

УДК 550.47, 579.266

СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЦИКЛА МЕТАНА В ВЕРХНИХ СЛОЯХ ДОННЫХ ОСАДКОВ КАРСКОГО МОРЯ

© 2024 г. А. Л. Брюханов^а, В. С. Севастьянов^{б, *}, М. Д. Кравчишина^с, С. А. Воропаев^б,
Н. В. Душенко^б, А. В. Кураков^а, В. Ю. Федулова^б

^аМосковский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

^бИнститут геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина, 19

^сИнститут океанологии им. П. П. Ширшова РАН, Россия, 117997, Москва, Нахимовский проспект, 36

*e-mail: vsev@geokhi.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 16.02.2024 г.

Принята к публикации 26.02.2024 г.

Изучение состава микробных сообществ цикла метана в верхних слоях донных осадков над крупными залежами углеводородов Южно-Карской нефтегазоносной области Западно-Сибирской провинции показало наличие в этих слоях как аэробных метанотрофных бактерий, так и анаэробных метаногенных архей, а также многочисленных гетеротрофных микроорганизмов различных филогенетических групп. Исследования проводили в Байдарацкой губе и на востоке Пухучанской впадины (южная часть Карского моря). В поверхностных окисленных горизонтах (0–2 см, E_h от 60 до 175 мВ) донных осадков были обнаружены аэробные метанотрофные бактерии семейств *Methyloligellaceae*, *Methylolphagaceae* и *Methylomonaceae*, причём представители семейства *Methyloligellaceae* в довольно значимом количестве (1.52–2.61 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК) встречались на всех исследованных станциях Карского моря. В подповерхностных восстановленных горизонтах (18–20 см, E_h от –63 до –246 мВ) донных осадков среди метаногенных архей преобладали представители порядка *Methanomassiliococcales* (до 3.3 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК). Также были обнаружены метаногенные археи порядков *Methanofastidiosales*, *Methanobacteriales* и *Methanomicrobiales*. Кроме того, на этих восстановленных горизонтах встречались и аэробные/факультативно анаэробные метанотрофные бактерии семейств *Methylcocccaceae* и *Methylomonadaceae*, но относительная численность (выраженная в процентах чтений последовательностей от общего их числа) анаэробных метанотрофных архей была там крайне невысокой. По всей видимости, окисление метана в донных осадках Карского моря, где на большинстве исследованных станций его концентрация резко увеличивалась с глубиной осадка, происходит преимущественно в аэробных условиях поверхностных горизонтов, где относительная численность и филогенетическое разнообразие метанотрофов выше.

Ключевые слова: углерод, метан, метаногены, метанотрофы, морские осадки, Арктика, Карское море

DOI: 10.31857/S0016752524060029, **EDN:** JBDGVE

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы играют чрезвычайно важную роль в биогеохимических циклах углерода и других химических элементов в Мировом океане. Циклы ключевых биогенных элементов в экосистемах арктических морей имеют определённые особенности по сравнению с другими морями. Эти различия заключаются в значительной сезонной изменчивости всех биологических процессов и в их протекании в холодной окружающей среде, часто при отрицательной температуре. Во время ледниковых периодов позднего плейстоцена (Jakobsson et al., 2014) на арктическом шельфе формировался мощный слой многолетнемерзлых пород (ММП) и газогидратных отложений. Деградация ММП в Арктике приводит к естественной эмиссии метана, одного из основных парниковых газов, который

мигрирует через открытые талики на шельфе (Romanovskii et al., 2005). Было выявлено большое количество сейсмоакустических аномалий, свидетельствующих об активной дегазации в южной части Карского моря, начавшейся в результате интенсивного разрушения толщ субаквальных ММП в условиях постгляциальной трансгрессии (Portnov et al., 2013; Semenov et al., 2020). Надо отметить, что ММП покрывают 24 % Земли в северном полушарии и содержат 1700 миллиардов тонн захороненного углерода (Miner et al., 2022).

Юго-западная часть Карского моря, в первую очередь, Байдарацкая губа и Приямальский шельф — это область дегазации осадочных толщ, являющейся результатом поднятия флюидов углеводородных газов (в основном метана) из недр Земли вверх по разрезу осадочной толщи

к поверхности дна, и которые, нередко, высачиваются в водную толщу (Рокос, Тарасов, 2007; Portnov et al., 2013, 2014; Serov et al., 2015; Миронюк и др., 2019; Кохан и др., 2023). Как правило, выраженных струйно-пузырьковых газопроявлений в водной толще не обнаруживают, однако признаки газонасыщенности осадков в Байдарцкой губе и на Приямальском шельфе отмечаются практически повсеместно (Рокос, Тарасов, 2007; Portnov et al., 2013; Serov et al., 2015; Кохан и др., 2023). Тем не менее, биогеохимические процессы, протекающие в юго-западной части Карского моря и обусловленные дегазацией осадочных толщ, до сих пор крайне слабо изучены, а происхождение источников метана остается дискуссионным.

Изучение микробных сообществ в морских донных осадках позволяет понять механизм деградации органического вещества (ОВ) и косвенно оценить эмиссию парниковых газов. Метан является основным конечным газообразным продуктом разложения микроорганизмами ОВ в анаэробных условиях. Процессы, вовлеченные в цикл метана, происходят как в бескислородных восстановленных (метаногенез и анаэробное окисление метана), так и в окисленных (аэробное окисление метана) условиях.

