

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Пыркин Владислав Олегович

**Разнообразие и распространение углеводород-окисляющих бактерий
в Арктических морях**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель **Бонч-Осмоловская Елизавета Александровна**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты **Щербакова Виктория Артуровна**, доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, лаборатория анаэробных микроорганизмов, главный научный сотрудник
Манучарова Наталия Александровна, доктор биологических наук, профессор, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, кафедра биологии почв, профессор
Павлова Ольга Николаевна, доктор биологических наук, Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория микробиологии углеводов, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «02» июня 2026 года в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

Тел: 8(495)-939-35-46

Электронная почта: nvkostina@mail.ru. С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3854>

Автореферат разослан « » _____ 2026 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.В. Костина

Общая характеристика работы

Актуальность

Углеводороды (УВ) широко распространены в морских экосистемах, куда они могут попадать как в результате естественных выходов нефти, так и вследствие антропогенной деятельности. В России, по оценкам специалистов, на регион западно-арктических морей приходится 85 % начальных суммарных ресурсов УВ. В российской части Баренцева моря открыты газовые и газоконденсатные месторождения, а в Печорском – нефтяные и нефтегазоконденсатные, причем разработка последних уже ведется. Увеличение транспортного потока и потребление биоресурсов в арктическом регионе привело к повышенному антропогенному влиянию на морские экосистемы. УВ нефти и нефтепродуктов, попадающие в водные экосистемы, являются источниками углерода и энергии для УВ-окисляющих бактерий (УВОБ), и при наличии благоприятных условий частично разлагаются. Таким образом, потенциал микробной биодegradации имеет первостепенное значение для морских экосистем, особенно в полярных районах, поскольку низкие температуры и полярные циклы светового дня ограничивают эффективность абиотических процессов удаления загрязняющих веществ.

Цель исследования

Целью настоящей работы являлось исследование разнообразия и распространения УВОБ Баренцева и Печорского морей и их потенциала к биодеструкции УВ путем анализа микробных сообществ как природных образцов (придонной воды и донных отложений), так и накопительных культур, развивавшихся в присутствии различных УВ субстратов.

Поставленные задачи

1. Изучение микробного состава образцов придонной воды и донных отложений исследуемых морей из местообитаний с различной антропогенной нагрузкой, связанной с добычей УВ, для выявления доминирующих таксонов и наличия известных УВОБ.

2. Получение накопительных культур УВОБ и изучение их микробного состава.
3. Выявление ключевых таксонов, способных участвовать в процессах окисления УВ в исследуемых морях.
4. Анализ метагеномов накопительных культур с целью выявления генов окисления УВ.
5. Выделение и идентификация штаммов УВОБ.
6. Оценка способности выделенных штаммов УВОБ к утилизации различных УВ, входящих в состав нефти.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являлись образцы морской воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей, а также выделенные из них накопительные и чистые культуры УВОБ.

Предметом исследования являлись разнообразие, распространение, генетический потенциал и метаболическая активность УВ-окисляющих микроорганизмов исследуемых морей.

Научная новизна

Впервые было проведено широкомасштабное исследование разнообразия прокариот в акватории российской части Баренцева и Печорского морей путем высокопроизводительного секвенирования участка V4 генов 16S рРНК. Впервые определены ключевые таксоны бактерий, вовлечённые в окисление УВ в исследуемых акваториях. Впервые изучен генетический потенциал *Psychromonas* sp., *Falsihalocynthiibacter arcticus*, *Rhodoglobus* sp. и ряда представителей некультивируемых таксонов, определяющий их способность к окислению УВ. Описан новый вид "*Salinibacterium pechorense*". Впервые показана биодеструкция стеранов бактериями из рода *Salinibacterium*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе работы, могут быть использованы для дальнейших исследований в области микробного разнообразия арктических морей, физиологии и генетики УВОБ, а также конструирования микробных биопрепаратов для утилизации нефтяных разливов в северных морях.

Методология диссертационного исследования

В работе были использованы традиционные и современные методы и подходы микробиологии и молекулярной биологии, биоинформатики, статистического анализа и аналитической химии. Накопительные и чистые культуры УВОБ были получены путем культивирования природного материала исследуемых морей на жидких и твердых средах в присутствии широкого спектра УВ. Профили микробных сообществ по гену 16S рРНК были получены с помощью ПЦР и высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Illumina, MiSeq). Также было проведено метагеномное (Illumina) и полногеномное (ONT, MGI) секвенирование накопительных и чистых культур, соответственно. Спектр потребления УВ субстратов анализировался методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Полученные результаты были подвергнуты биоинформатической и статистической обработке.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоял в участии в экспедиции для отбора образцов, в разработке и проведении экспериментальных работ, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке текстов и иллюстраций для публикаций. Все этапы работы выполнялись лично автором или при его непосредственном участии.

Степень достоверности полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, актуальных методов анализа и статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Микробные сообщества исследованных проб из Баренцева и Печорского

- морей не содержат таксонов, ассоциированных с хроническим УВ загрязнением, в концентрациях, превышающих пороговый уровень детекции путем NGS-профилирования по гену 16S рРНК.
2. В накопительных культурах УВОБ Баренцева моря доминируют бактерии родов, ассоциированных с цветением фитопланктона, который может являться источником некоторых УВ в морских экосистемах. В накопительных культурах УВОБ Печорского моря доминируют наиболее эффективные окислители УВ: *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, *Nocardioides*, *Janibacter*.
 3. Ключевыми бактериями, вовлеченными в окисление УВ в исследуемых морях, являются представители родов *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Halioglobus*, *Oleispira*, *Porticoccus*, *Rhodococcus*, *Hyphomonas*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, *Microbacterium*, *Janibacter*, *Nocardioides*, *Arthrobacter*, *Sphingomonadaceae*, *Leeuwenhoekella*, *Novosphingobium*, *Parafrigoribacterium*, *Micrococcus*.
 4. УВОБ Баренцева и Печорского морей, в том числе некультивируемые микроорганизмы, обладают необходимым набором ферментов для окисления широкого спектра УВ.
 5. Описан новый вид "*Salinibacterium pechorense*", способный окислять как алифатические, так и ароматические УВ.
 6. Полученные чистые культуры УВОБ обладают высоким биотехнологическим потенциалом для применения в препаратах и установках для разложения УВ.

