

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

*на правах рукописи*

Пыркин Владислав Олегович

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

1.5.11. Микробиология

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,

член-корреспондент РАН,

Бонч-Осмоловская Елизавета Александровна

Москва – 2026

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Нефть.....	13
1.1.1 Углеводороды нефти .....	13
1.1.2 Фракционный состав нефти.....	14
1.1.3 Зоны разгрузки флюидов УВ.....	15
1.2 Месторождения УВ в Арктике .....	15
1.2.1 Северные моря.....	15
1.2.2 Баренцево и Печорское моря .....	16
1.3 Микроорганизмы Арктических морей .....	18
1.4 УВ-окисляющие микроорганизмы.....	19
1.4.1 Разнообразие УВОБ в морских экосистемах .....	19
1.4.2 Сообщества нефтеокисляющих микроорганизмов .....	22
1.5 Окисление УВ.....	22
1.5.1 Геохимические аспекты окисления УВ нефти микроорганизмами .....	22
1.5.2. Факторы, влияющие на биodeградацию нефти .....	25
1.5.3 Биологическое окисление компонентов нефти в аэробных условиях .....	25
1.5.3.1 Биологическое окисление <i>n</i> -алканов .....	25
1.5.3.2 Биологическое окисление циклических алканов .....	28
1.5.3.3 Биологическое окисление ароматических УВ.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1 Объекты исследования .....	32
2.1.1 Пробоотбор .....	32
2.2. Получение накопительных культур УВОБ .....	34
2.3 Получение чистых культур УВОБ .....	36
2.3.1 Выделение чистых культур УВОБ.....	36
2.3.2 Молекулярная идентификация чистых культур УВОБ .....	36
2.3.3 Биохимическая характеристика чистых культур УВОБ.....	36

2.3.4	Микроскопия чистых культур УВОБ .....	37
2.4	Профилирование микробных сообществ по гену 16S рРНК .....	38
2.4.1	Выделение ДНК .....	38
2.4.2	NGS-профилирование по гену 16S рРНК.....	38
2.4.3	Биоинформатический и статистический анализ данных профилирования микробных сообществ по гену 16S рРНК .....	39
2.5	Метагеномное секвенирование микробных сообществ накопительных культур .....	39
2.5.1	Метагеномное секвенирование .....	39
2.5.2	Биоинформатический анализ данных метагеномного секвенирования .....	39
2.5.3	Поиск генов окисления УВ в геномах собранных из метагеномов .....	40
2.6	Получение полных геномов чистых культур УВОБ.....	40
2.6.1	Биоинформатический анализ полных геномов УВОБ.....	41
2.7	Оценка УВ-окисляющей активности.....	42
2.7.1	Подготовка проб для гравиметрического и хроматографического анализа.....	42
2.7.2	Оценка биодеструкции УВ .....	42
2.8	Количество исследованных образцов.....	43
Глава 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ .....	44
3.1	Характеристика исследованных образцов воды и донных отложений .....	44
3.2	Исследование природных микробных сообществ воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей <sup>1</sup> .....	44
3.2.1	Микробные сообщества придонной воды Баренцева моря.....	45
3.2.2	Микробные сообщества донных отложений Баренцева моря ....	46
3.2.3	Микробные сообщества придонной воды Печорского моря .....	46
3.2.4	Микробные сообщества донных отложений Печорского моря..	49
3.2.5	Сравнение коровых микробиомов придонной воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей .....	49

3.3	Получение накопительных культур, развивающихся в присутствии УВ и анализ присутствующих в них микробных сообществ .....	53
3.3.1.	Анализ микробных сообществ накопительных культур УВ-окисляющих микроорганизмов, полученных из придонной воды Баренцева моря.....	53
3.3.2.	Анализ микробных сообществ накопительных культур УВОБ придонной морской воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей .....	55
3.3.2.1	Микробные сообщества накопительных культур УВОБ придонной морской воды и донных отложений Баренцева моря....	56
3.3.2.2	Микробные сообщества накопительных культур УВОБ из проб придонной воды и донных отложений, отобранных в районе НМ Печорского моря.....	58
3.3.2.2.1	Анализ микробных сообществ УВОБ из донных отложений НМ Печорского моря в накопительных культурах с использованием расширенного спектра УВ .....	61
3.3.3	Определение ключевых таксонов бактерий, потенциально окисляющих УВ, в накопительных культурах .....	64
3.3.4	Представленность ключевых УВ-окисляющих таксонов в придонной воде и донных отложениях Баренцева и Печорского морей .....	67
3.4	Анализ метагеномов накопительных культур, развивающихся в присутствии УВ.....	67
3.4.1	Распределение ферментов окисления УВ в MAG, собранных из метагеномов накопительных культур.....	71
3.4.2	Распределение ферментов окисления УВ в MAG .....	72
3.5	Получение чистых культур УВОБ .....	73
3.5.1	Таксономическое положение выделенных штаммов микроорганизмов .....	73
3.5.2.	Морфологическая характеристика, анализ полных геномов и определение таксономического положения штаммов УВОБ .....	77
3.5.2.1	Характеристика таксономического положения <i>Salinibacterium</i> sp. штамм SB.....	78

3.5.3 Анализ генов окисления УВ в полных геномах чистых культур ...	81
3.5.4 Анализ утилизации УВ выделенными штаммами бактерий.....	83
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	105
ВЫВОДЫ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	108
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	139

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность работы**

Углеводороды (УВ) широко распространены в морских экосистемах, куда они могут попадать как в результате естественных выходов нефти, так и вследствие антропогенной деятельности (Quigley et al., 1999; NPC, 2015). По разным оценкам, среди северных морей Печорское море, наряду с Карским, лидирует по запасу нефти (Egorov et al., 2021).

Одной из мировых тенденций последних лет является смещение фокуса в области добычи нефти и газа на акватории северных морей, где, по данным геологоразведки, находится большая часть мировых запасов нефти и газа (Патин, 2017). В России, по оценкам специалистов, на регион западно-арктических морей приходится 85 % начальных суммарных ресурсов УВ (Селин и др., 2008). На российском арктическом шельфе открыто порядка 20 нефтегазоносных провинций. Акватории Баренцева, Печорского и Карского морей считаются самыми ресурсоёмкими, в их пределах сосредоточено около 62,7 % суммарных геологических ресурсов акватории РФ (Еремин и др., 2010). Доля неразведанной нефти в норвежской части Баренцева моря составляет 65 % от всех запасов неразведанной нефти на Норвежском шельфе (Directorate, 2017). Тем самым Баренцево море притягивает нефтяную промышленность как Норвегии, так и России (Gerdes, 2005).

Одной из приоритетных задач государственной программы изучения недр и воспроизводства минерального сырья России является разработка новых месторождений в регионе Баренцева моря (Суслова, 2014). В Российской части Баренцева моря открыты газовые и газоконденсатные месторождения, а в Печорском – нефтяные и нефтегазоконденсатные (Федоровский и др., 2005). Морская ледостойкая стационарная платформа МСЛП Приразломная в одноименном месторождении – это уникальная

платформа, на которой ведётся полный цикл работ по нефтедобыче и транспортировке УВ (Кузьмин, Варакин, 2020).

Увеличение транспортного потока и потребление биоресурсов в Арктическом регионе привело к повышенному антропогенному влиянию на морские экосистемы (Кучейко и др., 2020). Несмотря на то, что сейчас проблема нефтяного загрязнения стоит очень остро, важно не забывать, что нефть была частью морской среды на протяжении миллионов лет, и микроорганизмы, использующие её в качестве источника углерода, встречаются повсеместно, от тропиков до полярных широт (Rizzo et al 2019). Стоит отметить, что источником УВ в морских системах, хотя и в меньшей мере, могут выступать скопления фитопланктона, что образует так называемый краткосрочный цикл УВ (the short-term hydrocarbon cycle). Бактерии, ассоциированные с цветением фитопланктона, также способны ассимилировать УВ (Lea-Smith et al., 2015).

В настоящий момент известно около 320 родов углеводородокисляющих бактерий (УВОБ; Diaz, 2004). Нефть и нефтепродукты, попадая в морские экосистемы, выступают в качестве источников углерода и энергии для УВОБ, приводя к увеличению их численности (Федоренко, 2016). В первую очередь компоненты нефти потребляются аэробными УВОБ (Xu et al., 2018). Таким образом, потенциал микробной биодegradации имеет первостепенное значение, особенно в полярных районах, поскольку низкие температуры и циклы светового дня ограничивают эффективность абиотических процессов деструкции УВ (Das, Chandran, 2011).

**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.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **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 участков V4 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**

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 и методы исследования**

В работе были использованы классические и современные методы и подходы микробиологии, 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 хроматомасс-спектрометрии. Полученные результаты подвергались биоинформатической и статистической обработке.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоял в участии в экспедиции для отбора образцов, в разработке, планировании и проведении экспериментальных работ, обработке, визуализации 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 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 лабораторных культурах УВОБ Баренцева моря доминируют бактерии родов, ассоциированных с цветением фитопланктона, который может являться источником некоторых УВ в морских экосистемах. В лабораторных 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*, *Leeuwenhoekiella*, *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 журналах, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук. 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.

### **Место проведения работы**

Работа проводилась на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в период с 2019 по 2023 годы.

## 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 биологии 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 ТТР-19 и ТТР-20 за передачу образцов и возможность участия в научно-исследовательском рейсе в Баренцево море, в особенности геологический отряд ТТР-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 к.х.н. Пановой Т.В. за помощь в проведении нанопорового секвенирования. Автор благодарит коллектив общефакультетской лаборатории электронной микроскопии за помощь в проведении сеансов сканирующей микроскопии чистых культур, а также кафедру 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.

# Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Нефть

### 1.1.1 Углеводороды нефти

Нефть – это сложная смесь УВ с различными сернистыми, азотистыми и кислородными соединениями. УВ нефти можно разделить на следующие классы соединений (Алёшин, 1986; Alloway, Ayres, 1993; Гордадзе, 2015):

- Алканы  $C_nH_{2n+2}$ . Содержатся в нефтях в виде прямых цепей, так и в форме изомеров. В них выделяют также газообразный метан и его гомологи. Линейные алканы легко поддаются биологическому разложению. Содержание данного класса в нефтях может составлять от 20 до 60%.

- Разветвлённые алканы и изопренаны. Самые известные изопреноидные алканы – пристан (2,6,10,14-тетраметилпентадекан) и фитан (2,6,10,14-тетраметилгексадекан), за счёт своей устойчивости к биологическому окислению применяются в качестве маркерных соединений (Powell, 1988). Общее содержание разветвленных УВ в нефти составляет 0,2–3,0 %.

- Нафтеновые УВ – циклические соединения с общей формулой  $C_nH_{2n}$ . Данный класс соединений входит в состав всех нефтяных фракций. Более устойчивы к биохимическому разложению, чем алканы. Содержание нафтеновых УВ в нефти – 30–60%.

- Ароматические УВ (арены) – непредельные циклические соединения ряда бензола с общей формулой  $C_nH_{2n-m}$ , где  $n - 6$ ,  $m$  – чётное число. Арены – наиболее водорастворимые и токсичные компоненты нефти. Могут быть представлены в виде бициклических (нафталины) и полициклических (ПАУ) соединений. Общее содержание ароматических УВ в нефти составляет 10–15 %.

- Гетероатомные соединения (смолы, асфальтены). Смолы – густые вязкие жидкости, легкорастворимые в органических растворителях. Смолы имеют полициклическое строение и содержат в своей структуре атомы серы и кислорода. Асфальтены представляют собой вещество, по составу сходное со смолами, но с большей молекулярной массой.

- Алкены (олефины)  $C_nH_{2n}$  – непредельные нециклические УВ. При нормальных условиях  $C_3$  и  $C_4$  – газы,  $C_5$ – $C_{18}$  – жидкости, высшие олефины – твердые вещества. Эти соединения почти не присутствуют в сырой нефти, но являются основным продуктом ее крекинга.

На основе данных анализа образцов нефти из различных месторождений было установлено, что сырая нефть на 20-60% состоит из алифатических УВ, на 15-35% из ПАУ, на 20-25% из смол и на 2-5% - из асфальтенов и других соединений (Гордадзе, 2015).

### 1.1.2 Фракционный состав нефти

Фракцией называется группа УВ, отличающихся друг от друга пределами выкипания (Бойко, 2007). К нефтепродуктам обычно относят следующие фракции: бензины, содержащие от  $C_5H_{12}$  до  $C_{10}H_{22}$ , в том числе ПАУ, с температурой кипения до  $180^\circ C$ ; керосины ( $C_9$ – $C_{16}$ ,  $180$ – $220^\circ C$ ); дизельные топлива ( $C_{14}$ – $C_{25}$ ,  $220$ – $350^\circ C$ ); мазут, состоящий из смеси УВ, асфальтенов, нефтяных смол, карбенов и др., с температурой кипения, лежащей в пределах  $350$ – $500^\circ C$  (Алёшин, 1986).

В общем виде фракции, выкипающие при температуре до  $180^\circ C$ , называют низкокипящими, или бензиновыми, от  $180$  до  $350^\circ C$  – среднекипящими, или керосиновыми, выше  $300^\circ C$  – высококипящими, или масляными (Вержичинская и др., 2009). Среднекипящие фракции состоят преимущественно из УВ с длиной цепи от 12 до 23 атомов углерода. Наряду с парафинами, они содержат в своем составе

нафтеновые, ароматические и нафтено-ароматические УВ. Высококипящие фракции представлены УВ с длиной цепи выше 24 атомов углерода, а также смолами, асфальтенами и различными органическими гетероатомными соединениями (Плотникова, 2012).

### **1.1.3 Зоны разгрузки флюидов УВ**

Зоны разгрузки флюидов УВ – это зоны в морском дне, где происходит выделение восстановленных соединений из подземных запасов УВ, из которых высачиваются, как газообразные УВ, так и более тяжёлые УВ (Kvenvolden, Cooper, 2003). Эти зоны являются источниками флюидов УВ, как жидких, так и газообразных (Quigley et al., 1999). В арктическом регионе 95% всех УВ попадет в морские экосистемы за счёт естественных высачиваний, объём которых, по оценкам, составляет  $4 \times 10^4$  т. в год (Vergeynst et al., 2019). Нефть, которая поступает из подземных коллекторов, ведёт себя также как нефть, разлитая при антропогенных воздействиях, например, образует пятна, дрейфующие с течениями (Hazen et al., 2016). При попадании сырой нефти в водные экосистемы она подвергается воздействию ряда физических, химических и биологических факторов, в результате чего происходят изменения ее состояния. К таким факторам относят механическое и турбулентное перемешивание, растворение, абсорбцию испарение, фотоокисление, биodeградацию (Федоренко, 2016).

## **1.2 Месторождения УВ в Арктике**

### **1.2.1 Северные моря**

Арктическая зона Российской Федерации – это акватории и территории, ограниченные полярным кругом на юге и границей территориальных вод на западе и северо-востоке. Общая площадь шельфовой арктической зоны составляет 21% площади шельфа Мирового океана (Еремин и др., 2010; Федоренко, 2016; Гаврилов и др.,

2015). Освоение и разработка ресурсного потенциала России играет важную роль в использовании сырьевого потенциала Арктической зоны. Арктическая зона представляет собой богатый минерально-сырьевой регион (Ганюхина, 2022). Арктические моря содержат в своих недрах около 80% суммарных ресурсов УВ российского шельфа (Селин и др., 2008). На российском арктическом шельфе открыто порядка 20 нефтегазоносных провинций. Акватории Баренцева, Печорского и Карского морей считаются самыми ресурсоёмкими; в их пределах сосредоточено около 62,7% суммарных геологических ресурсов акватории РФ (Еремин и др., 2010). Крупнейшими бассейнами в арктической части являются Восточно-Баренцевский, Южно-Карский, Лаптевский, Восточно-Сибирский и Чукотский бассейны. Ресурсная база УВ континентального шельфа России составляет 136 млрд тонн условного топлива (т.у.т.) (геологические запасы). Извлекаемые запасы, оцениваемые в 100 млрд т у.т., представлены 13 млрд тонн нефти и 87 трлн м<sup>3</sup> газа, что эквивалентно почти четверти (22–27%) всех ресурсов шельфа Мирового океана (Еремин и др., 2010). Акватории Баренцева, Печорского и Карского морей являются наиболее ресурсоёмкими; в их недрах расположено 63% суммарных геологических ресурсов акватории РФ (Федоренко, 2016).

### **1.2.2 Баренцево и Печорское моря**

Баренцевоморский шельф сформировался под действием комбинации процессов, которые контролировались тектоническими движениями литосферных плит, изменениями климата и накоплением осадков в течение миллионов лет (Lerch et al., 2016). В результате длительной геологической эволюции в пределах Баренцевоморской плиты были сформированы осадочные нефтегазоносные бассейны, которые отличаются друг от друга литологическим составом, мощностью, объемом нефтегазоматеринских толщ, характером пород,

типом ловушек, интенсивностью преобразований осадочных толщ, типом и химическим составом флюидов (Abay et al., 2018; Nicolaisen et al., 2019). Печорско-Баренцевоморский бассейн (ПББ) является одной из крупнейших территорий по залежам УВ сырья.

Потенциал ПББ оценивается в 10 % от всех УВ ресурсов России (Малышев, 2002). В пределах ПББ выделяются Тимано-Печорская нефтегазоносная провинция и Баренцевоморско-Северокарская. Эти суббассейны характеризуются автономностью в эволюции и накоплении УВ (Чупров, 2008). В Баренцевом море изучены разведочным бурением и подготовлены к разработке два месторождения (рисунок 1): Штокмановское газоконденсатное месторождение (далее – ГKM) и Мурманское газовое месторождение (далее – ГM); в Печорском море – три месторождения: Приразломное нефтеместорождение (далее – НM), Медыньское-море НM и Долгинское НM (Ерёмин, 2010; Норина, 2014).

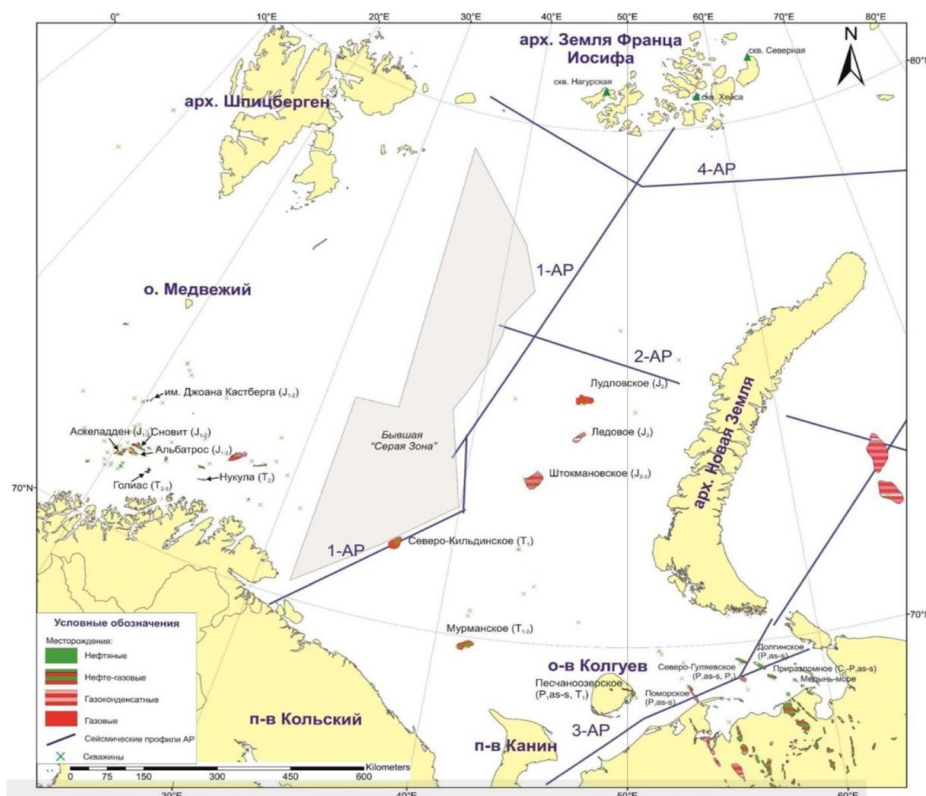


Рисунок 1. Месторождения УВ Баренцева и Печорского морей (Норина, 2014).

Основными процессами, под влиянием которых происходит выход нефти на поверхность, являются тектоническая активность, трансформация органических отложений и диссоциация газового гидрата (Lutz et al., 2021). Восстановленные УВ являются субстратами как для аэробного, так и для анаэробного окисления. Естественные выходы нефти формируют глубоководные районы, в которых происходит развитие микробных сообществ, способных к утилизации УВ (Hazen et al., 2016).

### **1.3 Микроорганизмы Арктических морей**

Микроорганизмы являются важной составляющей морских экосистем. Микроорганизмы осуществляют процесс деградации полимерных органических субстратов в донных осадках и водной толще. Факторами, которые определяют биогеохимическую активность, являются доступность органического вещества, температура, солёность, окислительно-восстановительный потенциал. В результате активной деятельности органогетеротрофных микроорганизмов осуществляется минерализация органического вещества, синтезируемого автотрофными организмами, а также привнесенного с суши и рек. Зонами повышенной микробной активности является слой наддонной воды и слой поверхностных осадков (Саввичев, 2011).

Главным фактором, определяющим развитие бактерий в арктических морях, является температура. Микроорганизмы, способные расти при низких температурах, разделяют на психрофильные и психротолерантные виды (Chattopadhyay, Jagannadham, 2001; Margesin, Schinner, 1994). Самыми распространенными в морских арктических экосистемах являются психрофильные бактерии, рост которых возможен в пределах от 0 до 20°C, при температурном оптимуме в 15°C (Morita,

1975). Психрофилы могут развиваться при 5°C и ниже, независимо от их оптимальных температур роста (Eddy, 1960). Способность некоторых бактерий к росту при температурах ниже нуля объясняется их обитанием в тонких водных прослойках, образующихся на границе соприкосновения льда и морской воды (Junge et al., 2001).

Придонная зона характеризуется температурами, близкими к точке замерзания, высоким давлением и отсутствием света. Эта зона является достаточно олиготрофной средой, где большая часть живых организмов зависит от осаждения органического вещества из более продуктивных зон в верхнем слое воды (Rapp, 2014). Единственным исключением являются те немногие локусы, где новое органическое вещество производится путем хемосинтеза, например, гидротермальные источники и холодные просачивания (Jorgensen, Voetius, 2007). Типичные бентосные бактерии, обнаруженные в арктических поверхностных осадках у Шпицбергена, или в море Лаптевых, относятся к классам *Gamma*proteobacteria, *Delta*proteobacteria, *Alpha*proteobacteria и *Actinomycetes* (Bienhold et al., 2012; Jacob et al., 2013).

## 1.4 УВ-окисляющие микроорганизмы

### 1.4.1 Разнообразие УВОБ в морских экосистемах

УВОБ распределены по многим филогенетическим группам, что видно из рисунков 2-3. Такое таксономическое разнообразие было достигнуто, вероятно, за счёт горизонтального переноса генов, так как есть данные о том, что способность к деградации УВ может переноситься на плаزمиде Oct, Nah7, dox, TOL, pBS216, pOV17 (Vetrova et al., 2007; Abbasian et al., 2016). Тот факт, что деградация УВ пока не обнаружена во всех бактериальных филах, может указывать на некоторые барьеры для такой передачи (Pora et al., 2017).

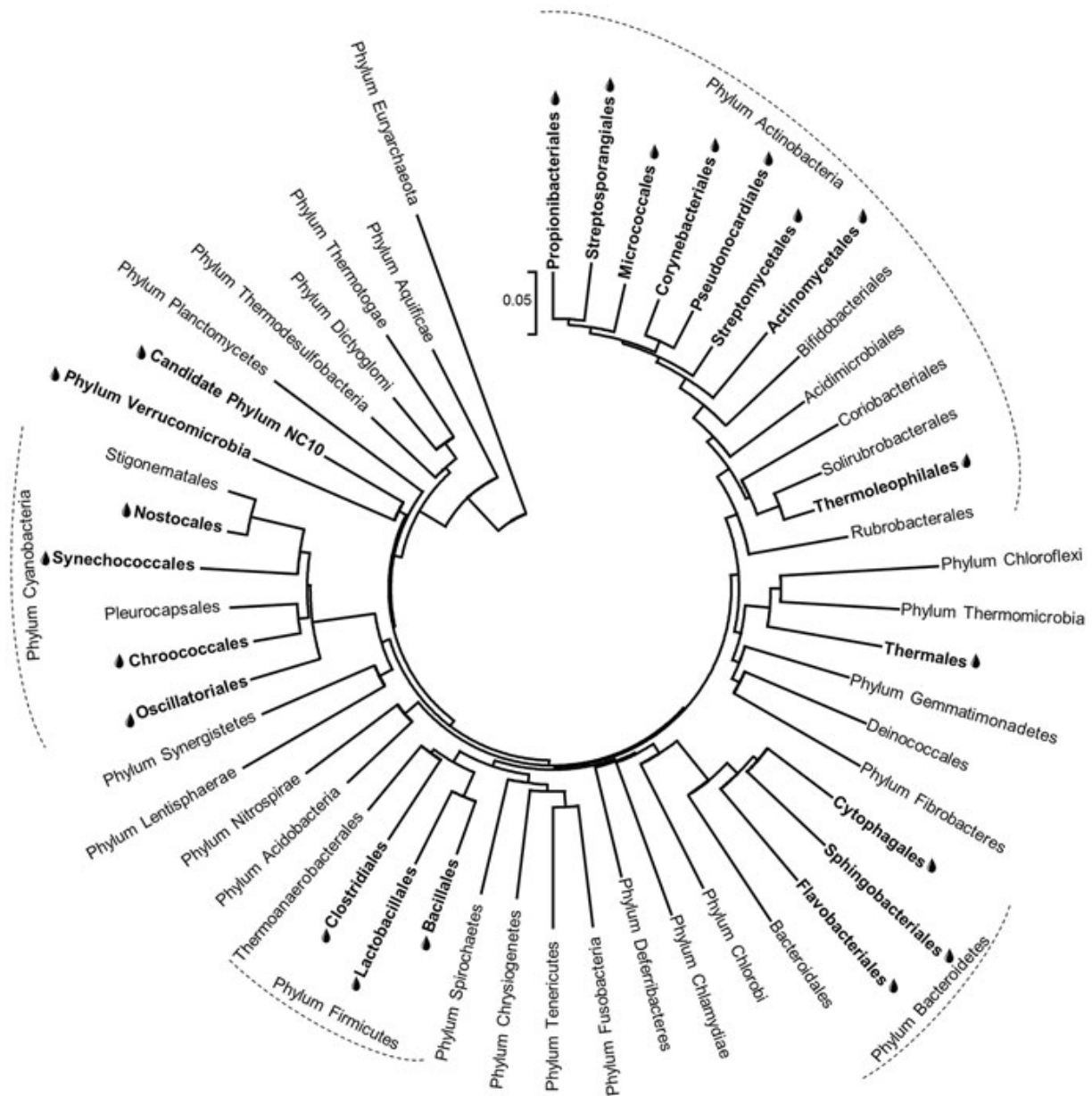


Рисунок 2. Филогенетическое разнообразие УВОБ в домене *Bacteria* (за исключением филума *Pseudomonadota*) (McGenity, 2019).



Рисунок 3. Филогенетическое разнообразие УВОБ в филуме *Pseudomonadota* (McGenity, 2019).

Самыми распространёнными УВОБ в морских экосистемах являются *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Archrobacter*, *Bacillus*, *Cycloclasticus*, *Coryneforms*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Vibrio* (Xue et al., 2015). По мнению других авторов, наиболее распространёнными являются гетеротрофные грамположительные микобактерии: роды *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* (Федоренко, 2016).

## 1.4.2 Сообщества нефтеокисляющих микроорганизмов

До разлива Deepwater Horizon в Мексиканском заливе в марте 2010 года было мало известно о сообществах микроорганизмов в этом регионе (McGenity, 2019). Секвенирование генов 16S рРНК образцов с фоновых территорий недалеко от Deepwater Horizon (DWH) показало, что в них доминируют SAR11, SAR406, SAR324 clade и разнообразные группы гаммапротеобактерий (King et al., 2015; Yang et al., 2016). Через несколько месяцев были изучены образцы непосредственно с разлива, что обнаружило доминирование новой группы *Oceanospirillales* (так называемая DWH *Oceanospirillales*), а также бактерий родов *Colwellia* и *Cycloclasticus*. Через некоторое время численность DWH *Oceanospirillales* и *Colwellia* в образцах из разлива вернулась к уровням, обнаруженным вне его, но *Cycloclasticus* продолжал доминировать, как и менее многочисленные группы гаммапротеобактерий, такие как *Pseudoalteromonas* и *Neptunomonas* (Dubinsky et al., 2013).

Микроорганизмы, обитающие на загрязненных участках, хронически подвергающихся воздействию нефти, обладают адаптивными особенностями устойчивости к УВ и включают физиологические свойства, такие как гидрофобная клеточная оболочка, связанная с активными транспортными системами, эффлюксными насосами и путями деградации УВ, как описано для видов, родственных *Rhodococcus* (de Carvalho et al., 2014). Аналогичным образом облигатные УВОБ оказались особенно хорошо приспособлены к среде, хронически загрязнённой нефтью (Yakimov et al., 2007). Сравнение  $\beta$ -разнообразия микробных сообществ из хронически загрязнённых участков с сообществами из участков, не подвергшихся воздействию нефти, показало наличие специфических микробных популяций, адаптированных к присутствию нефтяных УВ и многократным загрязнениям (Duran et al., 2015; Misson et al., 2016). Молекулярные методы показали, что в составе бактериальных сообществ в хронически загрязнённых отложениях доминируют представители *Bacteroidetes*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* (McGenity, 2019).

## 1.5 Окисление УВ

### 1.5.1 Геохимические аспекты окисления УВ нефти микроорганизмами

При определении степени биodeградации нефти распространённым

подходом является использование биомаркерных соединений. Биомаркерные параметры УВ предоставляют важную информацию о геологической истории нефти (Moldowan, McCaffrey, 1984; Peters, Moldowan, 1993).

Первым индикатором процессов биodeградации нефти является исчезновения *n*-алканов C<sub>6</sub>–C<sub>12</sub>. Нормальные алканы быстрее подвергаются биodeградации, чем изопреноиды. В связи с этим соотношение таких изопреноидов как пристан и фитан (рисунок 4) используют для оценки биodeградации нефти (Powell, 1988).

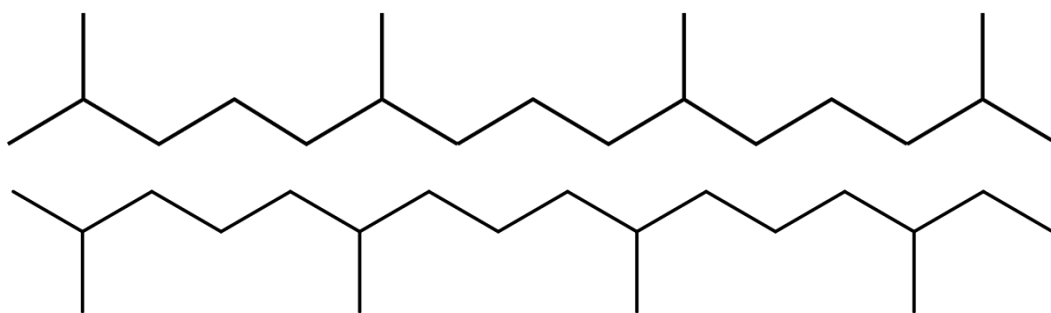


Рисунок 4 . Структурные формулы: пристан (сверху), фитан (снизу).

Однако в процессе биodeградации пристан и фитан также могут разлагаться, что ограничивает их использование (Jobson et al., 1972; Bailey et al., 1973).

После нормальных алканов и изоалканов идёт биodeградация стеранов. Стераны и терпаны – биомаркеры, более устойчивые к деградации. Стераны используются в нефтяной геологии для определения степени термической зрелости нефти и ее источника. Молекулярный скелет стеролов в процессе его преобразования в УВ относительно устойчив к биodeградации (Seifert, Moldowan, 1979). Более устойчивыми к процессам биodeградации считаются гопаны. Гопаны –пентациклические тритерпаны, полученные из предшественников – бактериальных липидов, появляются как повсеместно распространенные компоненты алифатической фракции сырой нефти (рисунок 5) (Ourisson et al., 1979; Prince et al., 1993).

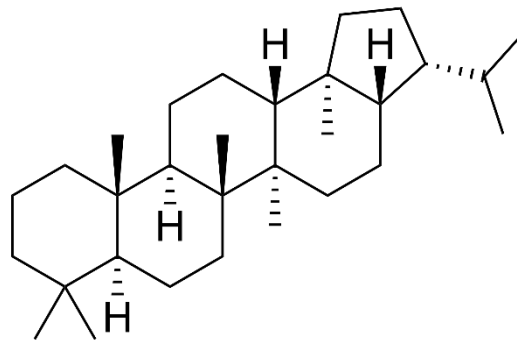


Рисунок 5. Структурная формула гопанов.

Этот ряд включает  $C_{27}$  17R-(H), 21 $\alpha$ (H)-гопан и гомогопаны  $C_{31}$ – $C_{35}$ , которые встречаются в виде эимеров 22S и 22R на основе асимметрического центра при  $C_{22}$  (Peters, 1996). Разложение гопана в лабораторных условиях часто бывает безуспешным, возможно, из-за короткого времени культивирования или отсутствия бактерий, разлагающих гопан (Rubinstein et al., 1977; Volkman et al., 1983; Prince et al., 1994). Однако сообщалось о разложении  $C_{30}$  17R(H),21(H) $\alpha$ -гопана и ряда гомогопанов, с преимущественным разложением гомологов с более высокой молекулярной массой ( $C_{35}$ > $C_{34}$ > $C_{33}$ > $C_{32}$ > $C_{31}$ > $C_{30}$ ) (Chosson et al., 1992).

В процессе биodeградации аренов первыми исчезают лёгкие ароматические соединения. В целом биорезистентность ароматических соединений возрастает с увеличением числа ароматических колец и числа алкильных заместителей (1 кольцо 2 кольца  $\rightarrow$  3 кольца  $\rightarrow$  4 кольца, метил- и диметил  $\rightarrow$  триметилалкильные соединения). Незначительные изменения содержания метил- и диметилнафталинов происходят при удалении *n*-алканов, триметилнафталины изменяются при удалении изопреноидов, а тетраметилнафталины сохраняются до тех пор, пока не будут в значительной степени истощены стераны. Фенантрены ведут себя сходным образом при увеличении алкилирования, но в целом более устойчивы к биоразложению, чем алкилнафталины (Fisher et al., 1998).

Для оценки биodeградации могут быть использованы следующие соотношения:

- отношение метилнафталенов (2 бензольных кольца в составе УВ) к метилфенантренам (3 бензольных кольца в составе УВ) (MN/MP);
- соотношения суммы метилнафталенов (MN), диметилнафталенов

(DMN) и триметилнафталенов (TMN);

- диметилнафталеновый индекс (DBR): 1,6-DMN/1,5-DMN;
- триметилнафталеновый индекс (TBR): 1,3,6-TMN/1,2,4-DMN.

С увеличением степени биodeградации значения выбранных индексов будут снижаться, а в ряду MN-DMN-TMN увеличиваться доля TMN.

### **1.5.2 Факторы, влияющие на биodeградацию нефти**

Факторы окружающей среды, которые влияют на биodeградацию нефти, – доступность источников азота и фосфора, природа УВ субстрата, его концентрация и наличие токсичных веществ в нефти или окружающей среде. К физическим факторам можно отнести температуру, доступность кислорода, соленость, рН и степень открытости экосистемы (Yakimov et al., 2007, Tremblay et al., 2017).

В водах Арктического бассейна особые условия, такие как низкая температура, морской лёд, гидродинамические условия и наличие нефте-минеральных и нефте-фитопланктонных агрегатов, могут влиять на биodeградацию нефти. Скорость утилизации питательных субстратов в морской воде, как правило, невысока. Выделяемые бактериями биосурфактанты повышают биодоступность этих соединений (в частности, компонентов нефти), что ведет к росту метаболической активности. Биосурфактанты – это поверхностно-активные вещества амфифильной природы, состоящие из полярной гидрофильной головки и неполярного гидрофобного хвоста. Действие биосурфактантов основано на их способности к снижению межфазного натяжения на границе двух несмешивающихся фаз, образуя эмульсию, которая приводит к увеличению доступности УВ субстрата для микроорганизмов (Banat et al., 2010). Биосурфактанты увеличивают площадь поверхности нефти, а вместе с тем и количество субстрата, фактически доступного для бактерий (Nikolopoulou, Kalogerakis, 2009).

### **1.5.3 Биологическое окисление компонентов нефти в аэробных условиях**

#### **1.5.3.1 Биологическое окисление *n*-алканов**

В связи с тем, что ключевыми участниками процесса разложения УВ в условиях антропогенного воздействия являются аэробные УВОБ, данная работа

посвящена процессу окисления УВ в присутствии O<sub>2</sub>.

Окисление линейных УВ (алканов) происходит за счет β-окисления с помощью алкан монооксигеназы до ацетил-КоА (рисунок 6) (Wagner et al., 2002).

### TERMINAL OXIDATION

### SUBTERMINAL OXIDATION

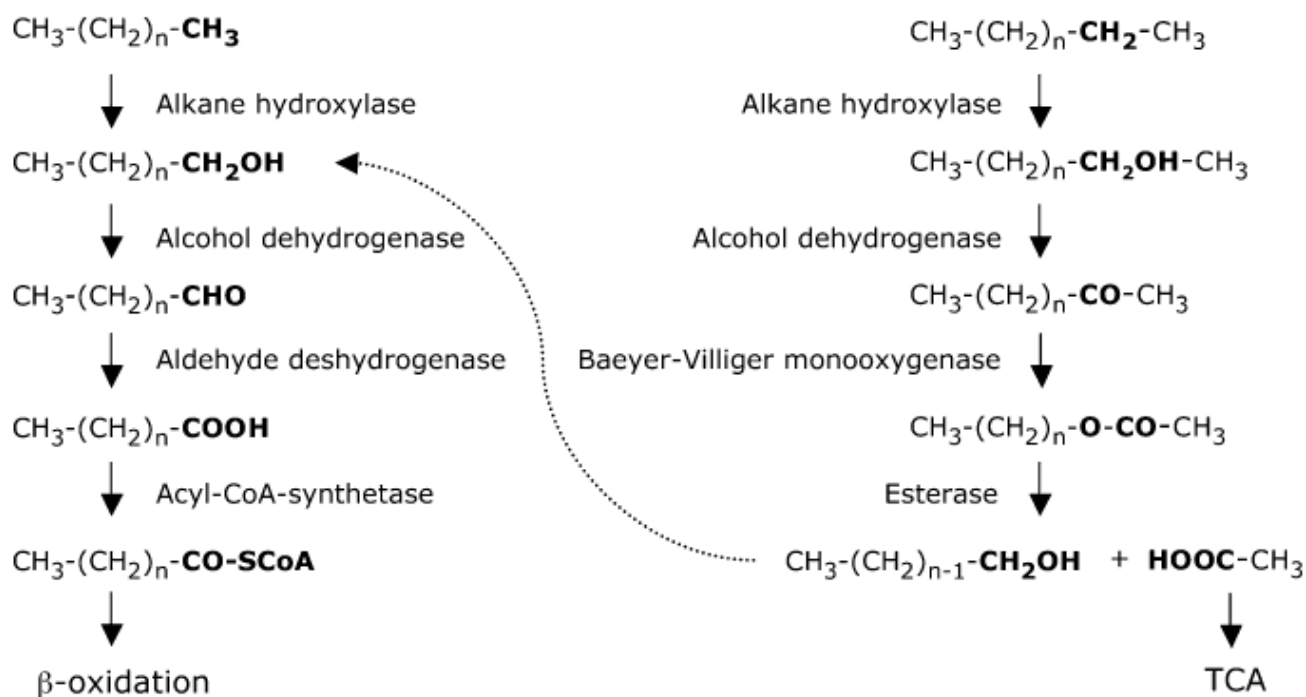


Рисунок 6. Наиболее распространенные пути окисления n-алканов у прокариот (Moreno, Rojo, 2019).

