
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СОСТАВА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА РЕЗЕРВУАРА ПОДЗЕМНЫХ ТЕРМАЛЬНЫХ ВОД В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

© 2017 г. В. В. Кадников^{a, b}, Ю. А. Франк^c, А. В. Марданов^b, А. В. Белецкий^b,
Д. А. Ивасенко^c, Н. В. Пименов^d, О. В. Карначук^c, Н. В. Равин^{a, b, *}

^aБиологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия

^bИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

^cТомский государственный университет, Россия

^dИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 26.06.2017 г.

Глубинная подземная биосфера является одной из наименее изученных экосистем на Земле, содержащих сообщества экстремофильных микроорганизмов. Целью работы являлась молекулярная характеристика микробных сообществ подземных термальных вод Западно-Сибирского региона, залегающих на глубинах 2–3 км. Отбор проб воды проводили из нефтепоисковой скважины 5Р, пробуренной до глубины 2.8 км, в районе пос. Чажемто Томской области. Вода имела температуру около 20°C, нейтральный pH и низкий окислительно-восстановительный потенциал (–304 mV). Подземные резервуары имеют сложную структуру и могут содержать как “планктонные”, так и иммобилизованные на поверхности пород в виде биопленок микроорганизмы, которые могут эпизодически вымываться и детектироваться в вытекающей из скважины воде. Мы провели анализ состава сообщества с помощью амплификации и пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК, проанализировав семь проб воды, отобранных в различные моменты времени в течение 26 ч. Бактерии, составлявшие около половины сообщества, были представлены в основном некультивируемыми линиями филумов *Firmicutes*, *Ignavibacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, а археи относились, в основном, к известным метаногенам родов *Methanothermobacter*, *Methanosaeta* и *Methanomassiliicoccus*. Анализ образцов, отобранных в различные моменты времени выявил большие вариации в содержании большинства групп бактерий, причем снижение содержания *Firmicutes* сопровождалось увеличением долей *Ignavibacteria* и *Chloroflexi*. Доля архей рода *Methanothermobacter* в течение суток изменялись незначительно, а для филотипов, отнесенных к *Methanosaeta* и *Methanomassiliicoccus*, наблюдались значительные вариации. По-видимому, гидрогенотрофные археи рода *Methanothermobacter* являются постоянной компонентой микробного сообщества и образуют его “планктонную” составляющую, а большая часть идентифицированных групп бактерий присутствует в биопленках или пространственно локализованных участках подземного водного резервуара, материал которых периодически поступает в скважину.

Ключевые слова: подземная биосфера, термальные воды, микробное сообщество, молекулярный анализ, метаногены

DOI: 10.7868/S0026365617060088

Микробные сообщества в глубинных подземных экосистемах Земли имеют различный состав, который зависит от геохимических условий (Gihring et al., 2006). Такие экосистемы остаются изолированными от поверхностной биосферы на протяжении тысяч–миллионов лет и не зависят от поступления органических веществ с поверхности (Edwards et al., 2012). Как правило, они характеризуются низким содержанием доступных субстратов, что определяет низкую скорость роста микроорганизмов подземной биосферы *in situ* (Jørgensen, 2012; Lever et al., 2015). С использованием молекулярных методов анализа генов 16S

рРНК в таких сообществах были обнаружены различные “некультивируемые” линии бактерий и архей, которые во многих случаях составляют большую часть сообществ и специфичны для подземных местообитаний (Takai et al., 2001a; Gihring et al., 2006; Chivian et al., 2008; Sahl et al., 2008).

В зависимости от доступных источников энергии, в микробных сообществах подземной биосферы могут преобладать литоавтотрофные или гетеротрофные микроорганизмы. Основным источником энергии для автотрофов является молекулярный водород абиотического происхожде-

ния (Nealson et al., 2005; Hallbeck, Pedersen, 2008). Он может использоваться сульфатредуцирующими микроорганизмами или метаногенными археями. Эти две группы микроорганизмов часто встречаются в подземных экосистемах (Moser et al., 2005). Другие подземные экосистемы, например, пластовые воды нефтяных месторождений, могут содержать большие количества оставшихся с момента их образования органических веществ, что определяет возможность развития разнообразных органотрофных микроорганизмов.