Апробация работы

Результаты диссертации были представлены на VII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Комплексные исследования Мирового океана», г. Санкт-Петербург, 2023; на 4-ом Всероссийском микробиологическом конгрессе, г. Томск, 2023; на Всероссийской конференции с международным участием «Микробиомы природных местообитаний», г. Москва, 2024.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли науки. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Объём и структура диссертации

Работа состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы и Приложение. Работа изложена на 157 страницах, содержит 7 таблиц, 42 рисунка, 231 литературный источник (29 на русском и 202 на английском языке) и 3 приложения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д.б.н. Бонч-Осмоловской Е.А. за неоценимую помощь в подготовке работы. За моральную поддержку и помощь в области органической геохимии и молекулярной экологии прокариот автор выражает благодарность к.х.н. Строевой А.Р. Также автор признателен к.б.н. Гавириной Л.А. и Шестакову А.И. за помощь в микробиологической части исследования, к.б.н. Меркелю А.Ю. и к.б.н. Клюкиной А.А. за помощь в освоении молекулярно-биологических и биоинформатических методов. Автор признателен к.б.н. Дгеубадзе П.Ю. за передачу образцов из Печорского моря. Автор благодарит весь коллектив экспедиций TTR-19 и TTR-20 за передачу образцов и возможность участия в научно-исследовательском рейсе в Баренцево море, в особенности геологический отряд TTR-20 и сотрудников геологического факультета к.г.-м.н. Ахманова Г.Г, к.г.-м.н. Полудеткину Е.Н. и Соловьеву М.А. Автор признателен сотрудникам кафедры геохимии горючих ископаемых геологического факультета к.г.-м.н. Видищевой О.И. и к.х.н. Калмыкову А.И. за предоставление образцов сырой нефти и помощь в анализе биодegradации УВ. Автор выражает огромную благодарность сотруднику

химического факультета МГУ к.х.н. Пановой Т.В. за помощь в проведении нанопорового секвенирования, а также кафедре органической химии и химии нефти РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина за предоставление некоторых индивидуальных УВ. Автор благодарит свою семью и всех своих друзей за бесконечную поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обосновывается актуальность темы исследования, а также формулируется цель и задачи исследования.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из 5 глав. В главе 1 представлен обзор УВ нефти. Глава 2 посвящена месторождениям УВ в Арктике. Глава 3 описывает микробные сообщества арктических морей. В 4-ой главе описаны основные аэробные УВОБ. В главе 5 представлены основные механизмы биологического окисления УВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе анализировались образцы воды и донных отложений, отобранные в Баренцевом и Печорском морях. Ключевым критерием выбора данных акваторий являлась различная степень нефтегазовой нагрузки: северная и северо-восточная часть Баренцева моря представляют собой районы с фоновым уровнем флюидоразружки, в то время как Печорское море характеризуется активной добычей УВ.

Пробоотбор. Пробоотбор в Баренцевом море осуществлялся в июле-августе 2020 г. и в сентябре-октябре 2021 г., в ходе рейсов по программе Training-Through-Research (TTR) UNESCO-IOC («Обучение-через-исследование») TTR-19 и TTR-20 НИС «Академик Николай Страхов», организованной МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке Министерства высшего образования и науки РФ. Пробоотбор в Печорском море осуществлялся в августе 2020 г. на ИС «Картеш». В Печорском море все образцы были отобраны в районах нефтяных месторождений (НМ) Долгинское и Приразломное.

Образцы придонной морской воды отбирались батометром Нискина (ИС «Картеш») или из верхней части гравитационной трубы (НИС «Академик Николай Страхов»). Для концентрации клеток микроорганизмов и их последующего анализа морскую воду в среднем объеме 2 л фильтровали через систему стекловолоконного префильтра (Whatman® Grade GF/C (Maidstone, UK), Glass Fiber Filter Membrane Filters, GVS) с размером пор 1,2 мкм и мембранного фильтра Durapore® (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) с размером пор 0,22 мкм. Образцы донных отложений отбирались из верхних слоев 0-5 см под поверхностью дна, с помощью гравитационной трубы (длиной 4 м и весом около 800 кг) со вставленным пластиковым вкладышем (НИС «Академик Николай Страхов»), или дночерпателя (ИС «Картеш»).

Получение накопительных культур УВОБ. Объединенные образцы морской воды и донных отложений вносили в стерильную морскую воду или минеральную среду ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995), содержащую сырую нефть или индивидуальные УВ (алканы – *n*-алканы: *n*-нонан, *n*-ундекан, *n*-октадекан; циклоалкан – циклогексан; арены – фенантрен, бифенил; изопренан –пристан) в качестве единственного источника углерода и энергии. Концентрация УВ составляла от 0,2 до 1,0% (об. /об.).

Инкубирование проводили в орбитальном шейкере при 180 об/мин в течение 7–30 суток при температуре 15°C. Исключение составили образцы воды из Баренцева моря, которые культивировали при 5°C. Контролем служили аналогичные среды, содержащие инокулят, но без добавления углеводов.

После первого этапа проводили не менее двух последовательных пересевов (2% инокулята) в свежую среду того же состава. Анализ структуры микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования участка V4 генов 16S рРНК выполняли после каждого этапа культивирования.

Выделение чистых культур УВОБ. Выделение чистых культур проводили на минеральной среде ONR7a с внесением УВ, с дальнейшим пересевом на Plate Count Agar (PCA), г/л: K₂HPO₄, 1,5; KH₂PO₄, 0,75;

MgSO₄·7H₂O, 1,0; (NH₄)₂SO₄, 4,0; NaCl, 30; гидролизат казеина, 5,0; дрожжевой экстракт, 2,5; D(+)-глюкоза, 1,0; дистиллированная вода; pH 7,0; при температуре 15°C, с последующей идентификацией гена 16S рРНК.

Биохимическая характеристика. Оксидазную активность определяли по Tarrand и Gröschel, 1982. Каталазную активность определяли по Smibert и Kreig, 1994. Образование ацетоина, индола, наличие β-галактозидазы, разложение полисахаридов, рост при различных концентрациях NaCl, pH исследовали на среде PCA. Для оценки утилизации субстратов использовали тест систему The Biolog GEN III MicroPlate (США).

Выделение ДНК. Выделение ДНК из образцов морской воды, донных отложений, накопительных культур производилось с использованием коммерческого набора FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США) согласно инструкции производителя.

NGS-профилирование по гену 16S рРНК. NGS-профилирование микробных сообществ по гену 16S рРНК для каждого образца проводили в двух повторностях. Все этапы анализа сопровождались отрицательным контролем. Библиотеки участка V4 гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq готовили по двухэтапной схеме ПЦР (Gohl et al., 2016). Для получения ампликонов использовали следующую систему праймеров: 515F и Pro-mod-805R (Merkel et al., 2019). Библиотеки секвенировали на MiSeq (Illumina, США). Обработывали нуклеотидные последовательности методом ASV (Amplicon Sequence Variant). ASV-таблица была создана с помощью ПО Dada2 и базы данных SILVA 138. Статистическую обработку данных проводили с помощью веб-сервиса MicrobiomeAnalyst и RStudio. Последовательности фрагментов гена 16S рРНК были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроектов PRJNA980746, PRJNA1005790.

