

На правах рукописи

БУКИН
Сергей Викторович

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

03.02.08 –Экология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2017

Работа выполнена в лаборатории микробиологии углеводов в ФГБУН
Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г.
Иркутск

*Научный
руководитель:* **Павлова Ольга Николаевна**
кандидат биологических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Лимнологический институт Сибирского отделения Российской
академии наук, г. Иркутск

*Официальные
оппоненты:* **Карначук Ольга Викторовна**
доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой
Физиологии растений и биотехнологии Федерального
государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Национальный исследовательский
Томский государственный университет», г. Томск

Зайцева Светлана Викторовна
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории
микробиологии Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт общей и экспериментальной
биологии Сибирского отделения Российской академии наук», г.
Улан-Удэ

*Ведущая
организация:* Федеральное государственное учреждение «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

Защита диссертации состоится 9 июня 2017 г. в 10⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский
государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
Байкальский музей им. профессора М. М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО
«ИГУ» им. В. Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124,
и на сайте Иркутского государственного университета:
<http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=102>.

Отзыв просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по
адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет
ИГУ. Тел./факс: (3952)24-18-55; e-mail: dissovvet07@gmail.com

Автореферат разослан «__» апреля 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Донные отложения морских и пресноводных водоёмов представляют собой крупнейший резервуар органического углерода на Земле ($\sim 15000 \times 10^{18}$ г, Hedges and Keil, 1995; Tranvik et al., 2009). Вместе с тем донные осадки являются одной из уникальных экологических ниш, изобилующей некультивируемыми, недавно открытыми или слабоизученными микроорганизмами (Teske et al., 2013). В глубоководных водоёмах основная масса донных отложений, как среда обитания, характеризуется отсутствием кислорода, низкими температурами, а также нехваткой легкодоступных источников углерода и энергии. В районах субаквальных разгрузок глубинных гидротермальных и холодных газо- и нефтенасыщенных флюидов, где в донные отложения с потоками газов поступают дополнительные доноры и акцепторы электронов, численность и активность микробных сообществ значительно возрастает (Parkes et al., 2014).

Помимо питательных субстратов восходящие потоки флюидов могут выносить к поверхности дна представителей микробных сообществ глубинных слоёв донных отложений (Hubert et al., 2009). Метаболические возможности микроорганизмов глубинной биосферы и их роль в биогеохимических циклах в настоящее время являются объектами интенсивных исследований (Biddle et al., 2012; Bonch-Osmolovskaya et al., 2012; Edwards et al., 2012; Orsi et al., 2013; Parkes et al., 2014; Orcutt et al., 2015).

Наравне с морскими экосистемами, перспективным местом изучения микробных сообществ, ассоциированных с флюидными разгрузками, является пресноводное озеро Байкал. Расположение в тектонически активной зоне обуславливает различные экологические особенности функционирования экосистемы озера, а также наличие подводных грязевых вулканов, разгрузок нефте- и газонасыщенных флюидов, залежей газовых гидратов (Кузьмин и др., 1998; Конторович и др., 2007; Khlystov et al., 2013). Одним из мест концентрации таких геологических аномалий в озере является район Посольского разлома и, в частности, подводная возвышенность Посольская Банка (Naudts et al., 2012). Анализ аномалий теплового потока, сейсмические и гидроакустические исследования (Klerkx et al., 2006; Naudts et al., 2012), а также исследования изотопного состава углерода разгружающихся газов (Калмычков и др., 2006; Pimenov et al., 2014), позволяют предполагать наличие в данном районе подтока глубинных флюидов и функционирование конвективной флюидной петли (Vanneste et al., 2002).

Недавно проведённые исследования показали, что в осадках зоны глубоководных метановых сипов Посольской Банки с нетипично высокой активностью протекают процессы сульфат-редукции и метаноокисления (Пименов и др., 2014; Pimenov et al., 2014). Однако, влияние флюидных потоков на состав и функционирование микробных популяций, осуществляющих конечные этапы анаэробной деструкции органического вещества и образования углеводородных

газов, изучено недостаточно. Кроме того, было показано, что в зоне разлома с газонасыщенными флюидами из глубинных осадков к поверхности дна озера поступают мелкоразмерные частицы, включая створки древних диатомовых водорослей (Клеркс и др., 2003). Очевидно, что вместе с флюидами, в поверхностные осадки могут выноситься и микроорганизмы. Несмотря на то, что ранний диагенез органического вещества в озере является предметом многочисленных исследований (Мизандронцев, 1978; Гранина, 2008; Och et al., 2012), возможность поступления в приповерхностные осадки озера Байкал представителей глубинных микробных сообществ и их роль в процессах деструкции органического вещества не изучалась.

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

Задачи:

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

Научная новизна работы. Впервые проведен комплексный анализ природных микробных сообществ, осуществляющих заключительные этапы деструкции органического вещества в донных осадках глубоководной разгрузки углеводородных газов «Посольская Банка» как при низких положительных температурах (4 °С), характерных для оз. Байкал, так и в термобарических условиях, характерных для зоны генерации углеводородов. С помощью пиросеквенирования ампликонов фрагментов генов 16S рРНК установлено, что по структуре и составу микробные сообщества донных осадков сипа «Посольская Банка» значительно отличаются от сообществ донных отложений других районов разгрузки углеводородов оз. Байкал, что определяется геологической структурой изучаемого района. Впервые методами культивирования в психрофильных условиях (4 °С) на средах с различными субстратами исследовано образование углеводородных газов микробными сообществами донных отложений озера Байкал. Обнаружены взаимосвязи между

литологической характеристикой донных отложений и активностью процессов генерации метана при использовании различных субстратов метаногенеза. Впервые, в накопительных культурах микробных сообществ донных отложений озера Байкал при росте на средах с углекислым газом и ацетатом натрия в качестве источников углерода отмечено образование не только метана, но и более тяжелого углеводородного газа – этана. В этаногенном сообществе на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК выявлены представители порядков *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Thermoplasmatales* и филума *Bathyarchaeota*. В серии экспериментов по культивированию сообществ донных отложений метанового сипа «Посольская Банка» при температуре 80 °С и давлении 5 МПа впервые установлена способность населяющих их микробных популяций осуществлять трансформацию органического вещества в термобарических условиях с образованием биомаркеров нефти (ретен и гаммацерена).

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

Защищаемые положения:

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

2. Экологические особенности: температурные условия, интенсивность поступления глубинных флюидов и концентрации органических субстратов

определяют состав углеводов, образуемых микробными сообществами на заключительных этапах деструкции органического вещества в донных осадках зоны глубоководной разгрузки углеводородных газов «Посольская Банка».