Наиболее доступным источником глубинных подземных термальных вод (с глубины 1–3 км) являются нефтепоисковые скважины, из которых эти воды могут вытекать под давлением. Микроорганизмы в вытекающей воде представляют в основном “планктонную” часть сообщества, наряду с которой в подземных резервуарах присутствуют и микроорганизмы, иммобилизованные на поверхности пород в виде биопленок, причем на их долю может приходиться более 99% всех клеток (McMahon, Pallner, 2014). Иммобилизованные на породах микроорганизмы могут эпизодически вымываться и, соответственно, детектироваться в вытекающей из скважины воде (Edwards et al., 2005; Wanger et al., 2006), что может объяснять наблюдаемые различия в составе микробных сообществ, в том числе в воде одного резервуара. Так, ранее на протяжении нескольких лет мы исследовали микробные сообщества подземных вод Западно-Сибирского региона, поступающих из скважины 3Р Парабельского района Томской области и обнаружили значительные вариации в его составе в разные годы (Frank et al., 2016).

В данной работе мы исследовали состав микробных сообществ подземных вод из нефтепоисковой скважины 5Р, расположенной в районе поселка Чажемто Томской области. Результаты секвенирования полученных с помощью ПЦР фрагментов генов 16S рРНК в разные временные точки позволили охарактеризовать состав этих микробных сообществ и выявить изменения численности определенных групп микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и характеристика химического состава воды. Отбор воды проводили из нефтепоисковой скважины 5Р, пробуренной в 1950-х годах до глубины 2.8 км в районе пос. Чажемто Томской области. Пробы воды объемом 3 л отбирали в апреле 2016 г. Всего было отобрано 7 проб: 29.04.2016 в 19:30 (СН1) и 22:30 (СН2), 30.04.2016 в 9:30 (СН3), 12:30 (СН4), 15:30 (СН5), 18:30 (СН6) и 21:30 (СН7). Температуру, рН и окислительно-восстановительный потенциал определяли на месте рН-метром HANNA HI 8314F. Воду

для анализа содержания ионов (30 мл) и элементный анализ (15 мл) фильтровали на месте через фильтр 0.22 мкм. Элементный анализ воды (образец СН7) проводили в ООО “Химико-аналитический центр “Плазма” (г. Томск) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) и ионов на ионном хроматографе.

Выделение метагеномной ДНК, ПЦР-амплификация и пиросеквенирование фрагментов генов 16S рРНК. Для сбора биомассы микроорганизмов образцы воды (по 3 л на каждый образец) пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры гомогенизировали, растирая с жидким азотом, препарат метагеномной ДНК выделяли методом, основанным на лизисе клеток с последующей обработкой детергентом СТАВ (Wilson, 1987). Всего было выделено около 1 мкг ДНК на каждый образец.

Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего вариабельные участки V3–V6, использовали “универсальные” праймеры U341F (5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3') и PRK806R (5'-GGA CTA CYV GGG TAT CTA AT-3'). Полученные с помощью ПЦР фрагменты генов 16S рРНК секвенировали на геномном анализаторе GS FLX (“Roche”, Швейцария) по протоколу Titanium с использованием набора реактивов GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+. Создание библиотеки, ее амплификацию и секвенирование на GS FLX проводили, следуя соответствующим протоколам фирмы “Roche”.

Анализ результатов пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК. До проведения анализа из набора определенных при пиросеквенировании последовательностей генов 16S рРНК были отбраны прочтения, начинающиеся с праймера U341F и имеющие длину более 150 нуклеотидов, при этом участки, выходящие за пределы первых 150 нуклеотидов в более длинных прочтениях были удалены для облегчения кластерного анализа. С помощью встроенного в пакет Usearch алгоритма Uchime (Edgar et al., 2011) были удалены потенциально химерные последовательности. Прочтения, встречающиеся один раз (во всем массиве данных) были исключены из анализа как вероятные ошибки пиросеквенирования с помощью пакета программ Mothur (Schloss et al., 2009). После предварительной фильтрации, в основном за счет удаления коротких прочтений, набор данных для исследуемых образцов содержал от 1109 до 9901 последовательностей (табл. 1). Дополнительно в анализ включили последовательности фрагментов генов 16S рРНК, полученные из пробы воды (СН0), отобранной в сентябре 2015 г. (Kadnikov et al., 2017).

