

Взаимосвязь распределения метана и психро-, мезо- и термофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в донных отложениях в Карском море

© 2021 А. Л. Пономарева*¹, Н. С. Полоник¹, А. И. Обжиров¹, Р. Б. Шакиров¹, Р. А. Григоров¹, Оливер Шмале², Сюзан Мау³

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия

²Институт Лейбница по исследованию Балтийского моря, Варнемюнде, Германия

³Бременский университет, Бремен, Германия

*E-mail: ponomareva.al@poi.dvo.ru

Резюме. Представлены данные о распределении биоиндикаторных термофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в поверхностном слое нефтегазоносных донных отложений в Карском море и их взаимосвязи с содержанием метана. Обнаруженные в зоне отсутствия постоянного теплового потока культивируемые термофильные микроорганизмы, способные использовать в качестве единственного источника углерода углеводороды нефти, могут служить индикаторами залежей нефти и газа. В работе были созданы накопительные культуры бактерий, которые инкубировали при температуре +5, +30 и +60 °С. Установлено, что углеводородокисляющий микробиом в основном представлен мезо- и психрофильными микроорганизмами. На станциях с наиболее высоким содержанием метана преобладали мезофильные нефтеокисляющие микроорганизмы. Термофильные бактерии данного трофического типа были выявлены только на одной из исследуемых станций, расположенной в южной части Новоземельской впадины.

Ключевые слова: метан, термофильные углеводородокисляющие бактерии, биоиндикаторные микроорганизмы, морские донные отложения, Карское море

Interrelation of methane distribution with psychro-, meso- and thermophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the bottom sediments of the Kara Sea

Anna L. Ponomareva*¹, Nikita S. Polonik¹, Anatoly I. Obzhirov¹, Renat B. Shakirov¹, Roman A. Grigorov¹, Oliver Schmale², Susan Mau³

¹V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS, Vladivostok, Russia

²The Leibniz Institute for Baltic Sea Research, Warnemünde, Germany

³University of Bremen, Bremen, Germany

*E-mail: ponomareva.al@poi.dvo.ru

Abstract. The article presents data on the distribution of bioindicator thermophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the surface layer of bottom oil and gas bearing sediments in the Kara Sea and their interrelation with methane content. Cultivated thermophilic microorganisms capable of using oil hydrocarbons as the only carbon source found in the zone of no constant heat flow are indicators of oil and gas deposits. In the work, enrichment cultures of bacteria were created, which were incubated at the different temperatures of +5, +30 and +60 °C. It was found that, the hydrocarbon-oxidizing microbiome is mainly represented by meso- and psychrophilic microorganisms. The stations with the highest methane content were dominated by mesophilic oil-oxidizing microorganisms. Thermophilic bacteria of this trophic type were identified only at one of the studied stations, located in the southern part of the Novozemelskaya Depression.

Keywords: methane, thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria, bioindicative microorganisms, sea bottom sediments, Kara Sea

Для цитирования: Пономарева А.Л., Полоник Н.С., Обжиров А.И., Шакиров Р.Б., Григоров Р.А., Шмале О., Мау С. Взаимосвязь распределения метана и психро-,

For citation: Ponomareva A.L., Polonik N.S., Obzhirov A.I., Shakirov R.B., Grigorov R.A., Schmale O., Mau S. Interrelation of methane distribution with psychro-, meso- and ther-

мезо и термофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов в донных отложениях в Карском море. *Геосистемы переходных зон*, 2021, т. 5, № 4, с. 389–398. <https://doi.org/10.30730/gtr.2021.5.4.389-393.394-398>.

mophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the Kara Sea. *Geosistemy perehodnykh zon = Geosystems of Transition Zones*, 2021, vol. 5, no. 4, pp. 389–398. (Russ. & Engl.). <https://doi.org/10.30730/gtr.2021.5.4.389-393.394-398>.

Благодарности и финансирование

Исследование поддержано РФФИ (20-55-12010 «Источники и динамика эмиссии метана в двух разных арктических окраинных морях»). Работа выполнена по проекту ЮНЕСКО «Геосистемы и минеральные ресурсы переходной зоны «континент–океан» и открытого океана» (ГЕОМИР, рук. Р.Б. Шакиров) в рамках Десятилетия наук об океане ООН (2021–2030 гг.).

Авторы признательны научному составу экспедиции 81 рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш» и выражают особую благодарность начальнику экспедиции академику РАН М.В. Флинту за совместную работу.

Введение

Карское море является частью Арктического бассейна и играет ведущую роль в формировании среды всей Арктики [Лисицын и др., 1994; Мошаров, Мошарова, 2010]. Согласно устоявшимся взглядам, шельф Карского моря представляет собой богатейший резерв для открытия новых нефтегазовых месторождений в российской Арктике [Ананьев, 2010; Ананьев, Косенкова, 2010; Конторович, Конторович, 2010; Григоренко и др., 2006]. Доля Карского моря, включая северные части Западно-Сибирской и Баренцево-Северо-Карской нефтегазоносных провинций, в общей структуре начальных суммарных геологических ресурсов углеводородов арктического шельфа России – 39 % [Григоренко и др., 2006]. Карское море включает три основных тектонических элемента разного возраста формирования, с различной внутренней структурой. С юга на север это Южно-Карский осадочный бассейн, Северо-Сибирский порог и Северо-Карский осадочный бассейн [Вержбицкий и др., 2012].

Микробиом Карского моря изучен с помощью молекулярно-генетических методов достаточно хорошо, но при этом не описано распределение углеводородоокисляющих бактерий в зависимости от содержания метана. В бактериальных сообществах донных отложений исследуемого региона, по литературным данным, доминируют представители филумов *Cyanobacteria*, *Verrucocomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*. Архейные сообщества представлены в меньшей степени и включают представителей филумов *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota* [Suslova et al., 2012; Mamaeva et al., 2016].