Апробация работы. Полученные в диссертации результаты были представлены на следующих международных и российских конференциях: VI Всероссийском Конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием Симбиоз-Россия 2013 (Иркутск, 2013), Российской конференции «Газовые гидраты в экосистеме Земли» (Новосибирск, 2014), 10th International Congress on Extremophiles (Россия, Санкт-Петербург, 2014), 6-ой Международной Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2015), 4-ом Байкальском Микробиологическом симпозиуме с международным участием BSM-2015 (Иркутск, 2015), 13th International Conference on Gas in Marine Sediments (GIMS 13) (Норвегия, Тромсё, 2016).

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

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

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю к.б.н. Павловой О.Н. и руководителю лаборатории д.б.н. Земской Т.И. за постановку задач, всестороннюю помощь в проведении исследований и ценные практические советы, д.х.н. Манакову А.Ю., д.г-м.н. Москвину В.И., к.г-м.н. Костыревой Е.А., к.б.н. Морозову И.В., к.х.н. Калмычкову Г.В., к.г.н. Иванову В.Г., к.б.н. Галачанц Ю.П., к.б.н. Петровой Д.П., к.г-м.н. Погодаевой Т.В., профессору Хачикубо А. и всем сотрудникам лаборатории микробиологии углеводов и геологии оз. Байкал Лимнологического института СО РАН за практическую помощь, интересные идеи и ценные советы на всех этапах работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведены литературные данные по геологическому строению и происхождению поднятия Посольская Банка, влиянию флюидных потоков на состав поровых вод донных отложений района Посольского разлома, а также экофизиологическим особенностям метаногенных архей и микроорганизмов глубинной биосферы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования. Объектами исследования были микробные сообщества донных отложений района глубоководной разгрузки газа, расположенной на южном склоне подводной возвышенности Посольская Банка

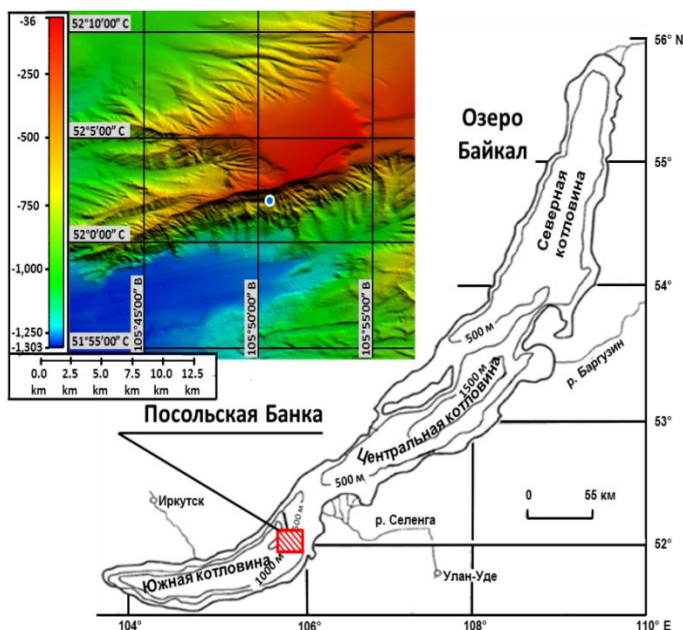


Рис. 1. Карта-схема района отбора проб.

микроорганизмов и подготовку образцов к химическому анализу поровых вод выполняли в лаборатории на судне.

Донные отложения трёх полученных кернов различались литологической структурой и химическим составом поровых вод. Осадки керна 2012 г. были максимально приближены к зоне разгрузки, характеризовались присутствием газовых гидратов, высокой газонасыщенностью, восстановленными условиями и наличием повышенных концентраций ацетат-иона (до 22,35 мг/л) и ионов аммония (до 3,7 мг/л) в поровых водах. В кернах 2014 и 2015 гг. донные отложения имели окисленный поверхностный слой, малую газонасыщенность и по химическому составу поровых вод соответствовали осадкам фоновых районов.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Микробиологические методы. Для культивирования метанобразующих сообществ микроорганизмов использовали жидкую среду Пфеннига (Кузнецов, Дубинина, 1989). В качестве источников углерода и энергии использовали CH_3COONa – 2 г/л, метанол – до 1 % или газовую смесь $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80 % : 20 %). При использовании ацетата газовую фазу флаконов заменяли азотом (только в 2015 г.), смесью – $\text{H}_2 + \text{N}_2$ (80 % : 20 %) или $\text{H}_2 + \text{N}_2$ (20 % : 80 %; только в 2015 г.). При добавлении метанола газовая фаза состояла из азота. Контролем служила анаэробная минеральная среда с атмосферой азота. Все посеы, за исключением контрольных, выполнены в трёх повторностях. Культивирование проводили в темноте при температуре 4 °С в течении 3-х месяцев (для образцов 2012 г.) или 12 месяцев (для образцов 2014, 2015 гг.).

Модельные эксперименты для изучения процессов преобразования органического вещества микробным сообществом в условиях температур, характерных для зоны генерации углеводов, проводили в специальных

(Южный Байкал) (рис. 1). Образцы осадков были отобраны с использованием геологической ударной трубы (ГТ) в ходе экспедиций на научно-исследовательском судне «Г. Ю. Верещагин» в июле 2012, 2014 и 2015 годов.

Осадки для молекулярно-генетических исследований и экспериментального термобарического культивирования асептически отбирали из срединной части кернов, гомогенизировали, и помещали в жидкий азот до момента их анализа в лаборатории. Постановку накопительных культур метаногенных

автоклавах, разработанных и собранных в Институте неорганической химии СО РАН им. А. В. Николаева. Инкубирование образцов донных осадков в автоклавах проводили при температуре 80 °С и давлении 5 МПа.

В автоклаве № 1 к образцу донных отложений был добавлен детрит байкальской диатомовой водоросли *Synedra acus*, чистая культура которой получена в отделе Ультраструктуры клетки ЛИИ СО РАН (Shishlyannikov et al., 2011). Газовая фаза в автоклаве № 1 состояла из смеси газов CH₄:H₂:CO₂ (50 % : 40 % : 10 %). В автоклав № 2 были помещены осадки без дополнительных субстратов, тогда как автоклав № 3 содержал простерилизованный образец донных отложений и выступал в качестве отрицательного контроля. Газовая фаза в автоклавах № 2 и № 3 состояла из метана. Культивирование осуществлялось в течение 17 месяцев. После вскрытия автоклавов, часть осадков использовали для выделения суммарной ДНК и микроскопического анализа. Микроскопию выполняли на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (ZEISS, Германия). Другая часть исследовалась на предмет изменений в содержании и составе органического вещества методом газового хромато-масс-спектрометрического анализа.

2.2.2 Молекулярные методы. Фиксацию препаратов для флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) проводили согласно методике предложенной Ф. Глэкнером (Glockner et al., 1999). Гибридизацию проводили с олигонуклеотидными зондами, специфичными к участкам ДНК *Bacteria* (EUB338, Amann et al., 1990), *Archaea* (ARCH915, Stahl, Amann, 1991), *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota* (EURY 498, CREN 499, Burggraf et al., 1994), мечеными флуоресцентным красителем CY3 (Синтол, Россия).