Метагеномное секвенирование. Подготовка «shotgun»-библиотек метагенома и секвенирование были выполнены в ООО «Биоспарк», Москва, Россия, с использованием набора для подготовки библиотеки Nextera XT

(Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя и системой HiSeq 2500 (Illumina, США) с набором реагентов, который может считывать по 100 нуклеотидов с каждого конца. Необработанные прочтения обрабатывали с помощью Trimmomatic. Затем прочтения были собраны MetaSPAdes. Прочтения были сопоставлены со сборкой с использованием программного обеспечения Bowtie2 для расчета покрытия. Биннинг контигов осуществляли с помощью MaxBin 2, MetaBAT 2 и CONCOCT. Дальнейшая агрегация и дерепликация этих трех наборов бинов в отдельные геномы из метагеномов (MAG) выполнялись с помощью DAS Tool. Полноту и контаминацию бинов оценивали с помощью CheckM. Таксономическое положение присваивалось с помощью GTDBtk. Поиск функциональных генов, кодирующих ферменты окисления УВ, проводился с использованием HMMER 3.3.2. В качестве референсной базы данных УВ-окисляющих ферментов применялась CANT-HYD.

Получение полных геномов чистых культур УВОБ. Для получения полных геномов УВОБ использовались методы секвенирования на платформах Nanopore (Oxford Nanopore Technologies) и BGI (MGI Tech). Для преобразования первичных данных использовали программу Guppy basecaller. Сборка генома была выполнена с помощью программы Unicycler v0.5.0. Видовую принадлежность определяли с помощью GTDB. Для уточнения таксономического положения использовали метрики ANI (Average Number Identity), AAI (Average Aminoacid Identity), dDDH, которые были рассчитаны в ruANI, EzAAI. Анализ ортологичных белков проводили в OrthoFinder. Поиск генов, кодирующих ферменты окисления УВ, выполняли с помощью TBLASTn.

Оценка УВ-окисляющей активности. Для оценки активности окисления УВ выделенными штаммами УВОБ был проведён 30-суточный эксперимент. В качестве субстрата использовали 700 мг сырой нефти, которую вносили в 100 мл среды ONR7a. Среда инокулировалась культурами из экспоненциальной фазы до оптической плотности 0,01 (590 нм).

Культивирование осуществляли в стеклянных колбах объёмом 250 мл, в трёх биологических повторах, при 15°C, в орбитальном шейкере (New Brunswick, Германия) при 180 об/мин. В качестве контроля использовали колбы со средой ONR7a без внесения культуры. Степень деструкции УВ определяли с помощью газо-жидкостной хроматографии на газовом хроматографе Agilent 8890, соединённом с масс-селективным детектором 5977В с высокоэффективным источником ионизации Inert plus. Газ-носитель – гелий; расход газа-носителя через колонку – 1 см³/мин, объём вводимой пробы – 1 мм³. Температура испарителя – 290°C, температура интерфейса – 300°C. Регистрация хроматограмм проводилась в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z 20÷600, время регистрации диапазона m/z – 0,2 с (положительно заряженные ионы), температура ионного источника – 230°C, энергия ионизирующих электронов – 70 эВ. Капиллярная колонка 60 м × 0,25 мкм × 0,25 мкм (HP-5ms). Условия анализа: начальная температура 60°C в течение 2 минут, затем нагрев со скоростью 15 °C/мин до 150 °C, далее со скоростью 3°C/мин до 310°C, конечная температура выдерживается 40 минут. Общее время анализа – 102 минуты. В качестве стандарта для калибровки прибора использовался гексахлорбензол. Растворитель – изооктан. Идентификация УВ проводилась по характеристическим ионам: *n*-алканы и изопренаны на масс-фрагменте m/z 71, терпаны – m/z 191, стераны – m/z 217 и 218, арены – m/z 142, 156, 170, 178, 192, 206. Индексы биодеградации УВ рассчитывали по соотношениям $\frac{Pr}{n-C_{17}}$, $\frac{Ph}{n-C_{18}}$, $\frac{MN}{MP}$, где *Pr* – пристан, *Ph* – фитан, *MN* – метилнафталены, *MP* – метилфенантрены.

Количество исследованных образцов. В ходе настоящего исследования был осуществлён отбор и проведено секвенирование 16S рРНК 27 образцов из Баренцева моря и 16 образцов из Печорского моря. Также было получено 125 накопительных культур, 119 из которых были проанализированы по участку V4 гена 16S рРНК, а для 7 проведено метагеномное секвенирование. Было выделено 44 штамма УВОБ, для 29 проведена идентификация по гену 16S

pРНК, для 6 – полногеномное секвенирование; для 7 культур была оценен спектр используемых УВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование природных микробных сообществ воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей

Для анализа таксономической структуры микробных сообществ было проведено профилирование участка V4 генов 16S pРНК. На основании полученных результатов был определен коровый микробиом (КМ) воды и осадков Баренцева и Печорского морей. КМ считается совокупность микроорганизмов, присутствующая в значительной доле (не менее 5%) в образцах определенного типа (Ainsworth et al., 2015; Sweet et al., 2017).

КМ придонной морской воды Баренцева моря (рис. 1а) состоял из 6 доминирующих таксонов, среди которых были неидентифицированные представители семейства *Nitrincolacaceae* и клады Clade Ia, *Candidatus Thioglobus* (SUP05 cluster), морские гетеротрофы родов *Polaribacter* и *Luteolibacter* и литоавтотрофные археи рода *Nitrosopumilus*. КМ донных отложений Баренцева моря (рис. 1б) включал в себя 5 доминирующих групп бактерий: род *Woeseia*, неидентифицированных сульфатредуцирующих бактерий семейства *Desulfobulbaceae* и Sva0081 sediment group, а также представителей некультивируемых порядков NB1j и Sva1033.

КМ придонной морской воды Печорского моря (рис. 1в) состоял из представителей 6 таксонов: неидентифицированных членов семейства *Nitrincolacaceae*, органогетеротрофных бактерий родов *Amylibacter* и *Polaribacter*, а также бактерий некультивируемых групп SAR86, SAR92 и Clade Ia. Коровый микробиом донных отложений Печорского моря состоял из представителей 7 таксонов (рис. 1г): неклассифицированных миксобактерий семейства *Sandaracinaceae*, органогетеротрофных бактерий рода *Woeseia*, метилотрофных бактерий рода *Methyloceanibacter*, неидентифицированных представителей семейства *Desulfobulbaceae* и порядков Sva1033 и BD7-8.