Первые данные по метаногенезу и метанотрофии в донных осадках Карского моря были получены в 1995–1996 гг. на Обь-Енисейском взморье и на северных участках шельфа (Намсараев и др., 1995; Леин и др., 1996). Цитируемые работы и все последующие исследования скоростей микробных процессов фиксировали очень низкую продукцию метана в осадках Карского моря: от 0.02 до 18 нмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ в юго-западной и северной частях моря и до 460 нмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ на обском мелководье (Леин и др., 1996; Саввичев и др., 2018; Воропаев и др., 2023). Метаногенные археи были представлены семействами *Methanobacteriaceae*, *Methanococcaceae* и *Methanosarcinaceae* (филум *Euryarchaeota*), составлявшими в сумме менее 1 % от общей численности архей (Саввичев и др., 2018). Скорость окисления метана, как правило, превышала скорость его образования в донных осадках: от 2.0 до 103 нмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ в юго-западной и северной частях Карского моря и до 780 нмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ в эстуарных осадках р. Оби (Леин и др., 1996; Леин, Иванов, 2009; Саввичев и др., 2018). В донных осадках Карского моря были обнаружены метанотрофы семейства *Methylococcaceae*, однако, не были выявлены анаэробные метанокисляющие археи (ANME), что дало основания авторам предполагать, что процесс окисления метана в изученных осадках осуществлялся бактериями семейства *Methylococcaceae* (Саввичев и др., 2018).

Известно, что в анаэробных условиях может происходить окисление метана синтрофными консорциумами метанотрофных архей и сульфатредуцирующих

бактерий (Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2002; Schreiber et al., 2010; Wegener et al., 2016; Yu et al., 2022), но факторы, влияющие на сопряженность процессов анаэробного окисления метана и сульфатредукции в таких уникальных экосистемах, пока ещё недостаточно изучены. Сульфатредуцирующие бактерии в Карском море были выявлены повсеместно, причем их доля в относительной численности микроорганизмов была примерно одинаковой в поверхностных и подповерхностных горизонтах осадков. Скорость сульфатредукции изменялась от 0.4–4.0 мкмоль $\text{S} \text{ дм}^{-3} \text{ сут}^{-1}$ в морских осадках акватории Карского моря до 17 мкмоль $\text{S} \text{ дм}^{-3} \text{ сут}^{-1}$ в эстуарии р. Обь (Леин и др., 1996; Саввичев и др., 2018).

Для шельфовых (глубины 20–120 м) фоновых районов Карского моря концентрация растворенного CH_4 в донных осадках варьировалась от 2.5 до 20 мкМ в переходных (от окисленных к восстановленным) и подповерхностных восстановленных горизонтах и от 0.01 до 2.0 мкМ — в поверхностных окисленных горизонтах (Леин и др., 2013; Саввичев и др., 2018).

Целью данной работы являлось изучение распределения метана как одного из основных парниковых и углеводородных газов, а также филогенетического состава сообществ микроорганизмов, потенциально участвующих в процессах его образования и окисления, в верхних слоях донных осадков Карского моря, различающихся по окислительно-восстановительному потенциалу (ОВП) — в поверхностных окисленных и в подстилающих их (т.е. ниже переходной зоны ОВП) восстановленных горизонтах. Это способствует накоплению экспериментальных данных для более глубокого понимания процессов биогеохимического цикла метана в арктических морях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В сентябре 2022 г. во время 89-го рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш» был осуществлен отбор образцов донных осадков в юго-западной части Карского моря (Кравчишина и др., 2022). Координаты и глубины станций, на которых осуществляли пробоотбор, показаны в табл. 1.

Колонка станции 7431, отобранная в Байдарцкой губе, и колонки станций 7440, 7441, 7460, отобранные на востоке Пухучанской впадины, относятся к южной Западно-Карской провинции

Таблица 1. Станции отбора образцов донных осадков в Карском море

Станция	Широта, °с.ш.	Долгота, °в.д.	Глубина моря, м
7431	69.7246	65.5349	34
7440	71.9578	67.4340	99
7441	72.3671	65.5353	105
7460	72.5827	67.3780	107



Рис. 1. Картограмма расположения станций отбора образцов донных осадков в Байдарацкой губе и на Прямыльском шельфе Карского моря (см. табл. 1).

(рис. 1) и представляют собой голоценовые осадки. Осадки состояли из практически однородного алевроито-пелитового ила насыщенного темно-серого цвета, перекрытого сверху окисленным коричневым слоем мощностью около 2 см.

Морские осадки отбирали с помощью мультикорера (МК) и геологической трубы большого диаметра (ТБД). Длина колонок осадков, отобранных МК, не превышала 50 см, а отобранных с помощью ТБД, не превышала 6 м. Затем колонки осадков из МК делили на горизонты, из которых стерильными обрезанными пластиковыми шприцами в стерильные пробирки типа Falcon отбирали образцы для изучения филогенетического состава микробных сообществ (преимущественно из поверхностных окисленных горизонтов 0–2 см и подповерхностных восстановленных горизонтов 18–20 см). Также из горизонтов колонок осадков из МК отбирали образцы для извлечения газов и экстракции органического вещества (ОВ). Осадки, отобранные ТБД, использовали для извлечения газов и экстракции ОВ из более глубоких горизонтов осадка.