Короткоцепочечные алканы с длиной цепи менее C<sub>9</sub> являются токсичными для многих микроорганизмов, однако они быстро испаряются из мест разлива УВ. Наиболее эффективно окисляются средне- и длинноцепочечные алканы (C<sub>10</sub>–C<sub>24</sub>).

Процесс биологического окисления линейных УВ подразделяется на два основных типа: монотерминальный и дитерминальный. Наиболее распространённым является монотерминальное окисление, которое инициирует атаку на концевую метильную группу. Этот каскад реакций ведет к последовательному образованию первичного спирта, альдегида и жирной кислоты. Далее жирная кислота подвергается β-окислению, в результате которого образуется ацетил-кофермент А. Для n-алканов с нечетным числом атомов углерода конечным продуктом становится пропионил-КоА, который карбоксилируется в метилмалонил-КоА и затем изомеризуется в сукцинил-КоА

(Caro Pascual, 2020).

Субтерминальное окисление (через вторичный спирт и кетон) характерно для короткоцепочечных алканов длиной углеродной цепи C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub>. Ненасыщенные 1-алкены окисляются по насыщенному концу; второстепенный путь включает образование эпоксида. Разветвленность УВ замедляет деградацию. Метильные группы существенно не влияют на этот процесс, тогда как объемные группы (третичный бутил) препятствуют ферментативному расщеплению (Fritsche et al., 2001).

Способность усваивать алканы широко распространена среди микроорганизмов. Это объясняется тем, что алканы представляют собой высоковосстановленные молекулы с высоким содержанием энергии и углерода, и поэтому могут служить источниками углерода энергии для микроорганизмов. Алканы в небольших количествах производятся многими живыми организмами, включая растения, зеленые водоросли, бактерии и животных (Schirmer et al., 2010; Lea-Smith et al., 2015; Pedrini et al., 2013). Биохимия путей разложения алканов была подробно изучена у некоторых микроорганизмов, таких как *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Dietzia* (McGenity, 2019). Изученные виды имеют несколько ферментных систем для начального гидроксирования *n*-алканов: (1) AlkB-подобную алкан гидроксилазу, состоящую из одного до трёх генов, (2) цитохром P450 и (3) AlmA-подобная алкан гидроксилазу (McGenity, 2019).

Фермент AlkB окисляет алканы C<sub>5</sub>–C<sub>12</sub>. (Kok et al., 1989; Panke et al., 1999). AlkB-подобная алкан гидроксилаза организована в два генетических кластера *alkBFGHJKL* и *alkST* (van Beilen et al., 2002). Первая реакция пути терминального окисления происходят благодаря трем ферментам: непосредственно алкан монооксигеназе (AlkB), рубредоксину (AlkG), и рубредоксин редуктазе (AlkT). Ген *alkT*, который кодирует третий компонент алкангидроксилазы, расположен ниже по кодирующей цепи от *alkS*, который кодирует транскрипционный регулятор пути. Оперон *alkBFGHJKL* транскрибируется с промотора PalkB, экспрессия которого требует транскрипционного активатора AlkS и присутствия *n*-алканов, которые действуют как эффекторы для AlkS (Moreno, Rojo, 2019).

CYP153 – растворимая монооксигеназа, для протекания реакции с участием

которой требуются ферредоксин и ферредоксин редуктаза, в результате чего происходит перенос электронов с НАД(Ф)Н на цитохром (Moreno, Rojo, 2019). Регуляция транскрипции генов CYP153 производится регулятором семейства AraC (CypR), расположенным выше по цепи (Liang et al., 2016). Семейство AraC представляет собой класс транскрипционных регуляторов, которые участвуют в регуляции метаболических путей у различных организмов. Типичные представители этого семейства обычно содержат два функциональных домена: N-концевой лиганд-связывающий домен и C-концевой ДНК-связывающий домен (Yin et al., 2024). CYP153 - одна из наиболее распространенных гидроксилаз среднецепочечных *n*-алканов, с количеством атомов углерода от 5 до 16, принадлежащая к суперсемейству цитохрома P450, которая широко экспрессируется в бактериях, разлагающих *n*-алканы (Liang et al., 2016). Определяющей реакцией для CYP153 является восстановительная активация молекулярного кислорода. В этой реакции один из атомов молекулярного кислорода включается в субстрат, а другой восстанавливается до молекулы воды (van Beilen et al., 2002).

AlmA играет ключевую роль в метаболическом пути разложения твёрдых длинноцепочечных *n*-алканов ( $\geq C_{20}$ ), которые крайне трудно поддаются деструкции. AlmA является гидроксилазой, катализирующей терминальное гидроксилирование длинноцепочечных *n*-алканов с образованием соответствующих первичных спиртов. Этот фермент кодирует предполагаемую монооксигеназу из семейства флавин-связывающих белков. Регуляция экспрессии AlmA также происходит за счет AraC (Wang et al., 2012; Yin et al., 2024).

### 1.5.3.2 Биологическое окисление циклических алканов

Цикланы относительно устойчивы к воздействию микроорганизмов, так как отсутствие открытой концевой метильной группы усложняет первичную атаку фермента на субстрат (Jaekel et al., 2015). Некоторые бактерии способны использовать циклогексан в качестве единственного источника углерода и энергии. Механизм окисления циклогексана показан на рисунке 7.

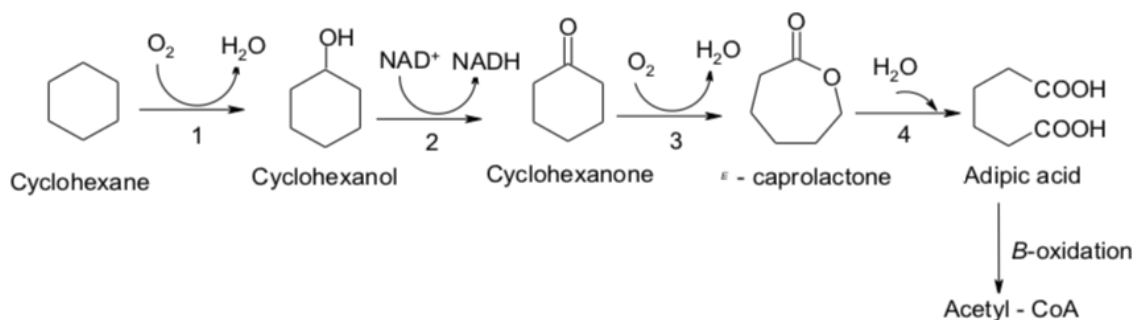


Рисунок 7. Схема биологического окисления цикланов (Olajire, Essien, 2014).

### 1.5.3.3 Биологическое окисление ароматических УВ

Ароматические соединения широко распространены в природе. Они встречаются в виде компонентов лигнина, ароматических аминокислот, ксенобиотических соединений и т.д. В связи с этим микроорганизмы обладают широким спектром метаболических путей утилизации ПАУ. Основные реакционные этапы путей включают в себя активацию ароматического кольца с помощью оксигеназ или КоА-лигаз и расщепление кольца до ди- или тригидроксилированных промежуточных продуктов или деароматизированных производных КоА. Активация ароматического кольца обычно осуществляется представителями одного из трех суперсемейств: негемовые оксигеназы, обычно катализирующие присоединение двух атомов кислорода, флавопротеиновые монооксигеназы и растворимые мультикомпонентные двухжелезные оксигеназы (рисунок 8) (Gibson, Parales 2000; Leahy et al., 2003; van Berkel et al., 2006). Альтернативно, ароматическое производное КоА атакуется многокомпонентными ферментами, где субъединицы оксигеназы принадлежат к двухжелезным оксигеназам, как в фенилацетил-КоА (Ismail, Gescher, 2012) или бензоил-КоА оксигеназе (Zaar et al., 2004). Дальнейшая аэробная деградация ди- или тригидроксилированных промежуточных продуктов может катализироваться интрадиоловыми или экстрадиоловыми диоксигеназами (Khot et al., 2021).

Наиболее изученными являются гены окисления нафталина на примере плазмиды NAH7 *Pseudomonas putida* G7 (Simon et al., 1993). В NAH7 гены катаболизма нафталина (*nah*) организованы в два оперона: финальный оперон, содержащий гены ферментов верхнего пути, участвующих в превращении нафталина в салицилат, и салицилатный оперон, содержащий гены ферментов нижнего пути, участвующих в превращении салицилата в пируват и ацетальдегид. Опероны регулируются общим регулятором NahR, положительным регулятором транскрипции типа LysR, широко распространенным в бактериях. В присутствии салицилата индуцируется NahR, что приводит к высокой экспрессии генов *nah* в бактериях. Нижний путь нафталинового оперона содержит 11 генов, расположенных в порядке *nahGTHINLOMKJY*, в котором *nahY* представляет собой ген нафталинового хемотаксиса (Ghosal et al., 2016).

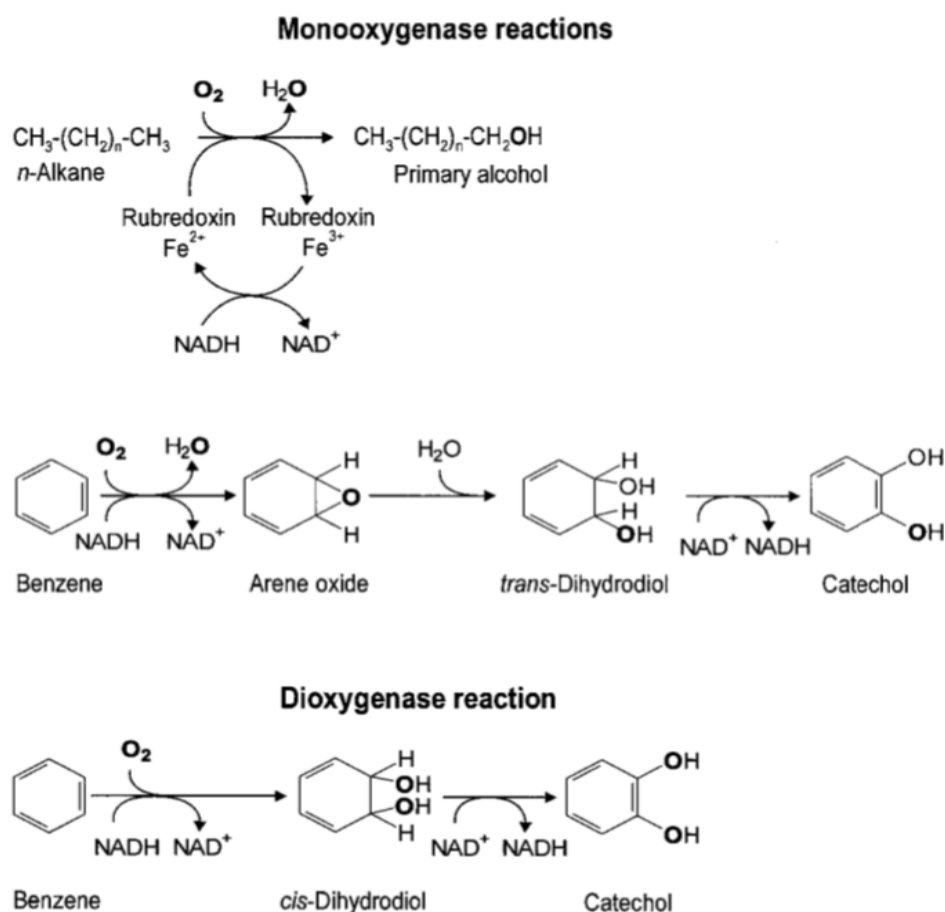


Рисунок 8. Схема биологического окисления аренов разными типами оксигеназ. Монооксигеназа катализирует присоединение атомов  $\text{O}_2$  из молекулярного кислорода и  $\text{H}_2\text{O}$ . Диоксигеназа присоединяет сразу два атома  $\text{O}_2$  из молекулярного кислорода (Fritsche et al., 2001).

Таким образом, северные моря являются экономически важной зоной из-за наличия больших запасов нефти и газа. Микроорганизмы, в свою очередь, обладают способностью к утилизации широкого спектра УВ. В связи с этим изучение биологических аспектов процесса деградации нефти в северных морях представляется важной фундаментальной задачей. Полученные результаты вносят вклад в развитие многих практических областей: оценку микробного биоразнообразия, мониторинг окружающей среды, производство бактериальных препаратов, геологическую разведку. В работе представлены результаты по изучению аэробных УВОБ в наиболее нефтегазоносных районах северных морей России - Баренцевом и Печорском морях.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

В работе анализировались образцы морской воды и донных отложений из Баренцева и Печорского морей (рисунок 9).

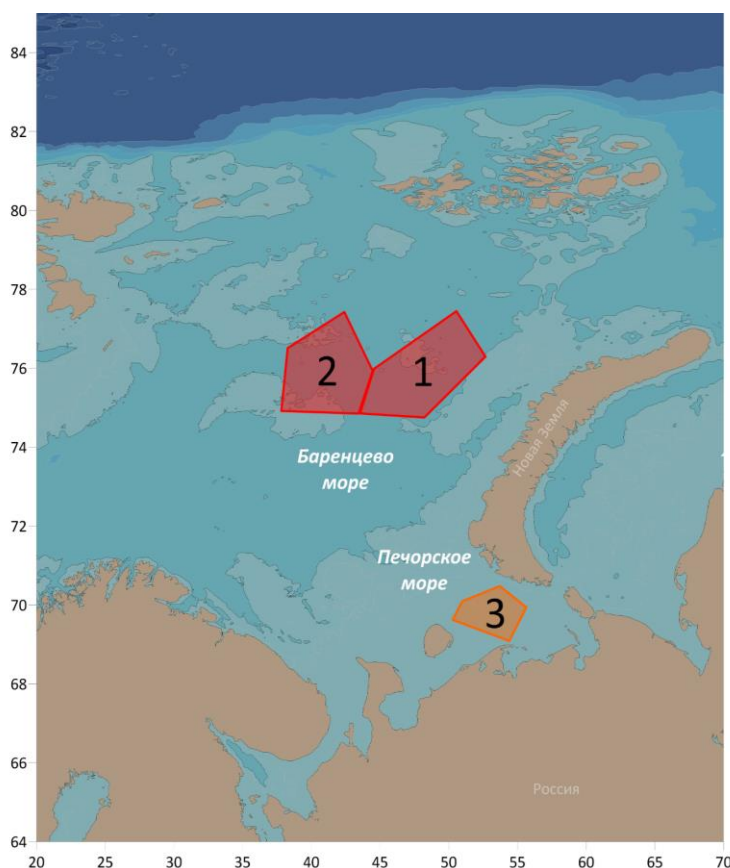


Рисунок 9. Исследованные районы Баренцева и Печорского морей: 1, 2 – области пробоотбора в Баренцевом море, 3 – район отбора образцов в Печорском море

#### 2.1.1 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-ИОС («Обучение-через-исследование») TTR-19 и TTR-20 НИС «Академик Николай Страхов», организованных 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» ЦМИ МГУ имени М.В. Ломоносова. Точки пробоотбора в Баренцевом море выбирали на основе геофизической интерпретации - наличия газа и структур дна, свидетельствующих об активных выходах УВ. Анализ проводился по данным геоакустической съёмки и

многолучевого эхолотирования. В Печорском море все образцы были отобраны в границах нахождения НМ Долгинское и Приразломное.

Образцы придонной морской воды отбирались батометром Нискина (ИС «Картеш»), или из верхней части гравитационной трубы (НИС «Академик Николай Страхов»). Для концентрирования клеток микроорганизмов и их последующего анализа морскую воду в объеме 2 л после доставки на борт судна 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. Полученные системы фильтров фиксировались в буфере А (10 мл 0,5М ЭДТА, 5 мл 1М TRIS-HCl, 1,5мл 5М NaCl, 33,5 мл MQ H<sub>2</sub>O).

Образцы донных отложений отбирались из верхних слоев донных отложений 0-5 см глубиной, с помощью дночерпателя (ИС «Картеш») или гравитационной трубы (НИС «Академик Николай Страхов», рисунок 10), и помещались в 50 мл пробирку типа Фалькон (Eppendorf, США) для дальнейшего культивирования и в 5 мл пробирку типа эппендорф, в которую добавлялся буфер А в соотношении 1:1, для дальнейшего выделения тотальной ДНК. Все зафиксированные в буфере образцы хранились в морозильной камере при -18°C, образцы для культивирования - при +4°C.



Рисунок 10. Пробоотбор образцов донных отложений гравитационной трубкой, НИС «Академик Николай Страхов», Баренцево море, октябрь 2021г.

## 2.2. Получение накопительных культур УВОБ

Было проведено 4 отдельных эксперимента по получению накопительных культур УВОБ.

1. Накопительные культуры из морской воды северо-восточной части Баренцева моря (рисунок 9-1).

Аликвоту морской воды инкубировали аэробно в стерильной морской воде, в присутствии сырой нефти Восточно-Таркосалинского НМ (1% от общего объема среды). Инкубирование проводили в стеклянных колбах объемом 250 мл (рисунок 11а), с 20 мл инокулята и 100 мл стерильной морской воды при 5°C в орбитальном шейкере (New Brunswick, Германия) при 180 об/мин. Образцы для таксономического профилирования сообществ накопительных культур по гену 16S рРНК объемом 5 мл отбирали на 7-ые сутки культивирования. Контролями к эксперименту служили данные NGS-профилирования инокулята (придонная морская вода) по гену 16S рРНК.

2. Накопительные культуры из морской воды и донных отложений северной части Баренцева моря (рисунок 9-2).

Культивирование проводили в стеклянных флаконах объемом 100 мл, с 20 мл стерильной морской воды в качестве питательной среды и 0,2% об. сырой нефти Восточно-Таркосалинского НМ, с 1 г донных отложений и 3 мл морской воды в качестве инокулята, при 15°C, в орбитальном шейкере (New Brunswick, Германия) при 180 об/мин в течение 7 суток (рисунок 11б). Далее 2 мл каждой полученной накопительной культуры пересеивали на среду ONR7а с индивидуальными УВ: нормальный нонан (*n*-нонан), нормальный ундекан (*n*-ундекан) и ПАУ фенантрен, 0,2 % об. Состав среды ONR7а г/л: NaCl – 22,79, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 11,18, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,98, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 1,46, TAPSO – 1,3, KCl 0,72, NH<sub>4</sub>Cl – 0,27, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,047, NaBr – 0,083, NaHCO<sub>3</sub> – 0,031, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,027, SrCl<sub>2</sub> – 0,014, NaF – 0,0026, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,002 (Dyksterhouse et al., 1995). Инкубирование проводили в пластиковых пробирках типа Фалькон объемом 50 мл, содержащих 20 мл среды, при 15°C и 180 об/мин в течение 7 суток. Параллельно инкубировали два типа контролей: биологический контроль – среда ONR7а с инокулятом без УВ; химический контроль – среда ONR7а с УВ, но без инокулята. Образцы для таксономического профилирования сообществ

накопительных культур по гену 16S рНК объемом 5 мл отбирали на 7-ые сутки культивирования

3. Накопительные культуры из морской воды и донных отложений Печорского моря.

Культивирование проводили по схеме, аналогичной эксперименту 2.

4. Накопительные культуры из донных отложений Печорского моря с использованием расширенного спектра УВ субстратов.

Образцы донных отложений объединяли в две группы по фактору локации отбора проб: Долгинское и Приразломное. Объединенные образцы, 10 об. %, инкубировали в пластиковых пробирках типа Фалькон, на среде ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995) с добавлением УВ (сырая нефть, *n*-нонан, *n*-октадекан, пристан, циклогексан, бифенил), 0,2 об.%. Культивирование проводили при 15°C в орбитальном шейкере (New Brunswick, Германия), при 180 об/мин в течение 14 суток, по истечении которых проводили пересев 2 мл культуры в аналогичные условия. В качестве контроля использовалась среда ONR7a с инокулятом, но без внесения УВ. Образцы для таксономического профилирования сообществ накопительных культур по гену 16S рНК объемом 5 мл отбирали на 14-ые сутки культивирования второго посева.

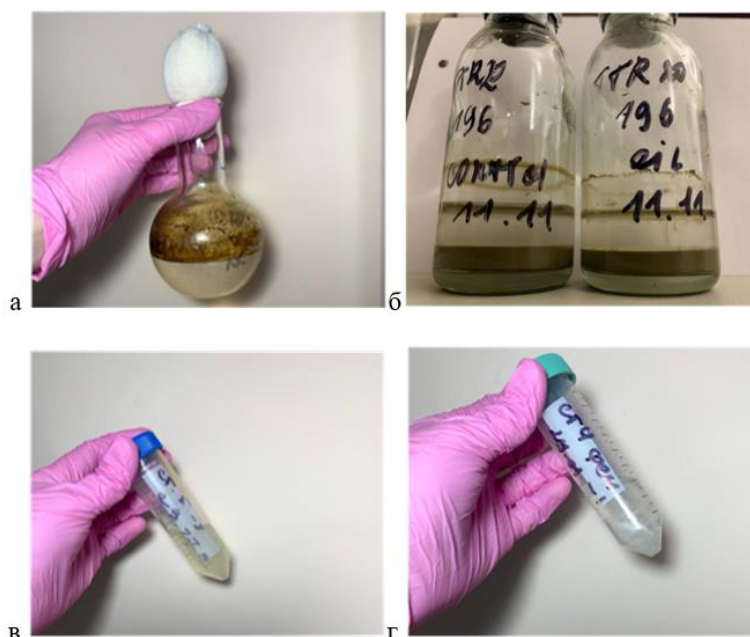


Рисунок 11. а, б – накопительные культуры с нефтью, в – накопительная культура с *n*-нонаном, накопительная культура с фенантrenom.

## 2.3 Получение чистых культур УВОБ

### 2.3.1 Выделение чистых культур УВОБ

Выделение чистых культур проводили на твердых агаризованных средах: ONR7a с внесением УВ, с последующим пересевом на Plate Count Agar (PCA), г/л:  $K_2HPO_4$  – 1,5;  $KH_2PO_4$  – 0,75;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,0;  $(NH_4)_2SO_4$  – 4,0 ; NaCl – 30; гидролизат казеина – 5,0; дрожжевой экстракт – 2,5; D(+)-глюкоза – 1,0; агар-агар – 15; дистиллированная вода, pH 7,0, при температуре 15°C. Стерилизацию УВ проводили с помощью автоклавирования при 1 ати в случае сырой нефти, *n*-нонана, *n*-ундекана, или растворения в ацетоне, в случае фенантрена. Внесение нефти, *n*-нонана и *n*-ундекана проводили в количестве 0,1% в среду культивирования, а также пропитывая ими вату, помещаемую в пластиковый конус с открытым основанием, который вкладывали в крышку чашки Петри. Культивирование проводили дном чашки Петри вверх, обеспечивая тем самым культуры парами УВ. Фенантрен после растворения в ацетоне заново растворяли в *n*-гексане и вносили на чашку Петри равномерным слоем. Культивирование проводили при 15°C до появления явного роста. Отдельные колонии пересеивали многократно, с контролем однородности морфологии колоний и клеток при микроскопировании. Заключительный пересев чистых культур проводили на богатую среду PCA.

### 2.3.2 Молекулярная идентификация чистых культур УВОБ

Для амплификации последовательности гена 16S рРНК выделенных культур использовали праймеры 27F, 1492R (Evrogen, Россия). Анализ хроматограмм проводили в программе BioEdit 7.7. Для анализа полученных последовательностей использовали базу данных BLASTn.

### 2.3.3 Биохимическая характеристика чистых культур УВОБ

Оксидазную активность определяли с использованием тетраметил-п-фенилендиамина (Tarrand, Gröschel, 1982). Каталазную активность определяли путем добавления 3% раствора перекиси водорода к бактериальным колониям и регистрации образования пузырьков газа. В соответствии с методами, описанными Smibert и Kreig (1994), определяли образование ацетона (реакция Фогеса-Проскауэра), индола и

наличие В-галактозидазы. Разложение полисахаридов и рост при различных концентрациях NaCl исследовали на среде PCA. Оптимальные значения pH для роста определяли в жидкой среде того же состава (без агара), исходный pH среды регулировали добавлением растворов NH<sub>4</sub>OH или HCl. Для оценки утилизации субстратов использовали тест систему The Biolog GEN III MicroPlate (США).

#### **2.3.4 Микроскопия чистых культур УВОБ**

Полученные чистые культуры бактерии изучали на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) в лаборатории центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»). Для проведения исследования применяли микроскоп JSM-6380LA (Jeol, Япония). Ускоряющее напряжение 20 кВ. Режим регистрации вторичных электронов.

Для анализа морфологии колонию помещали на поверхность обезжиренного покровного стекла. Далее покровные стекла с бактериями помещали в гистологические кассеты и фиксировали в течение 30 мин в 2,5% растворе глутаральдегида в фосфатно-солевом буфере. Затем проводили дегидратацию образца в этиловом спирте возрастающей концентрации (%): 50 → 60 → 70 → 80 → 96 → 100, выдерживая в каждом растворе по 10-15 мин. После серии этапов спиртовой дегидратации гистологические кассеты помещали последовательно в растворы спирт-ацетон в соотношении 3:1; 1:1 и 1:3 на 15-20 мин, заканчивая абсолютным (100%) ацетоном, и выдерживали в нем образцы не менее 1 ч или оставляли на ночь в холодильнике. Образцы подвергали процессу высушивания методом “критической точки” в установке для высушивания образцов НСР-2 (Hitachi, Япония). Рабочая жидкость: диоксид углерода; промежуточные жидкости: ацетон, этанол; давление: до 100 кг/см<sup>2</sup>; температура: до 40°C; выпуск газа со скоростью 1 л/мин.

Полученные образцы помещали на специальные столики для напыления хромом в ионно-распылительной установке ИВ-3 Ion Coater ЕІКО (Hitachi, Япония). Ионный ток 6 мА. Распыление производили в атмосфере аргона при давлении 0,1 мм рт. ст. На плоских образцах со слабо выраженным микрорельефом толщина покрытия составляла 20 нм (4 мин).



Библиотеки секвенировали с помощью набора MiSeq Reagent Micro Kit v2 (500 циклов) (Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в соответствии с инструкциями производителя.

### **2.4.3 Биоинформатический и статистический анализ данных профилирования микробных сообществ по гену 16S рРНК**

Для обработки нуклеотидных последовательностей был использован метод ASV (Caruso et al., 2019). ASV-таблица была создана с помощью ПО Dada2 (Callahan et al., 2016) и базы данных SILVA 138 (Quast et al., 2013). Статистическую обработку данных проводили с помощью веб-сервиса MicrobiomeAnalyst (Chong et al., 2020) и RStudio. Композитный анализ с байесовской коррекцией был выполнен в ПО QIIME2 (Bolyen et al., 2019; Lin, Peddada 2020). Последовательности фрагментов гена 16S рРНК были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроектов PRJNA980746, PRJNA1005790.

## **2.5 Метагеномное секвенирование микробных сообществ накопительных культур**

### **2.5.1 Метагеномное секвенирование**

Подготовка “shotgun”-библиотек метагенома и секвенирование были выполнены в ООО «Биоспарк», Москва, Россия, с использованием набора для подготовки библиотеки Nextera XT (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя и системой HiSeq 2500 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) с набором реагентов, который может считывать по 100 нуклеотидов с каждого конца.

### **2.5.2 Биоинформатический анализ данных метагеномного секвенирования**

Необработанные прочтения обрабатывали с помощью Trimmomatic (Bolger et al., 2014) для удаления адаптера и качественной фильтрации. Затем прочтения были собраны с использованием MetaSPAdes (Nurk et al., 2017). Прочтения были сопоставлены со сборкой с использованием программного обеспечения Bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012) для расчета покрытия. Биннинг контигов осуществляли с помощью MaxBin 2 (Wu, Simmons, Singer, 2016), MetaBAT 2 (Kang et al., 2019) и CONCOCT (Alneberg et al., 2014). Дальнейшая агрегация и дерепликация этих трех

наборов бинов в отдельные геномы из метагеномов (MAG) выполнялись с помощью DAS Tool (Sieber et al., 2018). Полноту и контаминацию бинов оценивали с помощью CheckM (Parks et al., 2015). Таксономическое положение присваивалось каждому бину с помощью GTDBtk (Parks et al., 2018).

### **2.5.3 Поиск генов окисления УВ в геномах собранных из метагеномов**

Поиск функциональных генов, кодирующих ферменты окисления УВ, проводился с использованием скрытых марковских моделей (СММ) в программе HMMER 3.3.2 (Eddy, 2009). В качестве референсной базы данных применялась САНТ-НУД (Khot et al., 2021), содержащая анотированные последовательности гидроксилаз и других ферментов, участвующих в деградации УВ. Обработка и анализ данных осуществлялись с помощью пакета pandas в среде Python. Критерии отбора гомологичных генов включали следующие параметры:  $full\_seq\_E\_value \leq 0,001$  (статистическая значимость выравнивания полной последовательности);  $best\_dom\_score \geq 25$  (наивысший балл домена);  $full\_seq\_bias < 5$  (отсутствие систематической ошибки в полной последовательности);  $best\_dom\_E\_value \leq 0,001$  (статистическая значимость наилучшего домена);  $best\_dom\_bias < 5$  (отсутствие систематической ошибки в домене). Визуализация результатов проводилась с использованием пакета ggplot2 в RStudio и программы Microsoft Excel для построения графиков и анализа распределения данных.

## **2.6 Получение полных геномов чистых культур УВОБ**

Для получения полных геномов УВОБ использовались современные методы секвенирования на платформах Nanopore (Oxford Nanopore Technologies) и BGI (MGI Tech).

Подготовка библиотеки для полногеномного shotgun-секвенирования (WGS) и само секвенирование были выполнены с использованием набора MGIEasy FS PCR-Free DNA Library Prep Set и платформы DNBSEQ-G50 (MGI, Китай) в соответствии с протоколом производителя, с получением парных чтений длиной 150 п.н.

Геномную ДНК из бактерий для нанопорового полногеномного секвенирования выделяли с помощью набора Monarch Genomic DNA Purification Kit T3010 (New England Biolabs, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя.

Оценку количества и контроль качества полученной гДНК проводили с помощью анализа длин фрагментов методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле (“ДНК-технология”, Россия), спектрофотометра для микрообъемов NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Нанопоровое секвенирование образцов проводили по технологии секвенирования гДНК Oxford Nanopore Technologies (ONT, Великобритания) в полном соответствии с протоколом Native barcoding genomic DNA (SQK-LSK109) на приборе MinION (ONT, Великобритания) с использованием ячейки R9.4.1. Ячейку помещали в прибор и начинали процесс секвенирования. Для преобразования первичных данных использовали программу Guppy basecaller. Все данные с качеством  $Q < 7,5$ , полученном из оценки программой Guppy basecaller, не участвовали в дальнейшем анализе.

Сборка геномов была выполнена с использованием данных секвенирования с платформ Nanopore и DNBSEQ с помощью программы Unicycler v0.5.0 (Wick et al., 2017).

### **2.6.1 Биоинформатический анализ полных геномов УВОБ**

Аннотацию генов проводили с использованием базы данных RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). Видовую принадлежность определяли с помощью базы данных GTDB.

Для уточнения таксономического положения использовали метрики ANI (Average Nucleotide Identity), AAI (Average Aminoacid Identity), dDDH (digital DNA-DNA Hybridization), которые были рассчитаны в pyANI, EzAAI (Kim et al., 2021). Анализ ортологичных белков проводили в OrthoFinder с последующей визуализацией пакетом ggtree в среде R (Emms et al., 2019; Xu et al., 2022).

Поиск генов, кодирующих ферменты окисления УВ, выполняли с помощью алгоритма TBLASTn (Gertz et al., 2006). В качестве базы данных использовали набор аминокислотных последовательностей ферментов окисления УВ, характерных для исследуемых родов бактерий из данных последовательностей MAG (раздел 3.5.3). Критерии отбора гомологичных генов включали  $\text{pident} \geq 90\%$  (процент идентичности аминокислотных последовательностей);  $e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$  (статистическая значимость совпадения);  $\text{bitscore} \geq 500$  (информационная значимость выравнивания).

## 2.7 Оценка УВ-окисляющей активности

### 2.7.1 Подготовка проб для гравиметрического и хроматографического анализа

Для оценки активности окисления УВ выделенными штаммами УВОБ был проведён 30-суточный эксперимент. В качестве субстрата использовали сырую нефть Восточно-Таркосалинского НМ, 700 мг которой вносили в 100 мл среды ONR7a. Среда инокулировали культурами из экспоненциальной фазы до оптической плотности 0,01 (590 нм). Культивирование осуществляли в стеклянных колбах объёмом 250 мл, в трёх биологических повторностях, при 15°C, в орбитальном шейкере (New Brunswick, Германия) при 180 об/мин. В качестве контроля использовали колбы со средой ONR7a без внесения культуры.

### 2.7.2 Оценка биодеструкции УВ

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 см<sup>3</sup>/мин, объём вводимой пробы – 1 мм<sup>3</sup>. 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 биодegradации УВ рассчитывали по соотношениям  $\frac{Pr}{n-C_{17}}$ ,  $\frac{Ph}{n-C_{18}}$ ,  $\frac{MN}{MP}$ ,  $\frac{MN}{DMN+TMN}$ ,  $\frac{1,6DMN}{1,5DMN}$ ,  $\frac{1,3,6TMN}{1,2,4DMN}$ , где *Pr* – пристан, *Ph* – фитан, *MN* – метилнафталены, *MP* – метилфенантрены, *DMN* – диметилнафталены, *TMN* – триметилнафталены.

## 2.8 Количество исследованных образцов

В ходе настоящего исследования был осуществлён отбор и проведено секвенирование участка V4 гена 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 (таблица 1). Было выделено 44 штамма УВОБ, для 29 проведена идентификация по гену 16S рРНК, для 6 – полногеномное секвенирование; для 7 культур была оценен спектр используемых УВ.

Таблица 1. Количество исследованных образцов придонной воды, донных отложений, накопительных и чистых культур

Природные образцы			
Баренцево море		Печорское Море	
<b>27</b>		<b>16</b>	
Накопительные культуры			
Получено	Секвенирование		
	V4 16S рРНК	Метагеномное	
<b>125</b>	<b>119</b>	<b>7</b>	
Чистые культуры			
Получено	Секвенирование		Оценка спектра деструкции УВ
	16S рРНК	Полногеномное	
<b>44</b>	<b>29</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ<sup>1</sup>

### 3.1 Характеристика исследованных образцов воды и донных отложений

В ходе экспедиций TTR-19, TTR-20 НИС «Академик Николай Страхов» в Баренцево море, август 2020 г., сентябрь-октябрь 2021 г. и ИС «Картеш» в Печорское море было отобрано и проанализировано 43 образца придонной воды и донных отложений.

Придонная вода Баренцева моря характеризовалась соленостью около 34‰, а температура составляла от 0 до 3°C. Донные отложения из Баренцева моря представляли собой песчанистые алевроитовые глины, температура поднятого на борт судна керна варьировалась от 3,5 до 4°C. Придонная морская вода Печорского моря характеризовалась солёностью от 32,5 до 33,6 ‰ и температурой от 3,2 до 4,2 °C.

### 3.2 Исследование природных микробных сообществ воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей<sup>1</sup>

Для 20 проб придонной воды и 7 проб донных отложений Баренцева моря, а также для 8 проб придонной воды и 8 проб донных отложений Печорского моря был проведен анализ состава микробных сообществ.

Анализ альфа-разнообразия (индекс Chao1, ANOVA, p-value 0,034) исследуемых микробных сообществ показал, что в донных отложениях и морской воде Баренцева моря уровень альфа-разнообразия прокариот выше, чем в аналогичных образцах из Печорского моря (рисунок 12).

---

<sup>1</sup> Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

1. Stroeve 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. — V. 12, № 2. — P. 387.

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. [Pyrkin V.O., Gavirova L.A., Stroeve 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. — V.93. № 3. — PP. 344–348

3. Pyrkin V.O., Gavirova L.A., Stroeve 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. — V.94, №5. — PP. 676–683.

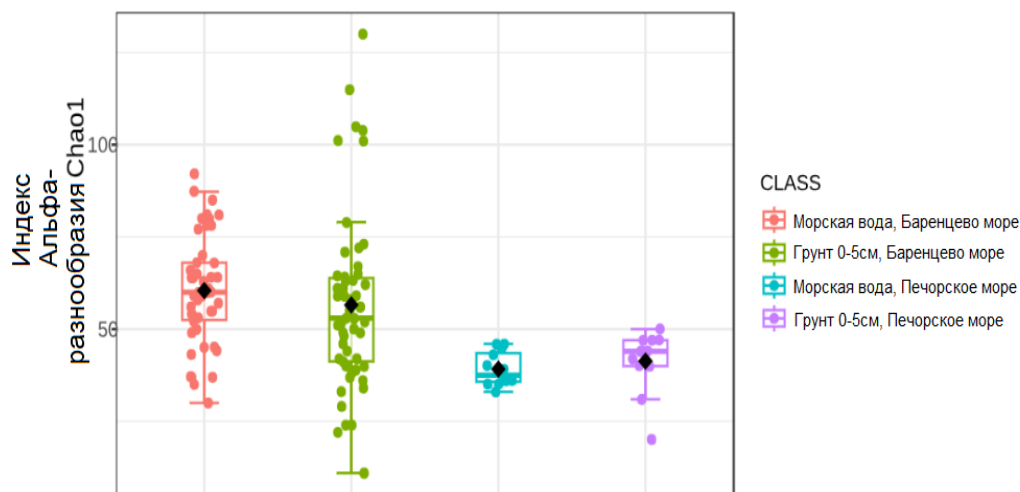


Рисунок 12. Уровень альфа-разнообразия в образцах донных отложений и придонной воды Баренцева и Печорского морей, индекс Chao1, ANOVA, p-value 0,034.