Выделение препаратов суммарной ДНК из биомассы образцов донных отложений и накопительных культур микроорганизмов проводили методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989) в модифицированном варианте (Шубенкова и др., 2005). Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с универсальными эубактериальными и архейными праймерами. Клонирование продуктов амплификации фрагментов гена 16S рРНК бактерий и архей (500-1300 п.н.) осуществляли в плазмидный вектор pGEM-T (Promega, США). Лигирование и трансформацию проводили согласно предложенной методике фирмы производителя. Секвенирование продуктов амплификации выполняли в ЦКП СО РАН «Геномика» (г. Новосибирск). Идентификацию полученных фрагментов гена 16S рРНК чистых культур и суммарного микробного сообщества осуществляли с использованием поисковой программы BLAST сервера NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Пиросеквенирование переменных районов гена 16S рРНК образцов суммарной ДНК, выделенной из донных осадков, выполнено на платформе Roche 454 Genome Sequencer FLX Titanium с использованием бактериальных U341F/U785R (Lee et al., 1993; Muyzer et al., 1993) и архейных A2Fa/A519R (Reysenbach, Pace, 1995; Teske,

Sørensen, 2008) праймеров. Для обработки и анализа данных пиросеквенирования использовали программу Mothur, версии v.1.31.2. (Schloss et al., 2009). Полученные последовательности были классифицированы с использованием референсной базы данных последовательностей 16S рНК SILVA (<http://arb-silva.de> silva) с 80 % доверительным порогом в Mothur.

2.2.3 Физико-химические методы. Измерение концентраций углеводородных газов в донных отложениях и атмосфере флаконов с накопительными культурами проводили методом фазово-равновесной дегазации (Большаков и Егоров, 1987). Анализ выполняли на газовом хроматографе ЭХО-ПИД (КТИ ГЭП СО РАН, Россия).

Изотопный состав углерода и водорода углеводородных газов определяли с помощью масс-спектрометра стабильных изотопов Thermo Finnigan DELTA plus XP (США) с капиллярной колонкой Supelco Carboxen-1006 PLOT (США) на базе Технологического института г. Китами (Япония).

Общее содержание органического углерода ($C_{орг.}$) в образцах донных отложений устанавливали с помощью экспресс анализатора углерода АН-7529 (ГЗИП, Беларусь). Выделение растворимой фракции органического вещества и определение молекулярных биомаркеров проводили согласно методике опубликованной ранее (Каширцев и др., 2001). Анализ состава полученных фракций проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии на системе, включающей газовый хроматограф Agilent 6890 (США) и масс-спектрометр Agilent 5973N (США) с капиллярной колонкой Agilent HP-5MS (США) на базе Института нефтегазовой геологии и геофизики СО РАН, Новосибирск. Идентификацию индивидуальных углеводородов проводили поиском по библиотеке NIST-05.

Пробы поровых вод для анализа их химического состава отбирались путём центрифугирования образцов осадка. Измерения концентрации анионов в поровых водах проводили методом жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром А-02 (ЭКОНОВА, Россия). В качестве носителя использовали гидрофталат калия. Относительная погрешность измерений 5–7 % (до 10 % для хлоридов; Барам и др. 1999). Содержание катионов определяли методами атомной абсорбции (Ca^{2+} , Mg^{2+}) и атомной эмиссии (Na^+ , K^+) с использованием атомно-абсорбционного спектрометра ААС-30 (ZEISS, Германия) (Фомин, 2000).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Таксономическая структура микробного сообщества донных отложений в зоне разгрузки термогенных газов поднятия Посольская Банка. Для оценки биоразнообразия микроорганизмов в донных отложениях, ассоциированных с разгрузкой газов, использовали образцы осадка из керна, отобранного в 2012 г. Для анализа структуры сообщества было выделено 5 образцов тотальной ДНК из слоёв 0–2, 10, 70, 100 и 140 см. По результатам обработки данных секвенирования ампликонов участков гена 16S рНК получено 16320 бактериальных и 11006 архейных последовательностей, длиной 275–300 п.н. Построенные кривые

разряжения для бактерий и архей свидетельствуют о том, что на уровне рода достигнутый объём секвенирования удовлетворителен для полной характеристики разнообразия сообществ глубинных осадков (100 и 140 см) и недостаточен для выявления всего разнообразия микроорганизмов в поверхностных слоях донных отложений. По индексам биоразнообразия таксономическая сложность сообществ бактерий, на уровне рода, максимальна для поверхностного слоя осадка и уменьшается с глубиной. Сообщества архей менее сложны, а максимум их разнообразия по индексам отмечен на глубине 10 см (табл. 1).

Таблица 1

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

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

В результате таксономического анализа микробных сообществ, во всех слоях исследуемого осадка выявлены последовательности фрагментов генов 16S рРНК представителей девяти общих бактериальных типов: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Aminicenantes* (OP8), *Atribacteria* (OP9), *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* (α , β и δ) и четырёх типов архей: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Bathyarchaeota* (рис 2).

В сообществах поверхностного слоя наиболее широко представлены бактерий типов *Acidobacteria* (22 %), *Proteobacteria* (17,6 %), *Chloroflexi* (12 %), среди которых, наравне с аэробными, значительную долю составляли анаэробные органотрофные (*Anaerolinea*, *Caldilineae*, *Syntrophus*) и литотрофные (*Desulfobacca*, *Denitratisoma*, *Geothermobacter*, *Methylophilus*) микроорганизмы. В меньшей степени были представлены бактерий типов *Actinobacteria* (4,6 %) и *Cyanobacteria* (<0,1 %), последовательности которых численно доминируют в библиотеках генов 16S рРНК из поверхностных осадков других районов разгрузок углеводородов оз. Байкал (Zemskaya et al., 2015).

В составе библиотек сообщества подповерхностного слоя (10 см) преобладали последовательности генов 16S рРНК представителей филумов *Chloroflexi* (42 %), *Aminicenantes* (11,9 %) и δ -*Proteobacteria* (9,2 %). В сообществах слоёв донных

отложений ассоциированных с газовыми гидратами (70, 100, 140 см) велика доля (23-33 %) не типичных для оз. Байкал анаэробных органотрофных микроорганизмов филумов-кандидатов *Aminicenantes*, *Atribacteria*, *Latescibacteria*, *Saccharibacteria*, а также хемоорганотрофных бактерий филума *Deinococcus-Thermus* (до 15 %). В слое 140 см 25,5 % последовательностей принадлежат бактериям порядка *Pseudomonadales*.