Для извлечения газов из морских осадков влажные образцы осадков (по 300 мл) помещали в бутылки (0.5 л) с насыщенным раствором NaCl для фиксации и создавали в них гелиевый пузырь объемом 10 мл, в который извлекались находящиеся в осадке газы. Концентрацию газов измеряли при помощи газового хроматографа «КристалЛюкс-4000М» (Йошкар-Ола, Россия) с капиллярными колонками HP-Plot Q (30 м × × 0.53 мм × 40 мкм) и ZB-5

(30 м × 0.53 мм × 5 мкм). Поток газа-носителя гелия марки 6.0 составлял 10 мл/мин, температура термостата 120 °С. Для измерения концентрации CH₄ использовали пламенно-ионизационный детектор, для измерения концентрации CO₂ использовали детектор по теплопроводности. Погрешность измерения для CH₄ составляла 1 %, для CO₂—0.5 %. В качестве стандартных образцов использовали поверочные газовые смеси «Фёссен Эм Ай И», Россия. Концентрации газов определяли на основе градуировочных графиков, пересчитывая на объем соответствующего отобранного осадка. Среднее значение концентраций газов в осадках рассчитывали по трем измерениям.

Осадки высушивали при температуре 50 °С, ретирали в шаровой мельнице, затем в лабораторных условиях осуществляли горячую экстракцию ОВ из осадков в аппарате Сокслета смесью бензола и метанола (9:1 об.) в течение 36 ч, измерение экстрагированного ОВ проводили на аналитических весах (Галимов, Кодина, 1982).

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП или E_h) измеряли в судовой лаборатории непосредственно после отбора осадков с помощью ОВП-метра Milwaukee MW500 PRO (Milwaukee, США). Точность измерения ±5 мВ.

Филогенетический состав микробных сообществ в осадках был изучен с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, содержащих варибельный регион V3–V4, с использованием в качестве ПЦР-матрицы хромосомной ДНК, выделенной из образцов донных осадков. После отбора образцы кратковременно (не более 1–2 сут.) хранили при 4 °С в буферном растворе, содержащем 0.15 М NaCl и 0.1 М Na₂ЭДТА (pH 8.0). Выделение ДНК из образцов донных осадков проводили в лаборатории на борту судна с помощью набора DNeasy Power Soil Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Амплификацию V3–V4 региона гена 16S рРНК осуществляли с использованием праймеров 341F и 806R. Полученные ампликоны очищали от компонентов реакционной смеси и доулавливали к ним посредством реамплификации специальные адаптеры, необходимые для дальнейшего бар-кодирования (Frey et al., 2016). Бар-кодирование проводили с помощью набора Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов, чтение с двух концов) в ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН. Парные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы FLASH (Magoč, Salzberg, 2011). Для определения размера кластеров (оперативных таксономических единиц, ОТЕ) в каждой пробе все исходные объединенные чтения накладывались на репрезентативные последовательности ОТЕ

с минимальной идентичностью 97 % по всей длине с помощью программы Usearch (Edgar, 2010). Таксономическую классификацию полученных ОТЕ проводили по базе последовательностей 16S рРНК RDP database (Wang et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вертикальное распределение концентраций CH_4 и CO_2 на различных горизонтах донных осадков исследованных станций представлено в табл. 2. В осадках Карского моря нами было зафиксировано увеличение концентрации CH_4 и CO_2 с возрастанием глубины осадка, при этом на ряде горизонтов концентрация CO_2 превышала концентрацию CH_4 от 10 до 640 раз (табл. 2). Значения pH донных осадков находились в диапазоне 6.7–8.0.

Таблица 2. Концентрация CH_4 и CO_2 на различных горизонтах в колонках донных осадков Карского моря

Станции	Горизонт, см	CH_4 , мкмоль дм ⁻³	CO_2 , мкмоль дм ⁻³
7431	0–8	0.04	11.89
	18–23	0.73	12.77
	140–145	12.99	16.34
	179–184	25.11	28.75
7440	0–5	0.02	0.52
	15–20	0.04	3.05
	48–52	0.19	4.80
	165–169	4.47	19.30
	558–562	48.79	58.96
7441	0–6	0.28	3.05
	14–18	0.08	3.02
	171–175	0.12	24.73
	260–264	0.23	34.07
7460	0–6	0.04	25.73
	14–18	0.05	13.00
	168–172	0.53	31.39
	467–471	3.17	121.11

Концентрация метана в поверхностных окисленных горизонтах (0–5 см, E_h от 60 до 175 мВ) донных осадков Карского моря составляла 0.02–0.28 мкмоль дм⁻³ и увеличивалась в подповерхностных восстановленных горизонтах (18–20 см, E_h от –63 до –246 мВ) до 0.04–0.73 мкмоль дм⁻³. Полученные в предварительном эксперименте изотопные данные указывали на то, что метан имеет биогенное происхождение.

В осадке колонки станции 7431 содержание ОВ (мг), экстрагированного из осадка (г),

с глубиной уменьшалось примерно в 2 раза (от 0.67 до 0.37 мг г⁻¹). Наибольшее количество экстрагированного ОВ находилось в поверхностных окисленных горизонтах осадков на станциях 7431, 7440 и 7460 (0.67 мг г⁻¹, 0.78 мг г⁻¹ и 1.09 мг г⁻¹ соответственно). Необходимо отметить, что в поверхностных (0–2 см) горизонтах донных осадков на всех исследованных станциях Карского моря доля основных групп аэробных морских гетеротрофных микроорганизмов (*Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota*, *Acidobacteriota* и др.) (Oren, Garrity, 2021), разлагающих ОВ, составляла до 70 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК.

Некультивируемые строго анаэробные метаногенные археи порядка *Methanomassiliicoccales* в восстановленных подповерхностных горизонтах в Карском море были обнаружены в незначительном количестве: 0.43 % и 0.07 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК на станциях 7431 и 7441 соответственно (18–20 см, E_h от –84 до –180 мВ). Однако на горизонте 65 см колонки станции 7440 (где E_h был наиболее низким и достигал –300 мВ) представителей порядка *Methanomassiliicoccales* (семейство *Methanomethylophilaceae*) было гораздо больше — 3.3 % от всех чтений (рис. 2). Надо отметить, что к этому порядку относят ацидофильных и умеренно термофильных архей, обнаруженных в желудочно-кишечном тракте млекопитающих (Xie et al., 2024), причем единственный описанный представитель семейства *Methanomethylophilaceae* восстанавливает метанол и метиламины до метана с использованием водорода в качестве донора электронов (Bogrel et al., 2023).