Кластерный анализ и выбор репрезентативных последовательностей оперативных таксономических единиц (OTU) проводили с помощью пакета программ QIIME (Caporaso et al., 2010).

Таблица 1. Исследованные образцы воды из скважины 5P

Номер образца и время отбора	13.09.2015	29.04.2016	29.04.2016	30.04.2016	30.04.2016	30.04.2016	30.04.2016	30.04.2016
		19:30	22:30	9:30	12:30	15:30	18:30	21:30
	СН0	СН1	СН2	СН3	СН4	СН5	СН6	СН7
Всего чтений 16S рРНК после фильтрации	6663	1109	1618	4348	4946	4694	5493	9901

Анализ проводили для всего массива последовательностей генов 16S рРНК (7 образцов 2016 г. и образец 2015 г.), для каждой OTU учитывали число относящихся к ней последовательностей 16S рРНК в каждом образце. Полученные репрезентативные последовательности были таксономически классифицированы с помощью RDP classifier (Cole et al., 2009). Таксономическую идентификацию репрезентативных последовательностей также проводили в результате их сравнения с базой данных 16S рРНК в GenBank по протоколу BLASTN. При обнаружении последовательности, имеющей более 95% сходства с геном 16S рРНК таксономически описанного микроорганизма, OTU относили к соответствующему роду.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики подземных вод. Объектом исследования являлись подземные термальные воды Западно-Сибирского региона, залегающие на глубинах 2–3 км. Предполагается, что эти резервуары термальных вод были изолированы от поверхности на протяжении десятков–сотен миллионов лет. Отбор воды в апреле 2016 г. проводили из нефтепоисковой скважины 5P, пробуренной в 1950-х годах до глубины 2.8 км в районе пос. Чажемто Томской области. Вода на изливе скважины имела температуру 19.8–19.9°C, нейтральный pH (7.43–7.6) и низкий окислительно-восстановительный потенциал (от –304 до –338 mV). Концентрация сульфатов в воде была относительно невысока (90.4 мг/л), в ней имелся растворенный сероводород (15.7 ± 4.3 мг/л). В газовой фазе в основном присутствовал метан, который, судя по изотопному составу углерода, имел преимущественно биогенное происхождение ($\delta^{13}\text{C}/\text{CH}_4$ –59.87–60.03‰). Химический состав воды представлен в табл. 2.

Состав микробных сообществ подземных вод по результатам анализа последовательностей генов 16S рРНК. Анализ состава микробного сообщества выявил те же основные группы бактерий и архей, которые были обнаружены при анализе вод этой скважины в сентябре 2015 г. (Kadnikov et al., 2017). Соотношение архей и бактерий в сообществе в образцах 2016 г. изменялось незначительно (доля архей составляла 36–46% последо-

вательностей 16S рРНК), но в 2015 г. доля архей составляла 56% (табл. 3).

Доминирующими группами бактерий являлись представители филумов *Firmicutes*, *Ignavibacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* (класс дельта) и *Thermotogae*, а доли остальных филумов не превышали в среднем 1.5% (табл. 3). Наряду с известными группами были обнаружены также представители филумов *Acetothermia* (OP1), *Aminicenantes* (OP8), *Armatimonadetes* (OP10), *Atribacteria* (OP9), кандидатного филума BRC1 и пяти некультивируемых линий, которые не удалось классифицировать даже на уровне филума (табл. 3).