Таким образом, КМ исследуемых морей имели ряд различий. Например, в КМ воды Баренцева моря входили аммоний-окисляющие археи рода *Nitrosopumilus*, *Ca. Thioglobus* (SUP05 cluster) и гетеротрофные бактерии рода *Luteolibacter* (Park et al., 2012; Callbeck et al., 2018, Mori et al., 2019), отсутствующие в коровом микробиоме воды Печорского моря. Эти группы ранее были обнаружены в поверхностных слоях донных отложений Баренцева моря (Begmatov et al., 2021). В КМ донных отложений Баренцева моря, в отличие от аналогичных образцов Печорского моря, присутствовали некультивируемые бактерии филума NB1-j, метаболические функции которых до сих пор неизвестны (Timmers et al., 2016; Zhang et al., 2020). В свою очередь, в КМ придонной воды Печорского моря присутствовали *Amylibacter*, SAR86, SAR92, а в КМ донных отложений – *Sandaracinaceae*, *Methyloceanibacter*, BD7-8, которые отсутствовали в КМ Баренцева моря. Различия состава микробных сообществ исследуемых акваторий, вероятно, определяются природными физико-химическими факторами. Для Печорского моря характерно наличие терригенного органического вещества, а также интенсивное сезонное привнесение пресной воды рекой Печора: уровень распреснения в летние месяцы может достигать максимума в 11% (Ковалёв, 2006; Политова, 2007; Ефремкин и др., 2009).

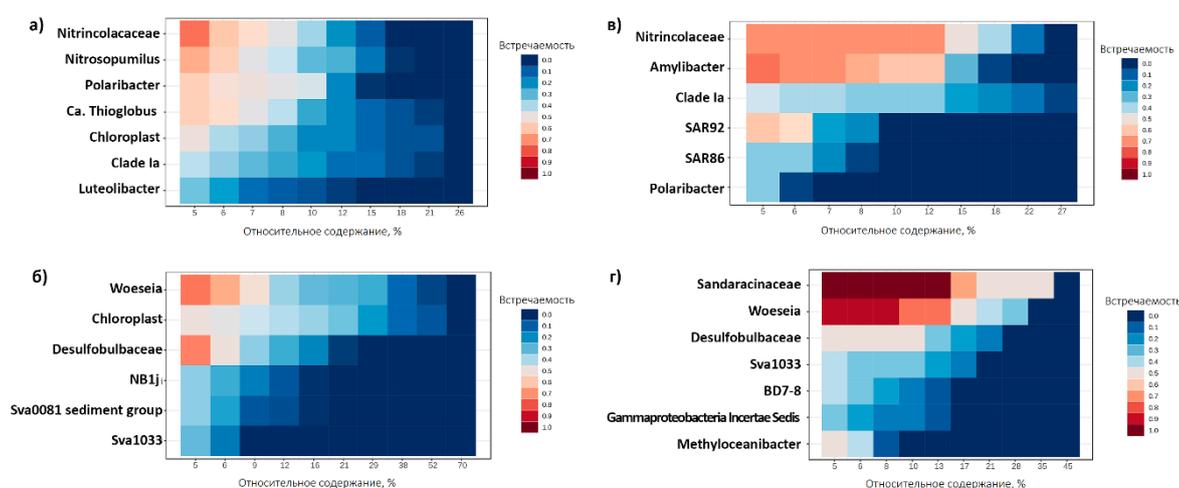


Рисунок 1. Коровые микробиомы образцов придонной воды (а, в) и донных отложений (б, г) Баренцева (а, б) и Печорского (в, г) морей

Следует отметить, что в образцах воды и донных отложений исследуемых морей, несмотря на активную добычу нефти в Печорском море, не обнаружены таксоны бактерий, характерные для акваторий с хроническим УВ загрязнением – облигатные УВОБ и актиномицеты, родственные *Rhodococcus* (Yakimov et al., 2007; Carvalho et al., 2014), что свидетельствует об отсутствии значительного антропогенного воздействия на акватории.

Получение накопительных культур, развивающихся в присутствии УВ и анализ присутствующих в них микробных сообществ

В ходе исследования были получены микробные сообщества, развивающиеся в присутствии нефти и отдельных её алифатических (*n*-нонан, *n*-ундекан, пристан, *n*-октадекан, циклогексан) и ароматических (бифенил, фенантрен) компонентов. Было установлено, что оптимальное время культивирования составляет 30 суток. Различие в температуре инкубации (5 или 15°C) не оказывало принципиального влияния на состав микробных сообществ.

В накопительных культурах из образцов Баренцева моря в присутствии нефти самыми распространенными таксонами в накопительных культурах являлись *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, содержание которых в некоторых образцах достигало 75%, и неклассифицированные члены семейства *Pseudomonadaceae*. В меньшем процентном соотношении (до 50%), но также в большинстве накопительных культур присутствовали бактерии родов *Oleispira* и *Psychrobacter*. Накопительные культуры с *n*-нонаном и *n*-ундеканом характеризовались увеличением доли бактерий родов *Halioglobus* (до 76% и 12%), *Oceanicoccus* (до 33% и 21%), *Limnobacter* (до 55% и 44%). Добавление фенантрена привело к доминированию бактерий родов *Porticoccus* – до 64% в опытных образцах, при отсутствии этих бактерий в контроле (рис. 2). Бактерии вышеназванных родов известны своей способностью к утилизации УВ и ассоциированы с цветением фитопланктона (Teeling et al., 2012; Lyu et al., 2021; Cordone et al., 2022).

При засеве сред с УВ образцами из Печорского моря во всех накопительных культурах доминировали бактерии рода *Psychrobacter*; в присутствии нефти доминирующую позицию занимали также роды *Dietzia* (до 23%), *Hyphomonas* (до 14%), *Janibacter* (23%) и *Altererythrobacter* (12%). В микробных сообществах, полученных при пересеве накопительной культуры с нефти на *n*-нонан и *n*-ундекан появлялись общие доминирующие таксоны, такие как *Rhodococcus* (до 29%) и *Hyphomonas* (до 44%). В присутствии *n*-октадекана *Rhodococcus* вытеснялся представителями рода *Sphingorhabdus*. В среде с пристаном в сообществе появлялись *Nocardioides* (6%). В среде с циклогексаном доминировали бактерии родов *Janibacter* (39%) и неидентифицированные *Bacillaceae* (10%). В случае использования фенантрена отмечалось увеличение до 47% доли неклассифицированных представителей семейства *Sphingomonadaceae* (рис. 2).