На станциях 7431, 7440 и 7441 (горизонт 18–20 см) детектировали также некультивируемых метаногенных архей порядка *Methanofastidiosales* (0.11 %, 0.08 % и 0.23 % от всех чтений соответственно). Представителей семейства *Methanosarcinaceae* порядка *Methanosarcinales* обнаружили на горизонте 18–20 см в колонках станций 7431 и 7460 в количестве 0.02 % и 0.3 % от всех чтений соответственно. Некоторые виды из порядка *Methanosarcinales* используют ацетат в качестве субстрата, тогда как другие способны расти на таких метилированных соединениях, как метиламины и метилсульфаты (Kendall, Boone, 2006). На горизонте 18–20 см колонок станций 7441 и 7460 детектировали *Methanocorpusculum* spp. (семейство *Methanocorpusculaceae* порядка *Methanomicrobiales*) — 0.34 % и 0.07 % от всех чтений соответственно. Известно, что эти метаногены восстанавливают CO_2 с использованием водорода или формиата (Zellner et al., 1989). Также в восстановленных горизонтах осадков станции 7460 (горизонт 18–20 см) встречались в незначительном количестве (0.08 % от всех чтений) метаногены рода

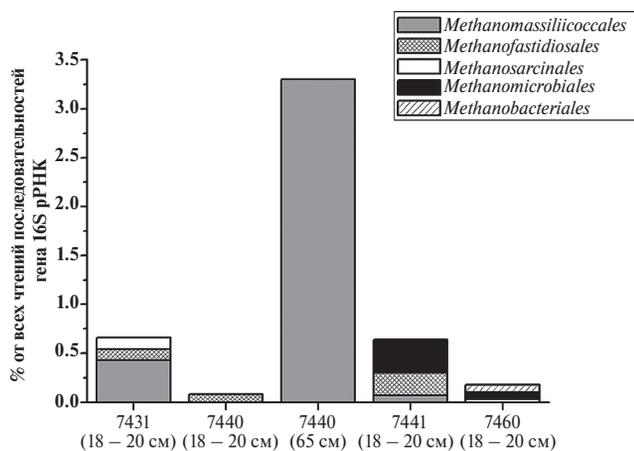


Рис. 2. Распространение метаногенных архей (на уровне порядков) в подповерхностных восстановленных горизонтах донных осадков Карского моря.

Methanobrevibacter (семейство *Methanobacteriaceae* порядка *Methanobacteriales*).

В верхних слоях донных осадков Карского моря нами были обнаружены микроорганизмы, относящиеся к некультивируемым **аэробным метанотрофным бактериям** из семейств *Methyloiligellaceae* (порядок *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria*), *Methylophagaceae* (порядок *Nitrosococcales* класса *Gammaproteobacteria*) и *Methylomonaceae* (порядок *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria*). Так, представители семейства *Methyloiligellaceae* в довольно значимом количестве (1.52–2.61 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК) встречались в поверхностных окисленных горизонтах (0–2 см) на всех исследованных станциях Карского моря (рис. 3).

Относительная численность метанотрофов из семейств *Methylophagaceae* и *Methylomonaceae* в поверхностных окисленных горизонтах равнялась 0.03–0.25 % от всех чтений (детектировали на всех станциях) и 0.03–0.06 % от всех чтений (обнаружены на станциях 7431 и 7440) соответственно. Необходимо отметить, что представители семейства *Methyloiligellaceae* были обнаружены и в подстилающих восстановленных горизонтах 18–20 см во всех колонках (станция 7431 – 0.47 %; станция 7440 – 0.33 %; станция 7441 – 0.58 %; станция 7460 – 0.23 %), и даже на горизонте 65 см колонки станции 7440 – 1.14 % от всех чтений. На горизонте 65 см колонки станции 7440 в количестве 0.02 % детектировали и представителей рода *Methylorubrum* (семейство *Beijerinckiaceae* порядка *Rhizobiales*). Метанотрофные бактерии семейств *Methylococcaceae* и *Methylomonadaceae* также встречались в восстановленных горизонтах 18–20 см (станция 7431 – 0.45 % и станция 7440 – 0.18 % от всех чтений соответственно).

Анаэробное окисление метана в восстановленных горизонтах арктических морских донных

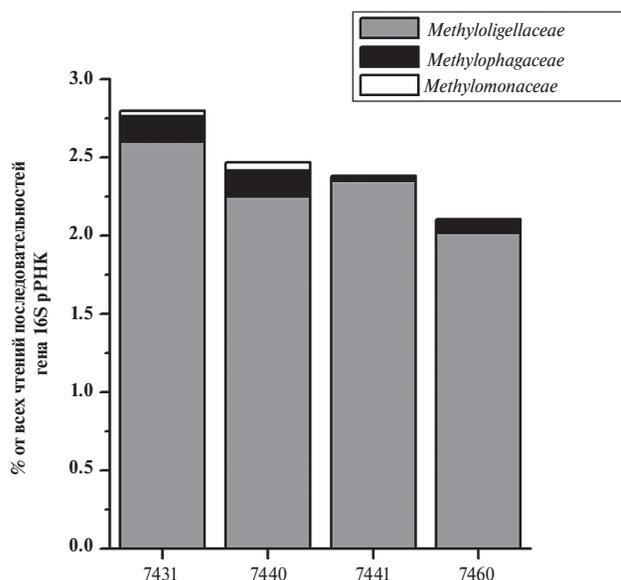


Рис. 3. Распространение метанотрофных бактерий (на уровне семейств) в поверхностных (0–2 см) окисленных горизонтах донных осадков Карского моря.