### 3.2.1 Микробные сообщества придонной воды Баренцева моря

Микробное сообщество придонной воды Баренцева моря было представлено археями *Nitrosopumilus*, гетеротрофными бактериями родов *Colwellia*, *Luteolibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Neptunomonas*, *Polaribacter*, *Woeseia*, некультивируемыми бактериями Clade Ia (*Pseudomonadota*), *Candidatus Thioglobus*, SAR92 clade (*Pseudomonadota*), SEEP\_SRB1 (*Desulfobacterota*), Sva0081 sediment group (*Thermodesulfobacteriota*), BD7-8 (*Pseudomonadota*), Gammaproteobacteria\_Incertae\_Sedis (*Pseudomonadota*), Sva1033(*Desulfobacterota*), NB1j и неклассифицированными представителями семейств *Desulfobulbaceae*, *Nitrincolaceae* и *Sandaracinaceae*.

Доминирующие позиции в составе сообщества занимали *Neptunomonas* (от 6,4 до 50%), *Ca. Thioglobus*, *Pseudomonadota*; от 1,8 до 15,5%), *Nitrosopumilus* (от 1,6 до 13,9%), неидентифицированные представители семейства *Nitrincolaceae* (от 2 до 13,3%), морские органогетеротрофы *Polaribacter* (от 1,2 до 12,6%), *Luteolibacter* (от 1,2 до 11%), Clade Ia (*Pseudomonadota*) (от 1,7 до 10,6%, некультивируемые сульфатредукторы *Sva0081\_sediment\_group* (*Desulfobacterota*) (от 1,1 до 9,8%), (рисунок 13)

### 3.2.2 Микробные сообщества донных отложений Баренцева моря

Микробные сообщества донных отложений Баренцева моря характеризовались присутствием гетеротрофных бактерий родов *Woeseia*, *Psychrilyobacter*, *Psychromonas*, хемолитоавтотрофных бактерий, относящихся к родам *Sulfurimonas* и *Mariprofundus*, некультивируемых бактерий SEEP\_SRB1 (*Desulfobacterota*), Sva0081 sediment group (*Thermodesulfobacteriota*), Sva1033 (*Desulfobacterota*), неклассифицированных представителей филума *Bacteroidota*, классов *Alphaproteobacteria*, *Desulfuromonadia*, *Gammaproteobacteria*, *Thermodesulfovibrionia*, порядка *Desulfobulbales*, семейств *Anaerolineaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Hyphomicrobiaceae*.

В числе доминирующих групп были неидентифицированные бактерии семейств *Hyphomicrobiaceae* (от 7,4 до 22,3%), *Desulfocapsaceae* (от 4,2 до 8,1%), *Desulfobulbaceae* (от 1,4 до 5,9%), а также некультивируемых представителей Sva0081 sediment group (*Desulfobacterota*; от 2,3 до 10%) (рисунок 14).

### 3.2.3 Микробные сообщества придонной воды Печорского моря

Микробные сообщества придонной воды Печорского моря были представлены гетеротрофными бактериями рода *Amylibacter*, *Planktomarina*, *Polaribacter*, *Oceanicoccus*, *Yoonia*, *Loktanella*, *Formosa*, *Sulfitobacter*, некультивируемыми бактериями Clade Ia (*Pseudomonadota*), NS5 marine group (*Bacteroidota*), OM43 clade (*Pseudomonadota*), OM60(NOR5) clade (*Pseudomonadota*), SAR92 clade (*Pseudomonadota*), *Ca. Thioglobus*, OM184 clade (*Pseudomonadota*), SAR86 clade (*Pseudomonadota*), неклассифицированными представителями семейств *Cryomorphaceae*, *Methylophagaceae*, *Nitrincolaceae* (рисунок 15).

В сообществах доминировали некультивируемые бактерии OM60(NOR5) clade (*Pseudomonadota*) (от 3 до 23,8% во всех исследованных образцах), неидентифицированные представителями семейства *Nitrincolaceae* (от 14 до 21,8%) и *Amylibacter* (от 12,8 до 16,6%) (рисунок 15).

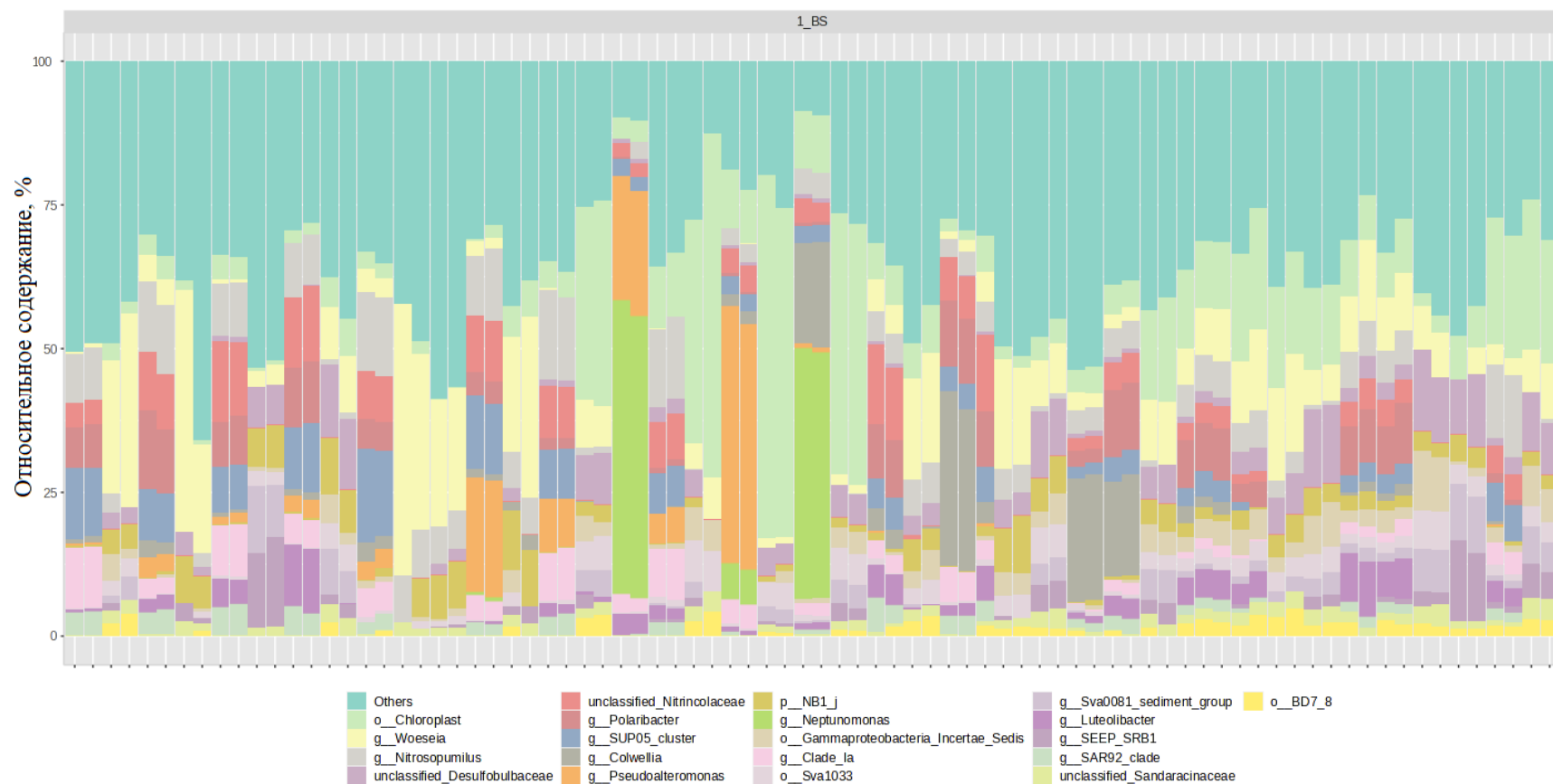


Рисунок 13. Состав микробных сообществ придонной воды Баренцева море, на основании результатов профилирования варибельных участков V4 гена 16S рРНК.

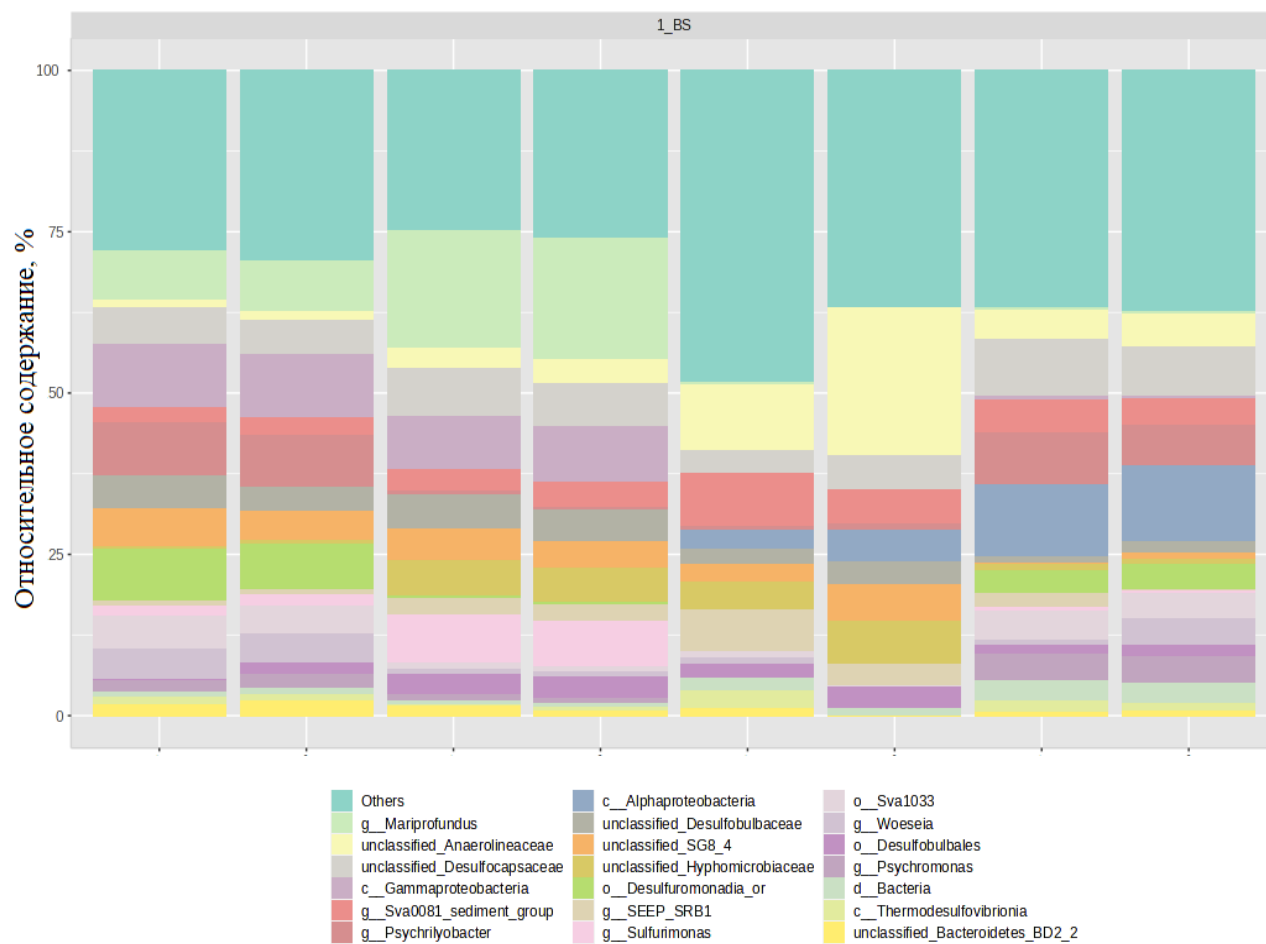


Рисунок 14. Состав микробных сообществ донных отложений Баренцева моря, на основании результатов профилирования переменных участков V4 гена 16S рРНК.

### 3.2.4 Микробные сообщества донных отложений Печорского моря

Микробные сообщества донных отложений Печорского моря были представлены гетеротрофными бактериями *Ilumatobacter*, *Lutimonas*, *Rubritalea*, *Woeseia*, хемолитоавтотрофными бактериями *Nitrospira*, *Sulfurovum*, метанотрофными *Methyloceanibacter*, некультивируемыми бактериями BD7-8 (*Pseudomonadota*), Gammaproteobacteria Incertae Sedis (*Pseudomonadota*), NB1j, Sva1033 (*Desulfobacterota*), Sva0996 marine group (*Desulfobacterota*), SEEP SRB1 (*Desulfobacterota*), SEEP SRB4 (*Desulfobacterota*), неклассифицированными представителями порядка *Actinomarinales*, семейств *Desulfobulbaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Desulfosarcinaceae*, *Microtrichaceae*, *Sandaracinaceae*.

При этом в донных отложениях Печорского моря доминировали миксобактерии из семейства *Sandaracinaceae* (от 7,5 до 26,7%), органогетеротрофные бактерии рода *Woeseia* (от 2,4 до 24%) и неклассифицированные *Actinomarinales* (от 4,5% до 10%) (рисунок 16).

### 3.2.5 Сравнение коровых микробиомов придонной воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей

Коровым микробиомом считается совокупность микроорганизмов, присутствующая в значительной доле образцов определенного типа. Многие исследователи определяют состав корового микробиома, как перечень таксонов, которые содержатся, как минимум, в 30% образцов соответствующего типа (Ainsworth et al., 2015; Sweet et al., 2017).

Для определения коровых микробиомов придонной воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей были отобраны таксоны уровня рода, которые встречаются не менее чем в 30% образцов соответствующего типа и происхождения, с относительной численностью не менее 5%. Все исследуемые коровые микробиомы включали в себя от 5 до 6 таксонов и существенно различались между собой.

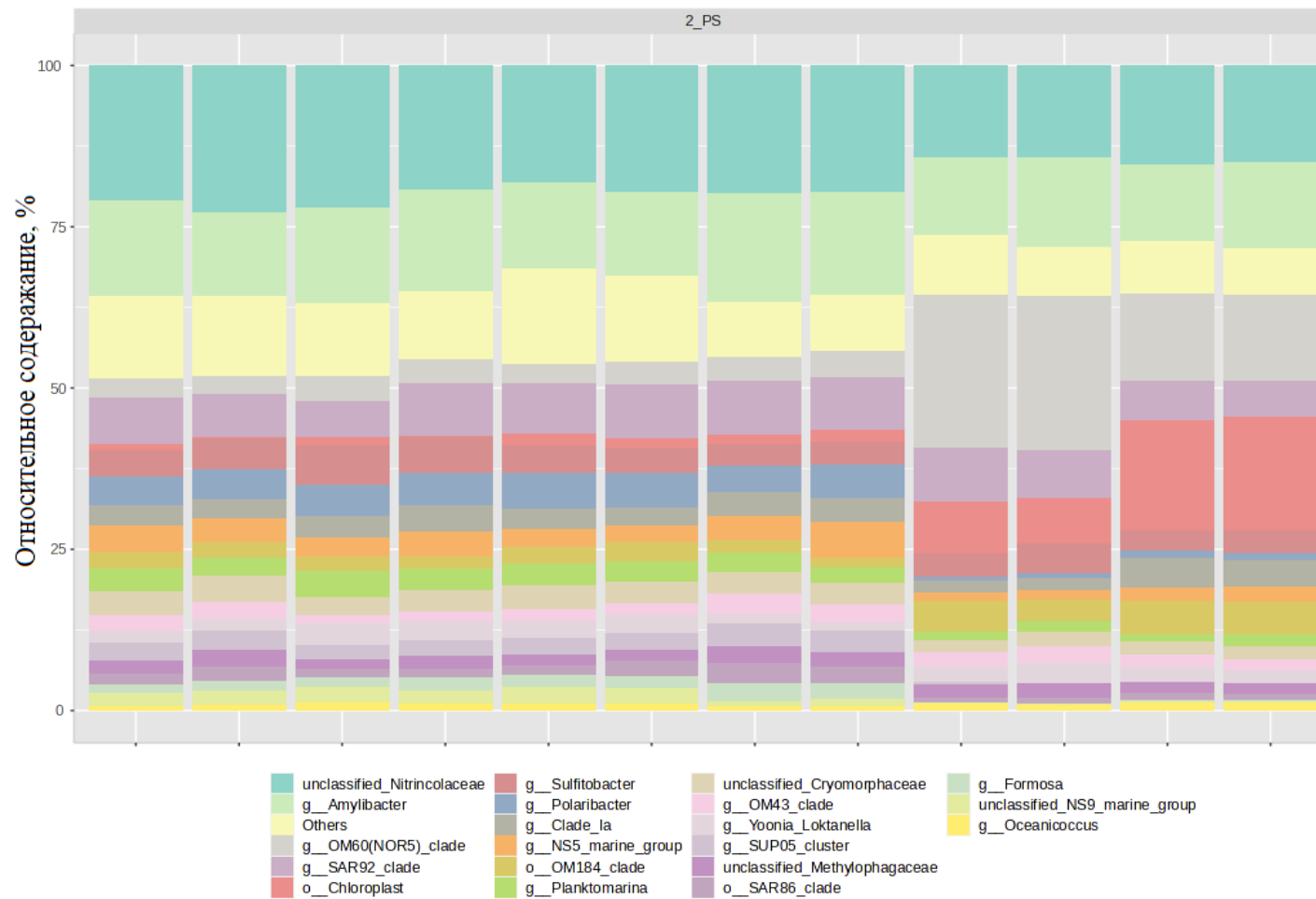


Рисунок 15. Состав микробных сообществ придонной воды отложений Печорского моря, на основании результатов профилирования переменных участков V4 гена 16S рНК.

Коровый микробиом морской воды Баренцева моря (рисунок 17а) состоял из 6 таксонов, среди которых были неидентифицированные представители семейства *Nitrincolaceae*, кластера *Candidatus Thioglobus* (SUP05 cluster) и клады Clade Ia, а также морские гетеротрофы родов *Polaribacter* и *Luteolibacter* и литоавтотрофные археи рода *Nitrosopumilus*. Коровый микробиом образцов донных отложений Баренцева моря (рисунок 17б) также включал в себя 5 групп бактерий: род *Woeseia*, неидентифицированные сульфатредуцирующие бактерии семейства *Desulfobulbaceae* и Sva0081 sediment group, а также представители некультивируемых порядков NB1j и Sva1033.

Коровый микробиом придонной морской воды Печорского моря (рисунок 17в) состоял из представителей 6 таксонов: неидентифицированных членов семейства *Nitrincolaceae*, органогетеротрофных бактерий родов *Amylibacter* и *Polaribacter*, а также бактериями некультивируемых групп SAR86, SAR92 и Clade Ia.

Коровый микробиом донных отложений Печорского моря также состоял из представителей 7 таксонов (рисунок 17г): неклассифицированных миксобактерий семейства *Sandaracinaceae*, органогетеротрофных бактерий рода *Woeseia*, метилотрофных бактерий рода *Methyloceanibacter*, неидентифицированных представителей семейства *Desulfobulbaceae* и порядков Sva1033 и BD7-8.

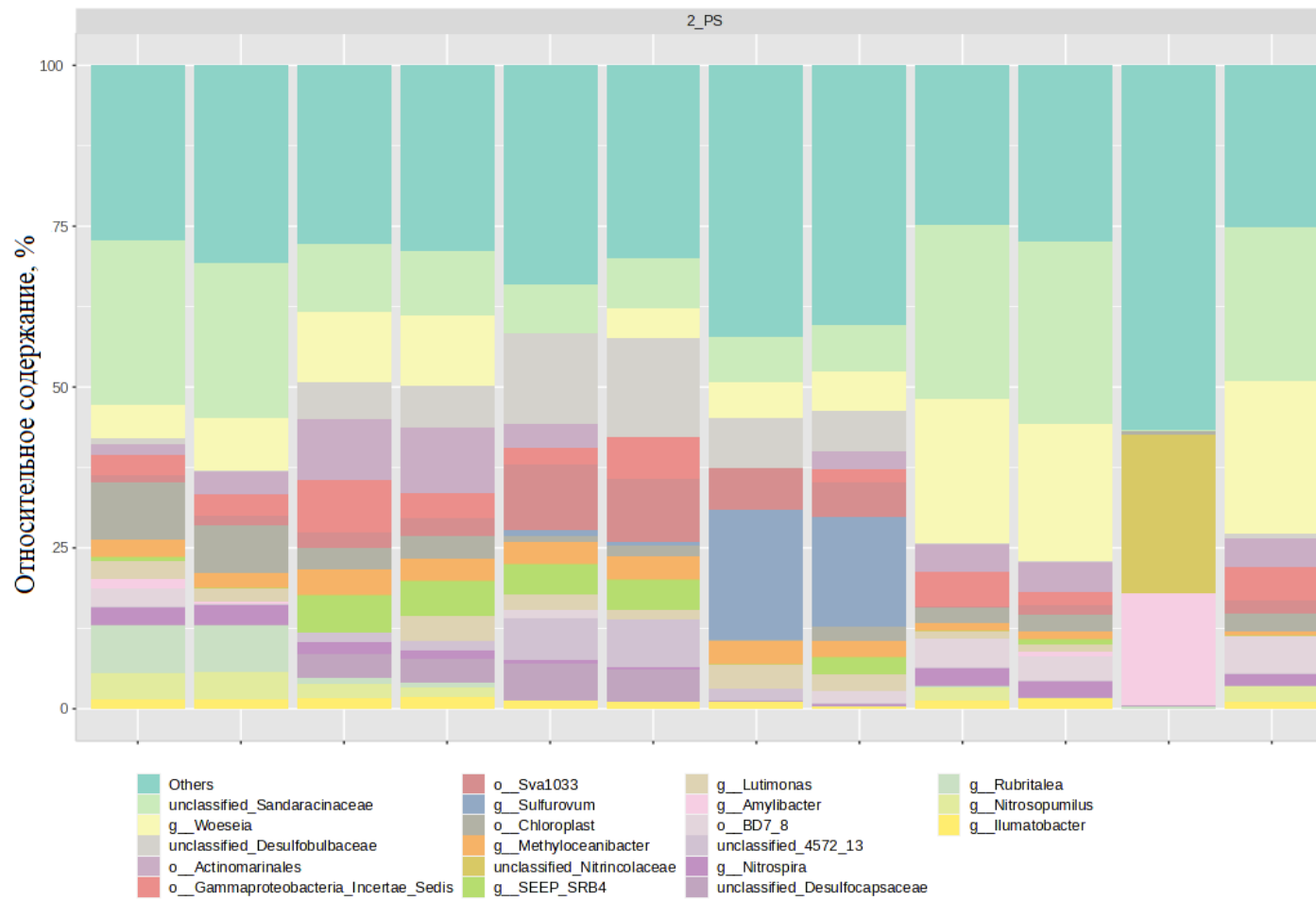


Рисунок 16. Состав микробных сообществ донных отложений Печорского моря, на основании результатов профилирования переменных участков V4 гена 16S рНК.

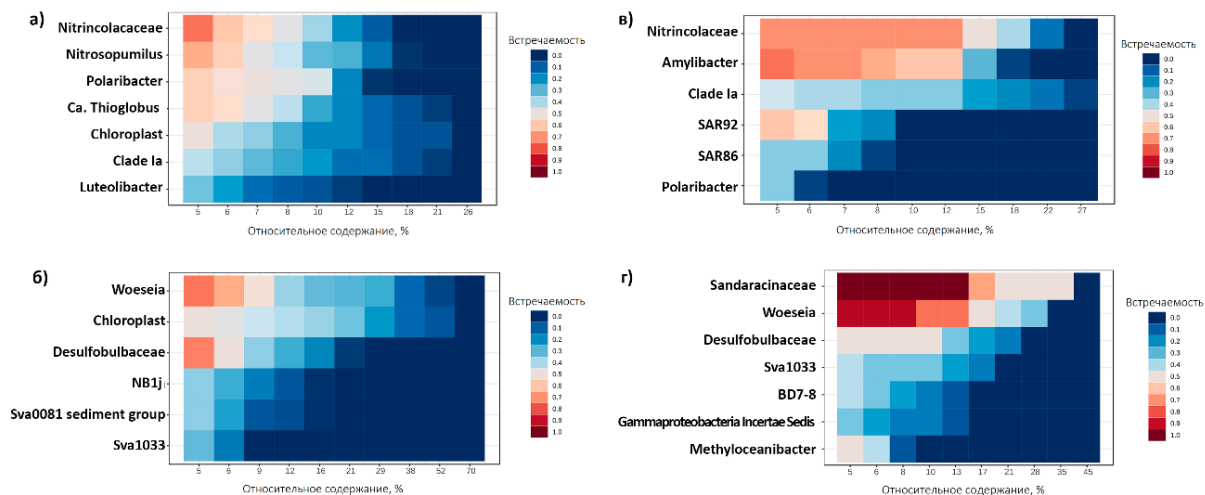


Рисунок 17. Коровые микробиомы придонной воды (а, в) и донных отложений (б, г) Баренцева (а, б) и Печорского (в, г) морей.

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

Было получено 125 накопительных культур, причем в 42 из них источником углерода и энергии являлась сырая нефть, в 52 – индивидуальные УВ, а 31 являлись биологическими и химическими контролями. Для получения накопительных культур было поставлено три эксперимента, которые различались между собой по инокуляту, среде и вносимым УВ субстратам. 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.

#### 3.3.1. Анализ микробных сообществ накопительных культур УВ-окисляющих микроорганизмов, полученных из придонной воды Баренцева моря

В результате инкубации образцов придонной воды в присутствии нефти в качестве единственного источника углерода и энергии в течение 30 дней было получено 26 накопительных культур. Контролем служили

результаты NGS профилирования образцов морской воды, использованных в качестве инокулята.

Из рисунка 18 видно, что самыми распространенными таксонами в накопительных культурах являются роды *Pseudoalteromonas* и *Pseudomonas*, содержание которых в некоторых образцах достигает 75%. В меньшем процентном соотношении (до 50%), но также в большинстве накопительных культур присутствовали бактерии родов *Oleispira* и *Psychrobacter*. В меньшей части образцов присутствовали бактерии родов *Colwellia* и *Shewanella* (до 30 и 75%, соответственно). Полученные результаты подтверждаются композитным анализом (ANCOM-BC), p-value < 0,01 (рисунок 19).

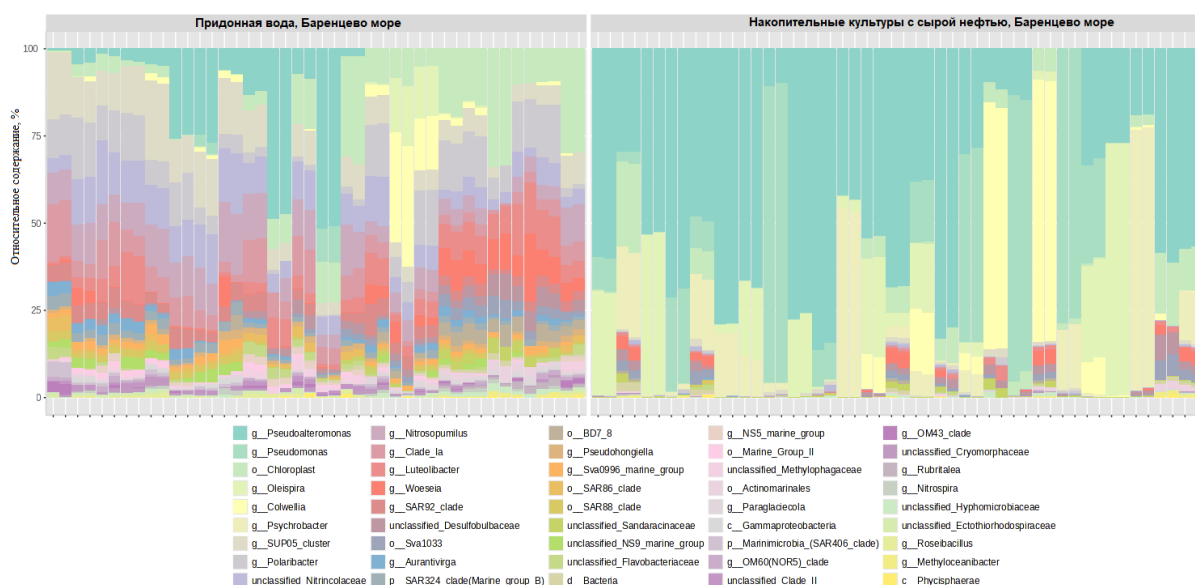


Рисунок 18. Микробный состав придонной воды Баренцева моря и накопительных культур с сырой нефтью, полученных из воды Баренцева моря, на основании результатов NGS профилирования сообществ по переменным участкам гена V4 16S рРНК; каждый образец представлен в двукратной повторности.

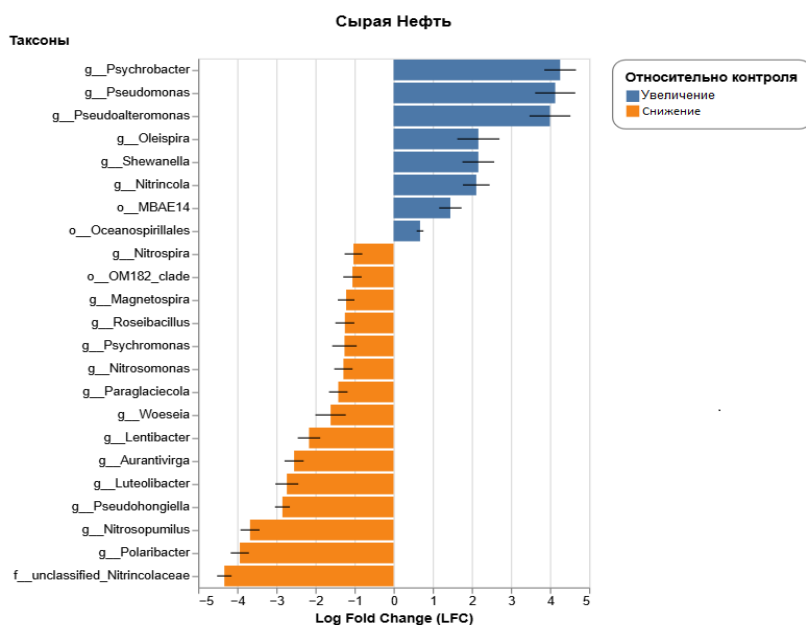


Рисунок 19. Результаты композитного анализа (ANCOM-BC) таксономического состава микробных сообществ в накопительных культурах с сырой нефтью, полученных из воды Баренцева моря, в сравнении с природными образцами морской воды того же региона,  $p$ -value < 0,01.

### 3.3.2. Анализ микробных сообществ накопительных культур УВОБ придонной морской воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей

В результате совместного внесения в среду придонной воды и донных отложений Баренцева и Печорского морей и двух последовательных пересевов было получено и затем проанализировано 12 накопительных культур, развивающихся в присутствии сырой нефти, 32 – в присутствии индивидуальных УВ и 26 контрольные культуры при времени инкубации 7 дней. В качестве индивидуальных УВ были выбраны *n*-нонан ( $C_9H_{20}$ ) как представитель нормальных алканов с длиной цепи до 10 атомов углерода, *n*-ундекан ( $C_{11}H_{24}$ ) как линейный алкан с длиной углеродной цепи более 10 атомов, и ПАУ фенантрен.

### 3.3.2.1 Микробные сообщества накопительных культур УВОБ придонной морской воды и донных отложений Баренцева моря

Сообщества, развивавшиеся из образцов Баренцева моря в присутствии УВ, имели схожий состав с контрольными культурами, за исключением увеличения в присутствии нефти относительного содержания неклассифицированных членов семейства *Pseudomonadaceae* - от 14% в контроле до 50% в опыте. Увеличение доли этих организмов относительно контроля, отмечалось и на втором этапе культивирования. Во втором контроле относительное содержание *Pseudomonadaceae* достигало 46%, а при добавлении *n*-нонана и *n*-ундекана 98% и 97% соответственно (рисунок 20). Накопительные культуры с *n*-нонаном также характеризовались увеличением доли бактерий родов *Halioglobus* до 76%, *Oceanicoccus* до 33%, *Limnobacter* до 55%, которые либо не обнаруживались в контрольных образцах, либо присутствовали в достаточно низком относительном количестве, в случае *Oceanicoccus* - 3%. При использовании *n*-ундекана, также наблюдалось увеличение *Halioglobus* до 12%, *Oceanicoccus* до 21% и *Limnobacter* до 44%, а в одном образце отмечалось увеличение ранее нами не встречаемого, рода бактерий *Paraperlucidibaca* от 2% в контроле до 71% в опыте. Добавление фенантрена привело к доминированию бактерий родов *Porticoccus* до 64% в опытных образцах, при отсутствии этих бактерий в контроле.

Отчасти полученные результаты согласуются с результатом ANCOM-BS,  $p\text{-value} < 0,01$ : при использовании *n*-нонана увеличивается доля *Halioglobus* и неклассифицированных членов семейства *Pseudomonadaceae*, добавление *n*-ундекана приводило к увеличению доли *Pseudomonadaceae*, а фенантрена – *Porticoccus* (рисунок 21). Однако в случае микробных сообществ, развивающихся на сырой нефти, достоверных различий с контролями этим методом обнаружено не было.

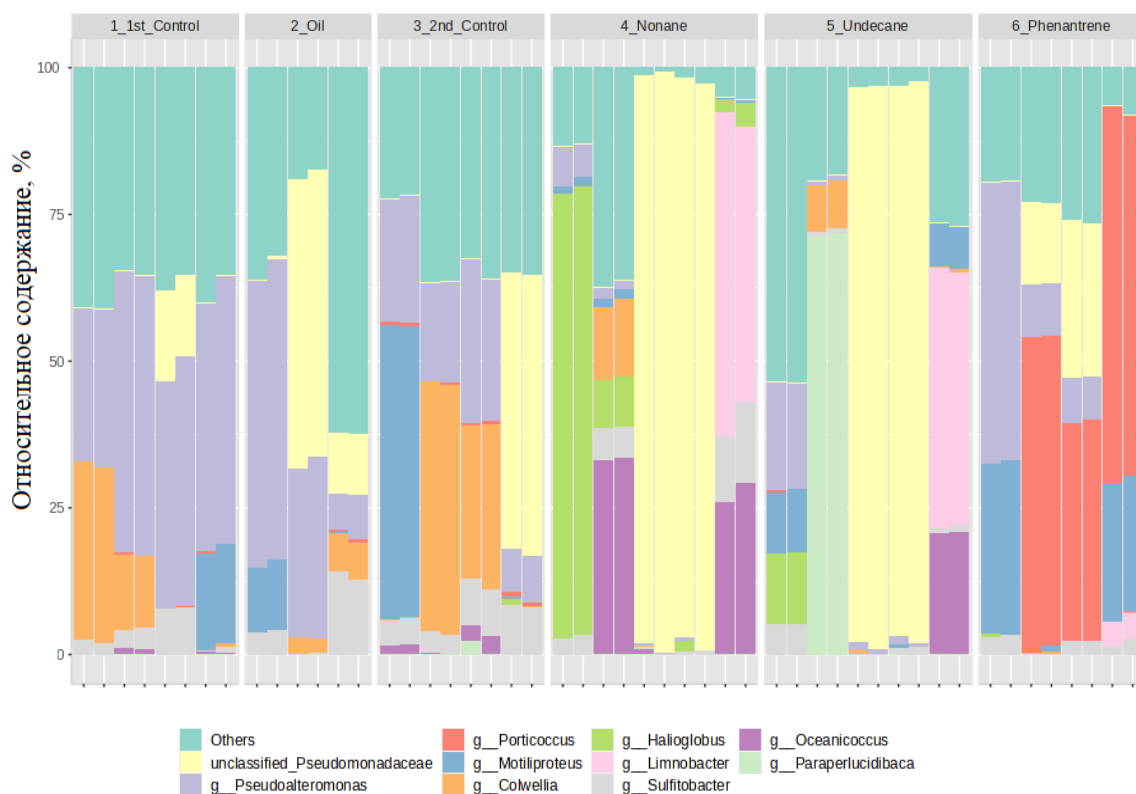


Рисунок 20. Таксономический состав накопительных культур Баренцева моря на основании результатов NGS профилирования сообществ по варибельным участкам гена V4 16S рРНК. 1\_1st\_control – первый контроль, 2\_Oil - накопительные культуры с сырой нефтью, 3\_2nd\_Control – второй контроль, 4\_Nonane - накопительные культуры с *n*-нонаном, 5\_Undecane – накопительные культуры с *n*-ундеканом, 6\_Phenanthrene – накопительные культуры с фенантреном. Каждый образец представлен в двухкратной повторности.

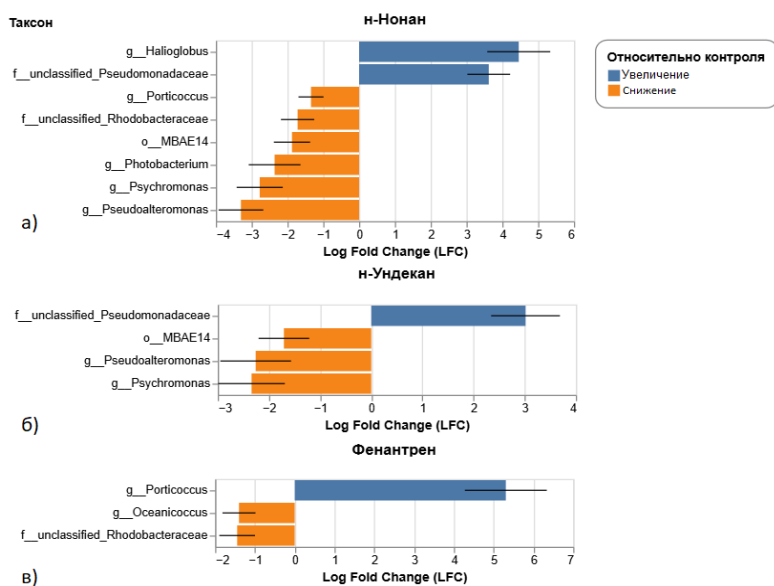


Рисунок 21. ANCOM-BC накопительных культур Баренцева моря с индивидуальными УВ,  $p\text{-value} < 0,01$ , QIIME.

### 3.3.2.2 Микробные сообщества накопительных культур УВОБ из проб придонной воды и донных отложений, отобранных в районе НМ Печорского моря

При исследовании сообществ УВОБ из образцов Долгинского и Приразломного НМ, полученных в присутствии *n*-нонана, *n*-ундекана и фенантрена, достоверных различий в таксономической структуре между НМ выявлено не было. В связи с отсутствием статистически значимых различий, дальнейший анализ таксономического состава проводился на объединенной выборке без разделения по НМ.

При засеве среды с УВ образцами из Печорского моря, представляющими собой смесь придонной воды и донных отложений, во всех накопительных культурах доминировали бактерии рода *Psychrobacter* (рисунок 22). Следует отметить, однако, что в контрольных средах их содержание было также значительным и в некоторых случаях даже превышало опытные образцы - до 90% в контроле и до 46% в экспериментах с нефтью. Также в присутствии нефти доминирующую позицию занимали роды *Dietzia* до 23% и *Hyphomonas* до 14%.