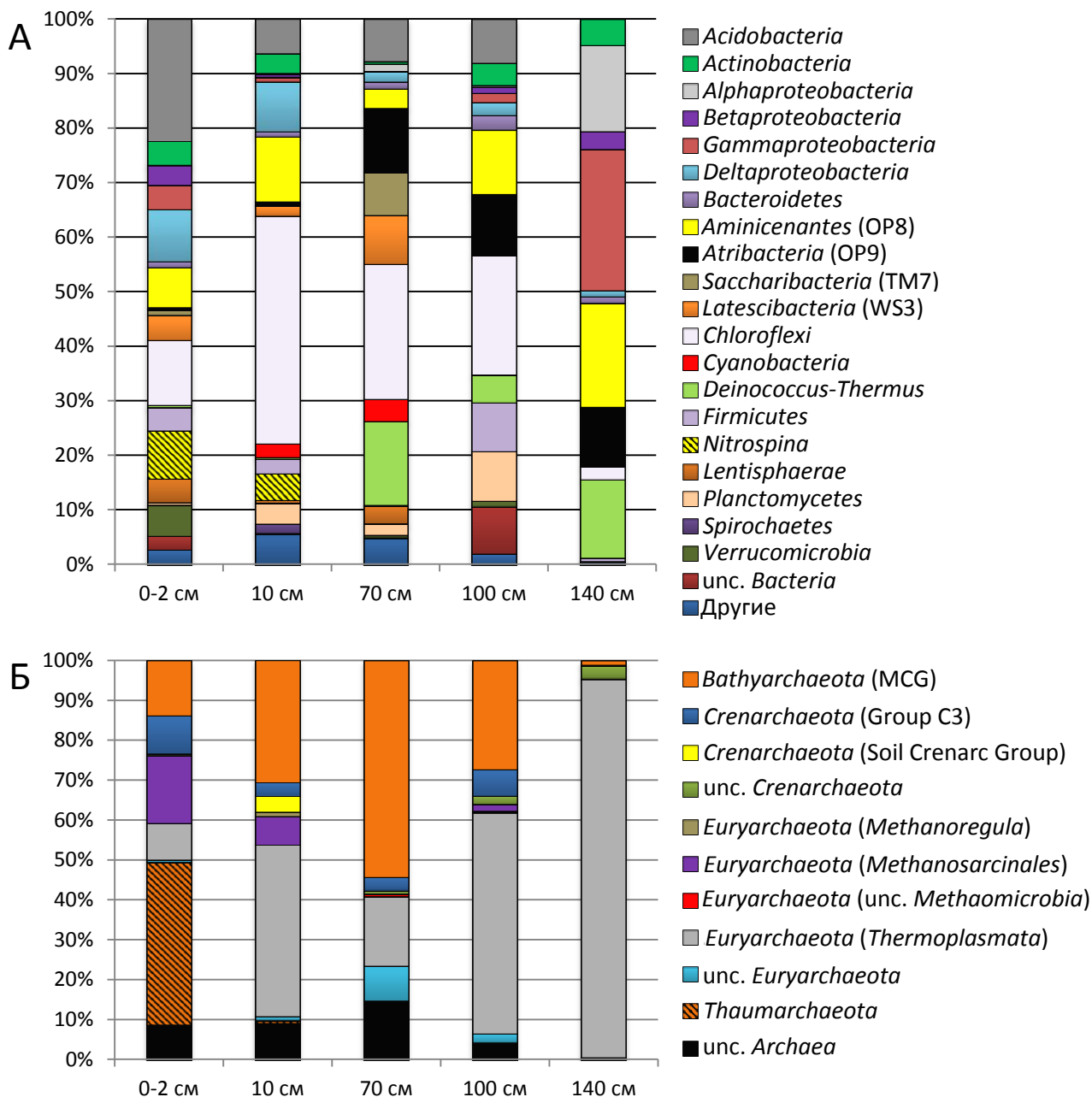


Рис. 2. Таксономический состав бактериальных (А) и архейных (Б) сообществ донных осадков района метанового сипа «Посольская Банка» по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.

В отличие от бактериального сообщества представители выявленных в настоящей работе филумов архей повсеместно распространены в донных отложениях и других районах Байкала, однако, характерной особенностью было преобладание среди *Euryarchaeota* последовательностей архей порядка

Thermoplasmatales и потенциально метанотрофных микроорганизмов группы GOM Arc I (*Methanosarcinales*), тогда как доля метаногенов не превышала 2 %.

Для оценки сходства таксономического состава сообществ бактерий и архей были построены диаграммы Венна. Анализ библиотек последовательностей генов 16S рРНК бактерий всех образцов не выявил ни одной общей оперативной таксономической единицы (ОТЕ) со 100 % гомологией. В библиотеках генов 16S рРНК архей из всех исследованных слоев донных отложений выявлены 2 общих ОТЕ (класс *Thermoplasmata*). Наибольшее количество общих бактериальных архейных ОТЕ отмечено в библиотеках сообществ поверхностного и подповерхностного слоев осадка и слоев 10–100 см.

С помощью метода непараметрического многомерного шкалирования была исследована сопряженность некоторых ионов, общей минерализации поровой воды и отдельных филоципов (ОТЕ) всех исследованных библиотек генов 16S рРНК (рис. 3).

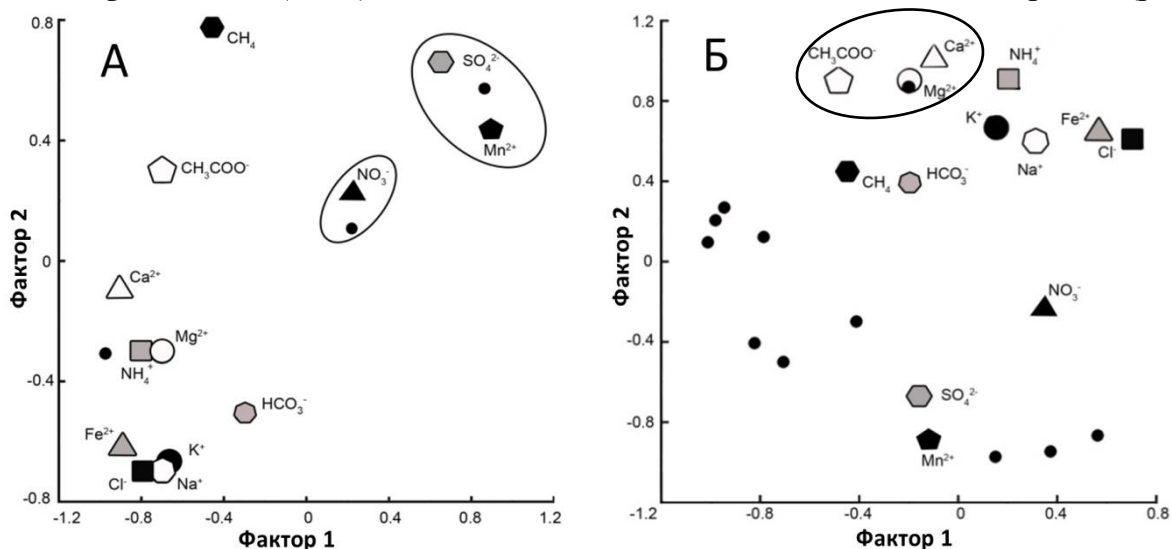


Рис. 3. График многомерного непараметрического шкалирования (nmds), показывающий взаимосвязь между ОТЕ библиотек генов 16S рРНК бактерий (А) и архей (Б), детектированных в донных осадках района глубоководного метанового сипа «Посольская Банка», и химическими компонентами поровых вод.