осадков происходит, по всей видимости, за счёт архей из кластеров ANME-2a-2b и ANME-2c, относящихся к филуму *Halobacterota*, часто в консорциуме с сульфатредуцирующими бактериями из филума *Desulfobacterota* (Begmatov et al., 2021). Однако эти **анаэробные метанотрофные археи**, потенциально способные к окислению метана, были обнаружены на станциях 7431, 7440 и 7460 (подповерхностный восстановленный горизонт 18–20 см) в крайне незначительном количестве (0.03–0.11 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК), и лишь на более глубоком сильно восстановленном горизонте 65 см колонки осадка на станции 7440 их относительная численность немного возростала, составляя 0.34 % от всех чтений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что 80–90 % ОВ, разлагающегося в процессе диагенеза, превращается в газ, в основном в CH_4 и CO_2 (Федоров и др., 2007). О деятельности многочисленных гетеротрофных микроорганизмов свидетельствует наличие большого количества CO_2 в верхних слоях донных осадков. Строго анаэробные метаногенные археи могут использовать различные субстраты для образования метана — CO_2/H_2 (гидрогенотрофный метаногенез), ацетат (ацетокластический метаногенез) и метилированные соединения (метилотрофный метаногенез) (Lang et al., 2015).

Из табл. 2 видно, что наибольшее количество CH_4 зарегистрировано в колонке осадка станции 7431 в Байдарацкой губе, а также в колонках

осадков станций 7440 и 7460 на севере Приамальского шельфа (на восточной периферии Пухучанской впадины). Метан по глубине морского осадка на этих станциях распределен неоднородно. В колонках осадков станций 7431 и 7440 концентрация CH_4 увеличивалась с глубиной на порядки. Наименьшее содержание CH_4 наблюдали в донном осадке на станции 7441. Можно предположить, что на станциях 7431 и 7440 определенный вклад в образование метана в верхних слоях осадка вносят представители порядка *Methanomassiliicoccales*, которые преобладают в подповерхностных восстановленных горизонтах среди метаногенных архей (рис. 2). Необходимо отметить, что в донных осадках Баренцева моря метаногены практически отсутствовали, лишь относительная численность метилотрофных метаногенов порядка *Methanofastidiosales* составляла менее 0.05 % (Begmatov et al., 2021).

На восстановленных горизонтах 18–20 см донных осадков на станциях 7431 и 7440 в незначительном количестве встречались метанотрофные бактерии, относящиеся к семействам *Methylococcaceae* и *Methylomonadaceae* (порядок *Methylococcales* класса *Gamma*proteobacteria). На горизонте 65 см колонки осадка станции 7440 детектировали и представителей рода *Methylorubrum* (семейство *Beijerinckiaceae* порядка *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria*), но лишь в количестве 0.02 % от всех чтений последовательностей гена 16S рНК. Известных представителей семейства *Methylococcaceae* и *Beijerinckiaceae* относят к аэробным метанотрофам, а вот представители семейства *Methylomonadaceae* являются одними из ключевых метанооксиляющих бактерий именно в анаэробных (бескислородных) водах нескольких озёр в северной части Западной Сибири (Cabrol et al., 2020).

Необходимо отметить, что аэробное окисление метана может осуществляться лишь метилотрофами, обладающими метанмонооксигеназой (Chistoserdova, 2015). В частности, показано, что ряд бактерий из семейства *Methyloiligellaceae* способны использовать как метилированные соединения, так и метан в качестве источников углерода и энергии (Takeuchi et al., 2019), а некоторые виды из рода *Methyloceanibacter* (представители которого детектированы нами в окисленных поверхностных горизонтах донных осадков всех исследованных станций в относительно большом количестве, вплоть до 2.44 % этого семейства вообще растут только на метане (Vekeman et al., 2016). Много метанотрофов присутствует и в семействе *Methylomonadaceae* (Martin-Pozas et al., 2022). Представители семейства *Methylococcaceae* также часто встречаются в морских местообитаниях и некоторые из них, судя по анализу геномов на предмет наличия генов метанмонооксигеназы (*pmo*), могут быть метанотрофами (Knief, 2015).

По всей видимости, окисление метана в донных осадках Карского моря происходит преимущественно в аэробных условиях, где относительная численность и филогенетическое разнообразие метанотрофных микроорганизмов выше. В поверхностных (0–2 см) окисленных горизонтах колонки осадков на всех исследованных станциях были также обнаружены бактерии семейства *Hyphomicrobiaceae* (порядок *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria*), чья относительная численность равнялась 0.45–1.19 % от всех чтений, а на станции 7441 достигала 2.65 %. В гораздо меньшем количестве (0.06–0.10 % от всех чтений) их детектировали в подповерхностных (18–20 см) восстановленных горизонтах донных осадков. Известно, что некоторые представители этого семейства могут использовать метанол, предполагается возможность их роста и на метане (Jeong, Kim, 2015). Присутствие аэробных метанотрофов в восстановленных подповерхностных горизонтах осадков можно объяснить наличием в этих районах Карского моря мест разгрузки углеводородных газов, а также физиологией представителей указанных семейств, многие из которых пока являются некультивируемыми бактериями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Невысокая относительная численность архей (0.18–3.6 % от всех чтений последовательностей гена 16S рНК), осуществляющих метаногенез и анаэробное окисление метана, в подстилающих восстановленных горизонтах донных осадков Карского моря косвенно свидетельствует о том, что большая часть органического вещества, достигающего дна, окисляется в поверхностных окисленных горизонтах осадков. Это подтверждается и наличием там многочисленных аэробных гетеротрофных микроорганизмов. Метаногенные архей в верхних восстановленных горизонтах донных осадков Карского моря были представлены порядками *Methanomassiliicoccales* (подавляющее большинство в осадках с наиболее низким E_h), а также *Methanofastidiosales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* и *Methanobacteriales*. По всей видимости, основными источниками метана являются глубокие горизонты восстановленной осадочной толщи, а также деградирующие субаквальные многолетнемерзлые породы и поднимающиеся к поверхности глубинные термогенные газы из крупных залежей углеводородов Южно-Карской нефтегазоносной области Западно-Сибирской нефтегазоносной провинции. Это подтверждается и нашими данными по резкому увеличению концентрации CH_4 с глубиной донного осадка на большинстве исследованных станций. Метан-содержащие флюиды мигрируют к поверхности дна, окисляясь благодаря деятельности преимущественно аэробных и факультативно анаэробных метанотрофных