Микробные сообщества, полученные при пересеве с нефти на *n*-нонан и *n*-ундекан имели общие доминирующие таксоны, таких как *Rhodococcus* - до 29%, *Dietzia* - до 26% и *Hyphomonas* - до 44%; в контролях представители этих родов отсутствовали. В случае использования фенантрена отмечалось увеличение доли неклассифицированных представителей семейства *Sphingomonadaceae* до 47 %; роды *Dietzia* и *Hyphomonas* также оставались доминирующими, а процентное соотношение *Rhodococcus* снижалось по сравнению с вариантами при внесении алканов (до 2%). Бактерии рода *Sphingorhabdus* присутствовали как в контрольных образцах (до 36%), так и в опытных (до 73% в случае *n*-нонана и до 49% при добавлении *n*-ундекана); в накопительных культурах

с фенантреном в качестве единственного источника углерода и энергии относительное количество представителей этого рода снижалось до 15%.

Результаты ANCOM-BC подтверждают увеличение доли *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Hyphomonas* в случаях использования УВ субстрата. Этот подход выявил также изменение относительной представленности таких таксонов, как *Arthrobcater* (сырая нефть), *Cereibacter* (сырая нефть, *n*-ундекан), *Marinobacter* (сырая нефть, *n*-нонан, *n*-ундекан), *Janibacter* (*n*-нонан, *n*-ундекан), *Paracoccus* (сырая нефть, *n*-нонан, *n*-ундекан), *Halomonas* (сырая нефть, *n*-нонан, *n*-ундекан) и некоторых других (рисунок 23).

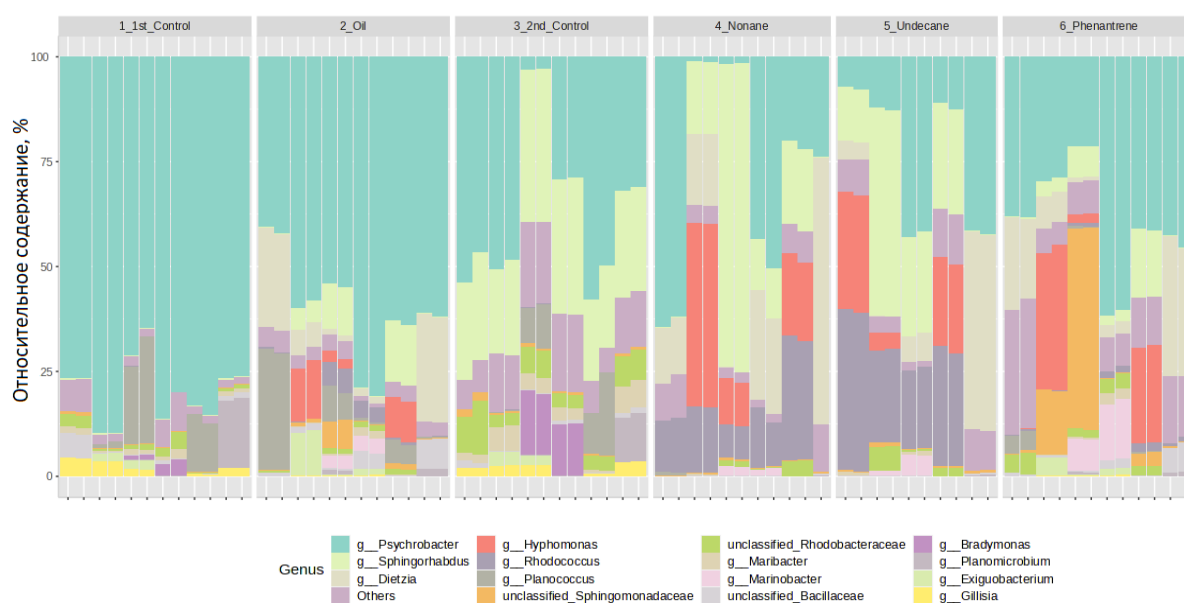


Рисунок 22 Таксономический состав накопительных культур Печорского моря на основании результатов NGS профилирования сообществ по переменным участкам V4 гена 16S рРНК. 1\_1st\_control – первый контроль, 2\_Oil – накопительные культуры с сырой нефтью, 3\_2nd\_Control – второй контроль, 4\_Nonane – накопительные культуры с *n*-нонаном, 5\_Undecane – накопительные культуры с *n*-ундеканом, 5\_Phenanthrene – накопительные культуры с фенантреном.

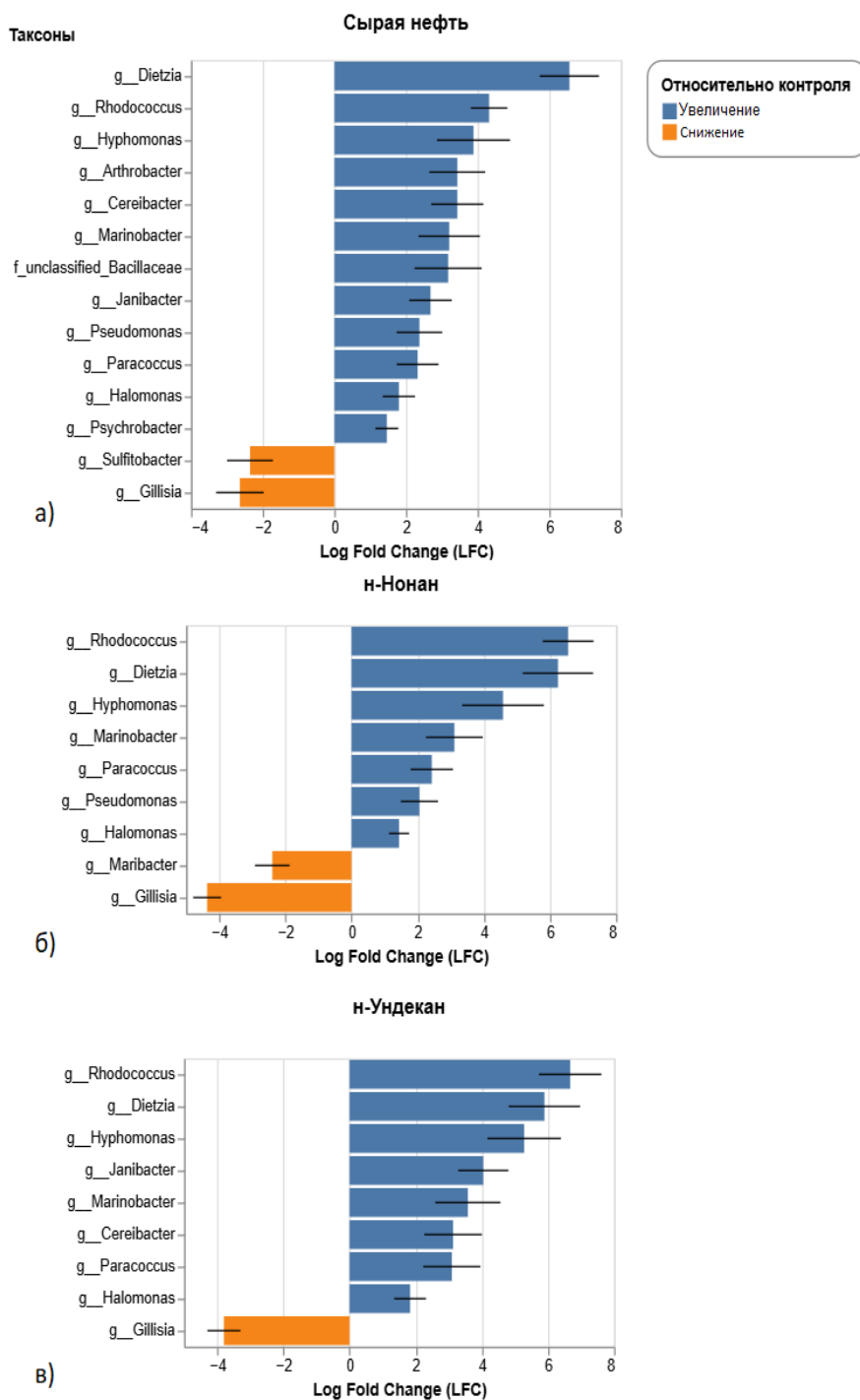


Рисунок 23. ANCOM-BC накопительных культур Печорского моря с сырой нефтью и индивидуальными УВ в качестве единственного источника углерода,  $p$ -value < 0,01, QIIME.

### 3.3.2.2.1 Анализ микробных сообществ УВОБ из донных отложений НМ Печорского моря в накопительных культурах с использованием расширенного спектра УВ

При использовании расширенного спектра УВ субстратов (*n*-октадекан, пристан, циклогексан, бифенил) были получены качественные и количественные различия в таксономической структуре сообществ УВОБ из исследуемых НМ. В ходе работы было получено 6 накопительных культур из донных отложений НМ Долгинское, состав которых был изучен с помощью NGS-профилирования гена 16S рРНК через 14 дней после второго пересева. На рисунке 24 представлены профили микробных сообществ, развивающихся в присутствии сырой нефти и индивидуальных УВ как единственных источников углерода и энергии. В качестве контроля приводится состав микробных сообществ, развивающихся на той же среде без энергетического субстрата.

Во всех накопительных культурах, полученных из образцов осадков из района Долгинского НМ, включая контроль, в значительном количестве присутствовали бактерии рода *Psychrobacter*. Однако лишь в образце с бифенилом относительная доля *Psychrobacter* (86%) превышала таковую в контроле (60%). В накопительной культуре, полученной на сырой нефти, присутствовали бактерии родов *Janibacter* (23%) и *Altererythrobacter* (12%) и неидентифицированные бактерии семейства *Bacillaceae* (15%). В накопительной культуре, полученной с *n*-нонаном, наиболее представленными были бактерии родов *Rhodococcus*, *Sphingorhabdus* и *Planococcus* (35, 9 и 4% соответственно). В присутствии *n*-октадекана *Rhodococcus* вытеснялся представителями рода *Sphingorhabdus*. В среде с пристаном в сообществе появлялись неидентифицированные представители семейства *Rhodobacteraceae* (13%), *Nocardioides* (6%), *Rhodococcus* (6%) и *Maribacter* (3%). В среде с циклогексаном доминировали бактерии родов *Janibacter* (39%) и неидентифицированные

*Bacillaceae* (10%), которые в меньших долях присутствовали в сообществе, полученном на бифениле, на фоне абсолютного доминирования *Psychrobacter*.

Такая же серия накопительных культур на средах с УВ (за исключением циклогексана) была получена из образцов донных отложений, отобранных в районе Приразломного НМ (рисунок 24). В контрольной накопительной культуре основными компонентами были бактерии рода *Acinetobacter* (73%) и некультивируемые *Sphingomonadaceae* (24%), однако в присутствии сырой нефти их вытесняли *Janibacter* (51%) и неидентифицированные *Bacillaceae* (29%), что качественно соответствует результатам, полученным в тех же условиях для образцов группы Долгинское. *Psychrobacter* (67%) появлялся только в присутствии *n*-нонана, в то время как на среде с октадеканом 89% от всей микробной популяции составляли неидентифицированные *Sphingomonadaceae*. В обоих случаях в культуре присутствовали бактерии рода *Nocardioides*. В присутствии пристана и бифенила значительная доля в микробном сообществе приходилась на бактерии родов *Janibacter* (50 и 42%, соответственно) и *Nocardioides* (46 и 9%); в накопительной культуре с бифенилом обнаруживался еще и *Arthrobacter* (42%).

Таким образом, в накопительных культурах с внесением УВ наблюдалось значительное увеличение доли микроорганизмов, которые в исходных образцах составляли минорную часть сообщества. Состав микробных сообществ варьировал в зависимости от места отбора проб (НМ Долгинское или Приразломное), за исключением вариантов с сырой нефтью, где различия между образцами были минимальны. Среди наиболее часто встречающихся/массовых таксонов следует отметить рода *Janibacter*, *Nocardioides*, *Sphingorhabdus* и *Rhodococcus*. В накопительных культурах, полученных в присутствии УВ, значительную долю составляли также

некультивируемые микроорганизмы семейств *Sphingomonadaceae*, *Bacillaceae* и *Rhodobacteraceae*.

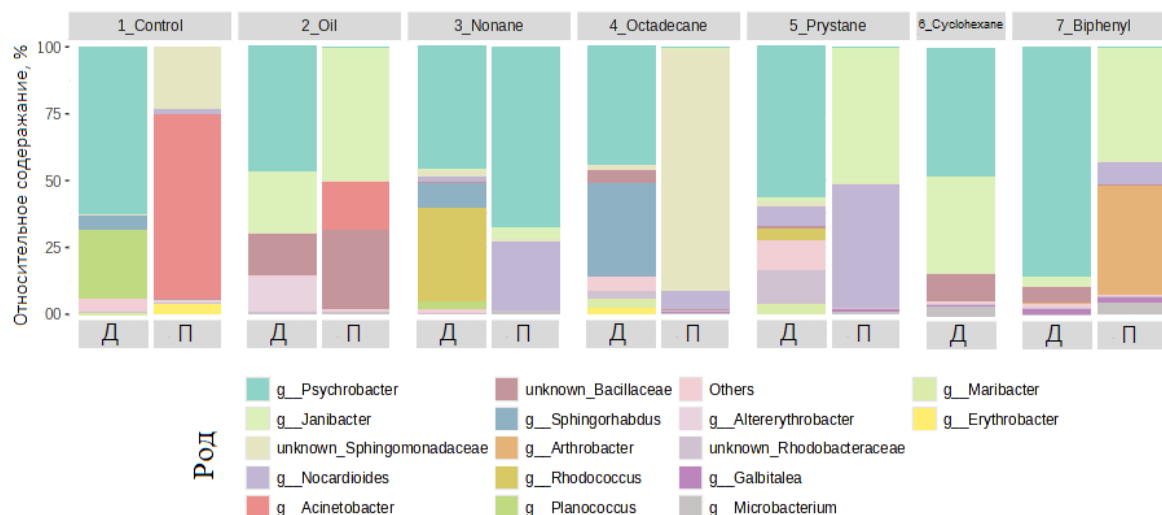


Рисунок 24. Таксономический состав микробных сообществ накопительных культур, полученных из донных отложений вблизи НМ Долгинское (Д) и Приразломное (П) на спектре УВ субстратов в качестве источников углерода и энергии, построенный на основании результатов NGS профилирования V4 региона гена 16S рРНК. 1\_Control – контроль, 2\_Oil – сырая нефть, 3\_Nonane - *n*-нонан, 4\_Octadecane – *n*-октадекан, 5\_Prystane – пристан, 6\_Cyclohexane – циклогексан, 6\_Biphenyl – бифенил.

Таким образом, в накопительных культурах из донных отложений НМ в присутствии расширенного спектра УВ появлялись микроорганизмы, ранее не присутствовавшие в накопительных культурах из Печерского моря (п. 3.3.2.2); при этом не было обнаружено представителей рода *Dietzia* и *Nurphomonas*. Такие расхождения объясняются различным составом инокулята в двух сериях накопительных культур из Печерского моря (придонная вода и донные отложения в первом случае и только донные отложения во втором).

За исключением сырой нефти, состав микробных сообществ в присутствии одних и тех же УВ был разным в образцах, отобранных вблизи разных НМ. Среди наиболее часто встречающихся/массовых таксонов следует отметить роды *Janibacter*, *Nocardioides*, *Sphingorhabdus*, *Rhodococcus*. Также в накопительных культурах, развивающихся в

присутствии УВ, значительную долю занимали некультивируемые микроорганизмы, представляющие семейства *Sphingomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Rhodobacteraceae*.

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

Для выявления ключевых таксонов бактерий, потенциально окисляющих УВ, был дополнительно проведен однофакторный анализ (ANOVA) результатов секвенирования гена 16S рРНК накопительных культур.

По результатам ANOVA была отмечена положительная связь наличия УВ субстрата с присутствием некоторых родов бактерий в сообществах накопительных культур (p-value от 2,80E-17 до 0,049; FDR < 0,01; F-статистика > 3,1). Значения p-value для каждого отдельного рода приведены в таблице 2. На основании результатов анализа был получен перечень родов бактерий, потенциально способных к росту за счет использования УВ субстратов, который включал *Rhodococcus*, *Porticoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, *Halioglobus*, *Oleispira*, *Microbacterium*, *Janibacter*, *Nocardioides*, *Arthrobacter*, неклассифицированные *Sphingomonadaceae*, *Leeuwenhoekiella*, неклассифицированные *Micrococcaceae*, *Parafrigoribacterium*, *Micrococcus*, *Erythrobacter*, *Altererythrobacter*, *Planococcus*, неклассифицированные *Flavobacteriaceae*.

Таким образом, по результатам ANOVA к перечисленным ранее родам, давшим значительный прирост относительной численности в присутствии УВ, добавилось еще несколько групп бактерий: роды *Demequina*, *Novosphingobium*, *Leeuwenhoekiella*, *Parafrigoribacterium*, *Micrococcus*, *Erythrobacter*, неклассифицированные *Flavobacteriaceae*. Содержание отдельных таксонов в накопительных культурах представлено

на рисунке 25. Увеличение относительной численности этих бактерий в присутствии УВ не было столь заметным, как у представителей родов, перечисленных в предыдущем разделе, однако статистически достоверным. Следует отметить, что инкубация накопительных культур в присутствии УВ субстратов занимала 7-14 дней, поэтому медленно растущие культуры не успели существенно увеличить численность, однако стимулирующее действие УВ на рост этих бактерий указывает на использование ими УВ как энергетических субстратов.

Таблица 2. Таксономическое положение бактерий, относительная численность которых в накопительных культурах достоверно возросла в присутствии УВ субстрата

Филум, класс	Род	УВ субстрат	P-value
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>n</i> -нонан, <i>n</i> -ундекан	$2,80 \times 10^{-17}$
<i>Pseudomonadota, Gammaproteobacteria</i>	<i>Porticoccus</i>	фенантрен	$2,85 \times 10^{-17}$
<i>Pseudomonadota, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	сырая нефть	$5,65 \times 10^{-14}$
<i>Pseudomonadota, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	сырая нефть, фенантрен	$3,09 \times 10^{-7}$
<i>Pseudomonadota, Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomonas</i>	<i>n</i> -нонан, <i>n</i> -ундекан, фенантрен	$1,09 \times 10^{-6}$
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Dietzia</i>	<i>n</i> -нонан, <i>n</i> -ундекан, фенантрен	$4,53 \times 10^{-6}$
<i>Pseudomonadota, Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingorhabdus</i>	<i>n</i> -нонан, <i>n</i> -ундекан, фенантрен	$3,40 \times 10^{-5}$
<i>Pseudomonadota, Gammaproteobacteria</i>	<i>Halioglobus</i>	<i>n</i> -нонан	$9,61 \times 10^{-5}$
<i>Pseudomonadota, Gammaproteobacteria</i>	<i>Oleispira</i>	сырая нефть	0,0001

<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Microbacterium</i>	циклогексан, бифенил	0,006
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Janibacter</i>	нефть,пристан, циклогексан, бифенил, фенантрен	0,0084131
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Nocardioides</i>	фенантрен, н-нонан, н-октадекан, бифенил, пристан	0,019
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Demequina</i>	пристан, циклогексан	0,024
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Arthrobacter</i>	фенантрен, бифенил	0,035
<i>Pseudomonadota, Alphaproteobacteria</i>	неклассифицированные <i>Sphingomonadaceae</i>	фенантрен, н-октадекан	0,04331
<i>Bacteroidota, Flavobacteriia</i>	<i>Leeuwenhoekella</i>	н-нонан	0,047
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	неклассифицированные <i>Micrococcaceae</i>	сырая нефть	0,047
<i>Pseudomonadota, Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>	пристан	0,047
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Parafrigoribacterium</i>	бифенил	0,047
<i>Actinomycetota, Actinomyces</i>	<i>Micrococcus</i>	н-нонан	0,048
<i>Pseudomonadota, Alphaproteobacteria</i>	<i>Erythrobacter</i>	н-октадекан	0,048
<i>Pseudomonadota, Alphaproteobacteria</i>	<i>Altererythrobacter</i>	сырая нефть	0,048
<i>Bacillota, Bacilli</i>	<i>Planococcus</i>	н-нонан	0,049
<i>Bacteroidota, Flavobacteriia</i>	неклассифицированные <i>Flavobacteriaceae</i>	н-октадекан	0,049

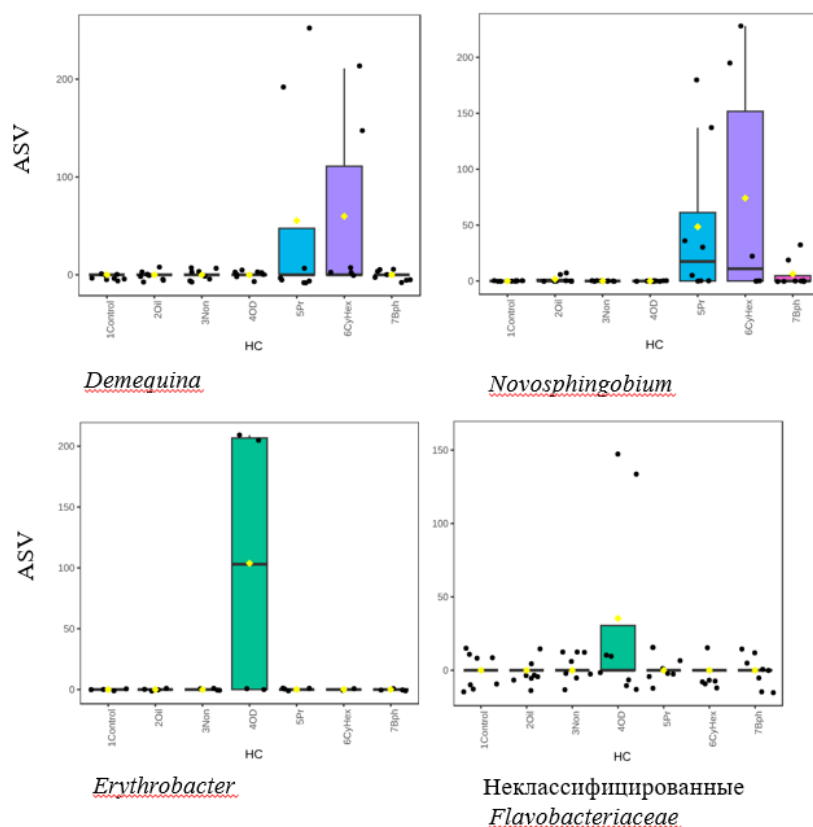


Рисунок 25. Количество прочтений ASV таксонов обнаруженных только при дисперсионном анализе в профилях накопительных культур по гену 16S рРНК.

### 3.3.4 Представленность ключевых УВ-окисляющих таксонов в придонной воде и донных отложениях Баренцева и Печорского морей

### 3.4 Анализ метагеномов накопительных культур, развивающихся в присутствии УВ

На основании результатов NGS профилирования V4 региона гена 16S рРНК 9 накопительных культур, различающихся по таксономическому составу, УВ субстрату и локации пробоотбора были выбраны для дальнейшего исследования с применением метагеномного секвенирования (таблица 3). В результате метагеномного анализа накопительных культур был собран 121 индивидуальный геном (MAG) с полнотой сборки от 63 до 100% и контаминацией не более 4%. Характеристика сборки метагеномов представлена в Приложении 1.



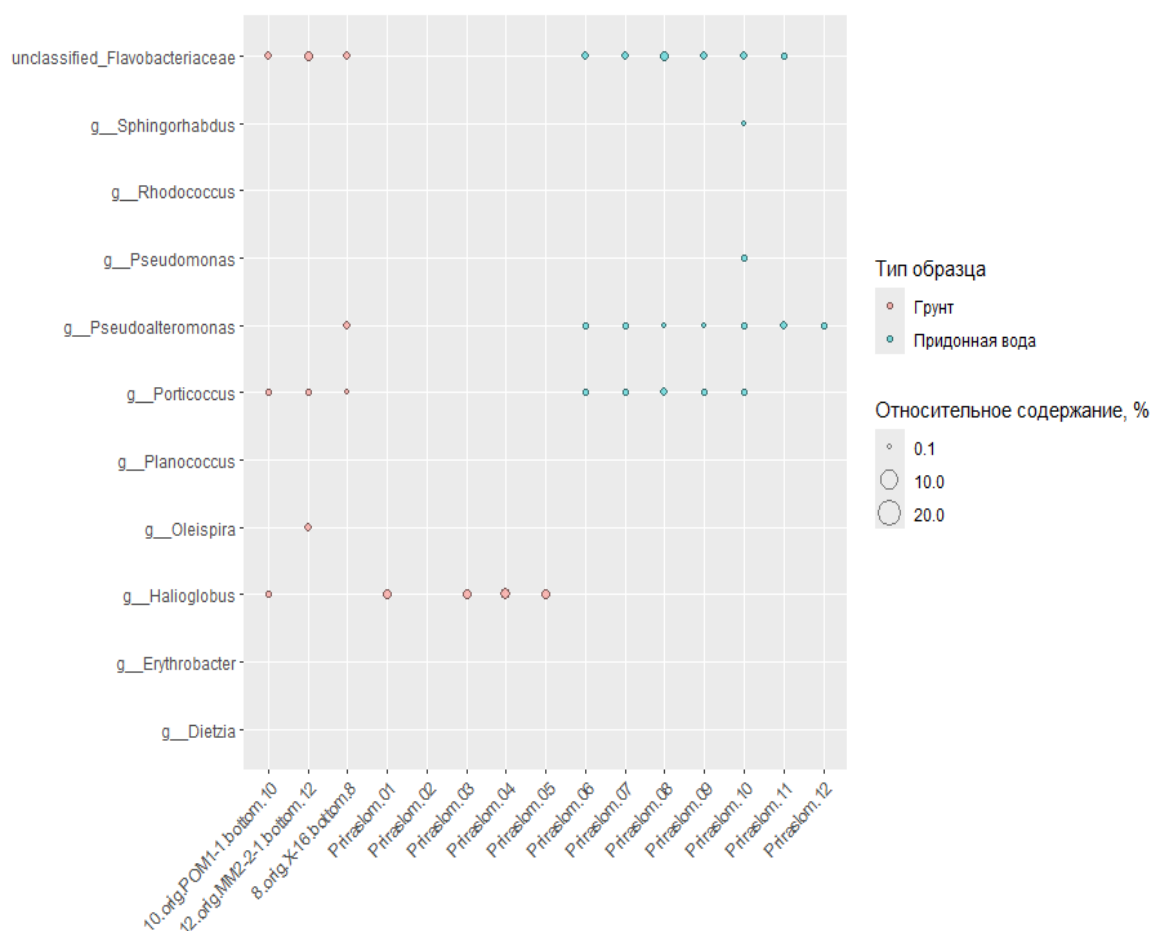


Рисунок 197. Содержание УВ-окисляющих таксонов в образцах придонной воды и донных отложениях Печорского моря.

Таблица 3. Метагеномы накопительных культур из образцов Баренцева и Печерского морей, использующих различные УВ

Метагеном	Инокулят	УВ субстрат	Представленность собранных MAG в сообществах
В9-О	Придонная вода Баренцева моря	сырая нефть	<i>Oleispira</i> (55%); <i>Shewanella</i> (10%); <i>Pseudoalteromonas</i> (9%); IMCC2047 ( <i>Pseudomonadales</i> , 9%)
В6-Н	Вода и донные отложения Баренцева моря	<i>n</i> -нонан	<i>Oceanicoccus</i> (39%); JAGPUQ01 ( <i>Porticoccaceae</i> ) (27%); JAHEGP01 ( <i>Pseudomonadales</i> , 11%); <i>Cognaticolwellia</i> (6%)
В1-У	Вода и донные отложения Баренцева моря	<i>n</i> -ундекан	<i>Limnobacter</i> (76%); <i>Oceanicoccus</i> (15%); <i>Parasphingorhabdus</i> (2%); <i>Motiliproteus</i> (1%)
Р2-У	Вода и донные отложения Печерского моря	<i>n</i> -ундекан	<i>Hyphomonas</i> (43%); <i>Rhodococcus</i> (16%); <i>Parasphingorhabdus</i> (13%); <i>Rhodococcus</i> (6%); <i>Aequorivita</i> (5%); <i>Dietzia</i> (4%); <i>Psychrobacter</i> (3%); <i>Paracoccus</i> (3%); <i>Maribacter</i> (2%); <i>Rhodoglobus</i> (1%)
В5-У	Вода и донные отложения Баренцева моря	<i>n</i> -ундекан	<i>Dietzia</i> (7%); JAGPUQ01 ( <i>Porticoccaceae</i> , 6%); <i>Halioglobus</i> (6%); <i>Sulfitobacter</i> (5%); JAHEGP01 ( <i>Pseudomonadales</i> , 5%); <i>Motiliproteus</i> (4%); <i>Pseudoalteromonas</i> (3%); <i>Halioglobus</i> (3%)

B7-PH	Вода и донные отложения Баренцева моря	фенантрен	<i>Porticoccus</i> 83%; <i>Halopseudomonas</i> (6%); <i>Pseudomonas</i> (5%); <i>Kiloniella</i> (3%); <i>Pseudoalteromonas</i> (2%)
B8-PH	Вода и донные отложения Баренцева моря	фенантрен	<i>Porticoccus</i> (77%); <i>Halopseudomonas</i> (15%); <i>Halomonas</i> (2%); <i>Pseudoalteromonas</i> (2%)

Полученные метагеномы анализировались на предмет наличия ферментов окисления УВ. Были обнаружены гены следующих ферментов: AbcA, AhyA, AlkB, AlmA, AssA, BssA, CmdA, CYP153, DmpO, DszC, EbdA, K27540, LadA, LadB, MAH, NdoC, NdoB, NmsA, non\_NdoB\_type, pBmoB, pBmoC, PrmA, PrmC, sBmoX, sBmoY, TmoB, TmoE, TomA (рисунок 28). Описание ферментов представлено в Приложении

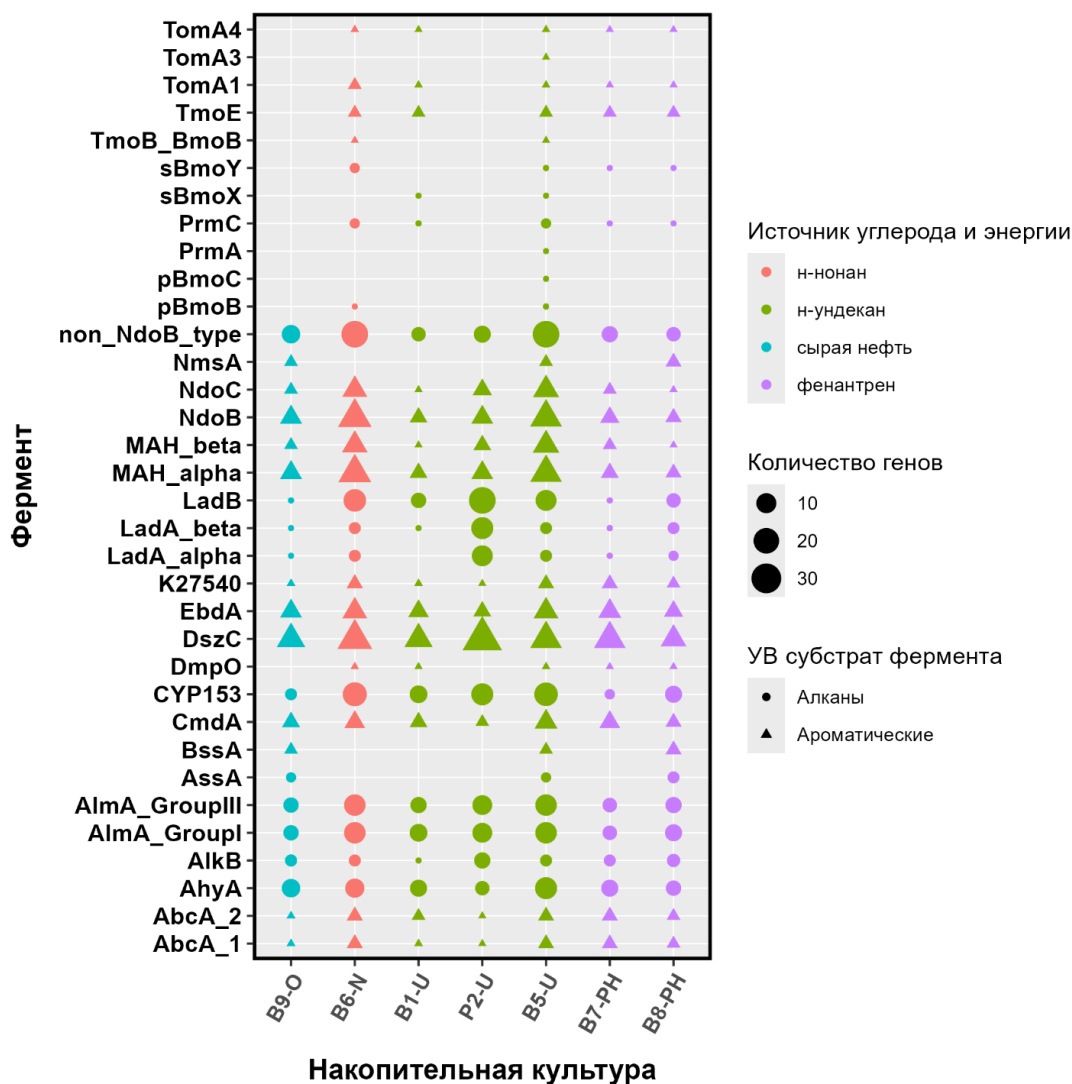


Рисунок 28. Наличие ферментов окисления УВ в метагеномах исследуемых накопительных культур.

### 3.4.1 Распределение ферментов окисления УВ в МАГ, собранных из метагеномов накопительных культур

Было изучено количественное распределение ферментов окисления УВ в МАГ из накопительных культур. Наибольшее количество ферментов было обнаружено в геномах накопительных культурах В6-Н и В5-У, где источниками углерода служили алифатические УВ. Наименьшее количество отмечалось в метагеноме накопительной культуры В8-РН.

При изучении метагеномов, несмотря на применение аэробного метода культивирования, были обнаружены ферменты анаэробного окисления УВ. Наибольшее количество гомологов ферментов анаэробного окисления УВ было отмечено в накопительных культурах В6-Н и В7-Н, где источниками углерода и энергии выступали *n*-ундекан и фенантрен, соответственно (рисунок 29).

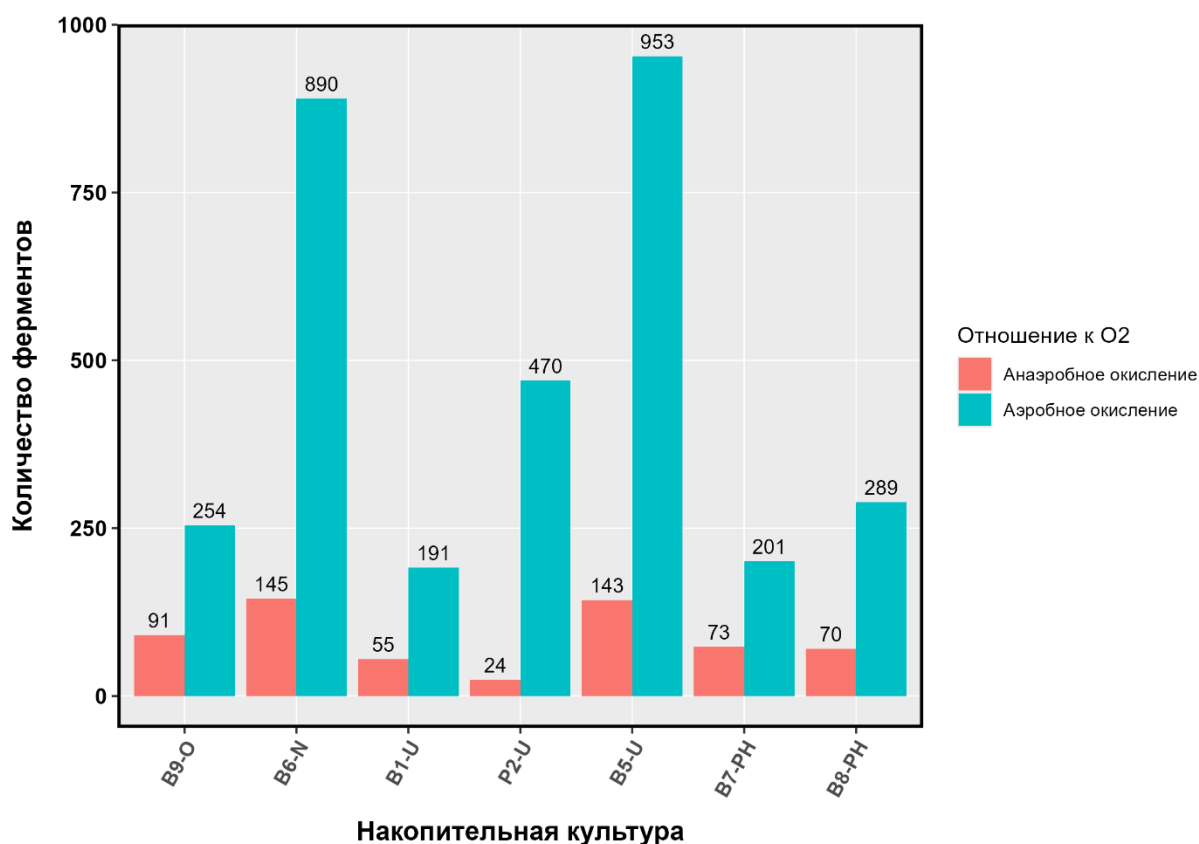


Рисунок 29. Количественное распределение гомологов ферментов аэробного и анаэробного окисления УВ в метагеномах накопительных культур, на основании базы данных SANT-HYD.

Ферменты анаэробного окисления УВ *AbcA*, *AhyA*, *CmdA*, *K27540* присутствовали во всех метагеномах, *AssA* - в накопительных культурах В9-О и В8-РН, а *BssA* только в В9-О, В5-У (рисунок 28).

Часть ферментов окисления УВ (TomA, TmoE, sVmoY, PrmA и DmpO) обнаруживались только в накопительных культурах Баренцева моря (рисунок 28).

### 3.4.2 Распределение ферментов окисления УВ в MAG

При исследовании MAG, собранных из метагеномов накопительных культур, было выяснено, что бактерии рода *Halioglobus* обладали наибольшим количеством гомологов ферментов окисления УВ. Бактерии этого рода присутствовали в накопительных культурах из Баренцева моря, полученных с использованием алканов (*n*-нонан и *n*-ундекан) в качестве источника углерода и энергии. Наименьшее количество исследуемых ферментов было отмечено в геноме *Aequorivita antarctica* - только CYP153 и DszC. *Aequorivita antarctica* присутствовала в накопительной культуре Печорского моря с *n*-ундеканом (таблица 3).