На распределение бактерий в донных отложениях влияет большое число комбинированных факторов, таких, например, как пассивное рассредоточение и экологический

отбор, но вклад каждого из этих факторов трудно дифференцировать. Температура имеет фундаментальное влияние на микробную экологию и скорость метаболизма микроорганизмов. Поскольку термофильные бактерии не могут расти на холодном морском дне, их неактивные формы не подвергаются селекции окружающей среды. При этом данное свойство углеводородоокисляющих бактерий позволяет им играть важную роль в поддержании микробного метаболизма в глубокой теплой морской биосфере, в частности в залежах нефти [de Rezende et al., 2013; Hubert et al., 2010; Robador et al., 2016]. Поэтому термофильность в сочетании со способностью микроорганизмов окислять углеводороды может являться показателем нефтегазопроявлений.

В Арктическом регионе термофильные бактерии в основном выделяют в районах либо палео-, либо активной гидротермальной деятельности. В районах активной гидротермальной деятельности существует большое разнообразие нефтеокисляющих и сульфатредуцирующих микроорганизмов [Jaeschke et al., 2012; Steinsbu et al., 2011; McVee, McVee, 1956]. Вопрос о наличии термофильных бактерий в газовых сипах и прилегающих к ним аномальных газовых полях в Карском море изучен крайне мало.

Районы исследования, материалы и метод

Научные работы проводились на борту НИС «Академик Мстислав Келдыш» в рейсе АМК-81 (с 27 августа по 25 сентября 2020 г.). Географически район работ охватывал акваторию от 71° 12.973 N до 76° 56.873 N и от 57° 08.070 E до 72° 13.863 E в Карском море, включая район восточного побережья Новой Земли и Ново-земельскую впадину (рис. 1). Образцы керн были получены методом малоглубинного бурения с помощью гравитационного пробоот-

борника из нержавеющей стали с внутренним диаметром 130 мм и длиной 600 см. Всего поднято и проанализировано 6 трубок.

Пробы донных осадков отбирали в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.01-80. Для анализов использовали окисленный (поверхностный) слой керна. Учет численности углеводородоокисляющих микроорганизмов проводили методом предельных разведений (титрационный метод) [Абакумов (ред.), 1983]. Посев производили в жидкие среды. Наличие или отсутствие роста отмечали визуально по помутнению среды, образованию пленки или осадка. Наиболее вероятную численность устанавливали по таблице Мак-Креди [Егоров (ред.), 1976].

Нефтеокисляющие бактерии культивировали на плотной питательной минеральной среде следующего состава (в г на 1000 мл): 10 $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 1.1 KCl, 30 NaCl, 0.28 FeSO_4 , 3.4 KH_2PO_4 , 4.4 K_2HPO_4 , 0.7 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ плюс 0.5 мл раствора микроэлементов. Раствор микроэлементов включал (в г на 1000 мл): 0.29 ZnSO_4 , 0.24 CaCl_2 , 0.25 CuSO_4 , 0.17 MnSO_4 , pH среды равен 7. В среду в качестве источника углерода добавляли 2 % стерильной нефти. Культивирование проводили при температурах +5, +30, +60 °C в течение 7 дней аэробно в колбах 100 мл на орбитальном шейкере «DSR-2100D-N» со скоростью вращения 150 об./мин.

Концентрации метана в морском осадке определяли методом Headspace. Осадок объемом 12 мл отбирали из керна при помощи шприцевого пластикового пробоотборника. Отобранный осадок переносили в стеклянную виалу емкостью 43 мл, заполненную насыщенным солевым раствором. Виалу немедленно герметично запирали пластиковой пробкой с резиновой септой и медицинской иглой удаляли излишки воды и воздуха. Виалы равномерно заполнялись гелием (12 мл) при помощи пластикового мешка Tedlar Bag Dual Valve (США) с двумя клапанами: через первый клапан заполняли гелием мешок, через второй, с помощью иглы, – виалу с образцом. В качестве газовой фазы использовался чистый гелий марки «6.0». Затем содержимое виалы интенсивно перемешивали вручную до полной гомогенизации осадка внутри виалы. Перед проведением анализа виалы с гомогенизированным осадком встряхивали в течение 3.5 ч с помощью шейкера LOIPLS-110 (Россия). Для анализа 5 мл газовой фазы равновес-

но извлекали шприцем и вводили в инжектор газового хроматографа.

Концентрации метана в газовой фазе определяли на газовом хроматографе «ЭХО-ЕW мод.2» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и металлической поликапиллярной колонкой (длина 2 м, толщина 0.2–0.3 мм, фаза Hayesep SD). Разделение компонентов происходило в изотермическом режиме при температуре колонки 50 °C. Температура детектора (ПВД) составляла 190 °C. В качестве газа-носителя использовался чистый гелий марки «6.0». Для калибровки прибора применялись сертифицированные поверочные газовые смеси (ООО «ПГС-Сервис», Россия) с объемными концентрациями метана в гелии 0.001, 0.005 и 0.01 %. Для расчетов и систематизации полученных в рейсе данных применялись электронные таблицы Microsoft Excel. Получаемые данные непосредственно после обработки вводили в геоинформационное приложение Ocean Data View для интерпретации.

Результаты и обсуждение

В окисленном слое донных отложений углеводородоокисляющие бактерии были обнаружены при содержании метана от 8.4 до 33.87 мл/л вдоль восточного побережья Новой земли и Новоземельской впадины. На станциях 6877 и 6887 углеводородоокисляющие микроорганизмы не выявлены. Обе эти станции характеризуются невысокими значениями содержания метана (8.3 и 5.3 мл/л соответственно) (см. таблицу).