Представители *Firmicutes* являлись наиболее многочисленной группой бактерий и в среднем составляли около 23% всего микробного сообщества. Большинство *Firmicutes* было представлено различными “некультивируемыми” линиями, филогенетически удаленными от известных групп. Из культивируемых *Firmicutes* были обнаружены представители рода *Coprothermobacter*, –

Таблица 2. Физико-химические характеристики воды из скважины 5P

Параметр	Значение	
	2015 г. (образец СН0)	2016 г. (образец СН7)
Температура, °C	20.8	19.8
pH	7.6	7.5
Eh, mV	–680	–329
Содержание в воде		
Na (мг/л)	1970	1826
B (мг/л)	6.1	4.7
K (мг/л)	13.9	14.6
Ca (мг/л)	245	233
Mg (мг/л)	1.1	1.1
Sr (мг/л)	15.8	17.0
Ba (мг/л)	4.1	3.9
Si (мг/л)	15.2	16.8
Fe (мг/л)	0.9	1.5
SO ₄ ²⁻ (мг/л)	23.3	90.4
H ₂ S (мг/л)	7.6	15.7

Таблица 3. Состав микробного сообщества подземных термальных вод из скважины 5Р

Домен, таксономическая группа	Доля в сообществе (% последовательностей генов 16S рРНК)							
	СН0	СН1	СН2	СН3	СН4	СН5	СН6	СН7
Archaea (всего)	55.6	38.3	42.6	39.5	43.8	36.1	42.7	46.0
<i>Crenarchaeota</i>	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
<i>Methanobacteria</i>	29.0	25.5	24.7	23.8	29.6	24.0	24.2	30.1
<i>Methanomicrobia</i>	26.4	10.6	14.6	14.7	10.8	8.3	14.6	13.0
<i>Thermoplasmata</i>	0.3	0.7	3.1	0.9	3.4	3.7	3.7	2.9
<i>Pacearchaeota</i>	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
<i>Thaumarchaeota</i>	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Woesearchaeota</i>	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bacteria (всего)	44.4	61.7	57.4	60.5	56.2	63.9	57.3	54.0
<i>Acetothermia</i>	1.9	1.3	0.9	1.1	0.9	1.3	0.8	0.6
<i>Acidobacteria</i>	0.3	0.9	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
<i>Actinobacteria</i>	0.1	1.6	0.1	0.6	0.4	0.1	0.0	0.1
<i>Aminicenantes</i>	0.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.0	0.0
<i>Armatimonadetes</i>	0.0	0.9	0.6	0.8	0.4	0.5	0.4	0.4
<i>Atribacteria</i>	0.3	1.5	0.1	0.3	0.4	0.5	0.2	0.2
<i>Bacteroidetes</i>	6.2	3.7	5.1	3.3	3.7	4.3	4.7	2.7
BRC1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>Chloroflexi</i>	6.1	7.3	7.2	12.9	6.7	8.1	5.9	6.3
<i>Firmicutes</i>	19.3	19.5	25.2	12.3	24.0	29.0	28.5	26.5
<i>Ignavibacteriae</i>	2.8	11.0	6.8	18.9	7.2	7.0	5.8	5.8
<i>Nitrospirae</i>	0.7	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.0	0.6	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
<i>Betaproteobacteria</i>	0.0	0.9	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.0	1.8	0.4	0.5	0.4	0.1	0.2	0.4
<i>Deltaproteobacteria</i>	1.2	2.1	3.5	4.6	3.8	5.1	3.8	4.9
<i>Thermodesulfobacteria</i>	0.0	0.0	0.3	0.1	0.3	0.5	0.4	0.4
<i>Thermotogae</i>	1.7	0.8	2.3	1.6	2.5	2.5	2.1	1.8
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0	0.3	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
Uncultured group 1	1.2	2.4	0.7	0.4	1.1	0.5	0.9	0.7
Uncultured group 2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Uncultured group 3	0.1	1.4	0.7	0.3	0.4	0.9	0.4	0.5
Uncultured group 4	1.2	1.4	1.2	0.7	1.3	1.4	0.8	0.8
Uncultured group 5	0.7	1.0	0.5	0.6	0.6	0.8	1.1	0.6
Others	0.5	0.6	0.9	0.9	1.1	0.7	1.0	1.0

Примечание. Таксономические группы указаны на уровне филума, для *Proteobacteria* и *Euryarchaeota* – на уровне классов.