Ряд MAG из накопительных культур, использующих УВ, принадлежал бактериям, относящихся к считающимся некультивируемыми группам. Эти организмы в составе своих геномов также имели ферменты окисления УВ. Так, в геноме бактерии, принадлежащей к группе JAGPUQ01 (семейство *Porticoccaceae*), содержались гомологи ферментов AbcA, AhyA, AlkB, AlmA, CYP153, DmpO, DszC, EbdA, K27540, LadA, LadB, MАН, NdoB, NdoC, PrmC, TmoB, VmoB, TmoE, TomA, pVmoB, sVmoY (рисунок 30). Согласно анализу метагеномов, бактерии группы JAGPUQ01 присутствовали в накопительных культурах из Баренцева моря с *n*-нонаном и *n*-ундеканом в качестве углеродного субстрата (27 и 6%, соответственно). Бактерии некультивируемого семейства JANEGP01 (порядок *Pseudomonadales*) обладали гомологами таких ферментов как AbcA, AhyA, AlkB, AlmA, AlmA, CYP153, CmdA, DszC, EbdA, K27540, LadB, MАН, NdoB, NdoC (рисунок 30). JANEGP01 также встречались в накопительных культурах из Баренцева моря с добавлением *n*-нонана (11%) и *n*-ундекана (5%). В MAG бактерии некультивируемого рода, обозначаемого Rs1 (семейство *Nitrincolaceae*) из накопительной культуры с срой нефтью (Баренцево море) присутствовали ферменты AbcA, AhyA, CmdA, DszC, EbdA, K27540, MАН, NdoB (рисунок 30). Отмечались. Наконец, в MAG некультивируемой бактерии группы IMCC2047 (отряд *Pseudomonadales*), обнаруженном в метагеноме накопительной культуре с сырой нефтью из Баренцева моря присутствовали ферменты AbcA, AlmA, K27540, MАН, NdoB (рисунок 30). Таким образом, ряд бактерий, принадлежащих

ранее некультивируемым таксонам, оказался способным к аэробному росту в присутствии УВ благодаря содержащимся в их геномах генов, кодирующих ферменты аэробного разложения УВ.

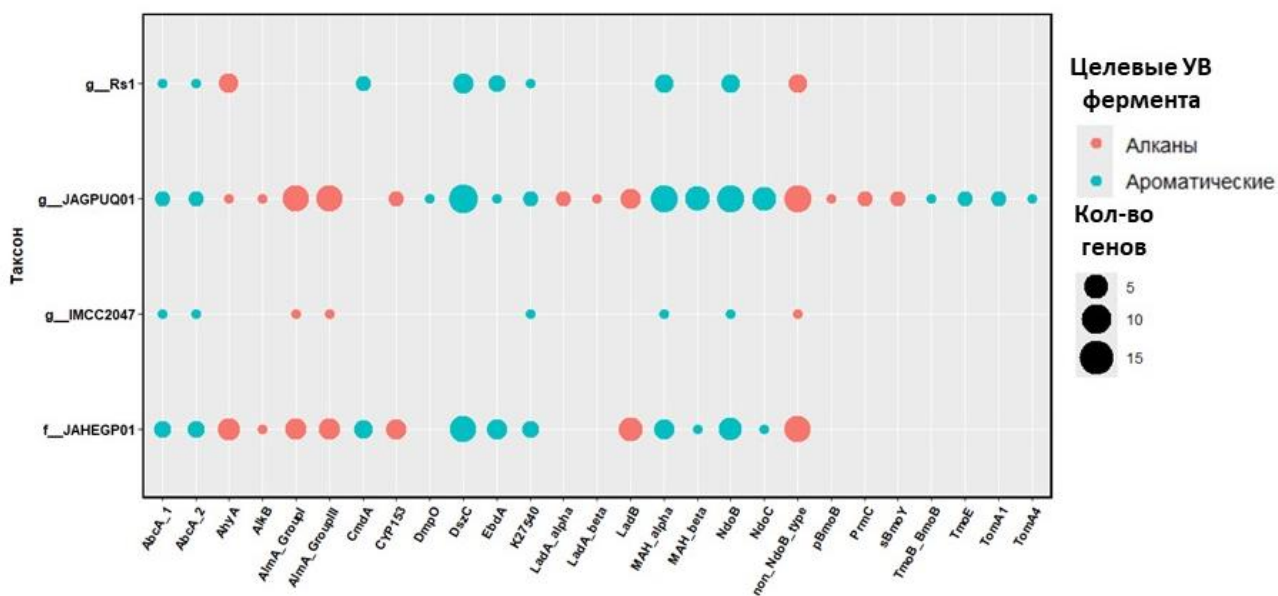


Рисунок 30. Наличие гомологов ферментов окисления различных УВ в MAG некультивируемых линий микроорганизмов из накопительных культур.

### 3.5 Получение чистых культур УВОБ

Из накопительных культур с УВ в качестве единственного источника углерода и энергии было выделено 29 штаммов бактерий. Для изолятов были получены последовательности гена 16S рНК, для 6 проведено полногеномное секвенирование; для 7 изолятов была изучена способность к окислению УВ.

#### 3.5.1 Таксономическое положение выделенных штаммов микроорганизмов

Перечень выделенных штаммов бактерий представлен в таблице 4. На основании анализа полной последовательности генов 16S рНК изоляты отнесены к родам *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Stutzerimonas*, *Halopseudomonas*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Janibacter*, *Salinibacterium*, *Janibacter*, *Microbacterium* (рисунок 31).

Таблица 4. Список изолятов, полученных из накопительных культур с сырой нефтью, *n*-нонаном, *n*-ундеканом, фенантреном в качестве источников углерода и энергии

Источник выделения	Изолят	Результаты сравнения с БД NCBI	сходство с БД NCBI по гену 16S рРНК, %	УВ субстрат, использованный в накопительной культуре
Баренцево море	F5	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99,93	фенантрен
		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	99,93	
		<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	99,93	
	F7	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99,93	фенантрен
		<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	99,93	
		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	99,86	
	U9	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99,93	<i>n</i> -ундекан
		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	99,93	
		<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	99,93	
	N11	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	100	<i>n</i> -нонан
		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	99,93	
		<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98,78	
	N14	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	100	<i>n</i> -нонан
		<i>Pseudoalteromonas issachenconii</i>	100	
	Ps15	<i>Pseudoalteromonas neustonica</i>	99,92	<i>n</i> -ундекан
		<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	99,92	
		<i>Pseudoalteromonas ostreae</i>	98,78	
	Ps19	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	98,78	<i>n</i> -ундекан
		<i>Pseudoalteromonas issachenconii</i>	98,76	
	U20	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99,93	<i>n</i> -ундекан
		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	99,93	
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>		99,93		

	N21	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	99,93	н-нонан
		<i>Pseudoalteromonas issachenconii</i>	99,93	
	U26	<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	99,85	н-ундекан
		<i>Halopseudomonas sabulinigri</i>	99,85	
	U27	<i>Pseudoalteromonas issachenconii</i>	99,31	н-ундекан
		<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	99,85	
	U28	<i>Pseudomonas marincola</i>	100	н-ундекан
	O2-21	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	99,31	сырая нефть
	O7-21	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	98,77	сырая нефть
		<i>Pseudoalteromonas ostreae</i>	98,77	
	O11-21	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	99,78	сырая нефть
		<i>Pseudoalteromonas ostreae</i>	99,65	
	O12-21	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	99,65	сырая нефть
		<i>Pseudoalteromonas ostreae</i>	99,41	
O13-21	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	99,64	сырая нефть	
O14-21	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99,42	сырая нефть	
	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	99,64		
Печорское море	Pr1	<i>Rhodococcus cerastii</i>	99,41	фенантрен
	D	<i>Dietzia kunjamensis</i>	99,92	фенантрен
		<i>Dietzia maris</i>	99,84	
		<i>Dietzia lutea</i>	98,97	
	Pr8	<i>Rhodococcus cerastii</i>	99,65	н-ундекан
		<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	98,95	
		<i>Rhodococcus fascians</i>	98,77	
	UPr 9	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>	99,86	н-ундекан
		<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	98,99	
		<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	98,92	
F20-23	<i>Halopseudomonas gallaeciensis</i>	100	фенантрен	
F11-23	<i>Psychrobacter arcticus</i>	100	фенантрен	

		<i>Psychrobacter okhotskensis</i>	100	
F22-23		<i>Stutzerimonas kunmingensis</i>	100	фенантрен
15-23		<i>Janibacter limosus</i>	99,64	фенантрен
		<i>Janibacter hoylei</i>	98	
F2-23		<i>Microbacterium paraoxydans</i>	100	фенантрен
SB		<i>Salinibacterium amurskyense</i>	99,8	фенантрен
F27-23		<i>Halopseudomonas sabulinigri</i>	100	фенантрен
18-23		<i>Psychrobacter okhotskensis</i>	100	фенантрен

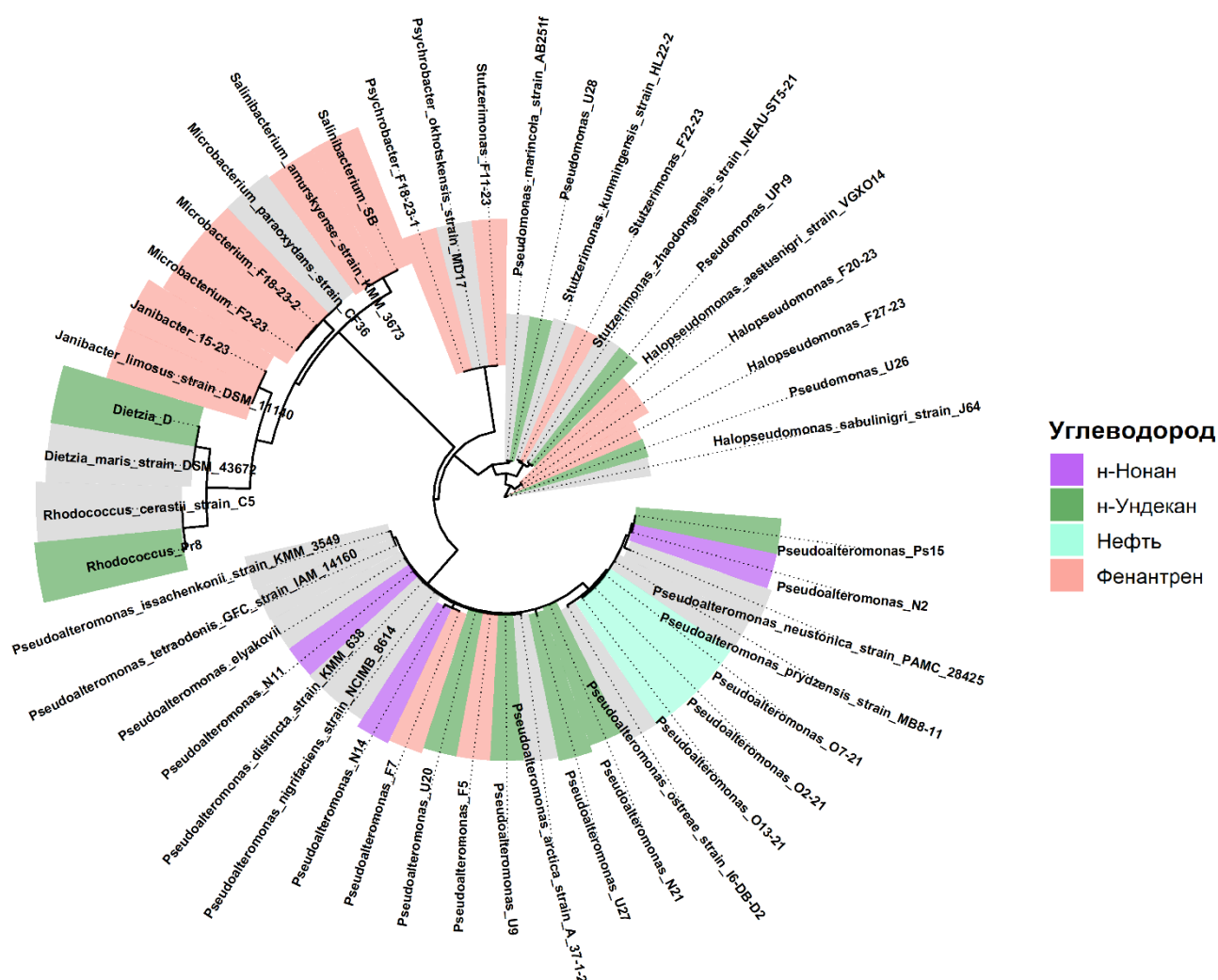


Рисунок 31. Филогенетическое положение изолятов, выделенных из накопительных культур УВОБ, определенное на основании анализа гена 16S рНК; референсные таксоны (98-100% идентичности) отмечены серым цветом.

Все полученные чистые культуры относились к филумам *Pseudomonadota* (F5, F7, U9, N11, N14, Ps15, Ps19, U20, N21, U26, U27, U28, O2-21, O7-21, O11-21, O12-21, O13-21, O14-21, UPr 9, F20-23, F11-23, F22-23, F27-23, 18-23) и *Actinomycetota* (Pr 1, D, UPr8, 15-23, F2-23, SB). Бактерии из филума *Pseudomonadota* были выделены из накопительных культур как Баренцева, так и Печорского моря. Представители *Actinomycetota* были выделены только из накопительных культур, где инокулятом являлся материал Печорского моря.

Бактерии родов *Pseudoalteromonas*, *Halopseudomonas*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus* не обладали избирательностью к УВ субстрату. В то же время *Psychrobacter*, *Stutzerimonas* и представители *Actinomycetota* (*Dietzia*, *Janibacter*, *Microbacterium*, *Salinibacterium*) были выделены только из накопительной культуры с фенантроном в качестве единственного источника углерода и энергии.

### **3.5.2. Морфологическая характеристика, анализ полных геномов и определение таксономического положения штаммов УВОБ**

Для штаммов Ps15, Ps19, 15-23, SB, Pr8, D с помощью метода сканирующей микроскопии была изучена морфология (рисунок 32), а также проведено полногеномное секвенирование. Описание исследуемых штаммов представлено в таблице 7.

Для 5 штаммов, за исключением SB, удалось определить видовую принадлежность с использованием базы данных GTDB (Chaumeil et al., 2019). Они были определены как *Pseudoalteromonas prydzensis* Ps15, *Pseudoalteromonas tetraodonis* Ps19, *Janibacter limosus* 15-23, "*Salinibacterium*, *Dietzia maris* D, *Rhodococcus cerastii* Pr8. Данные по сборке полных геномов представлены в приложении 3.

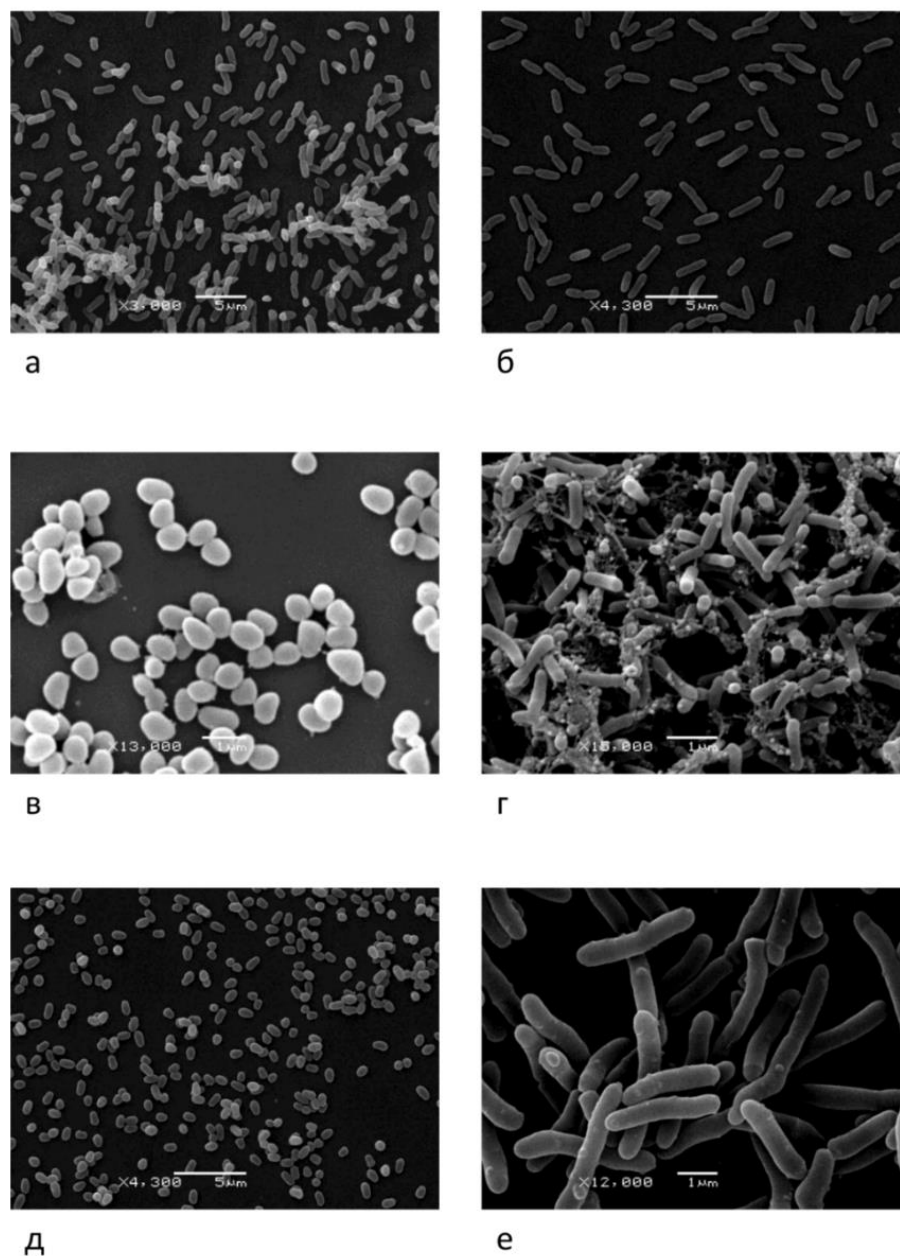


Рисунок 32. Микрофотографии *Pseudoalteromonas prydzensis* Ps15 (а), *Pseudoalteromonas tetraodonis* Ps19 (б), *Janibacter limosus* 15-23 (в), "*Salinibacterium* SB (г), *Dietzia maris* D (д), *Rhodococcus cerastii* Pr8 (е). Увеличение x3000-x18000, СЭМ, JEOL, JSM-6380LA, Япония.

### 3.5.2.1 Характеристика таксономического положения *Salinibacterium* sp. штамм SB

Для сравнения показателей идентичности штамма SB с валидно описанными родственными видами были выбраны полногеномные последовательности *Salinibacterium amurskyense* DSM16400, *Salinibacterium xinjiangense* CGMCC\_1.05381 и *Rhodoglobus aureus* JCM 12762, который, согласно базе данных GTDB, включает некоторые MAGs, классифицируемые как *Salinibacterium*. Значение dDDH штамма SB с типовым штаммом KMM 3673 типового вида было 27%. Наиболее высокие значения

ANI и AAI у SB были с *S. amurskyense* (85,78 и 90,86), что значительно ниже установленного видового порога в 95% (Jain et al., 2018). С остальными ближайшими родственными таксонами ANI и AAI не превышали 85,22 (ANI, *Rhodoglobus aureus*) (таблица 5).

Таблица 5. 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*. 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 *Sainibacterium* (рисунок 33).

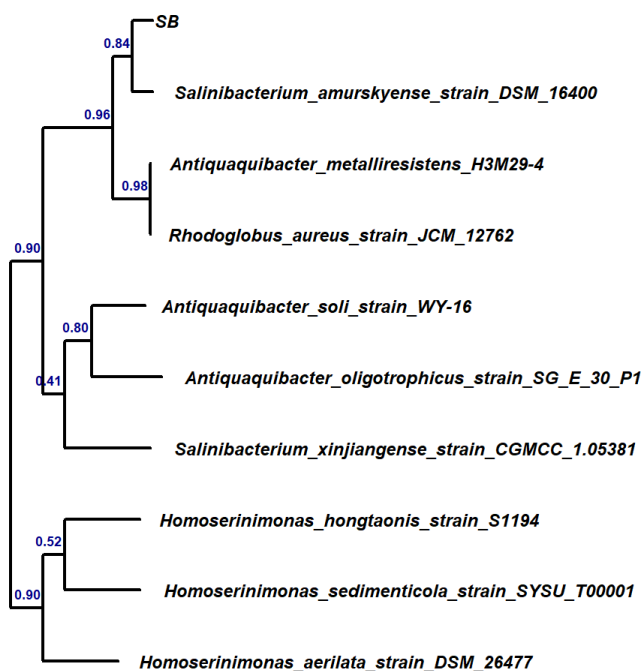


Рисунок 33. Филогенетическое дерево штамма SB с ближайшими видами, на основании 932 консервативных ортологичных групп генов с поддержкой aLRT.

Клетки штамма SB представляют собой неподвижные, не образующие спор палочки, окрашивающиеся по Граму положительно. Колонии на плотных питательных средах имеют желтую пигментацию. В ходе тестирования биохимических и физиологических признаков было выявлено, что SB обладает каталазной активностью, но не проявляет активности оксидазы и  $\beta$ -галактозидазы, не продуцирует ацетоин и индол, как и типовой вид рода. Изолят SB является мезофилом и умеренным галофилом. Его рост наблюдается в диапазоне температур 0-30°C, оптимум – 30°C, (отсутствует при 37 °C в отличие от типового вида) и при концентрации хлорида натрия 0–10%. Оптимальный для роста диапазон pH находится в нейтральной зоне (6–8), тогда как в кислой (pH 0–5) и щелочной (pH 9–10) средах рост не происходит (таблица 5). Как и типовой вид, SB способен к утилизации  $\alpha$ -D-глюкозы, D-маннозы, D-фруктозы, D-галактозы, L-фукозы, L-рамнозы. В отличие от типового вида, SB способен к утилизации D-арабитола и мио-инозитола (таблица 6).

Таблица 6. Сравнение морфологических, физиологических и биохимических признаков "*S. pechoriens*" SB с типовым штаммом *S. amurskyense* KMM 3673

Признак	" <i>Salinibacterium pechoriens</i> " SB	<i>Salinibacterium amurskyense</i> KMM 3673
Морфология	палочки	палочки
Цвет колоний	желтый	желтый
Подвижность	-	-
Окраска по Граму	положительная	положительная
Наличие спор	нет	нет
Оксидаза	-	-
Индол	-	-
В-галактозидаза	-	-
Ацетоин	-	-
Каталаза	+	+
pH 0-5	-	-
pH 6-8	+	+
pH 9-10	-	-
T 0 - 30, °C	+	+
T 37, °C	-	+
T 42, °C	-	-
NaCl 0 - 10 %	+	+
D-Целлобиоза	-	-
Генциобиоза	-	-
Сахароза	-	-
D-Тураноза	-	-

D-Раффиноза	-	-
$\alpha$ -D-Лактоза	-	-
D-Мельбиоза	-	-
D-Салицин	-	-
$\alpha$ -D-Глюкоза	+	+
D-Манноза	+	+
D-Фруктоза	+	+
D-Галактоза	+	+
L-Фукоза	+	+
L-Рамноза	+	+
D-Сорбит	-	-
D-Маннит	+	+
D-Арабитол	+	-
мио-Инозитол	+	-
Глицерин	+	+

Таким образом, на основании полученных данных штамм SB представляет собой новый вид из рода *Salinibacterium*. Для нового вида нами было предложено название “*Salinibacterium pechorensense*”.

### 3.5.3 Анализ генов окисления УВ в полных геномах чистых культур

Полученные геномы были проанализированы на предмет наличия генов окисления УВ. В геномах исследуемых бактерий были обнаружены гены, кодирующие ферменты окисления алифатических УВ: *AbcA*, *AhyA*, *AlkB*, *AlmA*, *CYP153*, *DszC*, *EbdA*, *K27540*, *LadA*, *LadB*, *NdoC*, *non\_NdoB\_type*, *PrmC*, *sVmoX*, *sVmoZ*, *TomA* (таблица 7). Наибольшее количество генов окисления УВ было обнаружено у штамма *Rhodococcus cerastii* Pr 8 (рисунок 34). Штаммы *Pseudoalteromonas*, наоборот, имели в геноме наименьшее количество генов, кодирующих ферменты утилизации УВ. На основании анализа геномов можно сделать вывод о том, что все исследуемые культуры имеют потенциальную способность к утилизации, как алифатических, так и ароматических УВ.

Геном типового вида *S. amurskyense* также был изучен на предмет наличия ферментов окисления УВ. В геноме *S. amurskyense* DSM\_16400 (Whitman et al., 2013) были обнаружены следующие ферменты окисления УВ: *AlmA*, *AlkB*, *LadB*, *LadA*, *CYP153*, *DszC*, *CmdA*.

Таблица 7. Описание таксономического положения, источника выделения, ферментов окисления УВ и морфологии исследуемых чистых культур УВОБ

Название штамма	Таксономия (Вид)	Источник выделения	УВ субстрат в накопительной культуре	Обнаруженные ферменты окисления УВ	Морфология
Ps15	<i>P. prydzensis</i>	Баренцево море	<i>n</i> -ундекан	AlmA, DszC, EbdA, K27540, PrmC, TomA1, sBmoZ	Светлые, круглые, глянцевые полупрозрачные колонии, клетки палочковидной формы
Ps19	<i>P. tetraodonis</i>	Баренцево море	<i>n</i> -ундекан	AlmA, K27540, DszC, PrmC и sBmoZ	Светлые, круглые, глянцевые полупрозрачные колонии, клетки палочковидной формы
15-23	<i>J. limosus</i>	Печорское море	фенантрен	AbcA, AhyA, AlmA, AlkB, CYP153, DszC, EbdA, LadA, LadB, NdoC, non_NdoB_type, sBmoX	Белые, крулые, матовые колонии, клетки овальной палочковидной формы
SB	<i>“Salinibacterium pechorensis”</i>	Печорское море	фенантрен	AlmA, AlkB, CmdA, CYP153, DszC, LadA, LadB, non_NdoB_type	Желтые, неровные, плотные колонии, клетки палочковидной формы
Pr 8	<i>R. cerastii</i>	Печорское море	<i>n</i> -ундекан	AbcA, AhyA, AlkB, AlmA, CYP153, DszC, EbdA, LadA, LadB, non_NdoB_type, NdoC, sBmoX,	Рыжие, круглые, матовые колонии, клетки палочковидной формы
D	<i>D. maris</i>	Печорское море	фенантрен	AbcA, AhyA, AlmA, AlkB, CYP153, DszC, EbdA, LadA, LadB, NdoC, non_NdoB_type	Красные, круглые, матовые колонии, клетки палочковидной формы

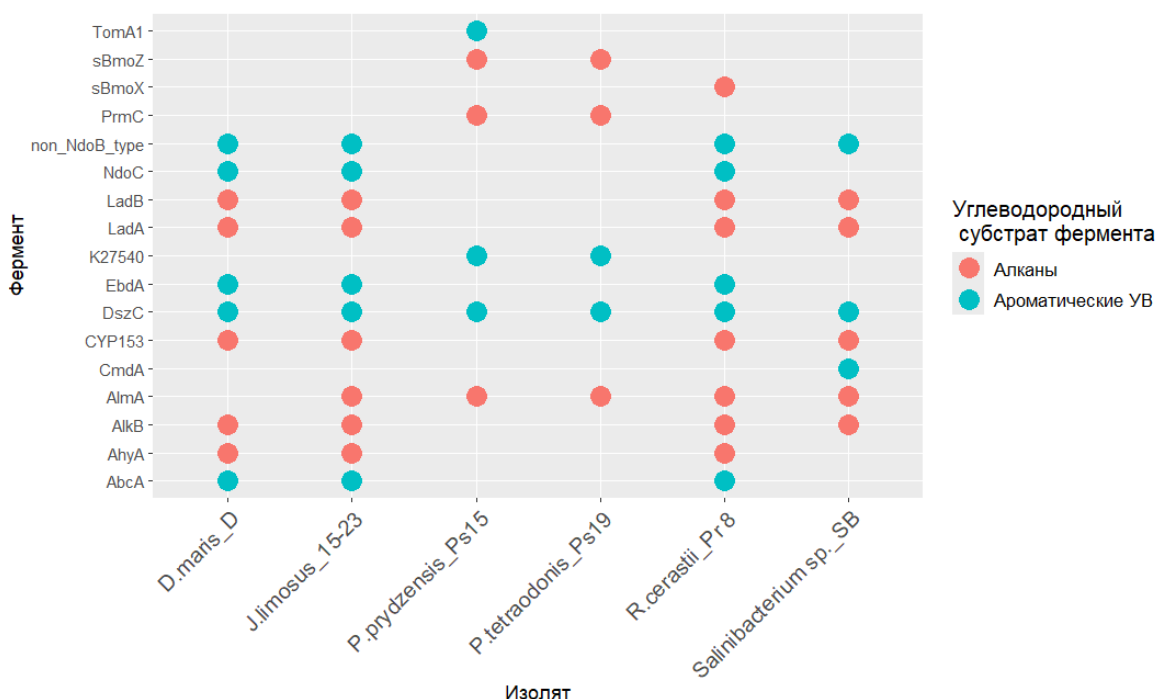


Рисунок 34. Ферменты окисления УВ, обнаруженные в геномах чистых культур УВОБ.

### 3.5.4 Анализ утилизации УВ выделенными штаммами бактерий

При исследовании процессов биodeградации УВ выделенными чистыми культурами бактерий была проведена оценка использования *n*-алканов. Наиболее интенсивное исчезновение *n*-алканов и увеличение доли изо-алканов было отмечено для *R. cerastii* Pr8 и "*S. pechoriensis*" SB (рисунок 35).

В случае инкубации сырой нефти с культурой SB была отмечена убыль 48% алканов. В основном SB утилизировала УВ с длиной цепи C<sub>10</sub>-C<sub>28</sub>. За то же время штамм Pr8 окислил 30% от всех алифатических УВ, преимущественно среднецепочечные C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>.

Для мониторинга разложения сырой нефти в исследовании использовались соотношения *n*-алканов к пристану и фитану (Pr/*n*-C<sub>17</sub> и Ph/*n*-C<sub>18</sub>). Из диаграммы соотношений данных параметров видно, что меньше всего алканы были деградированы в культурах *Psychrobacter* штамм 18-23 и *J. limosus* штамм 15-23. Далее в ряду Ps15 < Ps19 < Pr8 < D < SB увеличивается интенсивность биodeградации (рисунок 36).

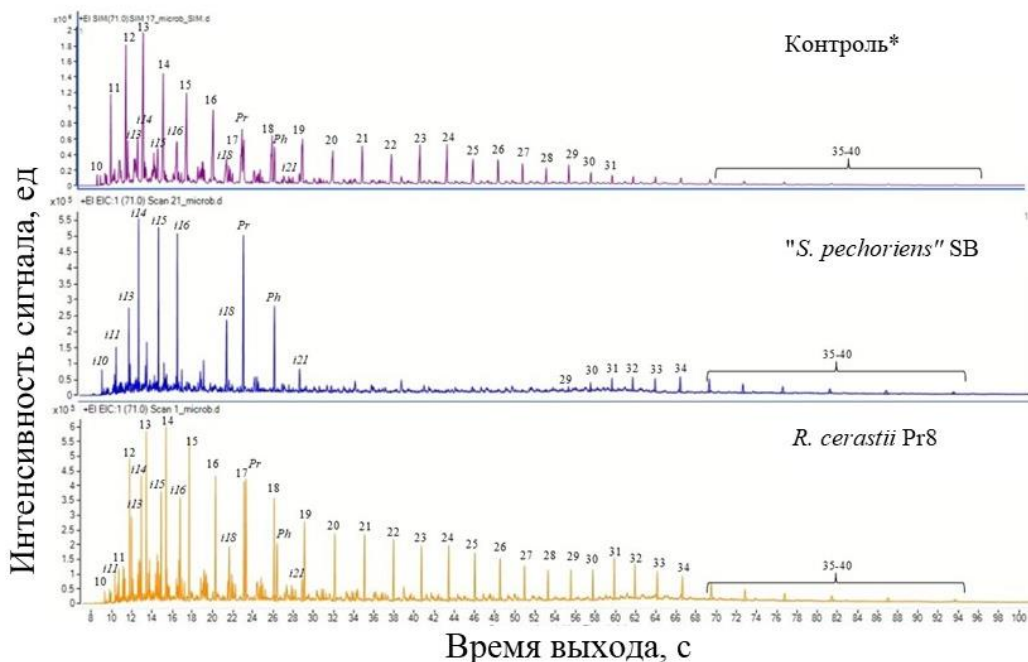


Рисунок 35. Изменение соотношения *n*-алканов и изопреноидов в процессе биодegradации;  $m/z = 71$ . В верхней части представлена контрольный образец, ниже нефть после инкубации с добавлением бактерий Pr8 и SB. Число на подписи пиков указывает количество атомов углерода в молекуле *n*-алканов и изопреноидов (i), Pr-пристан, Ph-фитан.

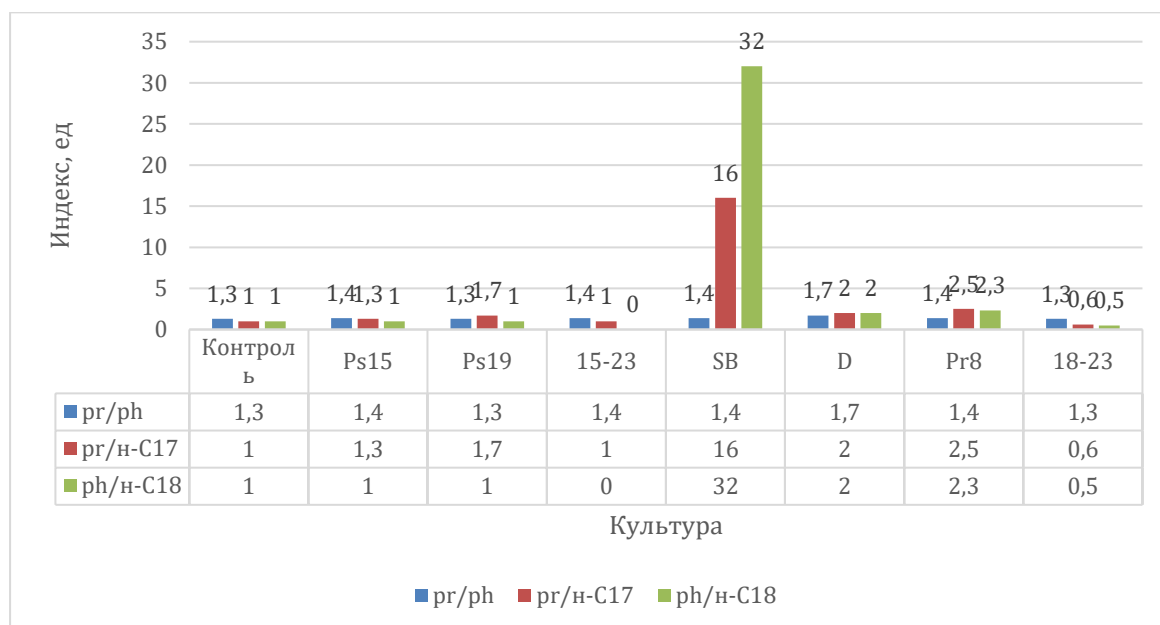


Рисунок 36. Значения индексов биодegradации *n*-алканов, где pr/ph – соотношение относительных количество пристана (pr) к фитану (ph), pr/n-C17 – пристана к *n*-гептадекану, ph/n-C18 – фитана к *n*-октадекану.

Анализ изученных образцов показал, что в случае SB стераны нефти были затронуты процессом биодegradации. Для этой культуры наблюдалось снижение  $\alpha\alpha\alpha R$  относительно  $\alpha\alpha\alpha S$ , а также отношение  $\alpha\beta\beta R$  к  $\alpha\beta\beta S$  в холестане ( $C_{27}$ )

(рисунок 37); в то время эргостан (C<sub>28</sub>) и стигмастан (C<sub>29</sub>) биодegradацией затронуты не были, также как и ряд гопанов.

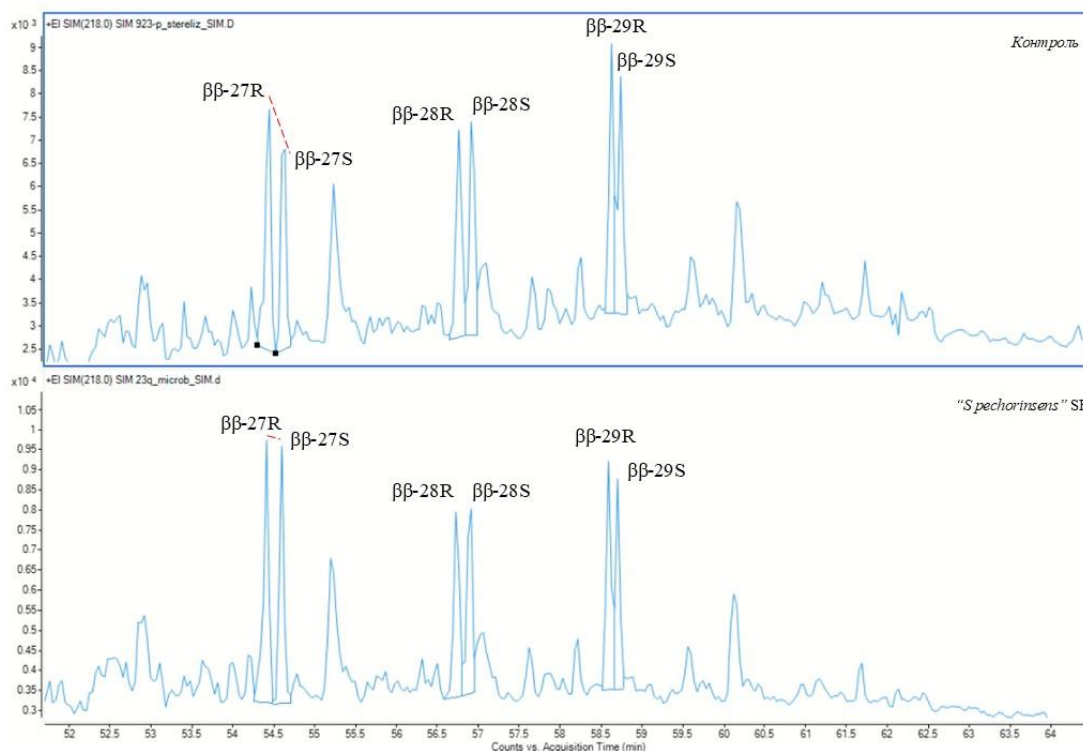


Рисунок 37. Масс-фрагментограмма по ионному току  $m/z=218$  контроля и нефти после биодegradации SB. Наблюдается уменьшение биологического  $\alpha\beta\beta-27R$  относительно геологического эписмера  $\alpha\beta\beta-27S$ .