Достоверное влияние ($p < 0,05$) на присутствие *Chloroflexi*, *Lentisphaerae*, *Acidobacteria*, *Aminicenantes*, семейства *Nitrospinaceae* (δ -*Proteobacteria*) и *Methylococcaceae* (γ -*Proteobacteria*) оказывали концентрации ионов сульфата и марганца(II). Присутствие представителей филумов *Chloroflexi* и *Bacteroidetes* было сопряжено с содержанием нитрат-иона, а представителей *Bathyarchaeota* – с содержанием ионов магния, ацетата и кальция.

Таким образом, в донных отложениях исследуемого района разгрузки сформированы микробные сообщества, ориентированные как на разложение органического вещества, так и использование энергии поступающих с флюидом неорганических соединений и восстановленных газов.

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

эксперимента с различными субстратами метаногенеза изучены низкотемпературные процессы образования метана микробными сообществами донных осадков, отобранных в разные годы. По результатам трех месяцев культивирования природных образцов в анаэробных условиях установлено, что активность процессов генерации метана различалась в зависимости от литологической структуры осадка и химического состава поровых вод кернов.

В поверхностных, восстановленных слоях керна, характеризующихся высокой газонасыщенностью, концентрация образовавшегося метана на средах для ацетокластических и гидрогенотрофных архей, не превышала 0.002 ммоль/л (рис. 4А). Образование метана наиболее активно проходило в сообществе слоя 55 см на среде с ацетатом и водородом (до 6.15 ммоль/л). С увеличением глубины осадка наблюдалось снижение влияния ацетата на продуктивность метангенерации и преимущественное увеличение концентрации метана за счет деятельности гидрогенотрофных архей.

Низкая метаногенная активность микробного сообщества поверхностных осадков может быть следствием деятельности сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), конкурирующих с метаногенами за общие субстраты. Это согласуется с данными о высокой скорости процесса сульфатредукции в данных слоях (Пименов и др., 2014) и присутствием значительной доли последовательностей СРБ в библиотеках гена 16S рРНК.

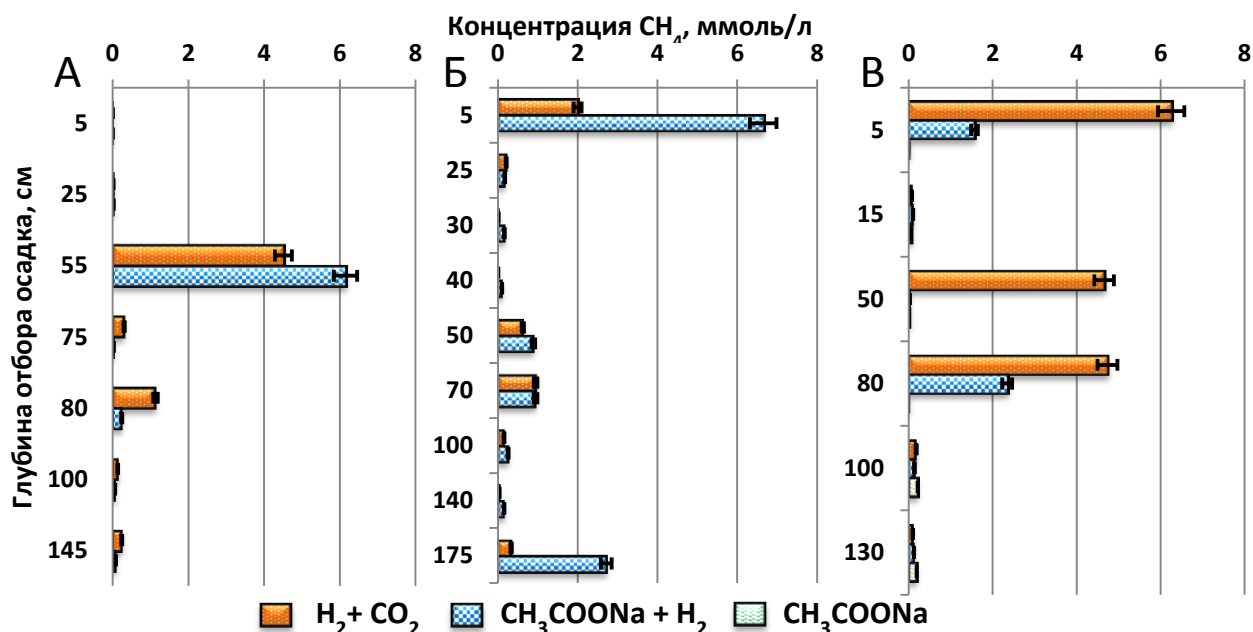


Рис. 4. Концентрации метана, в накопительных культурах донных осадков сипа «Посольская Банка» через 90 суток культивирования при 4 °С. Приведены данные для осадков кернов (А) Ст-5 ГТ-4 (2012 г.), (Б) Ст-1 ГТ-3 (2014 г.) и (В) Ст-2 ГТ-3 (2015 г.).

В осадках, удаленных от места разгрузки флюидов, имеющих малую газонасыщенность и химический состав поровых вод, характерный для фоновых районов, процессы метангенерации зафиксированы в поверхностном окисленном слое, и в слоях соответствующих верхней границе ледниковых глин (50–80 см) (рис.

4Б, В). Кроме того, интенсивное образование метана выявлено в одной из проб глубинного слоя 175 см (рис. 4Б).

При культивировании на среде с метанолом образование метана было зафиксировано только для сообществ поверхностных слоёв окисленных осадков. Метаногенные сообщества донных отложений 2015 г., в составе поровых вод которых не обнаружен ацетат-ион (рис. 4В), образовывали метан преимущественно по гидрогенотрофному пути, а количество продуцируемого метана коррелировало с начальной концентрацией водорода в среде. Наличие в среде ацетата не приводило к увеличению продуктивности метангенерации. Вместе с тем, в накопительных культурах, содержащих микробное сообщество донных осадков 2014 г., ацетат-ион в которых присутствовал изначально (рис. 4Б), образование метана в первые месяцы культивирования наиболее активно происходило на средах, содержащих ацетат и водород, нежели на средах с $\text{CO}_2 + \text{H}_2$. Однако, длительное культивирование приводило к выравниванию концентраций газа в культурах, содержащих $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ и в культурах с $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2$, несмотря на более широкий спектр субстратов в последних. Вероятной причиной данных процессов является преобладание в сообществах гидрогенотрофных метаногенных архей, использующих ацетат в качестве единственного или дополнительного источника углерода. Это предположение подтверждается результатами филогенетического анализа библиотек гена 16S рРНК (900 п.н.) *Archaea* из «гидрогенотрофной» и «ацетокластической» накопительных культур поверхностного слоя осадка (5 см) 2014 г. (рис. 4Б). В анализируемых образцах все выявленные последовательности имели высокий процент гомологии с представителями гидрогенотрофных метаногенных архей родов *Methanocella* и *Methanobacterium*, облигатно или факультативно использующих ацетат в качестве источника углерода, а также с некультивируемыми представителями филума *Bathyarchaeota*. Ацетокластических метаногенных архей в сообществах обнаружено не было.