Таким образом, в накопительных культурах из Баренцева моря доминировали бактерии родов, ассоциированных с цветением фитопланктона. В то же время, микробные сообщества накопительных культур Печорского моря были представлены известными УВОБ (*Rhodococcus*, *Sphingorhabdus*, *Planococcus*, *Nocardioides*, *Janibacter*, *Acinetobacter*).

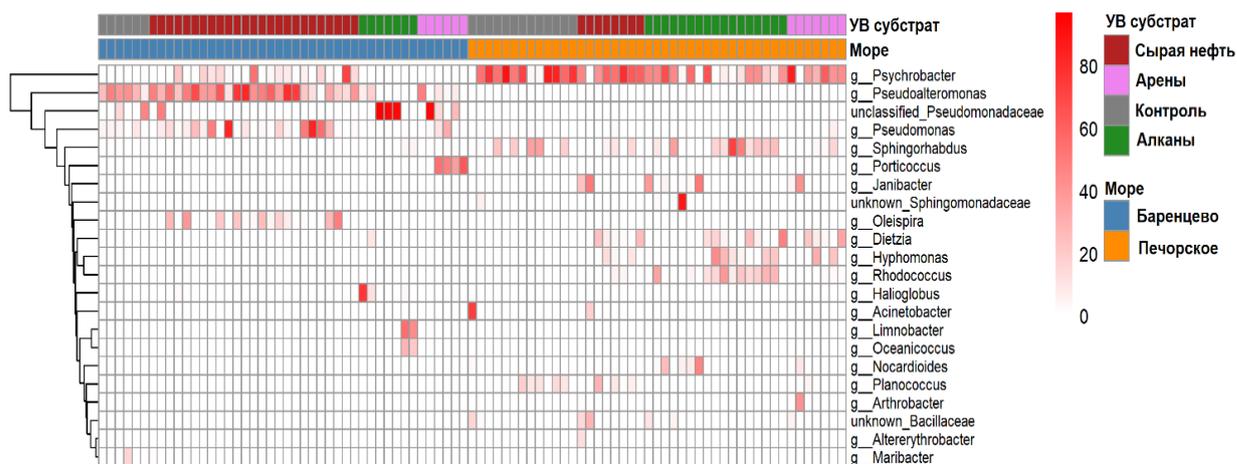


Рисунок 2. Состав доминирующих микроорганизмов в накопительных культурах УВОБ, на основании секвенирования V4 гена 16S рНК

Определение ключевых таксонов бактерий, потенциально окисляющих УВ, в накопительных культурах

В связи с достаточно коротким временем культивирования многие медленно растущие представители УВОБ могли остаться незамеченными. Для выявления ключевых таксонов бактерий, потенциально окисляющих УВ, был проведен дисперсионный однофакторный анализ результатов секвенирования участка V4 гена 16S рРНК накопительных культур. На основании результатов анализа был получен перечень родов бактерий, достоверно увеличивших относительное содержание в присутствии УВ относительно контроля (p -value < 0,05; FDR < 0,01; F-статистика > 3,1). Данный список включал в себя *Rhodococcus*, *Porticoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, неклассифицированные *Pseudomonadaceae*, *Hyphomonas*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, *Halioglobus*, *Oleispira*, *Microbacterium*, *Janibacter*, *Nocardioides*, *Arthrobacter*, неклассифицированные *Sphingomonadaceae*, *Leeuwenhoekiella*, неклассифицированные *Micrococcaceae*, *Parafrigoribacterium*, *Micrococcus*, *Erythrobacter*, *Altererythrobacter*, *Planococcus*, неклассифицированные *Flavobacteriaceae*.

Анализ метагеномов накопительных культур, развивающихся в присутствии УВ

Семь накопительных культур, различающихся по таксономическому составу, УВ субстрату и локации пробоотбора, были выбраны, на основании результатов NGS профилирования V4 региона гена 16S рРНК, для дальнейшего исследования с применением метагеномного секвенирования.

В результате метагеномного анализа накопительных культур было собрано 121 индивидуальный геном бактерий (MAG) с полнотой сборки от 63 до 100% и контаминацией не более 4%. Полученные метагеномы анализировались на предмет наличия ферментов окисления УВ. Были обнаружены ферменты окисления алифатических (AhyA, AlkB, AlmA, AssA, CYP153, LadA, LadB, non_NdoB_type, pVmoB, pVmoC, PrmA, PrmC, sVmoX, sVmoY) и ароматических (AbcA, BssA, CmdA, DmpO, DszC, EbdA, K27540,

MAH, NdoC, NdoB, NmsA, TmoB, TmoE, TomA) УВ. На рисунке 3 представлены данные о наличии гомологов вышеперечисленных ферментов в метагеномах исследуемых накопительных культур.

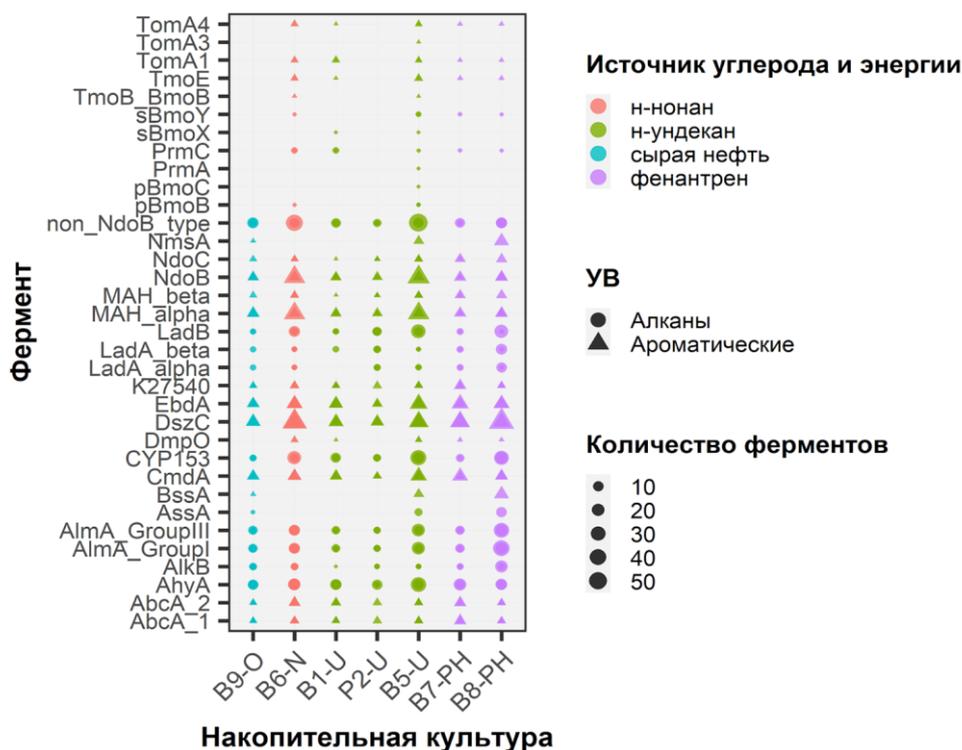


Рисунок 3. Наличие гомологов генов ферментов окисления УВ в метагеномах исследуемых накопительных культурах: B9-O - Баренцево море, сырая нефть; B6-N - Баренцево море, *n*-нонан; B1-U - Баренцево море, *n*-ундекан; P2-U - Печорское море, *n*-ундекан; B5-U - Баренцево море, *n*-ундекан; B7-PH - Баренцево море, фенантрен; B8-PH - Баренцево море, фенантрен