Численность мезофилов, определенная методом Мак-Креди, в незначительной степени зависела от колебаний содержания метана. Наибольшую численность этой группы фиксировали на станции 6879 с высоким содержанием метана (33.87 мл/л) и на станции 6912, расположенной в Ноземельской впадине, на которой была выявлена низкая концентрация метана (8.4 мл/л), – 4300 и 3500 кл/г соответственно. На станции 6879 численность мезо- и психрофильных углеводородоокисляющих бактерий была сопоставима (4300 и 3300 кл/г соответственно). На станции же 6912 количество мезофильных нефтеокисляющих микроорганизмов значительно превышало тот же показатель для психрофильных (3500 и 100 кл/г соответственно). Только психрофильные микроорганизмы были зафиксированы на станции 6919 и 6916.

Таблица. Численность термо-, мезо- и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в поверхностном слое донных отложений в Карском море

№ станции	Глубина, м	Содержание метана, мл/л	Нефтеокисляющие бактерии, кл/г			Местоположение станции
			+60 °С	+30 °С	+5 °С	
6877	85	8.3	–	–	–	Акватория Карского моря
6879	172	33.87	–	4300	3300	Желоб Святой Анны (южная часть)
6883	183	13.2	–	800	–	Желоб Святой Анны (центральная часть)
6887	528	5.3	–	–	–	Желоб Святой Анны (северная часть)
6919	195	9.4	–	–	500	Зал. Русанова, Новая Земля
6912	300	8.4	–	3500	100	Новоземельская впадина
6916	315	18.9	–	–	600	Там же
6928	250	14.8	200	100	–	Новоземельская впадина (южная часть)

Примечание. Прочерк – углеводородокисляющие бактерии не обнаружены.

Термофильные нефтеокисляющие микроорганизмы (200 кл/г) обнаружены только на одной станции 6928, расположенной в южной части Новоземельской впадины с высоким (14.8 мл/л), но не максимальным для района исследований содержанием метана. На этой станции выявлены также мезофильные нефтеокисляющие (100 кл/г) микроорганизмы. Мезофильные культуры представлены длинными тонкими палочками. Термофильные бактерии относительно однородны по морфологическому составу и представлены тонкими и/или

бочкообразными палочками. Наличие термофильных микроорганизмов может быть связано с гидротермальной активностью или выходом газа с глубин. Данные предположения косвенно подтверждаются тем, что осадок на станции обнаружения термофилов серо-черный с содержанием сульфидов, плотный, восстановленный, с большим содержанием гидротроилита.

Результаты исследования показали, что содержание метана в донных отложениях в разной степени влияло на обнаружение психро-, мезо- и термофильных углеводородокисляющих микроорганизмов. Психрофильные и мезофильные микроорганизмы встречались с одинаковой частотой. Наибольшее влияние содержание метана оказывало на численность психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов. Мезофилы в меньшей степени реагировали на изменение содержания метана. Термофилы обнаружены только на одной станции с содержанием метана 14.8 мл/л, расположенной вблизи прол. Карские ворота.

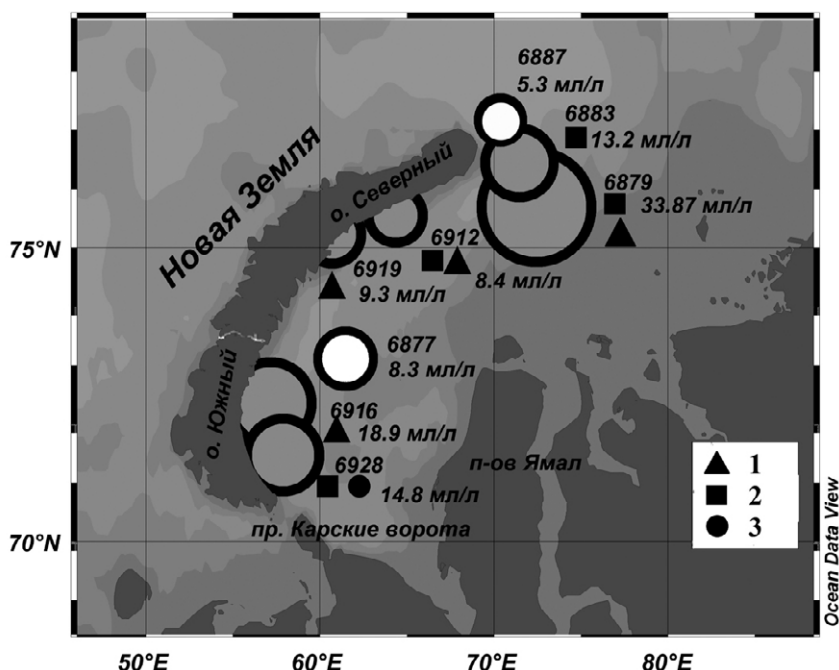


Рис. 1. Карта района исследований с обозначенными на ней станциями отбора донных отложений. Распределение содержания метана и мест обнаружения психро-, мезо- и термофильных углеводородокисляющих бактерий в донных отложениях Карского моря. Станции, на которых были выявлены бактерии: 1 – психрофильные углеводородокисляющие, 2 – мезофильные углеводородокисляющие, 3 – термофильные углеводородокисляющие. Незалитые кружки – станции, на которых углеводородокисляющие бактерии не были обнаружены.