Преимущественное образование метана по автотрофному пути в накопительных культурах в полной мере согласуется с данными изотопных исследований, указывающих на то, что в донных отложениях глубоководной зоны озера Байкал, 75–100 % метана образуется автотрофно (Намсараев и др., 1995).

3.3 Биогенное образование этана микробным сообществом донных отложений сипа «Посольская Банка». В ходе культивирования восстановленных донных отложений керна 2012 г. образование этана было зафиксировано в накопительных культурах из всех исследуемых слоёв. Результаты измерения концентрации C_2H_6 приведены на рис. 5. В перерасчете на углеводородные газы, наибольшая концентрация этана (26,8 об. %) зафиксирована в культурах из слоя осадка, прилегающего к газовым гидратам (75 см), на средах с $\text{CO}_2 + \text{H}_2$. На среде с ацетатом натрия и водородом наибольшая концентрация C_2H_6 выявлена при культивировании сообществ из осадков с глубин 55 и 100 см – 16,7 об. %.

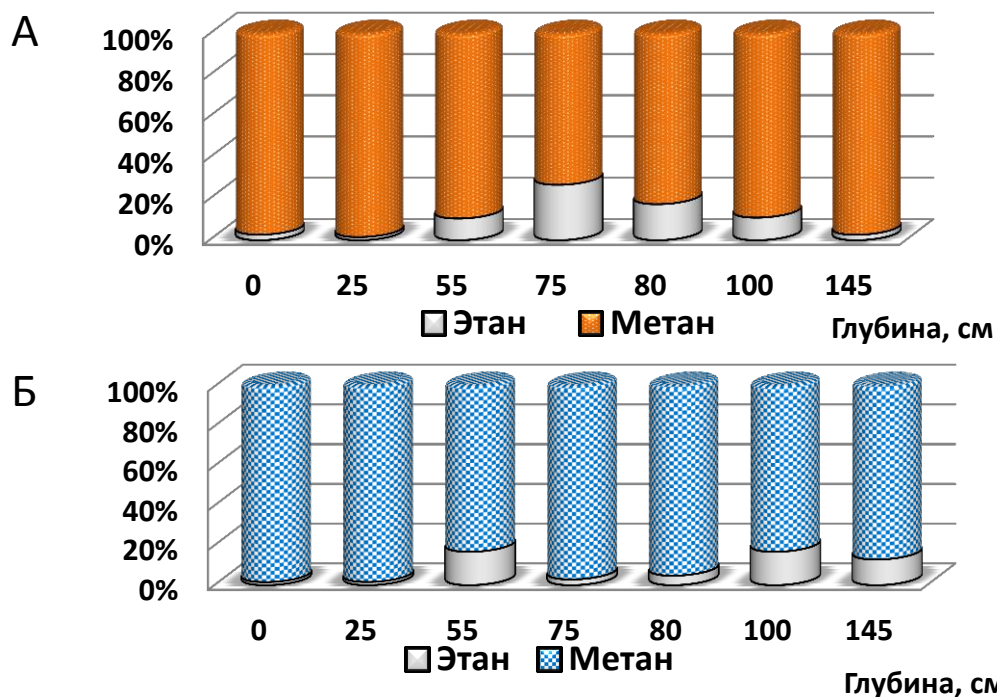


Рис. 5. Соотношение углеводородных газов в накопительных культурах с $H_2 + CO_2$ (А) и $CH_3COONa + H_2$ (Б), содержащих донные осадки керна Ст-5 ГТ-4 (2012 г.).

Для изучения состава микробного сообщества глубинного слоя осадка (100 см, среда с $CH_3COONa + H_2$), где было выявлено образование этана, после ряда последовательных разведений получена накопительная культура анаэробных микроорганизмов. Для данной культуры была проанализирована библиотека из 24-х клонов с фрагментами гена 16S рРНК представителей *Archaea*. В результате проведенного филогенетического анализа в составе библиотеки выявлены последовательности микроорганизмов, родственных представителям филумов *Euryarchaeota* (*Methanococcales*, *Methanosarcinales*) и *Bathyarchaeota* (MCG).

3.4 Деструкция органического вещества микробным сообществом донных осадков сипа «Посольская Банка» в условиях протокатагенеза. Наличие потока термогенных газов в районах глубоководных разгрузок на оз. Байкал обуславливает вероятность попадания в холодные поверхностные осадки представителей глубинного термофильного микробного сообщества. С целью установления возможности присутствия в низкотемпературных приповерхностных осадочных отложениях метанового сипа «Посольская Банка» микроорганизмов, способных развиваться в условиях высоких температур, характерных для глубинных слоев земной коры, были проведены лабораторные эксперименты по культивированию природных образцов осадков, в анаэробных условиях при температуре 80 °С и давлении 5 МПа. Для экспериментального культивирования были выбраны образцы донных отложений из слоя 60–100 см (2012 г.).

Суммарные данные пиросеквенирования библиотек ампликонов фрагментов генов 16S рРНК для образцов с глубины 70 см и 100 см, указывают на то, что среди *Bacteria* наиболее многочисленны последовательности представителей филумов

Chloroflexi (23,6 %), *Atribacteria* (OP9) (11,6 %), *Deinococcus-Thermus* (11,4 %), *Acidobacteria* (7,8 %), *Aminicenantes* (6,7 %), *Latescibacteria* (5,5 %), *Saccharibacteria* (4,8 %), *Planctomycetes* (4,7 %) и *Firmicutes* (3,5 %) (рис. 6А). К редким таксонам, составляющим менее 3 % последовательностей, относятся филумы *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Caldiserica*, *Cyanobacteria*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* (α , β , γ , δ), *Verrucomicrobia* и др. В домене *Archaea* все классифицированные последовательности распределены между *Bathyarchaeota* (MCG) (32,2 %), *Crenarchaeota* (Group C3) (6,14 %) и классами *Thermoplasmata* (47,9 %) и *Methanomicrobia* (1,71 %) представляющими филум *Euryarchaeota* (рис. 6А).