Распределение ферментов окисления УВ в индивидуальных геномах, собранных из метагеномов

Большинство MAG относилось к известным культивируемым бактериям, однако для некоторых микроорганизмов способность к разложению УВ ранее известна не была. Так, в MAG *Psychromonas* sp. были обнаружены AhyA, AlmA, AssA, BssA, CmdA, DszC, EbdA, NmsA, в MAG *Falsihalocynthiibacter arcticus* – AbcA, AhyA, CYP153, CmdA, DszC, EbdA, K27540, LadAB, в MAG *Rhodoglobus* sp. – AlmA, CYP153, DszC, LadAB.

Среди MAG присутствовали геномы микроорганизмов, ранее неизвестных в лабораторных культурах. В геноме JANEGP01 (4–10%, порядок *Pseudomonadales*) идентифицированы ферменты AbcA, AhyA, AlkB, AlmA,

CYP153, CmdA, DszC, EbdA, K27540, LadB, MAH, NdoB, NdoC. MAG IMCC2047 (8%, порядок *Pseudomonadales*) – AbcA, AlmA, K27540, MAH, NdoB. У Rs1 (0,67%, семейство *Nitrospiraceae*) – AbcA, AhyA, CmdA, DszC, EbdA, K27540, MAH, NdoB. Геном JAGPUQ01 (6–27%, семейство *Porticoccaceae*) – AbcA, AhyA, AlkB, AlmA, CYP153, DmpO, DszC, EbdA, K27540, LadA, LadB, MAH, NdoB, NdoC, PrmC, TmoB, VmoB, TmoE, TomA, pVmoB, sVmoY.

Таким образом, метагеномный анализ расширил круг морских микроорганизмов, способных к окислению УВ, за счет бактерий, относящихся как к известным родам, так и к новым таксонам, ранее не имевшим культивируемых представителей.

Анализ полных геномов изолятов,

выделенных из накопительных культур, использующих УВ

Из накопительных культур было выделено 44 и идентифицировано 29 штаммов УВ-использующих микроорганизмов. Для *Pseudoalteromonas prydzensis* Ps15, *Pseudoalteromonas tetraodonis* Ps19, *Janibacter limosus* 15-23, *Salinibacterium* sp. SB, *Rhodococcus cerastii* Pr 8, *Dietzia maris* D было проведено полногеномное секвенирование.

Для всех вышеназванных штаммов, за исключением штамма SB, удалось определить видовую принадлежность с использованием базы данных GTDB. На основании анализа ANI и AAI *Salinibacterium* sp. штамм SB представляет новый вид рода *Salinibacterium* (таблица 1). Род *Salinibacterium* включает в себя 2 вида - *S. amurskyense* и *S. xinjiangense* (Han et al., 2003; Zhang et al., 2008).

Значение dDDH штамма SB с типовым штаммом KMM 3673 типового вида *S. amurskyense* было 27%. Наиболее высокое значение ANI и AAI у SB было с *S. amurskyense* (85,78 и 90,86), что значительно ниже установленного видового порога в 95% (Jain et al., 2018) (таблица 1).

Таблица 1. Значения ANI и AAI, полученные при сравнении генома штамма SB с геномами типовых штаммов ближайших видов

Показатель	<i>S. amurskyense</i> DSM16400	<i>R. aureus</i> JCM 12762	<i>S. xinjiangense</i> CGMCC_1.05381
AAI	90,8	85,4	70,9
ANI	85,7	85,2	73,5

Филогенетический анализ консервативных ортологичных генов, также показал, что ближайшим родственником штамма SB является *S. amurskyense* (рис. 4). В геноме этого организма были обнаружены гены, кодирующие те же ферменты окисления УВ, что и у штамма SB, что говорит о распространении способности окислять УВ у представителей рода *Salinibacterium*.

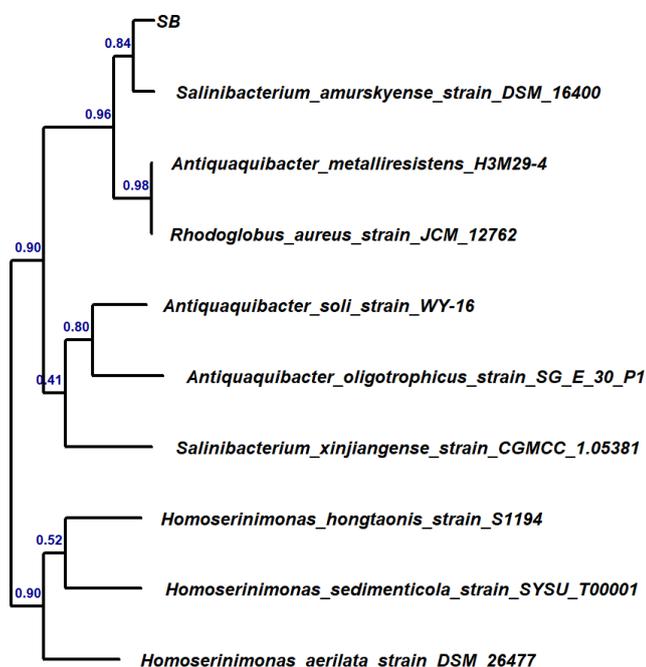


Рисунок 4. Положение штамма SB на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнения 932 консервативных ортологичных групп генов с поддержкой aLRT

Клетки штамма SB представляли собой неподвижные грамположительные палочки, образующие желтые колонии. Штамм SB являлся каталазоположительным, оксидазо- и β-галактозидазоотрицательным, не продуцировал ацетоин и индол. Являлся мезофилом и умеренным галофилом: рост присутствовал при 0-30°C (оптимум 30°C, отсутствует при 37°C в отличие от *S. amurskyense* КММ 3673), при 0-10 % NaCl, при pH 6-8.