Самые низкие значения отношений метилнафталенов к метилфенантренам (MN/MP) и метилнафталенов к ди- и триметилнафталенам  $MN/(DMN+TMN)$  были обнаружены у *J. limosus* 15-23 и "*S. pechoriensis*" SB (0,2 и 0,3, а также 0,04 и 0,1. соответственно) (рисунки 38-39). Согласно полученным значениям диметилнафталенового индекса (DBR), утилизация наблюдалась у штамма *D. maris* D (1,9); согласно значениям триметилнафталенового индекса (TBR), в ряду SB < Pr8 < 18-23 < Ps15 < D < 15-23 < Ps19 увеличивается степень биодеструкции алкильных нафталенов (рисунок 40).

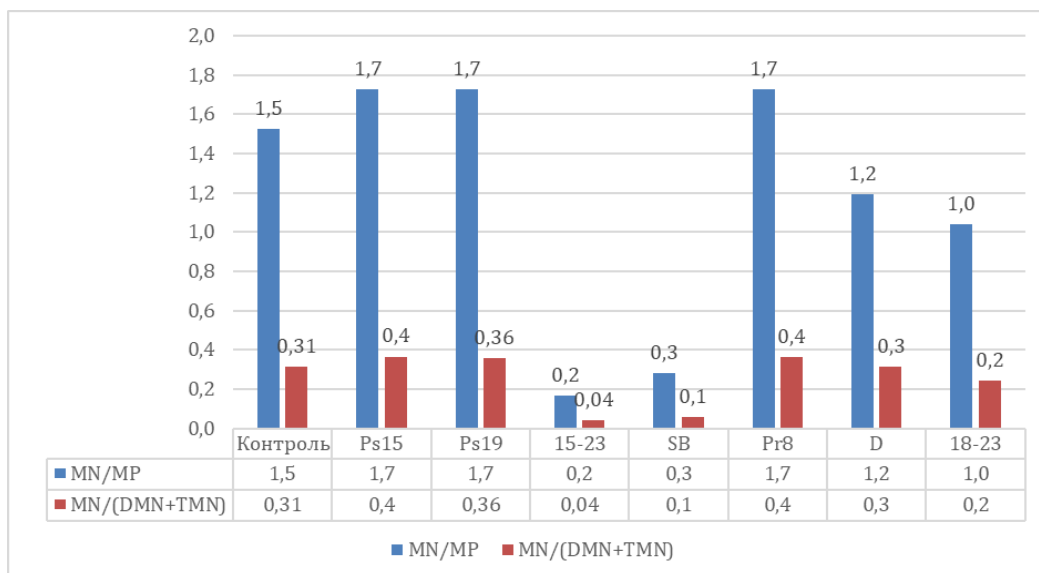


Рисунок 38. Значения индексов биодegradации ароматических соединений MN/MP и MN/(DMN+TMN).

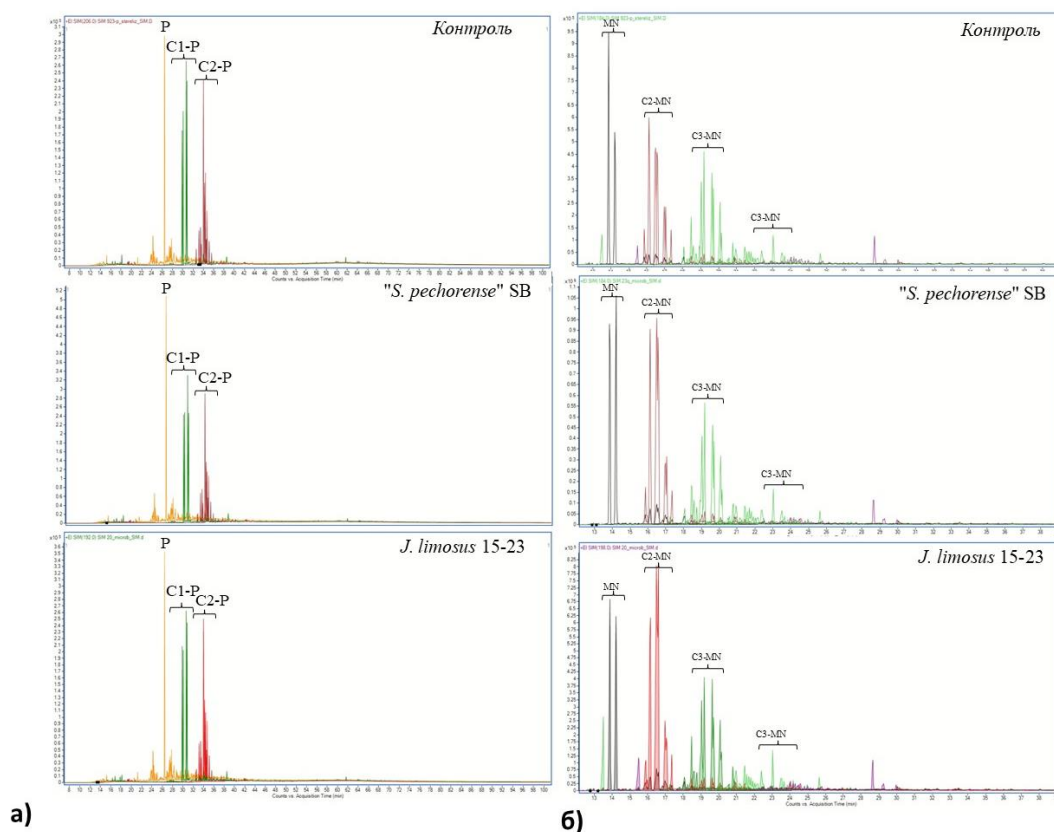


Рисунок 39. а: Масс-фрагментограммы ( $m/z=178, 192, 206$ ) показывающие алкил-фенантеновые соединения. Р-фенантрен, C1-Р - метил-фенантрен, C2-Р - диметил-фенантрен. б: Масс-фрагментограммы ( $m/z=142, 156, 170, 184, 198$ ), показывающие соотношения алкил-нафталиновых соединений и тиофенов. MN - метил-нафталены, C2-MN - диметил-нафталены, C3-MN - триметил-нафталены, DBT- дибензотиофен, MDBT - метил-дибензотиофен.

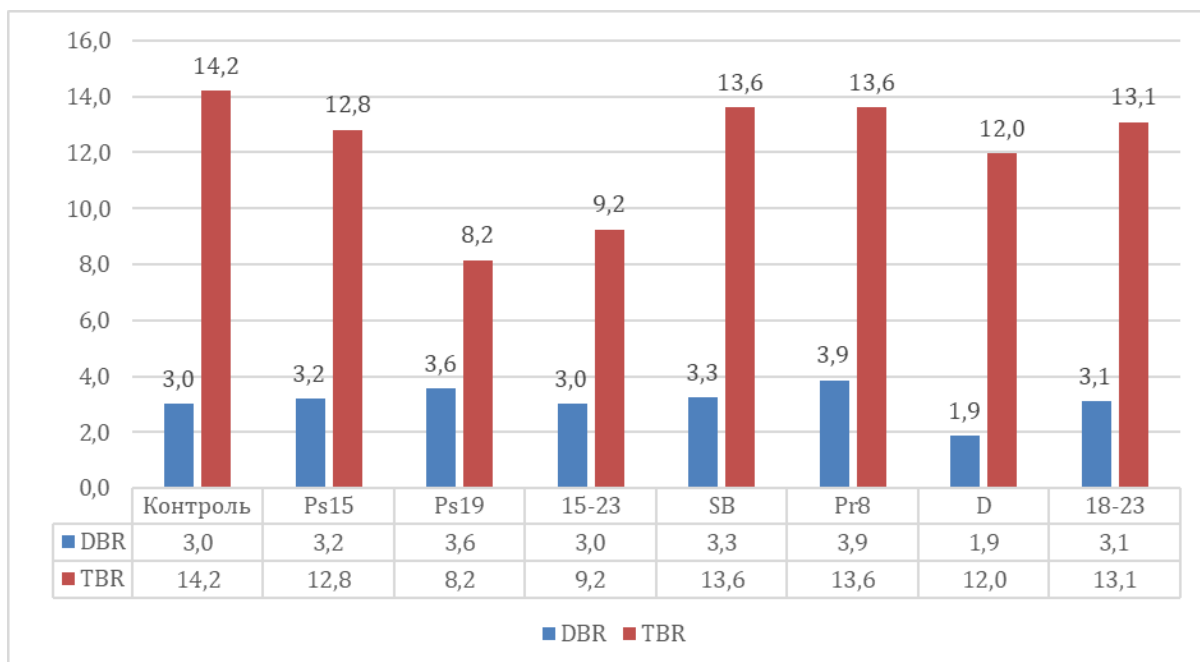


Рисунок 40. Значения индексов биodeградации ароматических соединений DBR и TBR.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Верхние слои донных отложений являются динамичной системой, которая регулярно промывается придонными водами, поставляющими в донный осадок органическое вещество и кислород. Участники микробного сообщества в верхнем слое осадков, имея доступ к свежему субстрату, подвергаются воздействию придонных вод, богатых кислородом, но вскоре оказываются погребенными в более глубоких бескислородных слоях отложений. Такие экологические условия способствуют росту разнообразного и метаболически универсального бактериального сообщества, поддерживая функцию поверхностных осадков как эффективных биологических фильтров (Probandt et al., 2017).

Анализ таксономического разнообразия микробных сообществ морской воды и донных отложений показал, что составы коровых микробиомов Баренцева и Печорское морей 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 коровых микробиомах обоих морей присутствовали некультивируемые представители семейства *Nitriocolaceae*, Clade Ia и бактерии рода *Polaribacter*.

При анализе микробных сообществ морей отмечены и различия. В коровый микробиом воды Баренцева моря входили аммоний-окисляющие археи рода *Nitrosopumilus*, *Ca. Thioglobus* 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 коровом микробиоме донных отложений Баренцева моря присутствовали некультивируемые бактерии филума NB1-j, метаболические функции которых до сих пор неизвестны (Timmers et al., 2016; Zhang et al., 2021). Различия состава микробных сообществ исследуемых акваторий, вероятно, определяются природными физико-химическими факторами. Водные массы Баренцева моря в исследуемых акваториях характеризуются низкой температурой в пределах -2 –

+1С° на поверхности и -10С° у дна зимой; летом - поверхностные воды в пределах -2 – +2С°, а придонные -1 – +1С°. Солёность остается высокой на протяжении как летнего, так и зимнего периодов (3,3-3,5% и более), что связано с притоком водных масс из северной Атлантики (Лисицын и др., 2021). Температурный режим воды Печорского моря в зимний период не имеет различий с Баренцевым морем; в летние месяцы поверхностные воды прогреваются до +5 – +7,5С°, а придонные имеют температуру +2 – +4С°. Для Печорского моря характерно интенсивное сезонное привнесение пресной воды рекой Печора: уровень распреснения в летние месяцы может достигать максимума в 11% (Ковалёв, 2006). Мониторинговые исследования Печорского моря также свидетельствуют о распреснении акватории за счет взаимодействия различных по происхождению вод (Ефремкин и др., 2009).

В глобальном исследовании метагеномов водных микробных сообществ отмечают, что для пресноводных сообществ характерно доминирование *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria*, а для сообществ солёных мест обитания – *Gamma*proteobacteria, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, что частично подтверждает наши данные по составу коровых микробиомов: доминирование *Sandaracinaceae* из класса *Deltaproteobacteria* в донных отложениях регулярно опресняемого Печорского моря (Chen et al., 2021).

В микробных сообществах исследуемых морей большую долю составляют как аэробные и/или аэротолерантные гетеротрофные бактерии (*Woeseia*, *Psychrilyobacter*, *Psychromonas*, *Amylibacter*, *Planktomarina*, *Polaribacter*, *Oceanicoccus*), так и сульфатредуцирующие представители разных таксономических групп (*Desulfobacterota*, *Desulfuromonadia*, *Desulfobulbales*). 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).

Таксоны, обнаруженные в микробных сообществах донных отложений, являются типично морскими обитателями и проводят метаболические процессы характерные для донных экотопов исследуемой акватории. Несмотря на активную

добычу УВ в Печорском море, нами не было обнаружено таксонов индикаторов нефтяных загрязнений.

Таким образом, коровые микробиомы исследованных образцов воды и осадков не содержали таксонов, характерных для акваторий, где наблюдается хроническое загрязнение УВ. К таким маркерам нефтяных загрязнений исследователи относят облигатные УВОБ (*Oleispira*, *Cycloclasticus*) и виды рода *Rhodococcus* (Bell et al., 1999; Yakimov et al., 2007). Все перечисленные ранее микроорганизмы коровых микробиомов являются типичными участниками сообществ незагрязненных морских экосистем.

При этом добавление УВ в систему вызывает активный рост бактерий, известных своей УВ-окисляющей активностью, что было выявлено при анализе микробных сообществ накопительных культур.

В накопительных культурах, инокулятом которых была морская вода Баренцева моря, главными участниками сообществ являются типично морские бактерии родов *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Oleispira*, *Colwellia*, *Shewanella* и *Woeseia*. Бактерии рода *Pseudoalteromonas* фигурируют во многих исследованиях, посвященных УВОБ морских экосистем: например, в накопительных культурах с нефтью и инокулятом из грунта Фарерско-Шетландского канала доля *Pseudoalteromonas* увеличивалась до 40% (Gontikaki et al., 2018). В работах по изучению разлива нефти в Мексиканском заливе отмечалось, что бактерии этого рода доминировали как в морской воде, так и в грунте (Dubinsky et al., 2013; Yang et al., 2016). В то же время вопрос об УВ-окисляющей активности *Pseudoalteromonas* остаётся спорным. Сообщалось о достоверной утилизации нефти консорциумом из морской воды Баренцева моря (вблизи о. Шпицберген), но все выделенные в чистую культуру бактерии, в том числе два вида *Pseudoalteromonas*, не показывали достоверной убыли компонентов нефти (Derpe et al., 2005). Однако сообщается и о штаммах *Pseudoalteromonas*, выделенных из воды Охотского моря, которые достоверно снижали содержание высокомолекулярных компонентов нефти (Богатыренко и др., 2013; Buzoleva et al.,

2017). Можно предположить, что способность к использованию УВ является видовым или даже штаммовым признаком бактерий рода *Pseudoalteromonas*.

Псевдомонады широко распространены, метаболически универсальны и обладают способностью использовать различные соединения, загрязняющие окружающую среду. При анализе метагеномов микробных сообществ нефтезагрязненной морской воды и почвы побережья Мурманской области обнаруживались гены разложения жирных кислот и алканов, принадлежащие *Pseudomonas*, УВ-окисляющие штаммы которых были выделены в чистую культуру (Semenova et al., 2022). Другие исследователи также отмечали доминирование доли *Pseudomonas* в накопительных культурах с УВ (Mulet et al., 2011).

Представители рода *Oleispira* являются облигатными психротолерантными УВОБ, впервые выделенными из вод Антарктики. Бактерии этого рода специализируются на разложении алифатических и разветвленных УВ (Yakimov et al., 2007). При исследовании разложения УВ во фьордах Гренландии на 24 сутки полевого эксперимента отмечалось образование биопленок бактериями рода *Oleispira* (Vergeynst et al., 2019).

Согласно исследованиям Мексиканского залива, содержание бактерий рода *Colwellia* увеличивалось в морской воде и грунте при разливе нефти DWH (Mason et al., 2014). Также *Colwellia*, *Shewanella* и *Woeseia* наблюдались в накопительных культурах с использованием сырой нефти, полученных из морской воды и грунта, в том числе и арктического происхождения (Chen et al., 2021).

При использовании в качестве инокулята не только морской воды, но и донных отложений Баренцева моря, наблюдается схожая картина, в виде доминирования *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Oleispira*. Однако в случае использования фенантрена в качестве единственного источника углерода доминирующей группой становятся бактерии рода *Porticoccus*, которые являются облигатными окислителями ПАУ, не способными расти на сахарах (Gutierrez et al., 2012).

Бактерии вышеназванных родов, помимо своей способности к утилизации УВ, ассоциированы с цветением фитопланктона (Teeling et al., 2012; Lyu et al., 2021; Cordone et al., 2022). Фитопланктон, в свою очередь, 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 вносил микрофитопланктон - *Thalassiosira*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Rhizosolenia hebetata* (до 70% от всего хлорофилла (*chl a*) на севере Баренцева моря) и нанофитопланктон - *Emiliana huxleyi* (до 65% *chl a* на юге Баренцева моря) (Kudryavtseva et al., 2023). Ранее сообщалось о продукции УВ *Rhizosolenia hebetata* (изопреноиды состава C<sub>25</sub>) и *Emiliana huxleyi* (алкены C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub>, C<sub>37</sub>, C<sub>38</sub>) (Grossi et al., 2000; Belt et al., 2017).

В исследовании, посвященном структуре микробного сообщества, ассоциированного с динофлагеллятами, отмечается увеличение доли *Pseudomonas* на позднем этапе цветения фитопланктона (Zheng et al., 2023). При таксономическом анализе фитобактериальных сообществ могут обнаруживаться облигатные УВ-окисляющие бактерии. Так, при исследовании фитобактериальных ассоциаций, было отмечено доминирование облигатной УВОБ *Alcanivorax* (40–63%) и наличие *Oleispira* (1–5%; Thompson et al., 2020). Средой для развития УВОБ в морских местообитаниях может являться фикосфера (Thompson et al., 2020; Variem, Kizhakkedath, 2021). *Porticoccus* впервые был выделен именно из ассоциации микроводорослей *Lingulodinium polyedrum* (Gutierrez et al., 2012). Связь бактерий рода *Pseudoalteromonas* с водорослями объясняется их альгицидной способностью (Семенов и др., 2014; Lovejoy et al., 1988). *Pseudoalteromonas* является важным участником разложения альгинатов в Арктике, тем самым высвобождая из талломов макроводорослей полисахариды, которые представляют собой пул углеводов в холодных местообитаниях (Xu et al., 2021).

Акватория российской части Баренцева моря характеризуется отсутствием разрабатываемых НМ, но в Печорском море ситуация обратная. Эксперимент по получению накопительных культур из морской воды и донных отложений

Печорского моря показал доминирование *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus* и *Hyphomonas*.

Бактерии рода *Psychrobacter* способны расти при температурах ниже нуля и обладают альгицидной активностью. В некоторых исследованиях наблюдалась увеличение доли *Psychrobacter* в накопительных культурах при добавлении УВ (Deppe et al., 2005; Dong et al., 201; Sinha et al., 2017).

Появляющийся в накопительных культурах из Печорского моря *Rhodococcus* – хорошо изученный род УВОБ, который, по литературным данным, способен к разложению широкого спектра органических веществ, включая ароматические и алифатические УВ (Cappelletti et al., 2019). Бактерии, родственные *Rhodococcus*, доминируют в акваториях, подверженных хроническому нефтяному загрязнению, за счет гидрофобной клеточной мембраны, связанной с активными транспортными системами, а также обладанию эффлюксными насосами и путями деградации УВ (de Carvalho et al., 2014).

Бактерии рода *Dietzia* обнаруживались во всех накопительных культурах Печорского моря. Род *Dietzia* был описан в результате реклассификации вида *Rhodococcus maris* в отдельный новый род (Raineu et al., 1995). Бактерии рода *Dietzia* широко распространены, их выделяют из почв, содовых озер, морских осадков, с поверхности кожи рыб. Известно, что они обладают УВ-окисляющей активностью в отношении нефти, коротко- и длинноцепочечных алканов (Bihari et al., 2011; Wang et al., 2011; Procópio et al., 2013). Встречаются данные, свидетельствующие о способности *Dietzia* к окислению ПАУ: фенантрена и нафталена (Al-Awadhi et al., 2012; Gurav et al., 2017; Ausuri et al., 2021)

Бактерии рода *Sphingorhabdus* отмечались в накопительных культурах как с алифатическими, так и с ароматическими УВ. При изучении УВОБ, обитающих в морской воде вблизи о. Шпицберген путем закладки микрокосмов с добавлением нефти, было отмечено доминирование бактерий рода *Sphingorhabdus*, в MAG которых обнаруживалось наибольшее, в сравнении с другими таксонами, количество генов, связанных с деградацией УВ (Kertesz et al., 2019; Nölvak et al., 2021). Полногеномные исследования штаммов *Sphingorhabdus*, выделенных из

нефтезагрязнённых прибрежных осадков, показали, что эти бактерии способны к разложению как алифатических, так и ароматических УВ (Im Jeong et al., 2016).

Как и в случае *Sphingorhabdus*, бактерии рода *Hyphomonas* наблюдались в нескольких опытных накопительных культурах. Способность к окислению УВ представителями рода *Hyphomonas* подтверждается в исследовании Wang и коллег, посвященном «ко-акклиматизации» микробных сообществ в ответ на стресс в виде разливов нефти в естественных местообитаниях. При добавлении пристана и ПАУ исследователи отмечали доминирование *Hyphomonas* (Wang et al., 2016).

При изучении среднецепочечного алифатического *n*-нонана отмечается доминирование бактерий из семейства *Sphingomonadaceae*. Геномные исследования указывают на способность этих бактерий к утилизации УВ нефти (Im Jeong et al., 2016). Для бактерий *Rhodococcus*, *Sphingorhabdus*, *Planococcus* также характерно потребление многих УВ, включая ароматические и алифатические УВ, в том числе и *n*-нонана (Cappelletti et al., 2019; Guo et al., 2023). Бактерии *Maribacter litoralis*, способны к утилизации ПАУ (Lee et al., 2018), однако указание на активность бактерий этого рода в отношении алифатических УВ нами получено впервые.

Добавление трудноразлагаемого УВ пристана вызывало рост неидентифицированных представителей семейства *Rhodobacteraceae*, родов *Nocardioides*, *Rhodococcus* и *Maribacter*. Считается, что пристан, как представитель изопреноидных алканов, в целом хуже используется микроорганизмами по сравнению с другими алифатическими алканами (Rojo et al., 2010). На этом основан пристан-фитановый индекс, который отражает степень биологической утилизации нефти (Powell, 1988). Несмотря на это, исследователи сообщают, что способность к окислению пристана обнаружена у нескольких видов *Nocardioides* (ранее *Nocardia*) *Nocardia* sp. штамм МН-2, *Nocardia globerula*, *N. cyriacigeorgica*, *N. Asteroides* (Whitehouse et al., 1974). Бактерии рода *Nocardioides* способны к деградации широкого круга соединений, в том числе ароматических УВ, галоалканов, азотных гетероциклов и полимерных полиэфиров (Ma et al., 2023; Zhu et al., 2024).

Внесение ПАУ бифенила в среду увеличивало долю бактерий рода *Janibacter*. ПАУ утилизируются с меньшей скоростью, чем алифатические, но есть ряд бактерий способных к предпочтительному окислению ароматических УВ соединений. К таким микроорганизмам относят бактерий рода *Janibacter*, обитающих, как в морских, так и наземных экосистемах (Martin et al., 1997; Thrash et al., 2011). Для штамма *Janibacter* sp. YU-1, выделенного из накопительной культуры с дибензофураном, была показана утилизация широкого спектра циклических УВ, в том числе и бифенила (Yamazoe et al., 2004).

При анализе NGS профилей по гену 16S рРНК сложно учесть минорную часть микробного сообщества. В связи с этим мы проанализировали данные ASV в зависимости от субстрата в накопительных культурах с помощью дисперсионного анализа, который показал стимулирующее воздействие УВ даже для тех бактерий, чья относительная численность была очень низкой. Согласно литературным данным, представители этих таксонов способны к росту в присутствии УВ или их утилизации. Например, бактерии из рода *Demequina* отмечаются в образцах загрязненной нефтью почвы (Li et al., 2023). Морские бактерии рода *Erythrobacter* хорошо известны своей способностью утилизировать алканы (Röling et al., 2002). Представители семейства *Flavobacteriaceae* обладают генами, связанными с процессом окисления УВ, а некоторые исследования с применением методов микрокосмов демонстрируют увеличение численности представителей этой группы при добавлении сырой нефти и нафталена в среду (Camacho-Montealegre et al., 2021; Venil et al., 2021). Бактерии рода *Novosphingobium* известны своей способностью к утилизации ароматических соединений (Lyu et al., 2014), но информации о способности расти на пристане в качестве углеродного субстрата, нами обнаружено не было.

При сравнении всех четырёх экспериментов по получению накопительных культур оказалось, что в накопительных культурах Баренцева моря с УВ в качестве единственного источника углерода и энергии, доминировали бактерии родов, связанных с цветением фитопланктона (*Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Oleispira*, *Porticoccus*), который является одним из источников УВ в морских экосистемах.

Микробные сообщества накопительных культур Печорского моря характеризуются присутствием известных родов бактерий, являющихся окислителями УВ: *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Hyphomonas*, *Sphingorhabdus*, *Nocardioides*, *Janibacter*. При использовании в качестве инокулята смеси придонной воды и донных отложений Печорского моря в накопительных культурах присутствовали бактерии родов *Hyphomonas* и *Dietzia*. В случае использования только донных отложений эти бактерии не обнаруживались. Известно, что род *Hyphomonas* является типичным представителем морской среды; его представители выделяются из вод Тихого и Атлантического океанов, а также Северного и Южно-Китайского морей (Li et al., 2014). В то же время сообщается о широком распространении бактерий рода *Dietzia*: имеются данные о штаммах, выделенных как из наземных экосистем, так и из водной среды (Venil et al., 2021, Yang et al., 2017). В связи с этим представляется вероятным, что бактерии рода *Hyphomonas* являются планктонными микроорганизмами, присутствующими только в воде Перческого моря. Относительное содержание *Dietzia* при засеве пробами донных отложений снижается за счет быстрого роста других участников УВ-окисляющего сообщества.

Анализ метагеномов накопительных культур позволил определить генетический потенциал микробных сообществ, формирующихся под воздействием УВ субстратов. У исследуемых таксонов в геномах присутствуют гены, которые кодируют ферменты, нацеленные не только на использованные при культивировании УВ, но и на другие классы УВ соединений. Например, при использовании алифатического *n*-ундекана в накопительных культурах наблюдалось наличие ферментов окисления ароматических УВ. Аналогичная ситуация отмечается в геномах накопительных культурах с использованием фенантрена: в них гены окисления алифатических УВ преобладают над ароматическими. Вероятно, это может быть связано с неспецифичностью некоторых диоксигеназ, с одной стороны, а с другой - с локализацией некоторых из этих ферментов на плазмидах. Larkin с коллегами сообщали о неспецифичности цитохрома P450 и возможности к окислению не только алифатических УВ, но и

ПАУ (Larkin et al., 2005). Плазмидам с генами катаболизма ПАУ посвящено множество работ. Наиболее изученными являются плазмиды NAN7, pBS216 (катаболизм нафтадена), IncP-7 (деструкция карбазола), TOL (толуола) (Аринбасаров и др., 2007; Volkova et al., 2005; Shintani et al., 2008; Yanagida et al., 2016). Также сообщается о бактериях, которые обладают в геноме сразу несколькими системами окисления УВ со схожей субстратной специфичностью (Маркова и др., 2023).

Метагеномное секвенирование исследуемых накопительных культур подтверждает некоторые данные других исследователей. В частности, проведенный недавно анализ MAG позволил впервые выявить способность бактерий рода *Halioglobus* к окислению УВ (Chen et al., 2024). Кроме того, собранные геномы бактерий *Pseudoalteromonas* демонстрируют вариабельность в наборе и количестве генов, связанных с окислением УВ, что согласуется с данными пангеномного анализа этих микроорганизмов. Это подтверждает выводы Bosi и коллег о высокой генетической гетерогенности даже среди близкородственных штаммов *Pseudoalteromonas* (Bosi et al., 2017).

Среди некультивируемых бактерий, обнаруженных в микробных сообществах накопительных культур, особый интерес представляют линии IMCC2047, JANEGP01 (обе порядок *Pseudomonadales*) и Rs1 (семейство *Nitrospiraceae*). По литературным данным IMCC2047 способны к бактериальному фотосинтезу и фиксации углерода через цикл Кальвина, однако о генах, ответственных за окисление УВ, ранее не сообщалось (Kang et al., 2011). Наши исследования показали, что у микроорганизмов, относящихся к этой группе, имеются ферменты AbcA, AlmA, K27540, MAN и NdoB, (рисунок 41). В базе данных NCBI JANEGP01 упоминается только в одном неопубликованном исследовании донных отложений реки Вайвера (Новая Зеландия). Бактерии из линии Rs1 описываются в качестве симбионтов *Osedax*. Rs1 обладает гетеротрофной универсальностью в поглощении углерода, фосфата и железа, свидетельствами независимого существования и многочисленными потенциальными вирулентными свойствами (Goffredi et al., 2014).

Литературных данных о наличии генов окисления УВ в геномах вышеперечисленных бактерий нами не обнаружено. Также мы не обнаружили исследуемых генов в депонированных (NCBI) геномах IMCC2047, JANEGP01 и Rs1.

Другая некультивируемая группа относится к JAGPUQ01 (семейство *Porticoccaceae*) и ранее была описана лишь в одном исследовании (Murphy et al., 2021). Эти бактерии выявлены в микрокосмах, где единственным источником углерода и энергии служили сырая нефть и дизельное топливо. Murphy с коллегами обнаружили в геноме JAGPUQ01 метан монооксигеназу, алкан 1-монооксигеназу (AlkB), цитохром P450 (CYP153), бифенил 2,3-диоксигеназу/ бензен 1,2-диоксигеназу, моно- и полиароматическую диоксигеназы (Murphy et al., 2021). В нашем исследовании в MAG JAGPUQ01 были найдены AlkB и CYP153, а также ряд других УВ-окисляющих ферментов (рисунок 41).

При анализе литературы нами не было обнаружено данных об УВ-окисляющей активности некоторых таксонов, несмотря на выявление в их геномах генов окисления УВ, рисунок 41. К таким бактериям относились представители *Psychromonas* sp., *Falsihalocynthiibacter arcticus* и *Rhodoglobus* sp. Бактерий рода *Psychromonas* описывают как пьезотолерантные, психроактивные, гетеротрофные микроорганизмы, способные формировать биоплёнки и разрушать альгинаты морских водорослей (Groudieva et al., 2003; Auman et al., 2006; Wang et al., 2024). В 2021 году вид *Halocynthiibacter arcticus* был реклассифицирован в *Falsihalocynthiibacter arcticus* (Liang et al., 2021). Представители *F. arcticus* являются аэробными психротолерантными гетеротрофными бактериями, впервые выделенными из морских осадков (Baek et al., 2015). Род *Rhodoglobus* включает в себя два вида - *R. vestalii* и *R. aureus* (Reddy et al., 2003; Sheridan et al., 2003). Оба вида были выделены из антарктических грунтов. Вид *R. vestalii* представлен грамположительными, аэробными, хемоорганогетеротрофными бактериями палочковидной формы с шарообразной структурой на конце, образующими красные колонии. Клетки *R. aureus* имеют палочковидную форму и образуют желтые колонии при поверхностном культивировании. Ранее в ходе

филогенетического анализа вид *Leifsonia aurea* был реклассифицирован в *R. aureus* (An et al., 2003), однако данных по утилизации УВ нефти бактериями вида *Leifsonia aurea* также не приводится.

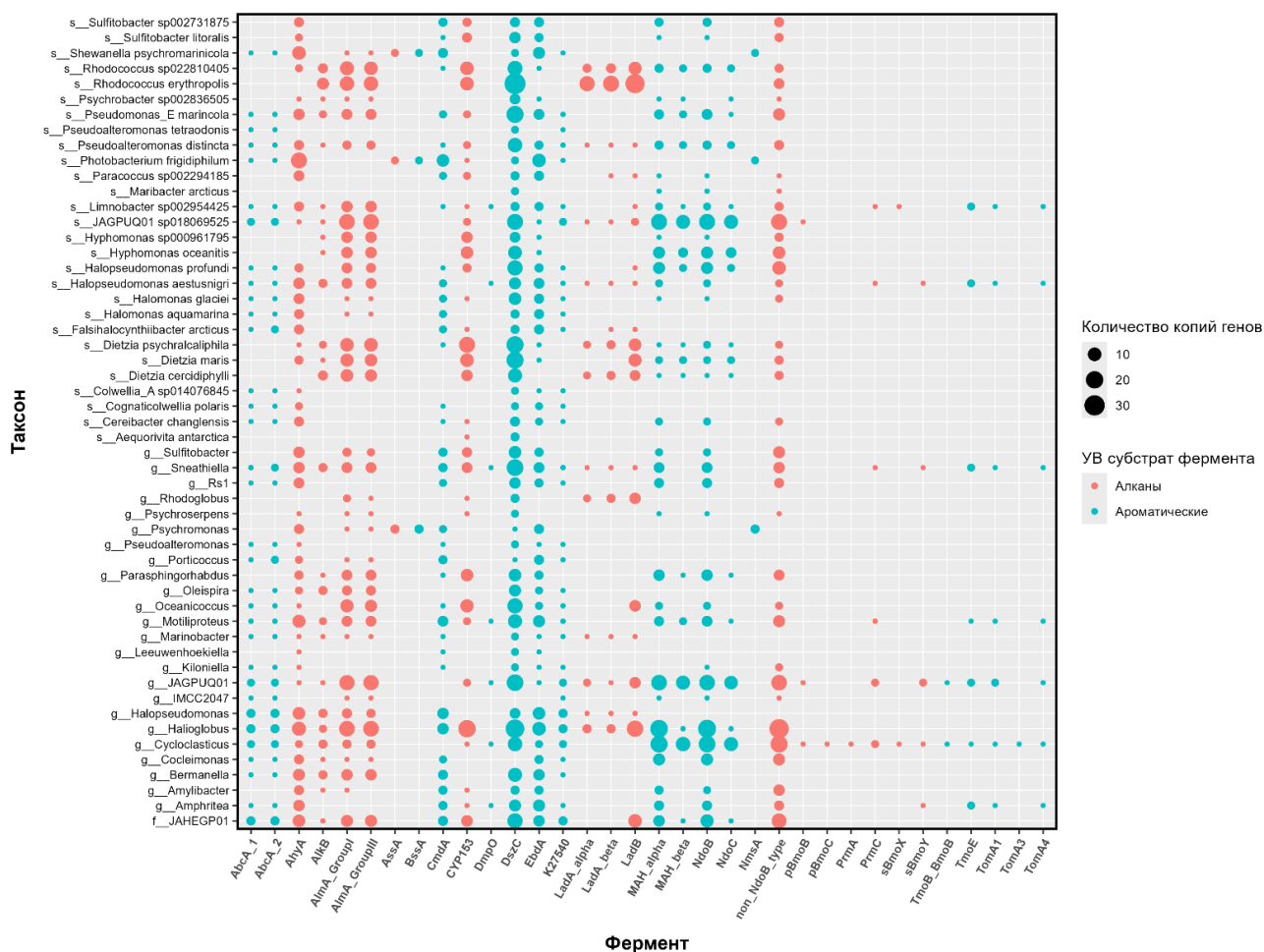


Рисунок 41. Распределение гомологов ферментов окисления УВ в MAG изолятов из Баренцева и Печерского морей, на основании базы данных SANT-HYD.

Выделенные нами в чистую культуру бактерии также оказались способными утилизировать разнообразные классы УВ, что подтверждается анализом информации, содержащейся в их геномах.

Как известно, в процессе аэробной утилизации компонентов нефти бактерии в первую очередь потребляют алифатические УВ (McGenity et al., 2019). При анализе полных геномов чистых культур были обнаружены следующие ферменты окисления алифатических УВ: AlkB, CYP153, AlmA, LadA, LadB. В исследуемых культурах ген *alkB* содержится в геномах бактерий *J. limosus* 15-23, "S.

*pechoriensens*" SB, *R. cerastii*. Pr 8, *D. maris* D. Наличие этого гена у бактерий родов *Rhodococcus* и *Dietzia* посвящено большое количество публикаций (Nie et al., 2014; Goma-Tchimbakala et al., 2023), однако присутствие гена *alkB* у бактерий родов *Janibacter* и *Salinibacterium* обнаружено нами впервые. Следует отметить, однако, что для *J. terrae* штамм S1N1 была показана утилизация алканов (Ezzat et al., 2022). Другой фермент, участвующий в процессе биodeградации алифатических алканов – цитохром P450 (CYP153), был обнаружен у тех же микроорганизмов.

Род *Salinibacterium* включает в себя 2 вида: *S. amurskyense* и *S. xinjiangense* (Han et al., 2003; Zhang et al., 2008). При определении видовой принадлежности штамма SB мы проанализировали геномы всех микроорганизмов из рода *Salinibacterium*, а также вида *Rhodoglobus aureus*, который, согласно базе данных GTDB, включает некоторые MAG, классифицируемые как *Salinibacterium*. Анализ ANI, AAI и ортологов, показал, что SB относится к роду *Salinibacterium* и филогенетически ближе к типовому виду. В геноме типового вида были обнаружены аналогичные ферменты окисления УВ, как и у SB, за исключением nonNdoBtype – белка, гомологичного  $\alpha$ -субъединице бензол/толуол/нафталиндиоксигеназы, что говорит об способности окислять УВ, как о родовом признаке этих бактерий.

В работах, описывающих новые виды *Salinibacterium*, не акцентируется внимание на способность к утилизации УВ. Исключение составляет описание *Salinibacterium metalliresistens* (реклассифицирован в *Antiquaquibacter metalliresistens*), где отмечается наличие генов окисления ПАУ, однако экспериментального подтверждения убыли УВ получено не было (Liu et al., 2024). Однако об УВ-окисляющей активности бактерий рода *Salinibacterium* сообщали другие исследователи. Так, Werner с коллегами описали способность *Salinibacterium* окислять сырую нефть в условиях почвенных микрокосмов (Werner et al., 2019). Морские изоляты *Salinibacterium* из побережья Патагонии оказались способными к утилизации ПАУ (Isaac et al., 2016). Штамм *Salinibacterium amurskyense* ARC 14 ВКПМ Ас-1993 был запатентован в качестве деструктора нефти и нефтепродуктов (Шестаков и др., 2017).

Субстратами для AlkB и CYP153 являются *n*-алканы короткой и средней длины углеродной цепи; более длинные алканы окисляются ферментами AlmA, LadA, LadB (Li et al., 2008; Wang, Shao, 2012). Wang и Shao в своем исследовании показали, что AlmA обладает широким распространением среди морских бактерий, ген *almA* встречается в разных географических локациях, а также в разных таксономических группах бактерий (Wang, Shao, 2012). В нашем исследовании гены *almA*, *ladA* и *ladB* были обнаружены у всех исследуемых чистых культур за исключением *D. maris D*.

Большинство чистых культур показали активность в отношении алифатических УВ, однако штаммы *Psychrobacter* 18-23 и *J. limosus* 15-23 не обладали алкан-окисляющей способностью. Эти бактерии были выделены из накопительной культуры с фенантроном в качестве единственного источника углерода. По данным NGS профилирования накопительных культур, бактерии рода *Psychrobacter* в большом количестве встречались в контроле, но при этом обладали генами окисления УВ (на основании метагеномного секвенирования). *J. limosus* 15-23, в свою очередь, имеет в своем геноме широкий спектр ферментов окисления УВ (на основании полногеномного секвенирования), в том числе и алифатических.

