i> <i>nivimaris</i> strain POI LV81– 57/311	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
MZ544365 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 42/37–3	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ573241 <i>Nocardioides</i> <i>dokdonensis</i> strain POI OP54– 35/al26–1	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+

MZ595666 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI LV81– 57/379–1(1)	–	+	+	+	–	–	+	+	–	+
MZ573242 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 19/287–1	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ595782 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/92–1	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ573409 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI LV81– 57/379–1	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ573761 <i>Stenotrophomona</i> <i>s</i> sp. strain POI OP54–19/al 26–3	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ562688 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI LV81– 23/149–3	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ562702 <i>Micrococcus</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379–1	–	–	–	–	+	–	+	–	+	–
MZ562704 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 29/206–2(1)	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ59600 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(3)	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ562706 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54–44/45– 3(3)	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+

MZ574136 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI LV81–51/330–3(1)	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
MZ577107 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI LV81–57/379–1(3)	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ577115 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54–41/al 36–28	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ577118 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54–59/75–14	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ577121 <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain POI OP54–44/45–2 (2)	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
MZ577132 <i>Psychrobacter pacificensis</i> strain POI LV81–57/al 379 (2)	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
MZ577136 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54–29/138–7	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ577169 <i>Psychrobacter maritimus</i> strain POI OP54–35/87–1	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
MZ569490 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI LV81–23/149–3(1)	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ569847 <i>Pseudomonas brenneri</i> strain POI OP54–35/18–4	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+

MZ569674 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 59/75–11	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+
MZ573202 <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> strain POI OP54– 19/103–1(2)	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+
MZ569721 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 35/18–2	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–
MZ569678 <i>Stenotrophomona</i> <i>s maltophilia</i> strain POI OP54– 41/36–2	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–
MZ573187 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54– 51/92–1(2)	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+
MZ569315 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54– 28/198–6	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MZ577172 <i>Psychrobacter</i> <i>submarinus</i> strain POI OP54– 28/101–1	–	+	–	–	+	–	+	+	+	+
MZ577174 <i>Stenotrophomona</i> <i>s rhizophila</i> strain POI LV81– 28/173–3(3)	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–
MZ577178 <i>Pseudomonas</i> <i>yamanorum</i> strain POI OP54–33/12– 1	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MZ577181 <i>Promicromonospo</i> <i>ra xylanilytica</i> strain POI OP54– 28/53–1	–	–	+	–	–	–	+	+	–	+

MZ577183 <i>Brevibacillus nitrificans</i> strain POI LV81– 19/135	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
MZ577213 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI LV81– 57/al 379 (1)	–	+	–	–	+	–	+	+	+	+
MT758444 <i>Robertmurraya kyonggiensis</i> strain poi87	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+
MT758443 <i>Psychrobacter piscatorii</i> strain poi185	–	+	–	–	+	–	+	+	+	+

Примечание: + есть рост бактерий на среде с субстратом; – нет роста бактерий на среде с субстратом

### Приложение 3

Обнаружение функциональных генов аэробной и анаэробной деградации углеводов в нефтеокисляющих штаммах

Штамм	<i>alkBB</i>	<i>bssA</i>
MZ569721 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-35/18-2		+
MZ573229 <i>Psychrobacter</i> sp. strain POI OP54-41/35-10(1)		+
MZ543973 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain POI OP54-28/188-5		+
MZ595782 <i>Pseudomonas</i> sp. strain POI OP54-59/92-1		+
MZ562706 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54-44/45-3(3)		+
MZ573198 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54-44/45-2		+
MZ569490 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain POI LV81-23/149-3(1)	+	+
MT758443 <i>Psychrobacter piscatorii</i> strain poi185	+	+
MZ577172 <i>Psychrobacter submarinus</i> strain POI OP54-28/101-1		+
MZ540913 <i>Psychrobacter glacincola</i> strain POI OP54-59/68-4	+	
MZ544190 <i>Psychrobacter nivimaris</i> strain POI OP54-44/45-3(1)	+	
MZ573242 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-19/287-1	+	
MZ562702 <i>Micrococcus</i> sp. strain POI LV81-57/al 379-1	+	
MZ577118 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-59/75-14	+	
MZ569678 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain POI OP54-41/36-2	+	
MZ569315 <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain POI OP54-28/198-6	+	
MZ577172 <i>Psychrobacter submarinus</i> strain POI OP54-28/101-1	+	
MZ577178 <i>Pseudomonas yamanorum</i> strain POI OP54-33/12-1	+	

**Приложение 4**

Последовательность гена 16S рPHK штамма *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8

>AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACTCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGT  
CGAACGGTCTAATGCTTAACACTGAGTGTTTCAGTAAGGTAGGGGACAGCGAGAGCGCGA  
AGAATGAGCGCTCCACGCATTCATAAGTGCCAACACAACACTGAAGGAACGCTGAATGTTGA  
GTGTTAAGTATTAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTACCCATAAAG  
CCGGGACAACCCTTGAAACGAGGGGCTAATACCGGATAATCTTTGGTCTTGGCATCAAGA  
GTAAAGGAAAGGTGGCCTCTGAAAATGCTGCCGATTATGGATGGACCCGCGTCTGATTAG  
CTGGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA  
ACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGATGAAGGTCTTCGGA  
TTGTAAAGTACTGTCTTTGGGGAAGAATGATCGATTTGAAAATATTGAGTCGATATGACG  
GTACCCAAGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGG  
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGGATAGTTAAGTCCGGT  
GTGAAAGATCAGGGGCTCAACCCTGAGAGTGCATCGGAAACTGGTTATCTTGAGGACAG  
GAGAGGAAAGTGGAAATCCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG  
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTAGAGG  
GTATCGACCCCTTCTGTGCCGAGTTAACACAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCC  
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATCCACAGAATCCAAAGGAA  
ACTTGGGAGTGCCCTTCGGGGAGCTGTGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGTTTAGTTGCTAACG  
AGTAAGTCGAGCACTCTAGACAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC  
GTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGA  
CGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCCAATCCGAGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCA  
GGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGG  
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCTGCAACACCC  
GAAGCCGGTGAGGTAACCCGAAAGGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGGGCCGATGATTGGG  
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT

## Приложение 5

Диагноз *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8.

Клетки штамма представляют собой грамотрицательные спорообразующие подвижные палочки. Клетки встречаются одиночно. Размножаются бинарным делением. Рост штамма в строго анаэробных условиях. Каталазо–отрицательная бактерия. Использует лактат, фумарат, формиат, этанол и метанол как донор электронов и источник углерода в присутствии сульфата. Использует сульфат и тиосульфат как акцептор электронов в присутствии лактата. Не использует сульфит и элементарную серу. Мезофил, растет в диапазоне температур от 20°C до 30°C (оптимум 25°C). Растет при pH 6–8 (оптимум 7,17–7,26). Зафиксирован рост в диапазоне NaCl от 0 до 10 г/л (оптимум 2 г/л). Доминирующие жирные кислоты клеточных стенок (>10%) C16:1, C16:0, C14:0 и iC15:0. Доминирующий изопреноидный хинон МК–7. Содержание Г+Ц в ДНК 42.08%. Типовой штамм SRJS8 (= ВКМ В–3540 = DSM 26308Т) выделен из донных отложений северной части Японского моря, Россия). Номер нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК в GenBank – МТ740695.2. Номер генома в GenBank: JAJDOO010000000.