Как и *S. amurskyense* КММ 3673, штамм SB способен к утилизации α -D-глюкозы, D-маннозы, D-фруктозы, D-галактозы, L-фукозы, L-рамнозы. В отличие от типового вида, SB способен к утилизации D-арабитола и миоинозитола.

Таким образом, на основании полученных данных штамм SB представляет новый вид рода *Salinibacterium* с предварительным названием "*Salinibacterium pechorensense*".

В геномах исследуемых бактерий были обнаружены гены, кодирующие ферменты окисления алифатических и ароматических УВ. Наибольшее количество генов окисления УВ было обнаружено у *R. cerastii* Pr 8. Таким образом, было установлено, что все исследуемые культуры имеют потенциальную способность к утилизации как алифатических, так и ароматических УВ (рис. 5).

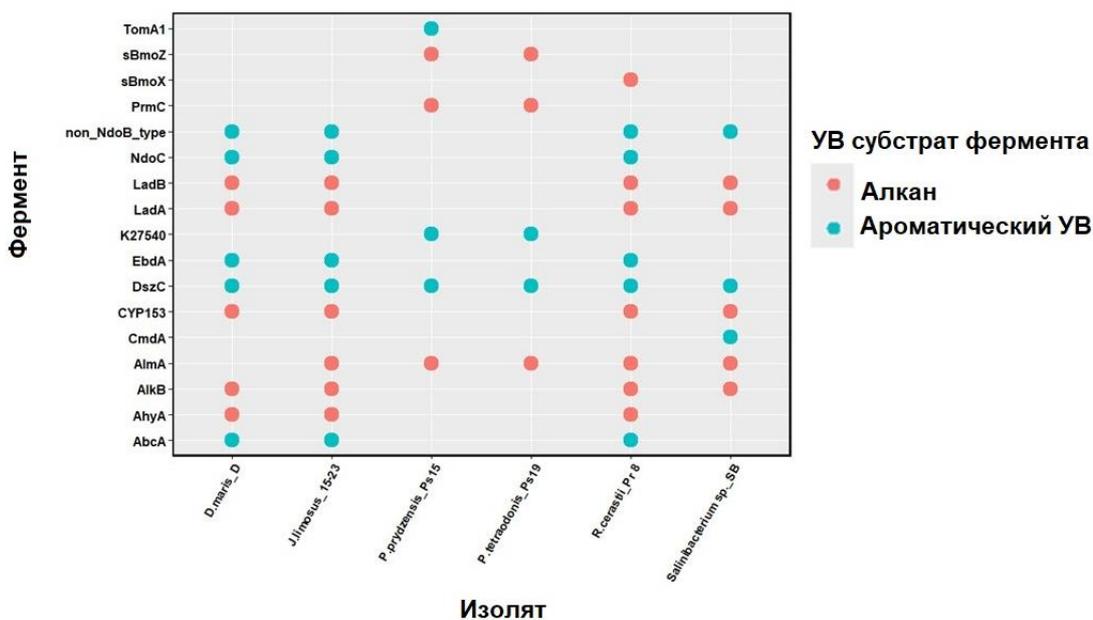


Рисунок 5. Ферменты окисления УВ, обнаруженные в геномах чистых культур УВОБ

Использование УВ выделенными штаммами бактерий

При исследовании процессов биodeградации УВ чистыми культурами бактерий была проведена оценка использования *n*- и *изо*-алканов. Наиболее интенсивное исчезновение *n*-алканов и увеличение доли *изо*-алканов было отмечено для *R. cerastii* Pr8 и "*S. pechorensense*" SB. В случае инкубации штамма

SB на среде с сырой нефтью была отмечена убыль 48% *n*-алканов, таблица 2. Штамм SB утилизировал УВ с длиной цепи C₁₀-C₂₈. В то же время штамм Pr8 окислил лишь 30% от всех линейных УВ, преимущественно среднецепочечные C₁₀-C₁₈.

Для мониторинга разложения сырой нефти в исследовании использовались соотношения *n*-алканов к пристану и фитану. В ряду Ps15 < Ps19 < D < Pr8 < SB увеличивалась интенсивность биодegradации (таблица 2).

Таким образом, наибольшую активность в деструкции всех исследуемых классов УВ нефти (кроме пентациклических – гопанов) показал штамм SB, превзойдя по этому показателю *R. cerastii* Pr 8. Эти результаты говорят о значительном биотехнологическом потенциале представителей рода *Salinibacterium*.

Таблица 2. Основные показатели биодegradации УВ исследуемыми культурами

Штамм	Биодegradация <i>n</i> -алканов, %	Индексы биодegradации алканов, Pr/ <i>n</i> -C17 / Ph/ <i>n</i> -C18	Индекс биодegradации метилнафталинов
Контроль	0	1 / 0	0,31
<i>P. prydzensis</i> Ps15	16	1 / 1	0,4
<i>P. tetraodonis</i> Ps19	13	1 / 1	0,36
<i>J. limosus</i> 15-23	1	1 / 0	0,04
" <i>S. pechorensis</i> " штамм SB	48	16 / 32	0,1
<i>R. cerastii</i> Pr 8	30	2 / 1	0,4
<i>D. maris</i> D	5	1 / 1	0,3

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ таксономического разнообразия микробных сообществ исследуемых морей показал, что составы КМ имеют некоторое сходство, что достаточно логично, так как Печорское море, ввиду географического положения, многие исследователи выделяют как юго-восточную часть акватории Баренцева моря (Агарков, Матвишин, 2019). В микробных сообществах исследуемых морей большую долю составляют как аэробные и/или аэротолерантные гетеротрофные бактерии, так и сульфатредуцирующие представители разных таксономических групп. Исследования бентосно-

пелагических связей в Баренцевом море показывают, что основными путями переработки органического вещества в южной части являются аэробное дыхание и сульфатредукция (Freitas et al., 2020). Несмотря на активную добычу УВ в Печорском море, нами не было обнаружено таксонов индикаторов нефтяных загрязнений.

Инкубация образцов в присутствии УВ вызывала активный рост бактерий, известных своей УВ-окисляющей активностью. При использовании в качестве инокулята образцов из Баренцева моря наблюдалось доминирование УВОБ, ассоциированных с цветением фитопланктона (Teeling et al., 2012; Lyu et al., 2021; Cordone et al., 2022). Фитопланктон может являться источником УВ в мировом океане, запуская так называемый краткосрочный цикл УВ (Lea-Smith et al., 2015). В 2020 и 2021 гг. основной вклад в цветение фитопланктона в Баренцевом море вносили микрофитопланктон, *Thalassiosira*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Rhizosolenia hebetata* (до 70% от всего хлорофилла (*chl*) "a" на севере Баренцева моря)(Kudryavtseva et al., 2023). Ранее исследователи сообщали о продукции УВ *Rhizosolenia hebetata* (изопреноиды состава C₂₅) (Yi et al., 2017).