микроорганизмов. Относительная численность строго анаэробных метанотрофов (кластеры архей ANME-2a-2b и ANME-2c) в верхних слоях донных осадков Карского моря была очень низкой. Однако были выявлены аэробные метанотрофные бактерии из семейств *Methyloligellaceae*, *Methylophagaceae* и *Methylomonaceae*, причём генетический материал представителей семейства *Methyloligellaceae* в довольно значимом количестве (1.52–2.61 % от всех чтений последовательностей гена 16S рРНК) встречался в поверхностных окисленных горизонтах осадков на всех исследованных станциях Карского моря и в меньшем количестве — в подстилающих восстановленных горизонтах (0.23–1.14 % от всех чтений).

Проведенное исследование распределения метана и структуры микробных сообществ его биогеохимического цикла в верхних слоях донных осадков юго-западной части Карского моря может представлять интерес при сравнительном мониторинге воздействия природных и антропогенных факторов на экосистемы морей Российской Арктики, в частности, для оценки роли бентосных микроорганизмов в поглощении парниковых газов.

Авторы благодарят Е. А. Новичкову, А. Г. Матуля, А. А. Ключиткина, А. Н. Новигатского, С. В. Сломнюка, А. В. Булохова (ИО РАН) и А. С. Саввичева (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь при отборе колонок донных осадков, Н. В. Козину (ИО РАН) за литологическое описание осадков, экипаж НИС «Академик Мстислав Келдыш» за помощь в проведении экспедиционных исследований, а также научного редактора В. Ю. Русакова и рецензентов.

Экспедиционные исследования и высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 20-17-00157-П, <https://rscf.ru/project/20-17-00157/>. Выделение газов из донных осадков, измерение концентрации газов и экстрагирование ОВ из донных осадков выполнены в ходе реализации государственного задания ГЕОХИ РАН № FMMZ-2024-0035. Выделение хромосомной ДНК из донных осадков и обработка результатов высокопроизводительного секвенирования выполнены в ходе реализации государственного задания по теме кафедры микробиологии МГУ «Физиология и биохимия фототрофных и хемотрофных микроорганизмов» (ЦИТус № 121032300094-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воропаев С. А., Севастьянов В. С., Душенко Н. В., Брюханов А. Л. (2023) Оценка потока метана со дна Карского моря. *ДАН. Науки о Земле*. **512**(1), 138–142.

Галимов Э. М., Кодина Л. А. (1982) Исследование органического вещества и газов в донных толщах дна Мирового океана. М.: Наука, 228 с.

Галимов Э. М., Кодина Л. А., Степанец О. В., Коробейник Г. С. (2006) Биогеохимия Российской

Арктики. Карское море. Результаты исследований по проекту SIRRO 1995–2003 годы. *Геохимия* **44**(11), 1139–1191.

Кохан А. В., Мороз Е. А., Еременко Е. А., Денисова А. П., Ананьев Р. А., Сухих Е. А., Никифоров С. Л., Соколов С. Ю., Разумовский А. А. (2023) Флюидогенный рельеф районов распространения многолетней мерзлоты на шельфе Печорского и Карского морей. *Вестник Московского университета. Серия 5. Геогр.* **78**(3), 104–124.

Кравчишина М. Д., Ключиткин А. А., Новигатский А. Н., Глуховец Д. И., Шевченко В. П., Белан Б. Д. (2023) 89-й рейс (1-й этап) научно-исследовательского судна «Академик Мстислав Келдыш»: климатический эксперимент во взаимодействии с самолетом-лабораторией Ту-134 «Оптик» в Карском море. *Океанология*. **63**(3), 492–495.

Леин А. Ю., Иванов М. В. (2009) Биогеохимический цикл метана в океане. М.: Наука, 575 с.

Леин А. Ю., Кравчишина М. Д., Политова Н. В., Саввичев А. С., Веслополова Е. Ф., Мицкевич И. Н., Ульянова Н. В., Шевченко В. П., Иванов М. В. (2012) Трансформация взвешенного органического вещества на границе вода–дно в морях Российской Арктики (по изотопным и радиоизотопным данным). *Литология и полезные ископаемые*. **2**, 115–145.

Леин А. Ю., Маккаев П. Н., Саввичев А. С., Кравчишина М. Д., Беляев Н. А., Дара О. М., Поняев М. С., Захарова Е. Е., Розанов А. Г., Иванов М. В., Флинт М. В. (2013) Процессы трансформации взвеси в осадок в Карском море. *Океанология*. **53**(5), 643–679.