После нормальных и изо-алканов идет биodeградация стеранов. Предшественниками стерана являются холестерол в животных и водорослях,  $\beta$ -ситостерол и стигмастерол в высшей растительности и эргостерол в дрожжах и грибах (Seifert, Moldowan, 1979). В процессе диагенеза и катагенеза при средних термических условиях стеролы преобразуются в стераны с биологической конфигурацией  $\alpha\alpha\alpha R$  ( $5\alpha(H)$ ,  $14\alpha(H)$ ,  $17\alpha(H)$ ,  $20R$ ) (рисунок 42).

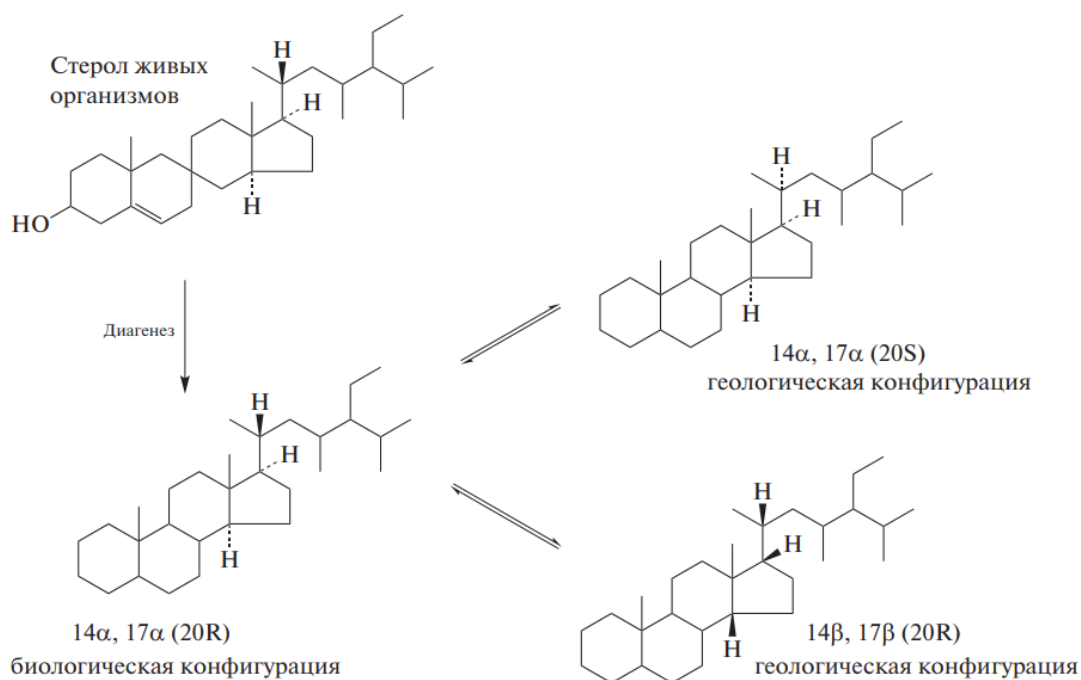


Рисунок 42. Трансформация 20R и 20S стеранов (эпимеров), 5 $\alpha$ (H),14 $\alpha$ (H),17 $\alpha$ (H) и 5 $\alpha$ (H),14 $\beta$ (H),17 $\beta$ (H) стеранов (диастереомеров). Пунктирной линией обозначена ориентация атома водорода в направлении от наблюдателя, относительно плоскости рисунка, треугольником – ориентированных к наблюдателю, относительно плоскости рисунка (Юсупова и др., 2023).

Кроме того, происходит частичная изомеризация боковой цепи, что приводит к смеси биологических 20R и геологических 20S эпимеров (Seifert, Moldowan, 1979). При биодеградаци биоконфигурации 20R подвергаются атаке бактерий быстрее, чем геоконфигурации 20S; также существует следующая последовательность: C<sub>27</sub>>C<sub>28</sub>>C<sub>29</sub> и  $\alpha\alpha\alpha R > \alpha\beta\beta R > \alpha\beta\beta S > \alpha\alpha\alpha S$  (Seifert and Moldowan, 1979; McKirdy et al., 1981). Из всех исследуемых культур только бактерии рода *Salinibacterium* показали активность в отношении биологического эпимера стерана C<sub>27</sub>. Остальные стераны и весь ряд гопанов затронут не был, что подтверждает литературные данные о низкой биодоступности этих соединений нефти. Гопаны – серия пентациклических тритерпанов, полученных из бактериальных предшественников липидов, появляются как повсеместно распространенные компоненты алифатической фракции сырой нефти. Гопаны считаются более устойчивыми к процессам биодеградаци (Ourisson et al., 1979; Prince et al., 1993).

Несмотря на широкое распространение циклических и ароматических УВ, в силу сложности своей структуры они менее подвержены биодegradации, чем алифатические УВ (Hidalgo et al., 2020). Тем не менее, бактерии имеют широкий спектр метаболических путей разложения этих соединений. Например, катехоловая ветвь бета-кетoadипатного пути и гены деградации бензоата широко представлены в бактериальных геномах (Harwood et al., 1995; Valderrama et al., 2012). В исследованных нами геномах были обнаружены ферменты DszC и TomA, кодирующие аэробную утилизацию ПАУ. Фермент DszC был обнаружен у всех характеризующих штаммов. DszC – это монооксигеназа двухкомпонентной флавиномоноксигеназной системы, которая катализирует два последовательных S-окисления дибензоокисления до дибензотиофен-5-сульфооксида, а затем дибензотиофен-5,5-диоксида. Этот фермент наиболее полно изучен на примере бактерии *Rhodococcus erythropolis*, с целью применения свойства десульфуризации в промышленности (Gonzalez-Orsorio et al., 2016). Warkhade с коллегами отмечают высокую представленность DszC в метагеномах холодных высачиваний в Средиземном и Каспийском морях, что может свидетельствовать об активном процессе десульфуризации ПАУ в водных местообитаниях (Warkhade et al., 2025). Способность к утилизации ПАУ связана с повсеместным распространением этих УВ в природе: они встречаются в растительных остатках, метаболитах фитопланктона и ксенобиотиках (De Luca et al., 2005; Rojo, 2019).

Отдельно стоит отметить, что бактерии *Rhodococcus* и *Dietzia* являются известными крайне эффективными окислителями ксенобиотиков, что подтверждается нашими экспериментальными данными: в их геномах обнаружено наибольшее количество генов окисления УВ как алифатических, так и ароматических соединений.

Из исследуемых чистых культур наиболее активными в отношении ПАУ являлись бактерии *J. limosus* 15-23, "*S. pechoriensens*" SB, *D. maris* D и *P. tetraodonis* Ps19. На основании результатов полногеномного секвенирования все перечисленные бактерии обладают генами окисления ароматических УВ. Литературные данные подтверждают способность бактерий рода *Janibacter* и

*Dietzia* к деградации ПАУ и родственных соединений. Yamazoe с коллегами сообщают о *Janibacter* sp. штамм YY-1, который окислял ряд ароматических соединений (нафталин, бифенил, дифениловый эфир, аценафтен, дибензофурана, дибензо-*n*-диоксин, флуорен, ксантен и другие; Yamazoe et al., 2004). В экспериментах с *Dietzia* sp. штамм DQ12-45-1b убыль ароматических УВ нефти наблюдалась уже на 8 сутки культивирования (Wang et al., 2011).

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

Особый интерес представляют бактерии рода *Pseudoalteromonas*, чья способность к окислению УВ до сих пор остаётся предметом научных дискуссий. Настоящее исследование выявило видоспецифичную активность этих бактерий в отношении нефтяных соединений. Так, *P. tetraodonis* Ps19 продемонстрировал способность разлагать как алифатические, так и ароматические УВ, тогда как *P. prydzensis* Ps15 не проявил подобной активности несмотря на то, что оба были выделены из накопительных культур с *n*-ундеканом в качестве единственного источника углерода.

Результаты метагеномного секвенирования подтверждают наличие у представителей рода *Pseudoalteromonas* генов окисления УВ. Это согласуется с данными Zan и коллег, которые обнаружили у представителей этого рода гены *alkB*, *ligB*, *yqhD* и *ladA* (Zan et al., 2021). Более того, полногеномный анализ штаммов Ps19 и Ps15 выявил присутствие ферментов sVmoZX, Alma, TomA, K27540 и DszC, кодирующих ферменты деградации УВ. Полученные данные подтверждаются экспериментальными исследованиями: ранее было показано, что бактерии этого рода способны окислять как алифатические, так и ароматические соединения (Богатыренко и др., 2013 Hedlund, Staley, 2006).

Таким образом, выделенные из исследуемых морей чистые культуры бактерий обладают широким арсеналом ферментов и демонстрируют способность к комплексной деградации широкого спектра нефтяных УВ. Полученные

результаты подтверждают их значительный биотехнологический потенциал для разработки технологий утилизации УВ загрязнений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что проблема нефтяного загрязнения на сегодняшний день стоит очень остро, нужно принимать во внимание, что УВ являются частью морской среды обитания на протяжении миллионов лет, и водные экосистемы обладают способностью к самоочищению, в первую очередь за счет УВ-окисляющих микроорганизмов.

При профилировании образцов Баренцева и Печорского морей не было выявлено таксонов бактерий характерных для мест с хроническим загрязнением нефти, даже несмотря на активную добычу нефти в Печорском море. Отличительными доминирующими таксонами Баренцева моря были *Luteolibacter*, NB1-j, Sva0081, *Colwellia*, для Печорского моря – *Amylibacter*, *Sandaracinaceae*, *Methyloceanibacter*. При этом для обеих акваторий характерны бактерии *Nitrincolacaceae*, *Ca. Thioglobus*, *Polaribacter*, *Woesiae*, *Desulfobulbaceae*, Sva1033.

Путем таксономического анализа накопительных культур, развивающихся в присутствии УВ, было установлено, что в них присутствовали разнообразные бактерии, относящиеся к четырём филумам – *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota* и *Pseudomonadota*. Накопительные культуры из материала Баренцева моря характеризовались доминированием бактерий родов *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Oleispira* и *Porticoccus*. Перечисленные таксоны ассоциированы с микро- и макроводорослями и разлагают их полисахариды. В микробных сообществах накопительных культур, полученных в присутствии УВ из образцов НМ Печорского моря, доминировали типичные деструкторы УВ, которые отличались быстрым ростом и широким спектром используемых УВ субстратов: *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, *Hyphomonas*. Эти таксоны имеют широкий спектр потребления УВ субстратов и часто детектируются в местах с хроническим загрязнением нефти.

Встречаемость УВОБ выше в образцах морской воды, нежели в донных отложениях, что, вероятно, связано с распространением УВ геологического происхождения в водной толще, а не в донных отложениях, а также с ассоциацией исследуемых таксонов с фитопланктоном и потреблением УВ, выделяемых в качестве вторичных метаболитов.

Исследуемые микробные сообщества обладают генетическим потенциалом для утилизации УВ: у исследуемых таксонов в геномах присутствуют ферменты, окисляющие как алифатические, так и ароматические УВ. Также в данном процессе участвуют представители ранее некультивируемых линий, включая таксоны JAGPUQ01, JANEGP01, Rs1, IMCC2047, в геномах которых также идентифицированы ферменты окисления УВ.

Выделенные в чистую культуру бактерии относятся к родам *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Halopseudomonas*, *Stutzerimonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Salinibacterium*, *Janibacter*. Штамм SB из рода *Salinibacterium* представляет собой новый вид. Экспериментально подтверждена способность новых изолятов к утилизации УВ, что согласуется с данными, полученными генетическими методами. 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*.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном биодegradационном потенциале микроорганизмов исследуемых морей в отношении нефтяных загрязнений.

## 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Агарков С.А., Матвишин Д.А. Влияние освоение региональных ресурсов углеводородов на экологическое состояние Печорского моря // Известия Санкт-Петербургского государственного экономического университета. – 2019. – №. 2 (116). – С. 58-67.
- 2 Алёшин Г.Н. Микроэлементный состав нефтей и нефтепродуктов: по данным нейтронно-активационного анализа: диссертация ... кандидата химических наук: 02.00.13. – Томск. 1986. – С. 268.
- 3 Аринбасаров М., Филонов А., Боронин А. Влияние катаболических плазмид на физиологические параметры бактерии рода *Pseudomonas* и эффективность биодеструкции нефти // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – №. 3.
- 4 Богатыренко Е., Бузолева Л., Репина М., Братенши А. Исследование нефтеокисляющей способности морских бактерий *Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas elyakovii* и *Oceaniphaera litoralis* // Фундаментальные исследования. – 2013. – №. 11-4. – С. 666-670.
- 5 Бойко Е.В. Химия нефти и топлив: учебное пособие для студентов, обучающихся // Федеральное агентство по образованию, Гос. образовательное учреждение высш. проф. образования Ульяновский гос. технический ун-т. - Ульяновск: УлГТУ. – 2007. –С. 59.
- 6 Вержичинская С.В., Дигуров Н.Г., Сеницин С.А. Химия и технология нефти и газа: учебное пособие для студентов образовательных учреждений среднего профессионального образования / С. В. Вержичинская, Н. Г. Дигуров, С. А. Сеницин. – Москва : Форум : ИНФРА-М. – 2007. – С. 399.
- 7 Гаврилов В.В. Правовой статус Северного морского пути Российской Федерации // Журнал российского права. – 2015. – №. 2 (218). – С. 147-157.

- 8 Ганюхина О.Ю. Природно-ресурсный потенциал Арктической зоны Российской Федерации // Аграрное и земельное право. – 2022. – №. 2 (206). – С. 112-115.
- 9 Гордадзе Г.Н. Углеводороды в нефтяной геохимии. Теория и практика. — М.: Российский государственный университет нефти и газа имени И. М. Губкина. 2015. — С. 559.
- 10 Еремин Н.А., Кондратюк А., Еремин А.Н. Ресурсная база нефти и газа арктического шельфа России // Георесурсы, геоэнергетика, геополитика. – 2010. – №. 1 (1). – С. 23
- 11 Ефремкин И.М., Холмянский М.А., Зеленковский П.С. Геоэкологическая характеристика южной части Баренцева моря (Долгинская площадь) // Вестник Санкт-Петербургского университета. Науки о Земле. – 2009. – №. 3. – С. 49-57.
- 12 Ковалёв И.В. Современное гидрохимическое состояние акватории Печорского моря в районе проведения разведочного бурения на углеводороды // Вестник Мурманского государственного технического университета. – 2006. – Т. 9. – № 5. – С. 839–842.
- 13 Кузьмин В. В., Варакин М. С. МЛСП «Приразломная»--уникальная нефтедобывающая платформа //Морской вестник. – 2020. – №. S1. – С. 31-33.
- 14 Кучейко А. Ю., Иванов А. Ю., Евтушенко Н. В., Александрова А. Г. Пленочные загрязнения Баренцева моря по данным радиолокационного мониторинга 2017-2019 гг // Экология и промышленность России. – 2020. – Т. 24. – №. 7. – С. 48-55.
- 15 Лисицын А. П., Агатова А. И., Агафонова Е. А. И др. Система Баренцева моря // Москва: ООО "Издательство ГЕОС". – 2021. – 672 с.
- 16 Маркова Ю.А., Петрушин И.С., Беловежец Л.А. Обнаружение генных кластеров биодеструкции алканов и ароматических соединений в

- геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27. – №. 3. – С. 276-282.
- 17 Малышев Н.А. Тектоника, эволюция и нефтегазоносность осадочных бассейнов европейского севера России. УрО РАН, 2002.
  - 18 Норина Д.А. Строение и нефтегазоматеринский потенциал пермско-триасовых терригенных отложений Баренцевоморского шельфа // Автореф. канд. дисс. на соиск. уч. степ канд. геол.-мин. наук. М.: МГУ. 2014.
  - 19 Патин С.А. Нефть и экология континентального // Гос. ком. Рос. Федерации по рыболовству, Федер. гос. унитар. предприятие "Всерос. науч.-исслед. ин-т рыб. хоз-ва и океанографии" (ВНИРО). – Москва : Издательство ВНИРО. – 2001. – С. 247.
  - 20 Плотникова И.Н. Фракционный состав нефти и методы его изучения: Учебно-методическое пособие // Казань: Казанский университет. 2012.
  - 21 Саввичев А.С. Микробные процессы циклов углерода и серы в морях Российской Арктики: автореферат дис. доктора биологических наук: 03.02.03 – Москва. – 2011. – С. 48.
  - 22 Селин В., Цукерман В., Виноградов А. Экономические условия и инновационные возможности обеспечения конкурентоспособности месторождений углеводородного сырья арктического шельфа / В. С. Селин, В. А. Цукерман, А. Н. Виноградов. – Апатиты : Институт экономических проблем им. Г.П. Лузина Кольского научного центра РАН. – 2008. – С. 267.
  - 23 Семенов А. М., Федоренко В. Н., Семенова Е. В. Микроорганизмы на поверхности морских макрофитов в северных морях России и их возможное практическое использование //Биосфера. – 2014. – Т. 6. – №. 1. – С. 60-76.

- 24 Сулова А. А. Сейсмостратиграфический анализ и перспективы нефтегазоносности юрских отложений Баренцевоморского шельфа //Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2014. – Т. 9. – №. 2. – С. 24.
- 25 Федоренко В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.02.03, 03.01.06 – Москва. – 2016. – С. 27.
- 26 Федоровский Ю. Ф., Захаров Е. В., Оксенойд Б. Е. Нефть Баренцева моря-новый этап освоения //Геология, геофизика и разработка нефтяных и газовых месторождений. – 2005. – №. 12. – С. 4-8.
- 27 Чупров В. С. Углеводородный потенциал Печорско-Баренцевоморского бассейна //Вестник геонаук. – 2008. – №. 11. – С. 7-12.
- 28 Шестаков А.И., Сережкин И.Н., Ламова Я.А., Князюк М.К., Федоренко В.Н., Шабалин Н.В., Шестакова О., Митрофанова Т.И., Исаченко А.И. Штамм *Salinibacterium amurskyense* ARC 14 ВКПМ Ас-1993-деструктор нефти и нефтепродуктов. – 2017.
- 29 Юсупова А.А., Гируц М.В., Васильева А.В., Вылекжанина Д.С., Гордадзе Г.Н. К вопросу образования диастеранов в нефти и органическом веществе пород // Геохимия. – 2023. – Т. 68. – №. 7. – С. 687–694.
- 30 Abay T.B., Karlsen D.A., Pedersen J.H., Olausen S., Backer-Owe K. Thermal maturity, hydrocarbon potential and kerogen type of some Triassic–Lower Cretaceous sediments from the SW Barents Sea and Svalbard // Petroleum Geoscience. – 2018. – Т. 24. – №. 3. – С. 349-373.

- 31 Abbasian F., Lockington R., Megharaj M., Naidu R. A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation // Applied biochemistry and biotechnology. – 2016. – Vol. 178. – №. 2. – PP. 224-250.
- 32 Al-Awadhi H., Dashti N., Kansour M., Sorkhoh N., Radwan S. Hydrocarbon-utilizing bacteria associated with biofouling materials from offshore waters of the Arabian Gulf // International Biodeterioration & Biodegradation. Elsevier. 2012. – Vol. 69. – PP. 10–16.
- 33 Alloway B., Ayres D. C. Chemical principles of environmental pollution. – CRC press. – 1997.
- 34 Alneberg J., Bjarnason B.S., de Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Loman N.J., Andersson A.F., Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // Nature methods. – 2014. – T. 11. – №. 11. – C. 1144-1146.
- 35 An S.-Y., Xiao T., Yokota A. Reclassification of *Leifsonia aurea* to the genus *Rhodoglobus* as *Rhodoglobus aureus* comb. nov., and emended description of *Rhodoglobus vestalii* Sheridan et al. 2003 // The Journal of general and applied microbiology. – 2010. Vol. 56. – PP. 53–55.
- 36 Auman A.J., Breezee J.L., Gosink J.J., Kämpfer P., Staley J.T. *Psychromonas ingrahamii* sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – Vol. 56. – №. 5. – PP. 1001–1007.
- 37 Ausuri J., Vitale G.A., Coppola D., Palma Esposito F., Buonocore C., de Pascale D. Assessment of the degradation potential and genomic insights towards phenanthrene by *Dietzia psychralcaliphila* J11D // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – №. 6. – P. 1327.
- 38 Baek K., Lee Y.M., Shin S.C., Hwang K., Hwang C.Y., Hong S.G., Lee H.K. *Halocynthiibacter arcticus* sp. nov., isolated from Arctic marine sediment //

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – Vol. 65– №. 11. – PP. 3861–3865.
- 39 Bailey N.J.L., Jobson A.M., Rogers M.A. Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data // *Chemical Geology*. – 1973. – Vol. 11 – №. 3. – PP. 203–221.
- 40 Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – Vol. 87. – №. 2. – PP. 427–444.
- 41 Begmatov S., Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Rusanov I.I., Klyuvitkin A.A., Novichkova E.A., Mardanov A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V. Microbial communities involved in methane, sulfur, and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 11. – PP. 2362.
- 42 Bell K. S., Kuyukina M. S., Heidbrink S., Philp J. C., Aw D. W. J., Ivshina I. B., Christofi A. Identification and environmental detection of *Rhodococcus species* by 16S rDNA-targeted PCR // *Journal of applied microbiology*. – 1999. – Vol. 87. – №. 4. – PP. 472-480.
- 43 Belt S., Brown T., Smik L., Tatarek A., Wiktor J., Stowasser G., Assmy P., Allen C., Husum K. Identification of C<sub>25</sub> highly branched isoprenoid (HBI) alkenes in diatoms of the genus *Rhizosolenia* in polar and sub-polar marine phytoplankton // *Organic Geochemistry*. – 2017. – Vol. 110. – PP. 65-72.
- 44 Bienhold C., Boetius A., Ramette A. The energy–diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments // *The ISME journal*. – 2012. – Vol. 6. – №. 4. – PP. 724–732.

- 45 Bihari Z., Szvetnik A., Szabó Z., Blastyák A., Zombori Z., Balázs M., Kiss I. Functional analysis of long-chain n-alkane degradation by *Dietzia* spp. // FEMS Microbiology Letters. – 2011. – Vol. 316. – №. 2. – PP. 100–107.
- 46 Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30. – №. 15. – PP. 2114–2120.
- 47 Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nature biotechnology. – 2019. – Vol. 37. №. 8. – PP. 852–857.
- 48 Bosi E., Fondi M., Orlandini V., Perrin E., Maida I., de Pascale D., Tutino M.L., Parrilli E., Lo Giudice A., Filloux A., Fani R. The pangenome of (Antarctic) *Pseudoalteromonas* bacteria: evolutionary and functional insights. // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18. – №. 1. – PP. 93.
- 49 Buzoleva L., Bogatyrenko E., Repina M., Belkova N. Oil-oxidizing activity of bacteria isolated from south Sakhalin coastal waters // Microbiology. – 2017. – Vol. 86. – №. 3. – PP. 338–345.
- 50 Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nature methods – 2016. – Vol. 13. – №. 7. – PP. 581–583.
- 51 Callbeck C.M., Lavik G., Ferdelman T.G., Fuchs B., Gruber-Vodicka H.R., Hach P.F., Littmann S., Schoffelen N.J., Kalvelage T., Thomsen S., others. Oxygen minimum zone cryptic sulfur cycling sustained by offshore transport of key sulfur oxidizing bacteria // Nature communications. – 2018. Vol. 9. – №. 1. – PP. 1729.
- 52 Camacho-Montealegre C.M., Rodrigues E.M., Morais D.K., Tótola M.R. Prokaryotic community diversity during bioremediation of crude oil

- contaminated oilfield soil: effects of hydrocarbon concentration and salinity // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2021. – Vol. 52. – №. 2. – PP. 787–800.
- 53 Cappelletti M., Fedi S., Zannoni D. Degradation of alkanes in *Rhodococcus* // *Biology of Rhodococcus*. – 2019. – PP. 137–171.
- 54 Caro Pascual A. Hydrocarbon biodegradation potential in environmental bacterial metagenome: Master's Thesis. UiT Norges arktiske universitet. – 2020.
- 55 Caruso V., Song X., Asquith M., Karstens L. Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass // *mSystems*. – 2019. – Vol. 4. – №. 1. – PP. 10.1128/msystems.00163-18.
- 56 Chattopadhyay M., Jagannadham M. Maintenance of membrane fluidity in Antarctic bacteria // *Polar biology*. – 2001. – Vol. 24. – №. 5. – PP. 386–388.
- 57 Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Oxford University Press. – 2020.
- 58 Chosson P. In vitro biodegradation of steranes and terpanes: a clue to understanding geological situations // *Biological markers in sediments and petroleum*. – 1989. – PP. 320-349.
- 59 Chen H., Ma K., Huang Y., Yang Y., Ma Z., Chu C. Salinity drives functional and taxonomic diversities in global water metagenomes // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – PP. 719725.
- 60 Chen S. C. Musat, F., Richnow, H. H., & Krüger, M. Microbial diversity and oil biodegradation potential of northern Barents Sea sediments // *Journal of Environmental Sciences*. – 2024. – Vol. 146. – PP. 283-297.

- 61 Chong J., Liu P., Zhou G., Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data // *Nature protocols*. – 2020. – Vol. 15. – №. 3. – PP. 799–821.
- 62 Cordone A., D’Errico G., Magliulo M., Bolinesi F., Selci M., Basili M., de Marco R., Saggiomo M., Rivaro P., Giovannelli D. Bacterioplankton diversity and distribution in relation to phytoplankton community structure in the Ross Sea surface waters // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – PP. 722900.
- 63 D Ainsworth T., Krause L., Bridge T., Torda G., Raina J.-B., Zakrzewski M., Gates R.D., Padilla-Gamiño J.L., Spalding H.L., Smith C., others. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts // *The ISME journal*. – 2015. – Vol. 9. – №. 10. – PP. 2261–2274.
- 64 Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // *Biotechnology research international*. – 2011. – Vol. 2011. – №. 1. – P. 941810.
- 65 De Carvalho C.C., Costa S.S., Fernandes P., Couto I., Viveiros M. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* // *Frontiers in physiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 133.
- 66 De Luca G. et al. Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy) // *Marine Pollution Bulletin*. – 2005. – Vol. 50. – №. 11. – PP. 1223–1232.
- 67 Deppe U., Richnow H.-H., Michaelis W., Antranikian G. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9. – №. 6. – PP. 461–470.

- 68 Díaz E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. Sociedad Española de Microbiología. – 2004.
- 69 Dong C., Bai X., Sheng H., Jiao L., Zhou H., Shao Z. Distribution of PAHs and the PAH-degrading bacteria in the deep-sea sediments of the high-latitude Arctic Ocean // Biogeosciences. – 2015. – Vol. 12. – №. 7. – PP. 2163–2177.
- 70 Dubinsky E.A., Conrad M.E., Chakraborty R., Bill M., Borglin S.E., Hollibaugh J.T., Mason O.U., M. Piceno Y., Reid F.C., Stringfellow W.T. Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico // Environmental science & technology. – 2013. – Vol. 47. – №. 19. – PP. 10860–10867.
- 71 Duran R., Bielen A., Paradžik T., Gassie C., Pustijanac E., Cagnon C., Hamer B., Vujaklija D. Exploring *Actinobacteria* assemblages in coastal marine sediments under contrasted Human influences in the West Istria Sea, Croatia. // Environ Sci Pollut Res Int. – 2015. – Vol. 22Ю – №. 20. – PP. 15215–15229.
- 72 Dyksterhouse S.E., Gray J.P., Herwig R.P., Lara J.C., Staley J.T. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1995. – Vol. 45. – №. 1. – PP. 116–123.
- 73 Eddy B. The use and meaning of the term ‘psychrophilic’ // Journal of Applied Bacteriology. – 1960. – Vol. 23. – № 2. – PP. 189–190.
- 74 Eddy S. R. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference // Genome Informatics. – 2009. – Vol. 23. – 2009. – PP. 205-211.
- 75 Egorov A., Prischepa O., Nefedov Y., Kontorovich V., Vinokurov I. Deep Structure, Tectonics and Petroleum Potential of the Western Sector of the

- Russian Arctic // Journal of Marine Science and Engineering. – 2021. – Vol. 9. – PP. 258.
- 76 Emms D.M., Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. // Genome Biol. – 2019. – Vol. 20. – №. 1. – P. 238.
- 77 Ezzat S.M., Ahmed N.A. Short-Term Biodegradation of Crude Petroleum Oil in Water by Photostimulated *Janibacter terrae* Strain S1N1. // ACS Omega. –2022. – Vol. 7. – №. 16. – PP. 13976–13984.
- 78 Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. – 2014. – Vol. 2. – №. 1. – P. 6.
- 79 Fisher, S.J., Alexander, R., Kagi, R.I., and Oliver, G.A., Aromatic hydrocarbons as indicators of biodegradation in north Western Australian reservoirs, in The Sedimentary Basins of Western Australia: Proc. West Australian Basins Symposium. –1998. – Vol. 2. – PP. 185-194.
- 80 Freitas F.S., Hendry K.R., Henley S.F., Faust J.C., Tessin A.C., Stevenson M.A., Abbott G.D., März C., Arndt S. Benthic-pelagic coupling in the Barents Sea: an integrated data-model framework // Philosophical Transactions of the Royal Society A. – 2020. – Vol. 378. – № 2181. – PP. 20190359.
- 81 Fritsche W., Hofrichter M. Aerobic degradation by microorganisms // Biotechnology set. – 2001. – PP. 144–167.
- 82 Garrett R.M., Pickering I.J., Haith C.E., Prince R.C. Photooxidation of crude oils // Environmental science & technology. –1998. – Vol. 32. – №. 23. – PP. 3719–3723.
- 83 Gerdes B. et al. Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice // FEMS Microbiology Ecology. – 2005. – Vol. 53. – №. 1. – PP. 129-139.

- 84 Gertz E.M., Yu Y.-K., Agarwala R., Schäffer A.A., Altschul S.F. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST // *BMC biology*. – 2006. – Vol. 4. – №. 1. – P. 41.
- 85 Ghosal D. Ghosh, S., Dutta, T. K., Ahn, Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – PP. 208111.
- 86 Gibson D.T., Parales R.E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology // *Current opinion in biotechnology*. – 2000. – Vol. 11. – №. 3. – PP. 236–243.
- 87 Goffredi S. K., Yi H., Zhang Q., Klann J. E., Struve I. A., Vrijenhoek R. C., Brown C.T. Genomic versatility and functional variation between two dominant heterotrophic symbionts of deep-sea *Osedax* worms // *The ISME Journal*. – 2014. – Vol. 8. – №. 4. – PP. 908-924.
- 88 Gohl D.M., Vangay P., Garbe J., MacLean A., Hauge A., Becker A., Gould T.J., Clayton J.B., Johnson T.J., Hunter R. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies // *Nature biotechnology*. – 2016. – Vol. 34. – №. 9. – PP. 942–949.
- 89 Goma-Tchimbakala E.J.C.D., Pietrini I., Goma-Tchimbakala J., Corgnati S.P. Use of Shotgun Metagenomics to Assess the Microbial Diversity and Hydrocarbons Degrading Functions of Auto-Mechanic Workshops Soils Polluted with Gasoline and Diesel Fuel. // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 3. – P. 722.
- 90 Gontikaki E., Potts L., Anderson J., Witte U. Hydrocarbon-degrading bacteria in deep-water subarctic sediments (Faroe-Shetland channel) // *Journal of applied microbiology*. – 2018. – Vol. 125. – №. 4. – PP. 1040–1053.

- 91 Gonzalez-Osorio L., Luong K., Jirde S., Palfey B.A., Vey J.L. Initial investigations of C4a-(hydro)peroxyflavin intermediate formation by dibenzothiophene monooxygenase. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2016. Vol. 481. – № 1–2. – PP. 189–194.
- 92 Groudieva T., Grote R., Antranikian G. *Psychromonas arctica* sp. nov., a novel psychrotolerant, biofilm-forming bacterium isolated from Spitzbergen // *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* – 2003. Vol. 53. – №. 2. – PP. 539–545.
- 93 Grossi V., Raphel D., Aubert C., Rontani J.-F. The effect of growth temperature on the long-chain alkenes composition in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* // *Phytochemistry.* – 2000. – Vol. 54. – №. 4. – PP. 393–399.
- 94 Guo X., Qiu L., Liang Z., Lu Q., Wang S., Shim H. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. GG1 for metabolic degradation of chloroxylenol // *Chemosphere.* – 2023. – Vol. 338. – P. 139462.
- 95 Gurav R., Lyu H., Ma J., Tang J., Liu Q., Zhang H. Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes // *Environmental Science and Pollution Research.* – 2017. – Vol. 24. – №. 12. – PP. 11392–11403.
- 96 Gutierrez T., Nichols P.D., Whitman W.B., Aitken M.D. *Porticoccus hydrocarbonoclasticus* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium identified in laboratory cultures of marine phytoplankton // *Applied and environmental microbiology.* – 2012. – Vol. 78. – №. 3. – PP. 628–637.
- 97 Harwood C.S., Parales R.E. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. // *Annu Rev Microbiol.* – 1996. – Vol. 50. – PP. 553–590.
- 98 Han S.K., Nedashkovskaya O.I., Mikhailov V.V., Kim S.B., Bae K.S. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family

- Microbacteriaceae from the marine environment. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2003. – Vol. 53. – №. 6. – PP. 2061–2066.
- 99 Hazen T.C., Prince R.C., Mahmoudi N. Marine oil biodegradation. ACS Publications. – 2016 – PP. 2121-2129.
- 100 Hedlund B. P., Staley J. T. Isolation and characterization of Pseudoalteromonas strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties //Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 8. – №. 1. – PP. 178-182.
- 101 Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., de Oliveira V.M. Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. // Front Microbiol. – 2020. Vol. 11. – PP. 561506.
- 102 Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Applied and environmental microbiology. – 2014. – Vol. 80. – №. 16. – PP. 5116–5123.
- 103 Im Jeong H., Jin H.M., Jeon C.O. Complete genome sequence of *Sphingorhabdus* sp. M41, a versatile hydrocarbon degrader, isolated from crude oil-contaminated coastal sediment // Journal of Biotechnology. – 2016. – Vol. 227. – PP. 41–42.
- 104 Isaac P., Bourguignon N., Maizel D., Ferrero M. Indigenous PAH-Degrading Bacteria in Oil-Polluted Marine Sediments from Patagonia: Diversity and Biotechnological Properties // Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms. – 2016. – P. 31-42.

- 105 Ismail W., Gescher J. Epoxy coenzyme A thioester pathways for degradation of aromatic compounds // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. Vol. 78. – №. 15. – PP. 5043–5051.
- 106 Jacob M., Soltwedel T., Boetius A., Ramette A. Biogeography of deep-sea benthic bacteria at regional scale (LTER HAUSGARTEN, Fram Strait, Arctic) // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – №. 9. – P. e72779.
- 107 Jaekel U. Anaerobic oxidation of short-chain and cyclic alkanes by sulfate-reducing bacteria: PhD Thesis. University of Bremen Bremen. – 2011.
- 108 Jobson A., Cook F.D., Westlake D.W. Microbial utilization of crude oil. // *Appl Microbiol*. –1972. – Vol. 23. – №. 6. – PP. 1082–1089.
- 109 Jørgensen B.B., Boetius A. Feast and famine–microbial life in the deep-sea bed // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – Vol. 5. – №. 10. – P. 770–781.
- 110 Junge K., Krembs C., Deming J., Stierle A., Eicken H. A microscopic approach to investigate bacteria under in situ conditions in sea-ice samples // *Annals of Glaciology*. – 2001. – Vol. 33. – P. 304–310.
- 111 Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies // *PeerJ*. – 2019. – Vol. 7. – P. e7359.
- 112 Kang I., Kang D., Oh H.-M., Kim H., Kim H.-J., Kang T.-W., Kim S.-Y., Cho J.-C. Genome sequence of strain IMCC2047, a novel marine member of the Gammaproteobacteria. // *J Bacteriol*. – 2011. – Vol. 193. – №. 14. – PP. 3688–3689.
- 113 Kertesz M. A., Kawasaki A., Stolz A. Aerobic hydrocarbon-degrading alphaproteobacteria: Sphingomonadales // *Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes*. – 2019. – PP. 105-124.

- 114 Khot V., Zorz J., Gittins D.A., Chakraborty A., Bell E., Bautista M.A., Paquette A.J., Hawley A.K., Novotnik B., Hubert C.R.J., Strous M., Bhatnagar S. CANT-HYD: A Curated Database of Phylogeny-Derived Hidden Markov Models for Annotation of Marker Genes Involved in Hydrocarbon Degradation. // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 764058.
- 115 Kim D., Park S., Chun J. Introducing EzAAI: a pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity. // *J Microbiol.* – 2021. Vol. 59. – №. 5. – PP. 476–480.
- 116 King G., Kostka J., Hazen T., Sobecky P. Microbial responses to the Deepwater Horizon oil spill: from coastal wetlands to the deep sea // *Annual review of marine science.* – 2015. – Vol. 7. – №. 1. – PP. 377–401.
- 117 Kniemeyer O., Musat F., Sievert S.M., Knittel K., Wilkes H., Blumenberg M., Michaelis W., Classen A., Bolm C., Joye S.B., Widdel F. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria // *Nature.* 2007. – Vol. 449. – №. 7164. – PP. 898–901.
- 118 Kok M., Oldenhuis R., van der Linden M.P., Raatjes P., Kingma J., van Lelyveld P.H., Witholt B. The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene: sequence and expression // *Journal of Biological Chemistry.* – 1989. – Vol. 264. – №. 10. – P. 5435–5441.
- 119 Kudryavtseva E., Kravchishina M., Pautova L., Rusanov I., Silkin V., Glukhovets D., Torgunova N., Netsvetaeva O., Politova N., Klyuvitkin A., Savvichev A. Size Structure of Primary Producers in the Marginal Ice Zone of the European Arctic in Summer // *Doklady Earth Sciences.* – 2023. – Vol. 507. – PP. S313–S318.
- 120 Kvenvolden K., Cooper C. Natural seepage of crude oil into the marine environment // *Geo-marine letters.* – 2003. – Vol. 23. – №. 3. – PP. 140–146.