протеолитические бактерии с ферментативным метаболизмом (2.4%), а также *Pelotomaculum* (3.1%), *Syntrophothermus* (0.3%) и *Syntrophomonas* (0.15%), образующие синтрофные ассоциации с метаногенными археями. Известные представители сульфатредуцирующих *Firmicutes* обнаружены не были. Хотя в целом, за исключением образца СН3 (см. ниже), доля *Firmicutes* в сообществе

менялась незначительно (рисунок 1), на уровне отдельных OTU наблюдались значительные вариации, например, доля *Coprothermobacter* изменялась в диапазоне от 0.7 до 3.5% (табл. 4).

Бактерии филума *Chloroflexi* составляли от 6 до 8% микробного сообщества во всех образцах кроме СН3, в котором к этому филуму относилось 13% последовательностей 16S РНК (рисунок).

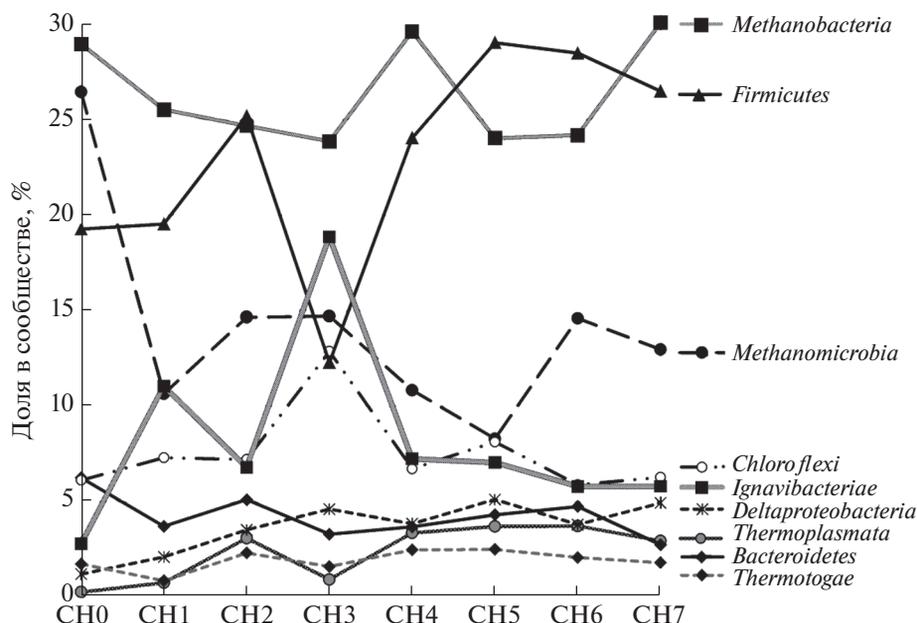


Рис. 1. Изменение численности основных групп микроорганизмов в образцах подземных вод скважины 5P.

Почти все обнаруженные *Chloroflexi* относились к семейству *Anaerolineaceae*, известные представители которого являются гетеротрофами, использующими полисахариды (Yamada et al., 2006), но были филогенетически удалены от культивируемых видов. Интересно, что увеличение доли *Chloroflexi* в образце CH3 обусловлено лишь одной OTU17, доля которой составляла в этом образце 7.8% всех последовательностей 16S рРНК, а в остальных – не более 0.3% (табл. 4).

Доля бактерий филума *Ignavibacteriae* изменялась в широких пределах, от 2.4% в образце 2015 г. (CH0) до 18.6% в образце CH3. Известные культивируемые представители этого филума, *Ignavibacterium album* и *Melioribacter roseus*, являются гетеротрофами, использующие различные полисахариды (Liu et al., 2012; Podosokorskaya et al., 2013; Kadnikov et al., 2013). Они могут расти как ферментативно, так и осуществляя процессы аэробного и анаэробного дыхания. Хотя *M. roseus* был выделен из подземных термальных вод Западно-Сибирского региона (Podosokorskaya et al., 2013), обнаруженные нами *Ignavibacteriae* были филогенетически удалены как от этого вида, так и от *I. album*. В более узком диапазоне изменялась доля *Bacteroidetes* (от 2.7 до 6.2%), представленных различными линиями, филогенетически удаленными от культивируемых бактерий этого филума (табл. 4).