Выводы

По данным нашего исследования, наибольшее влияние метан оказывал на психрофильные микроорганизмы, которые способны к росту в холодных донных отложениях, что обусловлено в большей степени

благоприятными условиями для выживаемости данной группы в окисленном слое донных отложений Карского моря. Психрофильные углеводородоокисляющие бактерии были связаны с содержанием метана независимо от его источника. На численность мезофильных углеводородоокисляющих бактерий содержание ме-

тана оказывало незначительное влияние. Термофилы были зафиксированы только на одной станции и могут быть обусловлены выходами метана, что косвенно подтверждается типом осадка. Поэтому термофильные углеводородоокисляющие микроорганизмы показали наибольшую биоиндикационную значимость.

Список литературы

1. Абакумов В.А. (ред.) **1983**. *Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений*. Л.: Гидрометеиздат, 240 с.
2. Ананьев В.В. **2010**. Проблемы и перспективы освоения ресурсной базы углеводородов в арктических акваториях России. *Минеральные ресурсы России. Экономика и управление*, 3: 42–47.
3. Ананьев В.В., Косенкова Н.Н. **2010**. Арктический шельф: «ресурсы для будущего». *Нефтяное хозяйство*, 12: 16–19.
4. Вержбицкий В.Е., Косенкова Н.Н., Ананьев В.В., Малышева С.В., Васильев В.Е., Мурзин Р.Р., Комиссаров Д.К., Рослов Ю.В. **2012**. Геология и углеводородный потенциал Карского моря. *Oil and Gas J.*, 110 (1): 48–54.
5. Григоренко Ю.Н., Мирчинк И.М., Савченко В.И., Сенин Б.В., Супруненко О.И. **2006**. Углеводородный потенциал континентального шельфа России: состояние и проблемы освоения. *Минеральные ресурсы России. Экономика и управление*, спец. вып. *Минеральные ресурсы российского шельфа*. М., с. 14–69.
6. Егоров Н.С. (ред.) **1976**. *Практикум по микробиологии*. М.: Изд-во МГУ, 308 с.
7. Конторович А.Э., Конторович В.А. **2010**. Геология и ресурсы углеводородов шельфов арктических морей России. В кн.: *Материалы совместного заседания Совета РАН по координации деятельности региональных отделений и региональных научных центров РАН и Научного совета РАН по изучению Арктики и Антарктики*. УрО РАН, с. 59–68.
8. Лисицын А.П., Шевченко В.П., Виноградов М.Е., Северина О.В., Вавилова В.В., Мицкевич И.Н. **1994**. Потоки осадочного вещества в Карском море и в эстуариях Оби и Енисея. *Океанология*, 34(5): 748–758.
9. Мошаров С.А., Мошарова И.В. **2010**. Сравнительный анализ продукционных и микробиологических характеристик Карского и Чукотского морей. В кн.: *Физические, геологические и биологические исследования океанов и морей*. М.: Научный мир, с. 494–505.
10. Hubert C., Arnosti C., Bruchert V., Loy A., Vandieken V., Jorgensen B.B. **2010**. Thermophilic anaerobes in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. *Environmental Microbiology*, 12(4): 1089–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02161.x>
11. Jaeschke A., Jorgensen S.L., Bernasconi S.M., Pedersen R.B., Thorseth I.H., Fruh-Green G.L. **2012**. Microbial diversity of Loki's Castle black smokers at the Arctic Mid-Ocean Ridge. *Geobiology*, 10(6): 548–561. <https://doi.org/10.1111/gbi.12009>
12. Mamaeva E.V., Galach'yants Y.P., Khabudaev K.V., Petrova D.P., Pogodaeva T.V., Khodzher T.B., Zemskaya T.I. **2016**. Metagenomic analysis of microbial communities of the sediments of the Kara Sea shelf and the Yenisei Bay. *Microbiology*, 85(2): 187–198. <https://doi.org/10.1134/s0026261716020132>
13. McBee R.H., McBee V.H. **1956**. The incidence of thermophilic bacteria in arctic soils and waters. *J. of Bacteriology*, 71(2): 182–185. <https://doi.org/10.1128/jb.71.2.182-185.1956>
14. de Rezende J.R., Kjeldsen K.U., Jorgensen B.B. **2013**. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years. *ISME J.*, 7(1): 72–84. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.83>
15. Robador A., Muller A.L., Sawicka J.E., Berry D., Hubert C., Loy A., Jorgensen B.B., Bruchert V. **2016**. Activity and community structures of sulfate-reducing microorganisms in polar, temperate and tropical marine sediments. *ISME J.*, 10(4): 796–809. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.157>
16. Steinsbu B.O., Tindall B.J., Torsvik V.L., Thorseth I.H., Daas F.L., Pedersen R.B. **2011**. *Rhabdothemus arcticus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Thermaceae isolated from a hydrothermal vent chimney in the Soria Mona vent field on the Arctic Mid-Ocean Ridge. *International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9): 2197–2204. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.027839-0>
17. Suslova M. Yu., Lipko I.A., Mamaeva E.V., Parfenova V.V. **2012**. Diversity of cultivable bacteria isolated from the water column and bottom sediments of the Kara Sea shelf. *Microbiology*, 81(4): 524–31. <https://doi.org/10.1134/s0026261712040157>

TRANSLATION

SHORT REPORT

УДК 550.72+574.4

<https://doi.org/10.30730/gtr.2021.5.4.389-393.394-398>

Interrelation of methane distribution with psychro-, meso- and thermophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the bottom sediments of the Kara Sea

Anna L. Ponomareva^{*1}, Nikita S. Polonik¹, Anatoly I. Obzhirov¹, Renat B. Shakirov¹, Roman A. Grigorov¹, Oliver Schmale², Susan Mau³

¹V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS, Vladivostok, Russia

²The Leibniz Institute for Baltic Sea Research, Warnemünde, Germany

³University of Bremen, Bremen, Germany

*E-mail: ponomareva.al@poi.dvo.ru

Abstract. The article presents data on the distribution of bioindicator thermophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the surface layer of bottom oil and gas bearing sediments in the Kara Sea and their interrelation with methane content. Cultivated thermophilic microorganisms capable of using oil hydrocarbons as the only carbon source found in the zone of no constant heat flow are indicators of oil and gas deposits. In the work, enrichment cultures of bacteria were created, which were incubated at the different temperatures of +5, +30 and +60 °C. It was found that, the hydrocarbon-oxidizing microbiome is mainly represented by meso- and psychrophilic microorganisms. The stations with the highest methane content were dominated by mesophilic oil-oxidizing microorganisms. Thermophilic bacteria of this trophic type were identified only at one of the studied stations, located in the southern part of the Novozemelskaya Depression.