Леин А. Ю., Русанов И. И., Саввичев А. С., Пименов Н. В., Миллер Ю. М., Иванов М. В., Павлова Г. Ф. (1996) Биогеохимические процессы циклов углерода и серы в Карском море. *Геохимия*. **34**(11), 1027–1044.

Миронюк С. Г., Колюбакин А. А., Голенок О. А., Росляков А. Г., Терехина Я. Е., Токарев М. Ю. (2019) Грязевулканические структуры (вулканоиды) Карского моря: морфологические особенности и строение // Геология морей и океанов: материалы XXIII Международной научной конференции (Школы) по морской геологии. М.: ИО РАН. Т. 5, 192–196.

Намсараев Б. Б., Русанов И. И., Мицкевич И. Н., Веслополова Е. Ф., Большаков А. М., Егоров А. В. (1995) Бактериальное окисление метана в эстуарии реки Енисей и Карском море. *Океанология*. **35**(1), 88–93.

Рокос С. И., Тарасов Г. А. (2007) Газонасыщенные осадки губ и заливов южной части Карского моря. Бюллетень комиссии по изучению четвертичного периода. **67**, 66–75.

Саввичев А. С., Русанов И. И., Кадников В. В., Белецкий А. В., Равин Н. В., Пименов Н. В. (2018) Состав микробного сообщества и активность микробных процессов цикла метана в поверхностных осадках Ямальского сектора юго-западной части Карского моря. *Микробиология*. **87**(2), 178–190.

- Федоров Ю. А., Тамбиева Н. С., Гарькуша Д. Н., Хо-рошевская В. О. (2007) Метан в водных экосистемах. Ростов на Дону — Москва: ЗАО «Ростиздат», 330 с.
- Begmatov S., Savvichev A. S., Kadnikov V. V., Be-letsky A. V., Rusanov I. I., Klyuvitkin A. A., Novichkova E. A., Mardanov A. V., Pimenov N. V., Ravin N. V. (2021) Microbial communities involved in methane, sulfur, and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea. *Microorganisms*. **9**(11), 2362.
- Boetius A., Ravensschlag K., Schubert C. J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B. B., Witte U., Pfannkuche O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*. **407**(6804), 623–626.
- Borrel G., Fadhlou K., Ben Hania W., Gaci N., Pehau-Arnaudet G., Chaudhary P. P., Vandekerckove P., Ballet N., Alric M., O'Toole P. W., Fardeau M. L., Ollivier B., Brugère J. F. (2023) *Methanomethylophilus alvi* gen. nov., sp. nov., a novel hydrogenotrophic methyl-reducing methanogenic archaea of the order *Methanomassiliicoccales* isolated from the human gut and proposal of the novel family *Methanomethylophilaceae* fam. nov. *Microorganisms*. **11**(11), 2794.
- Cabrol L., Thalasso F., Gandois L., Sepulveda-Jauregui A., Martinez-Cruz K., Teisserenc R., Tananaev N., Tveit A., Svenning M. M., Barret M. (2020) Anaerobic oxidation of methane and associated microbiome in anoxic water of Northwestern Siberian lakes. *Sci. Total Environ.* **736**, 139588.
- Chistoserdova L. (2015). Methylophiles in natural habitats: current insights through metagenomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**(14), 5763–5779.
- Conrad R. (2009) The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**(5), 285–292.
- Edgar R. C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. **26**(19), 2460–2461.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. (2016) Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(3), fiv018.
- Jacobsson M., Andreassen K., Bjarnadottir L. R., Dove D., Dowdeswell J. A., England J. H., Funder S., Hogan K., Ingolfsson O., Jennings A., Larsen N. K., Kircher N., Landvik J. Y., Mayer L., Mikkelsen N., Moller P., Niessen F., Nilson J., O'Regan M., Polyak L., Norgaard-Pedersen N., Stein R. (2014) Arctic Ocean glacial history. *Quat. Sci. Rev.* **92**, 40–67.
- Jeong S.-Y., Kim T. G. (2019) Development of a novel methanotrophic process with the helper microorganism *Hyphomicrobium* sp. NM3. *J. Appl. Microbiol.* **126**(2), 534–544.
- Kendall M. M., Boone D. R. (2006) The order *Methanosarcinales*. In: The Prokaryotes (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. eds.). N.Y.: Springer. Vol. 3, 244–256.
- Knief C. (2015) Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Front. Microbiol.* **6**, 1346.
- Lang K., Schuldes J., Klingl A., Poehlein A., Daniel R., Brunea A. (2015) New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*”. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(4), 1338–1352.
- Magoč T., Salzberg S. L. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. **27**(21), 2957–2963.
- Martin-Pozas T., Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Cañaveras J. C., Benavente D., Jurado V., Saiz-Jimenez C., Janssens I., Seijas N., Sanchez-Moral S. (2022) Role of subterranean microbiota in the carbon cycle and greenhouse gas dynamics. *Sci. Total Environ.* **831**, 154921.
- Miner K. R., Turetsky M. R., Malina E., Bartsch A., Tamminen J., McGuire A. D., Fix A., Sweeney C., Elder C. D., Miller C. E. (2022) Permafrost carbon emissions in a changing Arctic. *Nat. Rev. Earth Environ.* **3**, 55–67.
- Oren A., Garrity G. M. (2021) Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **71**(10), 005056.
- Orphan V. J., House C. H., Hinrichs K. U., McKeegan K. D., DeLong E. F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(11), 7663–7668.
- Portnov A., Mienert J., Serov P. (2014) Modeling the evolution of climate-sensitive Arctic subsea permafrost in regions of extensive gas expulsion at the West Yamal shelf. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* **119**(11), 2082–2094.
- Portnov A., Smith A. J., Mienert J., Cherkasov G., Rekant P., Semenov P., Serov P., Vanshtein B. (2013) Offshore permafrost decay and massive seabed methane escape in water depths >20 m at the South Kara Sea shelf. *Geophys. Res. Lett.* **40**(15), 3962–3967.
- Romanovskii N. N., Hubberten H.-W., Gavrilov A. V., Eliseeva A. A., Tipenko G. S. (2005) Offshore permafrost and gas hydrate stability zone on the shelf of East Siberian Seas. *Geo-Mar. Lett.* **25**, 167–182.
- Schreiber L., Holler T., Knittel K., Meyerdierks A., Amann R. (2010) Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environ. Microbiol.* **12**(8), 2327–2340.
- Semenov P., Portnov A., Krylov A., Egorov A., Vanshtein B. (2020) Geochemical evidence for seabed fluid flow linked to the subsea permafrost outer border in the South Kara Sea. *Geochemistry*. **80**(3), 125509.
- Serov P., Portnov A., Mienert J., Semenov P., Ilatovskaya P. (2015) Methane release from pingo-like features across the South Kara Sea shelf, an area of thawing offshore permafrost. *J. Geophys. Res. Earth Surf.* **120**, 1515–1529.
- Takeuchi M., Ozaki H., Hiraoka S., Kamagata Y., Sakata S., Yoshioka H., Iwasaki W. (2019) Possible cross-feeding pathway of facultative methylophile *Methyloceanibacter*