- 121 Larkin M. J., Kulakov L. A., Allen C. C. R. Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility // Current opinion in Biotechnology. – 2005. – Vol. 16. – №. 3. – PP. 282-290.
- 122 Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome // Genome biology. – 2009. – Vol. 10. – №. 3. – P. R25.
- 123 Lea-Smith D. J., Biller S. J., Davey M. P., Cotton C. A., Perez Sepulveda B. M., Turchyn A. V., Howe C. J. Contribution of cyanobacterial alkane production to the ocean hydrocarbon cycle // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – №. 112(44). – PP. 13591-13596.
- 124 Leahy J.G., Tracy K.D., Eley M.H. Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria // FEMS microbiology ecology. – 2003. – Vol. 43. – №. 2. – PP. 271–276.
- 125 Lee D.W., Lee H., Kwon B.-O., Khim J.S., Yim U.H., Park H., Park B., Choi I.-G., Kim B.S., Kim J.-J. *Maribacter litoralis* sp. nov. a marine bacterium isolated from seashore // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – Vol. 68. – №. 11. – PP. 3471–3478.
- 126 Lerch B., Karlsen D., Matapour Z., Seland R., Backer-Owe K. Organic geochemistry of Barents Sea petroleum: thermal maturity and alteration and mixing processes in oils and condensates // Journal of Petroleum Geology. – 2016. – Vol. 39. – №. 2. – PP. 125–148.
- 127 Li C., Lai Q., Li G., Liu Y., Sun F., Shao Z. Multilocus sequence analysis for the assessment of phylogenetic diversity and biogeography in *Hyphomonas* bacteria from diverse marine environments. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. №. 7. – P. e101394.
- 128 Li L., Liu X., Yang W., Xu F., Wang W., Feng L., Bartlam M., Wang L., Rao Z. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in

- complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. // *J Mol Biol.* – 2008. – Vol. 376. – №. 2. – PP. 453–465.
- 129 Li Y.-Q., Xin Y., Li C., Liu J., Huang T. Metagenomics-metabolomics analysis of microbial function and metabolism in petroleum-contaminated soil // *Brazilian Journal of Microbiology.* – 2023. – Vol. 54. – №. 2. – PP. 935–947.
- 130 Liang J.-L., JiangYang J.-H., Nie Y., Wu X.-L. Regulation of the Alkane Hydroxylase CYP153 Gene in a Gram-Positive Alkane-Degrading Bacterium, *Dietzia* sp. Strain DQ12-45-1b // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2016. – Vol. 82. – №. 2. – PP. 608–619.
- 131 Liang K.Y., Orata F.D., Boucher Y.F., Case R.J. Roseobacters in a sea of poly-and paraphyly: whole genome-based taxonomy of the family Rhodobacteraceae and the proposal for the split of the “Roseobacter clade” into a novel family, Roseobacteraceae fam. nov. // *Frontiers in Microbiology.* – 2021. – Vol. 12. – P. 683109.
- 132 Lin H., Peddada S.D. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction // *Nature communications.* – 2020. – Vol. 11. – №. 1. – P. 3514.
- 133 Liu Z. S., Wang K. H., Cai M., Yang M. L., Wang X. K., Ma H. L., Liu S. J. *Agromyces chromiirensistens* sp. nov., *Novosphingobium album* sp. nov., *Sphingobium arsenicirensistens* sp. nov., *Sphingomonas pollutisoli* sp. nov., and *Salinibacterium metallirensistens* sp. nov.: five new members of *Microbacteriaceae* and *Sphingomonadaceae* from polluted soil // *Frontiers in Microbiology.* – 2023. – Vol. 14. – PP. 1289110.
- 134 Lovejoy C., Bowman J.P., Hallegraeff G.M. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma* // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1998. – Vol. 64. – №. 8. – PP. 2806–2813.

- 135 Lutz R., Klitzke P., Weniger P., Blumenberg M., Franke D., Reinhardt L., Ehrhardt A., Berglar K. Basin and petroleum systems modelling in the northern Norwegian Barents Sea // *Marine and Petroleum Geology*. – 2021. – Vol. 130. – P. 105128.
- 136 Lyu T., Yang W., Cai H., Wang J., Zheng Z., Zhu J. Phytoplankton community dynamics as a metrics of shrimp healthy farming under intensive cultivation // *Aquaculture Reports*. – 2021. – Vol. 21. – P. 100965.
- 137 Lyu Y., Zheng W., Zheng T., Tian Y. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – №. 7. – PP. 1–8.
- 138 Ma Y., Wang J., Liu Y., Wang X., Zhang B., Zhang W., Chen T., Liu G., Xue L., Cui X. *Nocardioides*: “specialists” for hard-to-degrade pollutants in the environment // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – №. 21. – P. 7433.
- 139 Margesin R., Schinner F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology // *Journal of Biotechnology*. – 1994. – Vol. 33. – №. 1. – PP. 1–14.
- 140 Martin K., Schumann P., Rainey F.A., Schuetze B., Groth I. *Janibacter limosus* gen. nov., sp. nov., a new actinomycete with meso-diaminopimelic acid in the cell wall // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 1997. – Vol. 47. – №. 2. – P. 529–534.
- 141 Mason O.U., Han J., Woyke T., Jansson J.K. Single-cell genomics reveals features of a *Colwellia* species that was dominant during the Deepwater Horizon oil spill // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 332.
- 142 McCaffrey M.A., Moldowan J.M., Lipton P.A., Summons R.E., Peters K.E., Jeganathan A., Watt D.S. Paleoenvironmental implications of novel C<sub>30</sub> steranes in Precambrian to Cenozoic Age petroleum and bitumen // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1994. – Vol. 58. – №. 1. – PP. 529–532.

- 143 McGenity T.J. Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes. – 2019.
- 144 McKirdy D., Aldridge A.K., Ypma P.J.M. A geochemical comparison of some crude oils from pre-Ordovician carbonate rocks // *Advances in Organic Geochemistry*. – 1981. – P. 99–107.
- 145 Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O., Toshchakov S. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // *Microbiology*. – 2019. – Vol. 88. – №. 6. – PP. 671–680.
- 146 Misson B., Garnier C., Lauga B., Dang D.H., Ghiglione J.-F., Mullet J.-U., Duran R., Pringault O. Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. // *Sci Total Environ*. – 2016. – Vol. 556. – PP. 319–329.
- 147 Moreno R., Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria // *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*. – 2017. – PP. 1–25.
- 148 Mori J.F., Chen L.-X., Jessen G.L., Rudderham S.B., McBeth J.M., Lindsay M.B., Slater G.F., Banfield J.F., Warren L.A. Putative mixotrophic nitrifying-denitrifying gammaproteobacteria implicated in nitrogen cycling within the ammonia/oxygen transition zone of an oil sands pit lake // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2435.
- 149 Morita R.Y. Psychrophilic bacteria // *Bacteriological reviews*. – 1975. – Vol. 39. – №. 2. – PP. 144–167.
- 150 Mulet M., David Z., Nogales B., Bosch R., Lalucat J., García-Valdés E. *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill // *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology. – 2011. – Vol. 77. – №. 3. – PP. 1076–1085.

- 151 Murphy S.M., Bautista M.A., Cramm M.A., Hubert C.R. Diesel and crude oil biodegradation by cold-adapted microbial communities in the Labrador Sea // *Applied and environmental microbiology*. – 2021. – Vol. 87. – №. 20. – P. e00800-21.
- 152 National Petroleum Council. Arctic Potential: Realizing the Promise of U.S. Arctic Oil and Gas Resources [Electronic resource]. – 2015. – URL: <https://www.npcarcticreport.org/> (accessed: 08.11.2023).
- 153 Nicolaisen J., Elvebakk G., Ahokas J., Bojesen-Koefoed J., Olaussen S., Rinna J., Skeie J., Stemmerik L. Characterization of upper Palaeozoic organic-rich units in Svalbard: Implications for the petroleum systems of the Norwegian Barents shelf // *Journal of Petroleum Geology*. –2019. – Vol. 42. – №. 1. – P. 59–78.
- 154 Nie Y., Chi C.-Q., Fang H., Liang J.-L., Lu S.-L., Lai G.-L., Tang Y.-Q., Wu X.-L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. // *Sci Rep*. – 2014. – Vol. 4. – P. 4968.
- 155 Nikolopoulou M., Kalogerakis N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2009. – Vol. 84. – №. 6. – P. 802–807.
- 156 Nölvak H., Dang N.P., Truu M., Peeb A., Tiirik K., O’Sadnick M., Truu J. Microbial community dynamics during biodegradation of crude oil and its response to biostimulation in Svalbard seawater at low temperature // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 12. – P. 2425.
- 157 Norwegian Petroleum Directorate. Doubling the resource estimate for the Barents Sea [Electronic resource]. – 2017. – URL: <https://www.npd.no/en/news/News/2017/Doubling-the-resource-estimate-for-the-Barents-Sea/> (accessed: 08.11.2023).

- 158 Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // *Genome research*. – 2017. – Vol. 27. – № 5. – PP. 824–834.
- 159 Olajire A., Essien J. Aerobic degradation of petroleum components by microbial consortia // *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. – 2014. – Vol. 5. – №. 5. – P. 1.
- 160 Ourisson G., Albrecht P., Rohmer M. The Hopanoids: palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products // *Pure and Applied Chemistry*. – 1979. – Vol. 51. – PP. 709–729.
- 161 Panke S. et al. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65. – №. 6. – PP. 2324-2332.
- 162 Park J., Baek G.S., Woo S.-G., Lee J., Yang J., Lee J. *Luteolibacter yonseiensis* sp. nov., isolated from activated sludge using algal metabolites // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2013. – Vol. 63. –, №. Pt\_5. – PP. 1891–1895.
- 163 Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome research*. – 2015. – Vol. 25. – №. 7. – P. 1043–1055.
- 164 Pedrini N., Ortiz-Urquiza A., Huarte-Bonnet C., Zhang S., Keyhani N.O. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction // *Frontiers in microbiology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 24.
- 165 Peters K.E. Biological markers in sediments and petroleum: Edited by J. Michael Moldowan, Pierre Albrecht and R. Paul Philp. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ // *Organic Geochemistry*. – 1993. – Vol. 20. – №. 1. – P. 117.

- 166 Popa E., Iordache I. Dynamics of nitrogen-bound fuel conversion to nitrogen oxides by biomass combustion // *Revue Roumaine des Sciences Techniques Serie Electrotechnique et Energetique*. –2007. – Vol. 52. – №. 1. – P. 121.
- 167 Powell T. Pristane/phytane ratio as environmental indicator // *Nature*. – 1988. Vol. 333. – №. 6174. – P. 604–604.
- 168 Prince R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. // *Crit Rev Microbiol*. – 1993. – Vol. 19. – №. 4. – PP. 217–242.
- 169 Probandt D., Knittel K., Tegetmeyer H.E., Ahmerkamp S., Holtappels M., Amann R. Permeability shapes bacterial communities in sublittoral surface sediments. // *Environ Microbiol*. – 2017. – Vol. 19. – № 4. – PP. 1584–1599.
- 170 Procópio L., Elsas J.D. van, Seldin L., others. Transcriptional profiling of genes involved in n-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamea* P4 strain // *Brazilian Journal of Microbiology* – 2013. – Vol. 44. – PP. 639–647.
- 171 Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic acids research*. – 2012. – Vol. 41. – №. D1. – P. D590–D596.
- 172 Quigley D.C., Scott Hornafius J., Luyendyk B.P., Francis R.D., Clark J., Washburn L. Decrease in natural marine hydrocarbon seepage near Coal Oil Point, California, associated with offshore oil production // *Geology*. – 1999. Vol. 27. – №. 11. – PP. 1047–1050.
- 173 Rainey F., Klatte S., Kroppenstedt R., Stackebrandt E. *Dietzia*, new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1995. – Vol. 45. – № 1. – P. 32–36.

- 174 Rapp J. Bacterial diversity in sea ice, melt ponds, water column, ice algal aggregates and deep-sea sediments of the Central Arctic Ocean: PhD Thesis. –2014.
- 175 Reddy G., Prakash J., Srinivas R., Inoue Matsumoto G., Shivaji S. *Leifsonia rubra* sp nov and *Leifsonia aurea* sp nov., psychrophiles from a pond in Antarctica // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2003. – Vol. 53. – P. 977–984.
- 176 Rizzo C., Malavenda R., Gerçe B., Papale M., Sylđatk C., Hausmann R., Bruni V., Michaud L., Lo Giudice A., Amalfitano S. Effects of a simulated acute oil spillage on bacterial communities from Arctic and Antarctic marine sediments // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7. – №. 12. – P. 632.
- 177 Rojo F. Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids. – 2019.
- 178 Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes // Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. – 2010. – PP. 781–797.
- 179 RoLing W.F., Milner M.G., Jones D.M., Lee K., Daniel F., Swannell R.J., Head I.M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation // Applied and environmental microbiology. – 2002. – Vol. 68. – №. 11. – PP. 5537–5548.
- 180 Rubinstein I., Strausz O.P., Spyckerelle C., Crawford R.J., Westlake D.W.S. The origin of the oil sand bitumens of Alberta: a chemical and a microbiological simulation study // Geochimica et Cosmochimica Acta. – 1977. – Vol. 41. – №. 9. – PP. 1341–1353.
- 181 Schirmer A., Rude M.A., Li X., Popova E., Del Cardayre S.B. Microbial biosynthesis of alkanes // Science. – 2010. – Vol. 329. – № 5991. – PP. 559–562.

- 182 Seifert W.K., Moldowan J.M. The effect of biodegradation on steranes and terpanes in crude oils // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1979. – Vol. 43. – № 1. – PP. 111–126.
- 183 Semenova E.M., Babich T.L., Sokolova D.S., Ershov A.P., Raievska Y.I., Bidzhieva S.K., Stepanov A.L., Korneykova M.V., Myazin V.A., Nazina T.N. Microbial communities of seawater and coastal soil of Russian Arctic region and their potential for bioremediation from hydrocarbon pollutants // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10 – № 8. – P. 1490.
- 184 Sheridan P.P., Loveland-Curtze J., Miteva V.I., Brenchley J.E. *Rhodoglobus vestalii* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic organism isolated from an Antarctic Dry Valley lake. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2003. – Vol. 53. – №. Pt 4. – PP. 985–994.
- 185 Shintani M., Fukushima N., Tezuka M., Yamane H., Nojiri H. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples // *Biotechnology letters*. – 2008. – Vol. 30. – №. 1. – PP. 117–122.
- 186 Sieber C.M., Probst A.J., Sharrar A., Thomas B.C., Hess M., Tringe S.G., Banfield J.F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy // *Nature microbiology*. – 2018. – Vol. 3. – № 7. – PP. 836–843.
- 187 Simon M.J., Osslund T.D., Saunders R., Ensley B.D., Suggs S., Harcourt A., Wen-chen S., Cruder D.L., Gibson D.T., Zylstra G.J. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4 // *Gene*. – 1993. – Vol. 127. – №. 1. – PP. 31–37.
- 188 Smibert R.M., Kreis N.R. *Methods for General and Molecular Bacteriology* // *Am. Soc. Microbiol*. – 1994. – P. 603.
- 189 Sinha R.K., Krishnan K.P., Hatha A.A.M., Rahiman M., Thresyamma D.D., Kerkar S. Diversity of retrievable heterotrophic bacteria in Kongsfjorden, an

- Arctic fjord // *brazilian journal of microbiology*. – 2017. – Vol. 48. – №. 1. – PP. 51–61.
- 190 Somee M.R., Amoozegar M.A., Dastgheib S.M.M., Shavandi M., Maman L.G., Bertilsson S., Mehrshad M. Genome-resolved analyses show an extensive diversification in key aerobic hydrocarbon-degrading enzymes across bacteria and archaea // *Bmc Genomics*. – 2022. – Vol. 23. – №. 1. – P. 690.
- 191 Sweet M.J., Bulling M.T. On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease // *Frontiers in Marine Science*. – 2017. – Vol. 4. – P. 9.
- 192 Tarrand J. J., Gröschel D. H. Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates // *Journal of clinical microbiology*. – 1982. – Vol. 16. – №. 4. – PP. 772-774.
- 193 Teeling H., Fuchs B.M., Becher D., Klockow C., Gardebrecht A., Bennis C.M., Kassabgy M., Huang S., Mann A.J., Waldmann J. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom // *Science*. – 2012. – Vol. 336. – №. 6081. – PP. 608–611.
- 194 Thompson H.F., Summers S., Yucel R., Gutierrez T. Hydrocarbon-degrading bacteria found tightly associated with the 50–70 µm cell-size population of eukaryotic phytoplankton in surface waters of a Northeast Atlantic region // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – №. 12. – P. 1955.
- 195 Thrash J.C., Cho J.-C., Bertagnolli A.D., Ferriera S., Johnson J., Vergin K.L., Giovannoni S.J. Genome sequence of the marine *Janibacter* sp. strain HTCC2649 // *Journal of bacteriology*. – 2011. – Vol. 193. – №. 2. – P. 584–585.
- 196 Timmers P.H., Suarez-Zuluaga D.A., van Rossem M., Diender M., Stams A.J., Plugge C.M. Anaerobic oxidation of methane associated with sulfate

- reduction in a natural freshwater gas source // The ISME journal. – 2016. – Vol. 10. – №. 6. – P. 1400–1412.
- 197 Tremblay J., Yergeau E., Fortin N., Cobanli S., Elias M., King T.L., Lee K., Greer C.W. Chemical dispersants enhance the activity of oil- and gas condensate-degrading marine bacteria // The ISME Journal. – 2017. – Vol. 11.– №. 12. – PP. 2793–2808.
- 198 Valderrama J.A., Durante-Rodríguez G., Blázquez B., García J.L., Carmona M., Díaz E. Bacterial degradation of benzoate: cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways. // J Biol Chem. – 2012. – Vol. 287. – №. 13. – PP. 10494–10508.
- 199 Variem S. S., Kizhakkedath V. K. Phycosphere associated bacteria; a prospective source of bioactive compounds //Biologia. – 2021. – Vol. 76. – №. 3. – PP. 1095-1098.
- 200 Van Beilen J.B., Smits T.H.M., Whyte L.G., Schorcht S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Engesser K.-H., Witholt B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains // Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 4. – №. 11. – PP. 676–682.
- 201 Van Berkel W., Kamerbeek N., Fraaije M. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts // Journal of biotechnology. – 2006. – Vol. 124. – № 4. – P. 670–689.
- 202 Venil C.K., Malathi M., Devi P.R. Characterization of *Dietzia maris* AURCCBT01 from oil-contaminated soil for biodegradation of crude oil // Biotech. – 2021. – Vol. 11. – №. 6. – P. 291.
- 203 Vergeynst L., Greer C.W., Mosbech A., Gustavson K., Meire L., Poulsen K.G., Christensen J.H. Biodegradation, photo-oxidation, and dissolution of petroleum compounds in an Arctic Fjord during summer // Environmental Science & Technology. – 2019. – Vol. 53. – №. 21. – PP. 12197–12206.

- 204 Volkman J.K., Alexander R., Kagi R.I., Woodhouse G.W. Demethylated hopanes in crude oils and their applications in petroleum geochemistry // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1983. – Vol. 47. – № 4. – PP. 785–794.
- 205 Volkova O., Anokhina T., Puntus I., Kochetkov V., Filonov A., Boronin A. Effect of naphthalene biodegradation plasmids on physiological characteristics of rhizospheric bacteria of the genus *Pseudomonas* // *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*. – 2005. – Vol. 41. – № 5. – PP. 525–529.
- 206 Wagner, M., Wagner, M., Piske, J., Smit, R. Case histories of microbial prospection for oil and gas, onshore and offshore in northwest Europe // *AAPG Stud. Geol.* – 2002. – Vol.48. – PP. 453–479.
- 207 Wang L., He W., Gao Z.Y., Zhang D.F., Huang J.K., Liu C., Zhang A. H. *Hyphomonas sediminis* sp. nov., isolated from marine sediment // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2022. – Vol. 115. – №. 9. – PP. 1177-1185.
- 208 Wang P., Cai Y., Zhong H., Chen R., Yi Y., Ye Y., Li L. Expression and characterization of an efficient alginate lyase from *Psychromonas* sp. SP041 through metagenomics analysis of rotten kelp // *Genes*. – 2024. – Vol. 15. – №. 5. – P. 598.
- 209 Wang W., Shao Z. Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2012. – Vol. 80. – №. 3. – PP. 523–533.
- 210 Wang X.-B., Chi C.-Q., Nie Y., Tang Y.-Q., Tan Y., Wu G., Wu X.-L. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. // *Bioresour Technol.* – 2011. – Vol. 102. – №. 17. – PP. 7755–7761.
- 211 Warkhade Y., Schaerer L.G., Bigcraft I., Hazen T.C., Techtmann S.M. Diversity and Distribution of Hydrocarbon-Degrading Genes in the Cold

- Seeps from the Mediterranean and Caspian Seas. // *Microorganisms*. – 2025. – Vol. 13. – № 2. – P. 222
- 212 Werner D. Impacts of activated carbon amendments, added from the start or after five months, on the microbiology and outcomes of crude oil bioremediation in soil // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2019. – Vol. 142. – PP. 1–10.
- 213 Whitehouse M., Orr K., Beck F.W., Pearson C. Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvanticity in rats to vehicle composition // *Immunology*. – 1974. – Vol. 27. – №. 2. – P. 311.
- 214 Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS computational biology*. – 2017. – Vol. 13. – № 6. – P. e1005595.
- 215 Wu Y.-W., Simmons B.A., Singer S.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32. – №. 4. – PP. 605–607.
- 216 Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Gao X., Li F., Li H., Yu H. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P.2885.
- 217 Xu F., Cha Q.-Q., Zhang Y.-Z., Chen X.-L. Degradation and utilization of alginate by marine *Pseudoalteromonas*: a review // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2021. – Vol. 87. – №. 17. – P. e00368-21.
- 218 Xu S., Li L., Luo X., Chen M., Tang W., Zhan L., Dai Z., Lam T.T., Guan Y., Yu G. Ggtree: A serialized data object for visualization of a phylogenetic tree and annotation data. // *Imeta*. – 2022. – Vol. 1. – №. 4. – P. e56.

- 219 Xue J., Yu Y., Bai Y., Wang L., Wu Y. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review // *Current microbiology*. – 2015. – Vol. 71. – №. 2. – PP. 220–228.
- 220 Yakimov M.M., Timmis K.N., Golyshin P.N. Obligate oil-degrading marine bacteria. // *Curr Opin Biotechnol*. – 2007. – Vol. 18. – № 3. – PP. 257–266.
- 221 Yamazoe A., Yagi O., Oyaizu H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated dibenzofuran-utilizing *Janibacter* sp. strain YY-1 // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2004. – Vol. 65. – №. 2. – PP. 211–218.
- 222 Yanagida K., Sakuda A., Suzuki-Minakuchi C., Shintani M., Matsui K., Okada K., Nojiri H. Comparisons of the transferability of plasmids pCAR1, pB10, R388, and NAH7 among *Pseudomonas putida* at different cell densities // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2016. – Vol. 80. – №. 5. – PP. 1020–1023.
- 223 Yang S., Yu M., Chen J. Draft genome analysis of *Dietzia* sp. 111N12-1, isolated from the South China Sea with bioremediation activity. // *Braz J Microbiol*. – 2017. – Vol. 48. – №. 3. – PP. 393–394.
- 224 Yang T., Nigro L.M., Gutierrez T., Joye S.B., Highsmith R., Teske A. Pulsed blooms and persistent oil-degrading bacterial populations in the water column during and after the Deepwater Horizon blowout // *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. – 2016. – Vol. 129. – PP. 282–291.
- 225 Yin C.-F., Nie Y., Li T., Zhou N.-Y. AlmA involved in the long-chain n-alkane degradation pathway in *Acinetobacter baylyi* ADP1 is a Baeyer–Villiger monooxygenase // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2024. – Vol. 90. – №. 1. – P. e01625-23.

- 226 Zaar A., Gescher J., Eisenreich W., Bacher A., Fuchs G. New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii* // *Molecular microbiology*. – 2004. – Vol. 54. – №. 1. – P. 223–238.
- 227 Zan S., Lv J., Li Z., Cai Y., Wang Z., Wang J. Genomic insights into *Pseudoalteromonas* sp. JSTW coping with petroleum-heavy metals combined pollution. // *J Basic Microbiol*. – 2021. – Vol. 61. – № 10. – PP. 947–957.
- 228 Zhang D.-C., Liu H.-C., Xin Y.-H., Yu Y., Zhou P.-J., Zhou Y.-G. *Salinibacterium xinjiangense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2008. – Vol. 58. – № Pt 12. – PP. 2739–2742.
- 229 Zhang Y., Yao P., Sun C., Li S., Shi X., Zhang X.-H., Liu J. Vertical diversity and association pattern of total, abundant and rare microbial communities in deep-sea sediments // *Molecular Ecology*. – 2021. – Vol. 30. – №. 12. – PP. 2800–2816.
- 230 Zheng L., Lin H., Balaji-Prasath B., Su Y., Wang Y., Zheng Y., Yu G. A novel algicidal properties of fermentation products from *Pseudomonas* sp. Ps3 strain on the toxic red tide dinoflagellate species // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. Vol. 14. – PP. 1146325.
- 231 Zhu L., Yang B., Guo W., Hu X., Liu S., Xiao X., Wei W. *Nocardioides limicola* sp. nov., an alkaliphilic alkane degrading bacterium isolated from oilfield alkali-saline soil // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2024. – Vol. 117. – №. 1. – PP. 14.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Ферменты, обнаруженные в метагеномах исследуемых накопительных культур, на основании базы данных SANT-HYD

Сокращение	Название фермента	Класс УВ	Отношение к O <sub>2</sub> , окисление УВ
AbcA	бензолкарбоксилаза	Ароматический	Анаэробное
AhyA	C2-метилгидроксилаза алканов молибдоптеринового семейства	Алифатический	Анаэробное
AlkB	алкангидролаза	Алифатический	Аэробное
AlmA	флавинсвязывающая алканмонооксигеназа	Алифатический	Аэробное
AssA	алкилсукцинатсинтаза	Алифатический	Анаэробное
BssA	бензилсукцинатсинтаза	Ароматический	Анаэробное
CmdA	$\alpha$ -субъединица этилбензолдегидрогеназы молибдоптеринового семейства	Ароматический	Анаэробное
CYP153	окисляющая алканы цитохром P450	Алифатический	Аэробное
DmpO	фенол/толуол 2-монооксигеназа (NADH-зависимая)	Ароматический	Аэробное
DszC	дибензотиофенмонооксигеназа	Ароматический	Аэробное

EbdA	$\alpha$ -субъединица этилбензолдегидрогеназы молибдоптеринового семейства	Ароматический	Анаэробное
K27540	нафталинкарбоксилаза	Ароматический	Аэробное
LadA	длинноцепочечная алкангидролаза	Алифатический	Аэробное
LadB	длинноцепочечная алкангидролаза	Алифатический	Аэробное
MAN	$\alpha$ -субъединица бензол/толуол/нафталиндиоксигеназы	Ароматический	Аэробное
NdoC	$\beta$ -субъединица бензол/толуол/нафталиндиоксигеназы	Ароматический	Аэробное
NdoB	$\alpha$ -субъединица бензол/толуол/нафталиндиоксигеназы	Ароматический	Аэробное
NmsA	нафтилметилсукцинатсинтаза	Ароматический	Анаэробное
non_NdoB_type	белок, гомологичный $\alpha$ -субъединице бензол/толуол/нафталиндиоксигеназы	Ароматический	Аэробное
pVmoB	мембраносвязанная алканмонооксигеназа, субъединица B	Алифатический	Аэробное
pVmoC	мембраносвязанная алканмонооксигеназа, субъединица C	Алифатический	Аэробное

PrmA	пропан 2-монооксигеназа, большая субъединица	Алифатический	Аэробное
PrmC	пропан 2-монооксигеназа, малая субъединица	Алифатический	Аэробное
sVmoX	растворимая алканмонооксигеназа, субъединица А	Алифатический	Аэробное
sVmoY	растворимая алканмонооксигеназа, субъединица В	Алифатический	Аэробное
TmoB	толуолмонооксигеназа	Ароматический	Аэробное
TmoE	толуолмонооксигеназа	Ароматический	Аэробное
TomA	фенол/толуолмонооксигеназа/гидроксилаза	Ароматический	Аэробное

Приложение 2. Характеристики полноты сборки метагеномов

Название Метагенома	MAG	Относительная представленность, %	Полнота сборки	Контаминация	GC- состав	N50	Размер, п.н.о.	Количество контигов	Таксономия
B1-U	1NakV-01	76,5	99	0,238	0,525	155511	3429006	36	<i>g__Limnobacter</i>
	1NakV-02	14,8	99,02	2,009	0,465	130680	3860364	38	<i>g__Oceanicoccus</i>
	1NakV-03	2,05	93,69	0,238	0,571	24170	2737014	186	<i>g__Parasphingorhabdus</i>
	1NakV-04	1,2	93,15	3,64	0,554	28955	4751752	285	<i>g__Motiliproteus</i>

	1NakV-05	0,57	98,18	0,707	0,35	52790	3718200	104	<i>s__Maribacter arcticus</i>
	1NakV-06	0,53	96,63	1,931	0,496	18904	4282280	309	<i>g__Motiliproteus</i>
	1NakV-07	0,51	99,34	1,327	0,533	104575	4230163	90	<i>s__Falsihalocynthiibacter arcticus</i>
	1NakV-08	0,36	86,47	0,186	0,558	16065	3728417	291	<i>g__Sulfitobacter</i>
P2-U	2NakV-01	42,83	99,35	0,974	0,604	537712	3834993	20	<i>s__Hyphomonas oceanitis</i>
	2NakV-02	16,25	99,72	1,503	0,646	253528	5499846	181	<i>g__Rhodococcus</i>

2NakV-03	12,46	98,74	0,42	0,59 5	328673	393635 0	66	<i>g__Parasphingorhabdus</i>
2NakV-04	5,72	99,38	0,513	0,62 4	298651	631357 0	39	<i>s__Rhodococcus erythropolis</i>
2NakV-05	4,63	99,61	0,38	0,37 4	288354	355020 3	33	<i>s__Aequorivita antarctica</i>
2NakV-06	3,81	98,82	0	0,69 3	322107	422970 8	124	<i>s__Dietzia psychralcaliphila</i>
2NakV-07	3,08	97,74	4,716	0,42 8	61402	330677 6	132	<i>g__Psychrobacter</i>
2NakV-08	2,63	99,09	0	0,65 7	239932	343895 9	44	<i>g__Paracoccus</i>

	2NakV-09	1,58	99,66	0,707	0,349	512267	3912348	14	<i>s__Maribacter arcticus</i>
	2NakV-10	0,82	96,29	0,673	0,601	27336	2352379	125	<i>g__Rhodoglobus</i>
	2NakV-11	0,41	85,64	0,618	0,684	4781	3840077	929	<i>s__Cereibacter changlensis</i>
B5-U	5NakV-01	55,14	98,44	1,034	0,448	691417	2483912	4	<i>g__Cycloclasticus</i>
	5NakV-02	7,21	99,41	0,588	0,701	206218	3939240	60	<i>s__Dietzia maris</i>
	5NakV-03	6,19	99,44	0,74	0,508	268912	2786910	12	<i>g__JAGPUQ01</i>

5NakV-04	5,74	99,13	2,952	0,53 1	465809	450758 8	21	<i>g__Halioglobus</i>
5NakV-05	4,9	99,68	0,862	0,56 8	56555	459693 9	167	<i>g__Sulfitobacter</i>
5NakV-06	4,71	95,24	0,74	0,49 1	49209	423980 6	67	<i>g__Motiliproteus</i>
5NakV-07	3,75	97,33	0,829	0,52 5	92207	468141 7	79	<i>g__Motiliproteus</i>
5NakV-08	3,54	97,96	0,844	0,39 1	100571	443793 2	67	<i>s__Pseudoalteromonas distincta</i>
5NakV-09	3,17	90	1,062	0,54 1	573236	423658 7	33	<i>g__Halioglobus</i>

5NakV- 10	0,99	94,44	1,509	0,54 3	18650	409186 6	211	<i>g__Halioglobus</i>
5NakV- 11	0,93	72,36	1,04	0,47 5	10289	172490 0	225	<i>g__Porticoccus</i>
5NakV- 12	0,85	95,06	2,947	0,49 6	45904	558441 9	156	<i>g__Amphritea</i>
5NakV- 13	0,77	99,66	0,99	0,33 9	365929	424946 0	34	<i>g__Psychroserpens</i>
5NakV- 14	0,71	98,25	0,652	0,34 9	88237	362331 9	65	<i>s__Maribacter arcticus</i>
5NakV- 15	0,49	75,86	0	0,52	19158	440228 2	326	<i>g__Halioglobus</i>

	5NakV-16	0,46	97,59	1,067	0,416	26910	5651402	335	<i>s__Photobacterium frigidiphilum</i>
	5NakV-17	0,44	87,57	0,579	0,48	8787	3402673	521	<i>g__Sneathiella</i>
B6-N	6NakV-01	39,4	98,33	2,268	0,464	940447	4030510	33	<i>g__Oceanicoccus</i>
	6NakV-02	27,02	99,44	0,37	0,51	678225	2727481	5	<i>g__JAGPUQ01</i>
	6NakV-03	10,47	99,62	0,74	0,488	337634	4760929	34	<i>g__Oleispira</i>
	6NakV-04	5,83	99,66	1,161	0,375	202726	4404779	36	<i>s__Cognaticolwellia polaris</i>

6NakV-05	3,91	97,13	2,173	0,54 1	56593	514987 1	194	<i>g__Halioglobus</i>
6NakV-06	3,81	99,04	0,063	0,53 2	246785	509816 6	32	<i>g__Sulfitobacter</i>
6NakV-07	3,05	99,13	4,057	0,52 9	588396	507510 7	49	<i>g__Halioglobus</i>
6NakV-08	2,08	98,69	1,739	0,47 9	81318	407214 5	74	<i>g__Sneathiella</i>
6NakV-09	1,01	99,56	0,948	0,59 4	343776	395853 9	29	<i>g__Halopseudomonas</i>
6NakV-10	0,86	99,51	0,429	0,57	213330	495090 8	31	<i>s__Pseudomonas_E marincola</i>

6NakV- 11	0,6	75,17	1,724	0,52 8	70134	584289 4	255	<i>g__Halioglobus</i>
6NakV- 12	0,58	97,26	1,466	0,49 4	78365	483291 8	92	<i>g__Motiliproteus</i>
6NakV- 13	0,39	95,31	1,097	0,40 3	12992	382140 1	414	<i>s__Pseudoalteromonas tetraodonis</i>
6NakV- 14	0,36	96,46	1,318	0,46 4	9501	423883 4	679	<i>g__Sneathiella</i>
6NakV- 15	0,36	95,82	1,493	0,34 9	12040	381048 0	438	<i>s__Maribacter arcticus</i>
6NakV- 16	0,3	74,52	3,468	0,47	4043	178140 6	486	<i>g__Porticoccus</i>

B7-PH	7NakV-01	82,36	72,06	1,568	0,474	10079	1637228	190	<i>g__Porticoccus</i>
	7NakV-06	6,76	100	0,517	0,602	64596	4206402	180	<i>s__Halopseudomonas aestusnigri</i>
	7NakV-08	4,49	99,83	0,429	0,57	251562	4946184	21	<i>s__Pseudomonas_E marincola</i>
	7NakV-02	2,7	100	1,304	0,447	568401	5165680	94	<i>g__Kiloniella</i>
	7NakV-04	1,69	99,87	1,224	0,391	121477	4530599	104	<i>s__Pseudoalteromonas distincta</i>
	7NakV-03	0,69	98,04	2,173	0,464	31814	3785168	113	<i>g__Sneathiella</i>

7NakV-05	0,42	98,31	1,307	0,577	37198	4834584	230	<i>g__Halopseudomonas</i>
7NakV-07	0,39	97,21	3,399	0,531	27931	4729040	232	<i>g__Motiliproteus</i>
8NakV-01	76,91	63,8	2,22	0,4724	29711	1416510	77	<i>g__Porticoccus</i>
8NakV-02	11,68	99,78	0,517	0,6081	81058	3875874	86	<i>s__Halopseudomonas aestusnigri</i>
8NakV-03	3,27	98,8	0,517	0,5993	161691	3991084	81	<i>g__Halopseudomonas</i>
8NakV-04	2,77	92,86	0,646	0,572	31251	2466038	158	<i>s__Halomonas aquamarina</i>

8NakV-05	1,42	99,44	0,844	0,39 16	104394	451004 8	75	<i>s__Pseudoalteromonas distincta</i>
8NakV-06	1,08	98,72	0,354	0,58 74	140522	343053 6	45	<i>s__Sulfitobacter litoralis</i>
8NakV-07	0,56	97,77	2,693	0,54 75	84690	434154 1	112	<i>s__Halomonas glaciei</i>
8NakV-08	0,52	96,9	1,202	0,60 47	139083	373810 7	66	<i>s__Hyphomonas oceanitis</i>
8NakV-09	0,48	92,21	0,934	0,57 59	21885	406382 2	273	<i>s__Pseudomonas_E marincola</i>
8NakV-10	0,38	92,59	0,809	0,56 72	50411	339306 6	119	<i>g__Sulfitobacter</i>

	8NakV- 11	0,3	90,95	2,186	0,61 33	13034	326939 0	341	<i>g__Hyphomonas</i>
	8NakV- 12	0,24	74,35	1,265	0,38 22	6712	339721 9	632	<i>g__Psychromonas</i>
	8NakV- 13	0,22	82,17	3,656	0,36 3	6231	338376 5	678	<i>g__Leeuwenhoekiella</i>
	8NakV- 14	0,2	66,01	1,75	0,70 42	2632	239080 1	996	<i>s__Dietzia cercidiphylli</i>
B9-O	9NakV- 01	55,72	96,97	2,119	0,42 7	80343	482351 1	162	<i>g__Oleispira</i>
	9NakV- 02	10,45	98,23	1,244	0,42 1	124988	440120 6	73	<i>s__Shewanella psychromarinicola</i>

9NakV-03	9,18	97,55	1,705	0,409	120585	4688392	86	<i>g__Pseudoalteromonas</i>
9NakV-04	8,85	72,51	0	0,473	112590	1874532	76	<i>g__IMCC2047</i>
9NakV-05	2,68	98,34	0,652	0,458	27834	4105916	135	<i>g__Sneathiella</i>
9NakV-06	1,73	82,24	1,724	0,583	116283	4240806	80	<i>s__Halopseudomonas profundus</i>
9NakV-07	1,31	89,23	2,534	0,383	16279	3786106	170	<i>g__Cocleimonas</i>
9NakV-08	1,21	92,06	2,328	0,375	89660	3796237	52	<i>g__Colwellia_A</i>

9NakV-09	0,87	99,52	1,724	0,427	78289	5575721	97	<i>g__Bermanella</i>
9NakV-10	0,77	88,57	0,862	0,544	23520	3057637	174	<i>g__Marinobacter</i>
9NakV-11	0,67	95,7	1,22	0,402	31609	5574713	264	<i>g__Rsl</i>

Приложение 3. Общая информация о сборке геномов, исследуемых чистых культур, RAST.

<b>Характеристика</b>	Ps19	Ps15	15-23	SB	Pr 8	D
<b>Таксономия</b>	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	<i>Janibacter limosus</i>	<i>Salinibacterium</i> sp.	<i>Rhodococcus cerastii</i>	<i>Dietzia maris</i>
<b>Размер генома, п.о.</b>	5252805	4116221	3816584	2876696	5682275	3798016
<b>Содержание ГЦ</b>	41.3	40.5	70.2	60.0	64.7	70.3
<b>N50</b>	4001560	3505445	3815314	-	286356 3	270297
<b>L50</b>	1	1	1	1	1	5
<b>Количество контигов</b>	12	8	2	1	27	59
<b>Количество физиологических подсистем</b>	350	324	270	240	294	271
<b>Количество кодирующих последовательностей</b>	4744	3892	3762	2734	5585	3668
<b>Количество РНК</b>	130	126	52	53	52	52