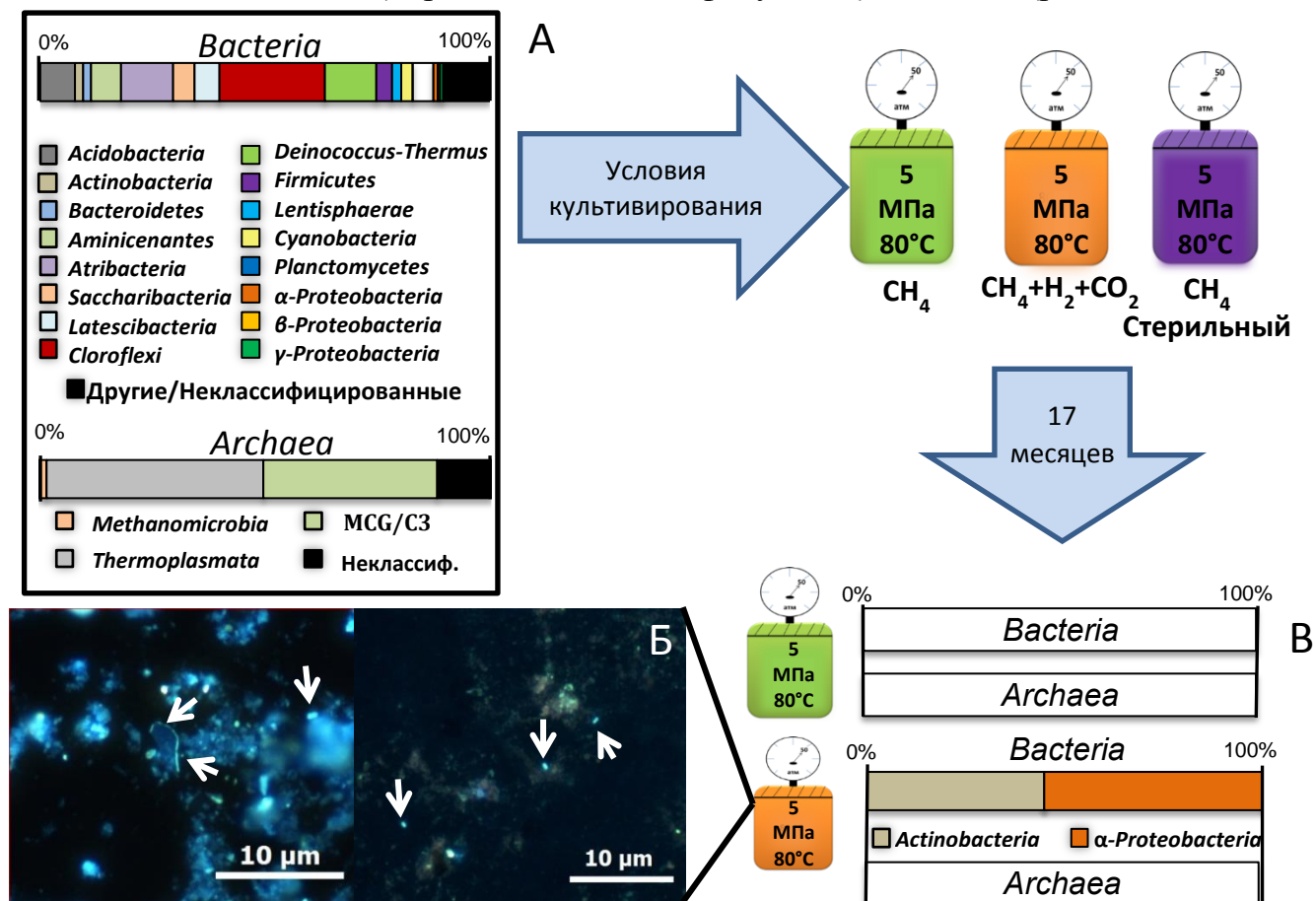


Рис. 6. Схема термобарического эксперимента. (А) Суммарный состав микробного сообщества отдельных слоёв донных отложений метанового сипа «Посольская Банка» до культивирования. (Б) Морфология микроорганизмов в донных отложениях после культивирования. (В) Состав микробного сообщества образцов осадка после 17 месяцев культивирования.

Через 17 месяцев термобарического культивирования в автоклавах при окрашивании 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ) и 3-N,3-N,6-N,6-N-тетрамтилакридин-3,6-диамином (акридин оранжевый) единичные клетки микроорганизмов детектировались только в образцах донных отложений с добавлением детрита водоросли *S. acuis*. экспозиция которых проходила в атмосфере CH₄:H₂:CO₂. Микроорганизмы, ассоциированные с частицами осадка, в основном были представлены палочковидными формами (рис. 6Б).

Положительные результаты ПЦР реакции после эксперимента также удалось получить только для препарата тотальной ДНК, экстрагированной из образца донных отложений, обогащенного детритом водоросли *S. acus*. Для данного образца была получена библиотека продуктов амплификации фрагмента генов 16S рРНК включающая 13072 нуклеотидных последовательности средней длиной 275 пар нуклеотидов, принадлежащих домену *Bacteria*. Археи детектированы не были. По результатам таксономической классификации установлено, что 99,4 % всех последовательностей принадлежат микроорганизмам родов *Arthrobacter* (16,6 %) и *Solirubrobacter* (27,5 %), относимых к филуму *Actinobacteria* (44,5%), а также роду *Sphingomonas* (55,3 %), представляющим класс α -*Proteobacteria* (55,3 %) (рис. 6B). В свою очередь 0,2 % последовательностей распределены между филумами *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, классами γ , δ -*Proteobacteria*. Ранее некоторые представители *Arthrobacter*, *Solirubrobacter* и *Sphingomonas* уже были изолированы из глубинной биосферы (Fredrickson et al., 1995; Balkwill et al., 1997; Crocker et al., 2000; Chang et al., 2007; Kobayashi et al., 2008), в том числе в термофильных условиях (Ciobanu et al., 2014). Также их присутствие в глубинной биосфере подтверждается с помощью молекулярно-генетических исследований (Inagaki et al., 2006; Mason et al., 2010; Breuker et al., 2011; Purkamo et al., 2013). Таким образом, одной из возможных причин их выживания после культивирования при 80 °С может быть их принадлежность к термофильным микробным сообществам глубинных слоёв донных отложений.

О том, что под воздействием микробного сообщества в термобарических условиях эксперимента происходят процессы преобразования органического вещества, свидетельствуют результаты хромато-масс-спектрометрического анализа. Значимые изменения в составе органического вещества наблюдались лишь в донных осадках, обогащённых детритом водоросли *S. acus*. Содержание C_{org} в осадке ходе эксперимента снизилась с 0,77 % до 0,66 %. Значение индекса нечетности для высокомолекулярных углеводов уменьшилось с 5,1 до 3, что свидетельствует о том, что степень превращения углеводородной составляющей органического вещества достигла 41 %. Среди терпанов, в осадке после эксперимента зафиксировано увеличение содержания таких биомаркеров нефти как гаммацерен и ретен.