Keywords: methane, thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria, sea bottom sediments, Kara Sea

For citation: Ponomareva A.L., Polonik N.S., Obzhirov A.I., Shakirov R.B., Grigorov R.A., Schmale O., Mau S. Interrelation of methane distribution with psychro-, meso- and thermophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the bottom sediments of the Kara Sea. *Geosistemy perhodnykh zon = Geosystems of Transition Zones*, 2021, vol. 5, no. 4, pp. 389–398. ((In Russ. & Engl.). <https://doi.org/10.30730/gtr.2021.5.4.389-393.394-398>)

Acknowledgements and Funding

The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (20-55-12010 “Sources and dynamics of methane emission in two different Arctic marginal seas”). The work was implemented within the project of UNESCO “Geosystems and Mineral resources in the “Continent-Ocean” transition zone and the Open Ocean” (GEOMIR, headed by R.B. Shakirov) under the United Nations Decade of Ocean Science (2021–2030).

The authors are grateful to the scientific staff of the expedition 81 of the cruise of the R / V “Akademik Mstislav Keldysh” and express special gratitude to the head of the expedition, Academician of the Russian Academy of Sciences, M.V. Flint, for their joint work.

Introduction

The Kara Sea is a part of the Arctic Basin and plays a leading role in formation of the environment of the entire Arctic [Lisitsyn et al., 1994; Mosharov, Mosharova, 2010]. In the established views, the shelf of the Kara Sea is a richest reserve for discovering new oil and gas fields in the Russian Arctic [Ananiev, 2010; Ananiev, Kosenkova, 2010; Kontorovich, Kontorovich, 2010; Grigorov et al., 2006]. Contribution of the Kara Sea, including northern parts of the West Siberian and Barents-North-Kara oil and gas bearing provinces,

in the overall structure of initial geological hydrocarbon sources of the arctic shelf in Russia is 39 % [Grigorenko et al., 2006]. The Kara Sea includes three main tectonic elements of different age of formation, and with different internal structure. From south to north, they are the South Kara sedimentary basin, North Siberian sill and the North Kara sedimentary basin [Verzhbitsky et al., 2012].

Microbiome of the Kara Sea is studied with the molecular genetic methods well enough, but the distribution of hydrocarbon-oxidizing bacteria depending on the methane content is not described.

Translation of the article published in the present issue of the Journal: Пономарева А.Л., Полоник Н.С., Обжиров А.И., Шакиров Р.Б., Григоров Р.А., Шмале О., Мау С. Взаимосвязь распределения метана и психро-, мезо- и термофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в донных отложениях в Карском море. *Translation by G.S. Kachesova.*

According to the literary data, the phyla *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* dominate in the bacterial communities of the bottom sediments. Archean communities are presented to a lesser extent and include the phyla *Thaumarchaeota* and *Crenarchaeota* [Suslova et al., 2012; Mamaeva et al., 2016].

The distribution of bacteria in the bottom sediments is affected by a large number of combined factors, such as passive dispersal and ecological selection, but it is difficult to differentiate the contribution of each of these factors. Temperature has a fundamental effect on microbial ecology and the metabolic rate of microorganisms. Since thermophilic bacteria cannot grow on the cold seabed, their inactive forms are not subject to the environmental selection. At the same time, this feature of hydrocarbon-oxidizing bacteria allows them to play an important role in maintaining the microbial metabolism in the deep warm marine biosphere, in oil deposits in particular [de Rezende et al., 2013; Hubert et al., 2010; Robador et al., 2016]. That is why thermophilicity along with the microorganism ability to oxidize hydrocarbons can be an indicator of oil and gas manifestations.

In the Arctic region, thermophilic bacteria are mainly found in the areas of either paleo-, or active hydrothermal activity. There is a wide variety of oil-oxidizing and sulfate-reducing microorganisms in the areas of active hydrothermal activity [Jaeschke et al., 2012; Steinsbu et al., 2011; McBee, McBee, 1956]. The question of the presence of thermophilic bacteria in gas seeps and adjacent anomalous gas fields in the Kara Sea is poorly known.

Study areas, materials and method

Scientific research was carried out on board the R/V Akademik Mstislav Keldysh during the cruise AMK-81 (from August 27 to September 25 of 2020). Geographically, the study area covered the water area from 71°12.973 N to 76°56.873 N and from 57°08.070 E to 72°13.863 E in the Kara Sea, including the area of the eastern coast of Novaya Zemlya and Novozemelskaya Depression (see the Figure). Core samples were taken by the method of shallow core drilling using stainless steel gravity corer with an inner diameter of 130 mm and a length of 600 cm. A total of six tubes were pulled out and analyzed.

Bottom sediments samples were taken in accordance with the requirements of GOST 17.1.5.01-80. An oxidized (surface) core layer was used for analysis. The number of hydrocarbon-oxidizing microorganisms was counted by the method of limiting dilution (titration method)

[Abakumov (ed.), 1983]. Culture was drawn in liquid media. The presence or absence of growth was noted visually by the medium turbidity, the formation of a film or sediment. The most probable number was defined according to the McCready table [Egorov (ed.), 1976].