- caenitepidi* Gela4 on methanotroph *Methylocaldum marinum* S8. *PLOS One*. **14**(3), e0251538.
- Vekeman B., Kerckhof F. M., Cremers G., de Vos P., Vandamme P., Boon N., Op den Camp H. J., Heylen K. (2016) New *Methyloceanibacter* diversity from North Sea sediments includes methanotroph containing solely the soluble methane monooxygenase. *Environ. Microbiol.* **18**(12), 4523–4536.
- Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(16), 5261–5267.
- Wegener G., Krukenberg V., Ruff S. E., Kellermann M. Y., Knittel K. (2016) Metabolic capabilities of microorganisms involved in and associated with the anaerobic oxidation of methane. *Front. Microbiol.* **7**, 46.
- Xie F., Zhao S., Zhan X., Zhou Y., Li Y., Zhu W., Pope P. B., Attwood G. T., Jin W., Mao S. (2024). Unraveling the phylogenomic diversity of *Methanomassiliicoccales* and implications for mitigating ruminant methane emissions. *Genome Biol.* **25**(1), 32.
- Yu H., Speth D. R., Connon S. A., Goudeau D., Malmstrom R. R., Woyke T., Orphan V. J. (2022) Community structure and microbial associations in sediment-free methanotrophic enrichment cultures from a marine methane seep. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**(11), e0210921.
- Zellner G., Stackebrandt E., Messner P., Tindall B. J., Conway de Macario E., Kneifel H., Sleytr U. B., Winter J. (1989) *Methanocorpusculaceae* fam. nov., represented by *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense* spec. nov. and *Methanocorpusculum bavaricum* spec. nov. *Arch. Microbiol.* **151**(5):381–390.

COMPOSITION OF METHANE CYCLE MICROBIAL COMMUNITIES IN THE UPPER LAYERS OF BOTTOM SEDIMENTS OF THE KARA SEA

© 2024 A. L. Bryukhanov^a, V. S. Sevastyanov^b, *, M. D. Kravchishina^c, S. A. Voropaev^b, N. V. Dushenko^b, A. V. Kurakov^a, V. Yu. Fedulova^b

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bVernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cShirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: vsev@geokhi.ru

A study of the distribution of methane cycle microbial communities in the upper layers of bottom sediments above large hydrocarbon reservoirs in the South Kara petroleum region of the West Siberian Province revealed the presence in these layers of both aerobic methanotrophic bacteria and anaerobic methanogenic archaea, as well as numerous heterotrophic microorganisms of various phylogenetic groups. Research was carried out in the Baydaratskaya Bay and in the east of the Pukhuchan Depression (southern part of the Kara Sea). Aerobic methanotrophic bacteria belonged to the families *Methyloligellaceae*, *Methylophagaceae* and *Methylomonaceae* were detected in the surface oxidized layers (0–2 cm, E_h from 60 to 175 mV) of bottom sediments. Moreover, representatives of *Methyloligellaceae* were found in quite significant amount (1.52–2.61 % of all 16S rRNA gene sequence reads) at all studied stations of the Kara Sea. In the subsurface reduced layers (18–20 cm, E_h from –63 to –246 mV), methanogenic archaea were dominated by representatives of the order *Methanomassiliicoccales* (up to 3.3 % of all 16S rRNA gene sequence reads). Methanogenic archaea of the orders *Methanofastidiosales*, *Methanobacteriales* and *Methanomicrobiales* were also discovered. In addition, aerobic/facultative anaerobic methanotrophic bacteria of the families *Methylococcaceae* and *Methylomonadaceae* were found on these reduced layers of the bottom sediments, but the relative abundance (in percentage of sequence reads of their total number) of anaerobic methanotrophic archaea was extremely low there. Apparently, the oxidation of methane in bottom sediments of the Kara Sea, where its concentration at most of the studied stations dramatically increased with sediment depth, occurs predominantly under aerobic conditions in the surface layers, where the relative abundance and phylogenetic diversity of methanotrophs is higher.

Keywords: carbon, methane, methanogens, methanotrophs, marine sediments, Arctic, Kara Sea