Акватория Баренцева моря характеризуется отсутствием разрабатываемых НМ, но в Печорском море ситуация обратная. Микробные сообщества накопительных культур Печорского моря характеризуются присутствием известных родов бактерий, являющихся окислителями УВ: *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Hyphomonas*, *Sphingorhabdus*, *Nocardioides*, *Janibacter* (Yamazoe et al., 2004; Procópio et al., 2013; Im Jeong et al., 2016; Wang et al., 2016; Cappelletti et al., 2019, 2020; Ma et al., 2023)

Анализ метагеномов накопительных культур позволил определить генетический потенциал микробных сообществ, формирующихся под воздействием УВ субстратов. По литературным данным об обнаруженных некультивируемых представителях известно, что представители IMCC2047 способны к бактериальному фотосинтезу, однако о генах, ответственных за окисление УВ, ранее не сообщалось (Kang et al., 2017). Бактерии из линии Rs1

описываются в качестве симбионтов *Osedax* (Goffredi et al., 2014); о использовании ими УВ не известно. В то же время в геноме JAGPUQ01 ранее были обнаружены *AlkB*, *CYP153*, и диоксигеназы ПАУ (Murphy et al., 2021).

Выделенные в чистую культуру бактерии также оказались способными утилизировать разнообразные классы УВ, что подтверждается анализом информации, содержащейся в их геномах. Присутствие гена *alkB* у бактерий родов *Salinibacterium* обнаружено нами впервые. В работах, описывающих новые виды *Salinibacterium*, не акцентируется внимание на способность к утилизации УВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ образцов воды и осадков Баренцева и Печорского морей не выявил таксонов бактерий, характерных для мест с хроническим загрязнением нефти, несмотря на активную добычу нефти в Печорском море. Накопительные культуры Баренцева моря, использующие УВ, характеризовались доминированием бактерий родов ассоциированных с микро- и макроводорослями которые разлагают их метаболиты. В то же время в накопительных культурах из образцов Печорского моря, где ведется разработка нефтяных месторождений, доминировали типичные деструкторы УВ, которые отличались быстрым ростом и широким спектром используемых УВ.

Микробные сообщества накопительных культур обладали генетическим потенциалом для использования широкого спектра УВ. Ферменты окисления УВ выявлены у представителей ранее некультивируемых групп, а также у таксонов, для которых подобная активность ранее не была описана. Штамм SB рода *Salinibacterium* представляет собой новый вид. Экспериментально подтверждена способность накопительных и чистых культур к утилизации УВ. Модельные эксперименты с сырой нефтью продемонстрировали избирательную деградацию различных классов УВ: *n*-алканы эффективно потреблялись представителями родов *Salinibacterium*, *Rhodococcus* и *Dietzia*, циклоалканы – *Salinibacterium*, а ПАУ – штаммами *Janibacter*, *Salinibacterium*, *Dietzia* и *Pseudoalteromonas*.

ВЫВОДЫ

1. В образцах воды и донных отложений исследуемых морей не обнаружены таксоны бактерий, характерные для акваторий с хроническим загрязнением УВ, что свидетельствует об отсутствии значительного антропогенного воздействия на акватории.
2. В накопительных культурах Баренцева моря, развивающихся в присутствии УВ, доминировали бактерии, ассоциированные с цветением фитопланктона, тогда как в накопительных культурах Печорского моря преобладали известные УВОБ, что коррелирует с разработкой нефтяных месторождений в регионе.
3. У представителей родов *Psychromonas*, *Rhodoglobus* и *Falsihalocynthiibacter* впервые обнаружены гены окисления УВ, что расширяет представления о таксономическом разнообразии УВОБ.
4. Наличие в геномах представителей некультивируемых таксонов групп JAGPUQ01, JANEGP01, Rs1, IMCC2047, относящихся к семействам *Porticoccaceae*, *Nitrincolaceae* и порядку *Pseudomonadales*, генов окисления УВ указывает на их потенциальную роль в деградации УВ в арктических морях и перспективность выделения их представителей в чистую культуру.
5. Описан новый вид "*Salinibacterium pechorense*", способный к эффективному окислению алканов, стеранов, аренов.
6. Штаммы бактерий, выделенные из Баренцева и Печорского морей, обладают комплексом ферментов, обеспечивающих деградацию как алифатических, так и ароматических УВ, что подтверждает их биотехнологический потенциал для применения в биоремедиации нефтезагрязненных сред.

**Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных для защиты
в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова
по специальности и отрасли наук:**

1. Stroeveva A.R., Klyukina A.A., Vidishcheva O.N., Poludetkina E.N., Solovyeva M.A., Pyrkin V.O., Gavirova L.A., Birkeland N.-K., Akhmanov G.G., Bonch-Osmolovskaya E.A., Merkel A.Yu. Structure of benthic microbial communities in the Northeastern part of the Barents Sea // *Microorganisms*. — 2024. — Vol. 12, № 2. — P. 387. EDN: OWGRPQ (Импакт фактор 4.2 (JIF)). Вклад автора в печатных листах: (1,86/0,56). Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах
2. Пыркин В.О., Гавирова Л.А., Строева А.Р., Меркель А.Ю., Видищева О.Н., Калмыков А.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Углеродородокисляющие бактерии донных экотопов Баренцева и Печорского морей // *Микробиология*. — 2024. — Т.93, № 3. — С. 330–335. EDN: SKUSMH (Импакт-фактор 1,034 (РИНЦ)) [Pyrkin V.O., Gavirova L.A., Stroeveva A.R., Merkel A.Yu., Vidishcheva O.N., Kalmykov A.G., Bonch-Osmolovskaya E.A. Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria of the Bottom Ecotopes of the Barents and Pechora Seas // *Microbiology*. — 2024. — Vol. 93. № 3. — pp. 344–348. EDN: UWSPTM (Импакт-фактор 1.3 (JIF))] (0,54/0,43)
3. Pyrkin V.O., Gavirova L.A., Stroeveva A.R., Dgebuadze P.Yu., Shestakov A.I., Klyukina A.A. Merkel A.Yu., Bonch-Osmolovskaya E.A. Composition of Microbial Communities in the Pechora Sea Bottom Sediments at the Sites of Developed Oil Deposits // *Microbiology*. — 2025. — Vol. 94, № 5. — pp. 676–683. EDN: MRZFOX (Импакт-фактор 1.3 (JIF)) (0,76/0,61)