Hydrocarbon-oxidizing bacteria were cultured on the dense breeding mineral medium of the following composition (in g per 1000 ml): 10 (NH₄)₂SO₄, 1.1 KCl, 30 NaCl, 0.28 FeSO₄, 3.4 KH₂PO₄, 4.4 K₂HPO₄, 0.7 MgSO₄ × 7H₂O plus 0.5 ml of the micronutrients solution. The micronutrients solution contains (in g per 1000 ml): 0.29 ZnSO₄, 0.24 CaCl₂, 0.25 CuSO₄, 0.17 MnSO₄. A pH of the medium was equal to 7. A 2 % sterile oil was added to the medium as a carbon source. Cultivation was carried out aerobically in 100 ml flasks at the temperatures of +5, +30, +60 °C for 7 days on a DSR-2100D-N orbital shaker with a rotation speed of 150 rpm.

The methane concentration in marine sediments was determined by the Headspace method. 12 ml of sediment was withdrawn from the core using a plastic syringe sampler. Withdrawn sediment was transferred into a 43 ml glass vial filled with brine. The vial was immediately sealed with a plastic stopper with a rubber septum. Excess water and air were removed by a medical needle. The vials were equally filled with helium (12 ml) by means of the Tedlar Bag Dual Valve (USA) plastic bag with two valves. The bag was filled with helium through the first valve, and the vial with a sample was filled through the second one using a needle. Pure helium of 6.0 grade was used as the gaseous phase. Then vial contents were intensively mixed in manual way until the sediment within the vial became completely homogenized. The vials with the homogenized sediment were shaken for 3.5 hours before carrying out the analysis using the LOIPLS-110 (Russia) shaker. For analysis, 5 ml of the gaseous phase were equally taken out using a syringe and put into the injector of the gas chromatograph.

The methane concentrations in the gaseous phase were determined on the ECHO-EW mod.2 gas chromatograph (Russia) equipped with a flame ionization detector and metal poly-capillary column (length is 2 m, width is 0.2-0.3 mm, phase Hayesep SD). The components were separated in isothermal mode at a column temperature of 50 °C. A detector temperature (FID) was 190 °C. Pure helium of 6.0 grade was used as a carrier gas. Certified calibration gas mixtures (OOO PGS-Service, Russia) with the volume concentrations of methane in helium

0.001, 0.005 and 0.01% was used to calibrate the equipment. Microsoft Excel spreadsheets were used to compute and organize the data obtained during the cruise. The data obtained were entered into the Ocean Data View geoinformation application for interpretation immediately after processing.

Results and discussion

Hydrocarbon-oxidizing bacteria were found in the oxidized layer of the bottom sediments at the methane content from 8.4 to 33.87 ml/l along the

eastern coast of the Novaya Zemlya and Novozemelskaya Depression. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms were not found at the stations 6877 and 6887. Both of these stations are characterized with low values of the methane content (8.3 and 5.3 ml/l, respectively) (see the Table).

The mesophiles count, determined by the McCready method, insignificantly depended on the methane content fluctuations. The maximum count of this group was recorded at the stations 6879 with high methane content (33.87 ml/l) and 6912 located in Novozemelskaya Depression, where a low methane content (8.4 ml/l) was revealed, – 4300 and 3500 cells/g, respectively. Meso- and psychrophiles hydrocarbon-oxidizing bacteria counts at the station 6879 were comparable (4300 and 3300 cells/g, respectively). But mesophiles oil-oxidizing microorganisms count at the station 6912 significantly exceeded the same indicator for psychrophilic ones (3500 and 100 cells/g, respectively). Only psychrophilic microorganisms were recorded at the stations 6919 and 6916.

Thermophilic oil-oxidizing bacteria (200 cells/g) were found only at one station 6928 located in the southern part of Novozemelskaya Depression with a high (14.8 ml/l), but not maximum for the study area, methane content. Mesophilic oil-oxidizing bacteria (100 cells/g) were also found at this station. Mesophilic cultures are represented by the long, thin rods. Thermophilic bacteria are relatively

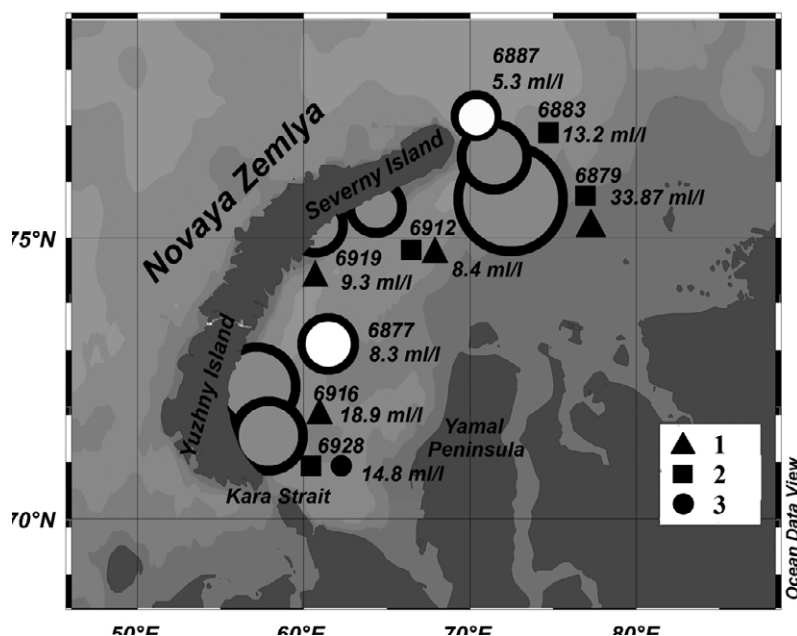


Figure. Map of the study area with marked stations of the bottom sediments sampling. Distribution of the methane content and places of psychro-, meso- and thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria in the bottom sediments of the Kara Sea. The stations, where the bacteria were found: 1 – psychrophilic hydrocarbon-oxidizing, 2 – mesophilic hydrocarbon-oxidizing, 3 – thermophilic hydrocarbon-oxidizing. Unfilled circles – the stations where hydrocarbon-oxidizing bacteria were not found.