Гаммацерен и его предшественник гаммацеран, как правило, рассматривается как признак накопления отложений в соленой среде (Sinninghe Damste et al., 1995; Peters et al., 2005). В нашем случае, исходный субстрат являлся пресноводным, о чем свидетельствует численная величина соотношения изопреноидов пристан/фитан (0,63). Гаммацеран основной биомаркер в нефти и битумах многих озёр, где органическое вещество в основном представлено детритом водорослей и бактерий (Peters et al., 2005). $\delta^{13}C$ гаммацерана свидетельствуют о его происхождении из биомассы простейших, цианобактерий и других микроорганизмов растущих в

различных палеоусловиях (Vaz dos Santos Neto et al., 1998). Ретен рассматривается как биомаркер хвойных растений (van Aarssen et al., 2000, Meyers, 2009). Его образование из биомассы водорослей и цианобактерий *Chlorella protothecoides* и *Synechocystis* sp. отмечалось в процессе пиролиза (+200–300 °C) (Wen et al., 2000). Участие анаэробных микроорганизмов в образовании ретена предполагалось и ранее (Martin et al., 1999), но экспериментально не было подтверждено. Полученные в более мягких, чем пиролиз, условиях экспериментальные данные доказывают, что ретен является продуктом деструкции биомассы диатомовых водорослей, осуществляемых микробным сообществом.

Сходные результаты были выявлены ранее в наших исследованиях по тебмобарическому культивированию микробного сообщества донных отложений метанового сипа «Голоустное» (Южный Байкал), при котором, в процессе деструкции биомассы диатомовой водоросли осуществляемой микробным сообществом, образовывался ретен (Pavlova et al., 2016). Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что микробные сообщества донных отложений озера Байкал с различными геохимическими характеристиками при достаточном количестве органического вещества и определенных температурных условиях способны осуществлять деструкцию органических субстратов с образованием таких компонентов нефти как ретен и гаммацерен.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

5. Установлено, что длительное культивирование микробных сообществ донных осадков глубоководного сипа «Посольская Банка», в термобарических условиях (80 °С, 5 МПа), обогащённых детритом водоросли *Synedra acus* и газовой смесью CH₄:H₂:CO₂ способствует развитию термофильных микроорганизмов, осуществляющих деструкцию биомассы диатомей с образованием биомаркеров нефти, таких как ретен и гаммацерен.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Павлова О. Н. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал / О. Н. Павлова, С. В. Букин, А. В. Ломакина, Г. В. Калмычков, В. Г. Иванов, И. В. Морозов, Т. В. Погодаева, Н. В. Пименов, Т. И. Земская // Микробиология. – 2014. –Т. 83, № 6. – С. 694–702.

2. Черницына С. М. Структура микробных сообществ в донных отложениях Посольской Банки, озеро Байкал / С. М. Черницына, Е. В. Мамаева, А. В. Ломакина, Т. В. Погодаева, Ю. П. Галачьянц, С. В. Букин, О. М. Хлыстов, Н. В. Пименов, Т. И. Земская // Микробиология. – 2016. –Т. 85, № 6. – С. 652–662.

3. **Bukin S. V.** The ability of microbial community of Lake Baikal bottom sediments associated with gas discharge to carry out the transformation of organic matter under thermobaric conditions / **S. V. Bukin**, O. N. Pavlova, A. Y. Manakov, E. A. Kostreva, S. M. Chernitsyna, E. V. Mamaeva, T. V. Pogodaeva, T. I. Zemskaya // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – Art. № 690.

4. Pavlova O. N. Transformation of organic matter by microbial community in sediments of Lake Baikal under experimental thermobaric conditions of protocatagenesis /

O. N. Pavlova, T. I. Zemskaya, A. V. Lomakina, O. V. Shubenkova, A. Y. Manakov, V. I. Moskvina, I. V. Morozov, **S. V. Bukin**, O. M. Khlystov // *Geomicrobiology J.* – 2016 – V. 33, № 7. – P. 599–606.

В материалах конференций:

5. **Букин С. В.** Выделение психрофильных метаногенных архей из донных осадков двух районов разгрузки углеводородов озера Байкал / **С. В. Букин**, О. Н. Павлова, В. Г. Иванов, Т. В. Погодаева, Т. И. Земская // *Материалы VI Всероссийского с межд. Участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013»*. Иркутск, 2013. – С. 63-64.

6. Павлова О.Н. Термотолерантные микроорганизмы в донных осадках оз. Байкал, приуроченных к зонам разломов / О. Н. Павлова, **Букин С. В.**, А. Ю. Манаков, В. И. Москвин, А. В. Ломакина, И. В. Морозов, Т. И. Земская // *Материалы Российской конференции «Газовые гидраты в экосистеме Земли, 2014»*. Новосибирск, 2014. – С. 77.

7. Павлова О.Н. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков озера Байкал / О. Н. Павлова, **С. В. Букин**, Г. В. Калмычков, В. Г. Иванов, А. В. Хабуев, Т. В. Погодаева, Т. И. Земская // *Материалы Российской конференции «Газовые гидраты в экосистеме Земли, 2014»*. Новосибирск, 2014. – С. 75.

8. **Букин С. В.** Процессы метангенерации в донных отложениях оз. Байкал, различающихся геохимическими условиями / **С. В. Букин**, О. Н. Павлова, Г. В. Калмычков, В. Г. Иванов, А. Хачикубо, А. В. Хабуев, И. В. Морозов, Т. И. Земская // *Тезисы докладов и стендовых сообщений 6-ой Международной Верещагинской Байкальской*. Иркутск, 2015. – С. 68–69.

9. **Букин С. В.** Метаногенные сообщества донных отложений оз. Байкал, различающихся геохимическими условиями: биологическое разнообразие, субстратная специфичность, активность процессов образования метана / **С. В. Букин**, О. Н. Павлова, Г. В. Калмычков, В. Г. Иванов, А. Хачикубо, А. В. Хабуев, И. В. Морозов, Т. И. Земская // *Материалы 4-го Байкальского Микробиологического симпозиума с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах»*. Иркутск, 2015. – С. 258-259.

10. Pavlova O. N. Thermophilic microorganisms in bottom sediments associated with fault areas of Lake Baikal / O. N. Pavlova, **S. V. Bukin**, A. A. Nikitina, A. V. Lomakina, E. V. Mamaeva, T. I. Zemskaya // *10th International Congress on Extremophiles*. Saint Petersburg, 2014. – P. 336.

11. Pavlova O. N. Microbial communities in bottom sediments of Lake Baikal and their role in the early hydrocarbon generation / O. N. Pavlova, **S. V. Bukin**, G. V. Kalmychkov, V. I. Moskvina, A. Y. Manakov, A. V. Lomakina, T. V. Pogodaeva, O. M. Khlystov, T. I. Zemskaya // *13-th International Conference on Gas in Marine sediments*. Tromso, Norway, 2016. – P. 103.