Table. Number of thermo-, meso- and psychrophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the surface layer of the bottom sediments in the Kara Sea

Station no.	Depth, m	Methane content, ml/l	Hydrocarbon-oxidizing bacteria, cells/g			Station location
			+60 °C	+30 °C	+5 °C	
6877	85	8.3	–	–	–	Water area of the Kara Sea
6879	172	33.87	–	4300	3300	St. Anna Trough (southern part)
6883	183	13.2	–	800	–	St. Anna Trough (central part)
6887	528	5.3	–	–	–	St. Anna Trough (northern part)
6919	195	9.4	–	–	500	Rusanov Bay, Novaya Zemlya
6912	300	8.4	–	3500	100	Novozemelskaya Depression
6916	315	18.9	–	–	600	At the same place
6928	250	14.8	200	100	–	Novozemelskaya Depression (southern part)

Note. Dash – hydrocarbon-oxidizing bacteria are not found.

homogeneous in morphological composition and represented by thin and/or barrel-shaped rods. The detection of thermophilic microorganisms may be associated with hydrothermal activity and gas release from the depth. These assumptions are indirectly confirmed with the fact, that the sediment at the station, where thermophiles have been found, is grey-black with sulfides content, dense, reduced, with a high hydrotroilite content.

The study results showed, that the methane content in the bottom sediments had influenced to varying degrees on the detection of psychro-, meso- and thermophilic hydrocarbon oxidizing bacteria. Psychrophilic and mesophilic microorganisms occurred with similar frequency. The methane content had the greatest effect on the count of psychrophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms. Mesophiles responded to change in the methane content to a lesser degree. Thermophiles were found only at one station with the

methane content of 14.8 ml/l located near the Kara Strait.

Conclusion

According to the data of our study, methane has the greatest effect on psychrophilic microorganisms able to grow in the cold bottom sediments, which is mostly due to favorable conditions for this group survivorship in the oxidized layer of the bottom sediments of the Kara Sea. Psychrophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria were associated with the methane content regardless of its source. The methane content had an insignificant effect on the count of mesophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria. Thermophiles have been found only at one station and may be conditioned by the methane release, that is indirectly confirmed with the sediment type. Therefore, thermophilic hydrocarbon-oxidizing microorganisms have demonstrated the greatest bioindication significance.

References

1. Abakumov V.A. (ed.) **1983**. [Guide to methods of hydrobiological analysis of surface waters and bottom sediments]. Leningrad: Gidrometeoizdat, 240 p. (In Russ.).
2. Ananiev V. V. **2010**. [Problems and prospects for the development of the resource base of hydrocarbons in the Arctic waters of Russia]. *Mineral'nyye resursy Rossii. Ekonomika i upravleniye = Mineral resources of Russia. Economics and Management*, 3: 42–47. (In Russ.).
3. Ananiev V.V., Kosenkova N.N. **2010**. [Arctic shelf: “resources for the future”]. *Neftyanoe khozyaystvo = Oil industry*, 12: 16–19. (In Russ.).
4. Verzhbitsky V.E., Kosenkova N.N., Ananiev V.V., Malysheva S.V., Vasiliev V.E., Murzin R.R., Komisarov D.K., Roslov Yu. V. **2012**. Geology and hydrocarbon potential of the Kara Sea. *Oil and Gas J.*, 110 (1): 48–54. (In Russ.).
5. Grigorenko Yu.N., Mirchink I.M., Savchenko V.I., Senin B.V., Suprunenko O.I. **2006**. [Hydrocarbon potential of the continental shelf of Russia: state and development problems]. *Mineral'nyye resursy Rossii. Ekonomika i upravleniye (spetsvypusk) = Mineral resources of Russia. Economics and Management*, spec. iss.: [Mineral resources of Russian shelf]. Moscow, p. 14–69. (In Russ.).
6. Egorov N.S. (ed.) **1976**. *Workshop on Microbiology*. Moscow: Publ. House of Moscow State University, 308 p. (In Russ.).
7. Kontorovich A.E., Kontorovich V.A. **2010**. [Geology and hydrocarbon resources of the shelves of the Arctic seas of Russia]. In: [Materials of the joint meeting of the RAS Council for the coordination of the activities of regional branches and regional scientific centers of the RAS and the Scientific Council of the RAS for the study of the Arctic and Antarctic]. URO RAN = UB RAS, p. 59–68. (In Russ.).
8. Lisitsyn A.P., Shevchenko V.P., Vinogradov M.Ye., Severina O.V., Vavilova V.V., Mitskevich I.N. **1994**. [Fluxes of sedimentary matter in the Kara Sea and in the estuaries of the Ob and Yenisei]. *Okeanologiya = Oceanology*, 34(5): 748–758. (In Russ.).
9. Mosharov S.A., Mosharova I.V. **2010**. [Comparative analysis of production and microbiological characteristics of the Kara and Chukotka seas]. In: [Physical, geological and biological studies of oceans and seas]. Moscow: Nauchnyy mir [Scientific world], p. 494–505. (In Russ.).
10. Hubert C., Arnosti C., Bruchert V., Loy A., Vandieken V., Jorgensen B.B. **2010**. Thermophilic anaerobes in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. *Environmental Microbiology*, 12(4): 1089–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02161.x>
11. Jaeschke A., Jorgensen S.L., Bernasconi S.M., Pedersen R.B., Thorseth I.H., Fruh-Green G.L. **2012**. Microbial diversity of Loki's Castle black smokers at the Arctic Mid-Ocean Ridge. *Geobiology*, 10(6): 548–561. <https://doi.org/10.1111/gbi.12009>
12. Mamaeva E.V., Galach'yants Y.P., Khabudaev K.V., Petrova D.P., Pogodaeva T.V., Khodzher T.B., Zemskaya T.I. **2016**. Metagenomic analysis of microbial communities of the sediments of the Kara Sea shelf and the Yenisei Bay. *Microbiology*, 85(2): 187–198. <https://doi.org/10.1134/s0026261716020132>

13. McBee R.H., McBee V.H. **1956**. The incidence of thermophilic bacteria in arctic soils and waters. *J. of Bacteriology*, 71(2): 182–185. <https://doi.org/10.1128/jb.71.2.182-185.1956>
14. de Rezende J.R., Kjeldsen K.U., Jorgensen B.B. **2013**. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years. *ISME J.*, 7(1): 72–84. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.83>
15. Robador A., Muller A.L., Sawicka J.E., Berry D., Hubert C., Loy A., Jorgensen B.B., Bruchert V. **2016**. Activity and community structures of sulfate-reducing microorganisms in polar, temperate and tropical marine sediments. *ISME J.*, 10(4): 796–809. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.157>
16. Steinsbu B.O., Tindall B.J., Torsvik V.L., Thorseth I.H., Daae F.L., Pedersen R.B. **2011**. *Rhabdothermus arcticus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Thermaceae isolated from a hydrothermal vent chimney in the Soria Mona vent field on the Arctic Mid-Ocean Ridge. *International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9): 2197–2204. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.027839-0>
17. Suslova M.Yu., Lipko I.A., Mamaeva E.V., Parfenova V.V. **2012**. Diversity of cultivable bacteria isolated from the water column and bottom sediments of the Kara Sea shelf. *Microbiology*, 81(4): 524–31. <https://doi.org/10.1134/s0026261712040157>

Об авторах

ПОНОМАРЕВА Анна Леонидовна (<https://orcid.org/0000-0002-4382-9156>), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории комплексных исследований окружающей среды и минеральных ресурсов, Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН им. В.И. Ильичева, Владивосток, ponomareva.al@poi.dvo.ru

ПОЛОНИК Никита Сергеевич (<https://orcid.org/0000-0002-4726-9459>), кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории газогеохимии, Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН им. В.И. Ильичева, Владивосток, npol86@mail.ru

ОБЖИРОВ Анатолий Иванович (<https://orcid.org/0000-0002-4031-6419>), доктор геолого-минералогических наук, главный научный сотрудник лаборатории газогеохимии, Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН им. В.И. Ильичева, Владивосток, obzhirov@poi.dvo.ru

ШАКИРОВ Ренат Белалович (<https://orcid.org/0000-0003-1202-0351>), доктор геолого-минералогических наук, заместитель директора, Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН им. В.И. Ильичева, Владивосток, ren@poi.dvo.ru

ГРИГОРОВ Роман Андреевич, старший инженер лаборатории комплексных исследований окружающей среды и минеральных ресурсов, Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН им. В.И. Ильичева, Владивосток, grigorov.roman1997@gmail.com

ШМАЛЕ Оливер, (<https://orcid.org/0000-0003-2987-4900>), доктор геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник, Институт Лейбница по исследованию Балтийского моря, Варнемюнде, Германия, oliver.schmale@io-warnemuende.de

МАУ Сюзан (<https://orcid.org/0000-0003-4186-8159>), доктор геолого-минералогических наук, приглашенный научный сотрудник Исследовательской группы Общая геология - морская геология. Отдел наук о Земле, Университет Бремена, Бремен, Германия, smau@marum.de

About Authors

PONOMAREVA Anna L. (<https://orcid.org/0000-0002-4382-9156>), Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory for comprehensive research of the environment and mineral resources, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch of the RAS, Vladivostok, ponomareva.al@poi.dvo.ru

POLONIK Nikita S. (<https://orcid.org/0000-0002-4726-9459>), Cand. Sci. (Chemistry), Researcher, Laboratory of gas geochemistry, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch of the RAS, Vladivostok, npol86@mail.ru

OBZHIROV Anatoly I. (<https://orcid.org/0000-0002-4031-6419>), Doctor of Geology and Mineralogy, Principal Researcher, Laboratory of gas geochemistry, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch of the RAS, Vladivostok, obzhirov@poi.dvo.ru

SHAKIROV Renat B. (<https://orcid.org/0000-0003-1202-0351>), Doctor of Geology and Mineralogy, Deputy Director, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch of the RAS, Vladivostok, ren@poi.dvo.ru

GRIGOROV Roman A. Senior Engineer, Laboratory for comprehensive research of the environment and mineral resources, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Branch of the RAS, Vladivostok, grigorov.roman1997@gmail.com

SCHMALE Oliver (<https://orcid.org/0000-0003-2987-4900>), Doctor of Geology and Mineralogy, Leibniz Institute for Baltic Sea Research, Warnemünde, Germany, oliver.schmale@io-warnemuende.de

MAU Susan (<https://orcid.org/0000-0003-4186-8159>), Doctor of Geology and Mineralogy, Visiting Researcher Fellow, Research group General Geology – Marine Geology, Department of Earth Sciences, University of Bremen, Bremen, Germany, smau@marum.de