Дельтапротеобактерии составляли 1.2% сообщества в образце 2015 г. и от 2 до 5% в образцах 2016 г. Большинство бактерий этой группы относились к порядку *Syntrophobacterales*, представите-

ли которого являются анаэробными хемоорганотрофами, образующими синтрофные ассоциации с метаногенными археями (Garrity et al., 2005). Из числа известных дельтапротеобактерий, способных восстанавливать сульфат, были обнаружены только представители рода *Syntrophobacter* (Chen et al., 2005), однако их доля в сообществе не превышала 1%.

Филум *Thermotogae*, доля которого в сообществе составляла от 0.8 до 2.5%, был представлен родами *Fervidobacterium* и *Mesotoga*. Бактерии этих родов являются анаэробными гетеротрофами, характерными для различных термальных экосистем.

В отличие от бактерий, выявленные археи представляли известные рода и виды метаногенов, как гидрогенотрофных, так и ацетокластических. Доли представителей других групп архей (*Crenarchaeota*, *Pacearchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Woesearchaeota*) не превышали 0.1%. Гидрогенотрофные археи порядка *Methanobacteriales* доминировали в микробном сообществе, и их доля была относительно постоянной (24–30%). Филогенетически они относились к родам *Methanobacterium* и *Methanothermobacter*, характерным для подземных термальных вод и нефтяных резервуаров.

В более широком диапазоне изменялось содержание архей порядка *Methanosarcinales*, доля которых составляла от 8.3 до 14.7% в образцах 2016 г. и 26.4% в образце 2015 г. (табл. 4). Эта группа была представлена тремя филотипами ацетокластических метаногенов, отнесенными к роду *Methanosaeta*, – *Methanosaeta thermophila*, *Methano-*

Таблица 4. Основные постоянные и переменные компоненты микробного сообщества подземных термальных вод из скважины 5P

OTU ID	Доля в сообществе мин./макс./сред., %	Таксономическая группа	Ближайший культивируемый организм (по 16S рРНК)	Идентичность, %
Постоянная часть сообщества				
Archaea				
OTU1	18.4/26.3/22.2	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> Marburg	100
OTU9	1.4/3.7/2.6	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanothermobacter crinale</i> HMD	100
Bacteria				
OTU18	0.6/1.9/1.1	<i>Acetothermia</i> (OP1)	<i>Candidatus Acetothermus autotrophicum</i>	87
OTU8	0.8/2.3/1.6	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i> GZ-RA12	90
OTU10	1.3/3.4/2.6	<i>Firmicutes</i>	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	99
Вариабельная часть сообщества				
Archaea				
OTU2	3.1/17.7/10.2	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosaeta thermophila</i> PT	100
OTU3	1.1/10.8/3.1	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	95
OTU62	0.0/6.1/0.9	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100
OTU28	0.4/2.6/1.0	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacterium beijingense</i> M4	100
OTU13	0.3/3.7/2.3	<i>Thermoplasmata</i>	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10	94
Bacteria				
OTU14	1.0/4.8/2.3	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Lentimicrobium saccharophilum</i> TBC1	88
OTU17	0.0/7.8/1.1	<i>Chloroflexi</i>	<i>Ornatilinea apprima</i> P3M-1	90
OTU11	0.8/2.9/1.9	<i>Chloroflexi</i>	<i>Levilinea saccharolytica</i> HIT3	97
OTU15	0.4/2.4/0.8	<i>Chloroflexi</i>	<i>Pelolinea submarina</i> MO-CFX1	97
OTU4	1.9/5.4/3.9	<i>Firmicutes</i>	<i>Anoxynatronum sibiricum</i> Z-7981	90
OTU5	0.7/3.5/2.4	<i>Firmicutes</i>	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> DSM 5265	94
OTU6	2.1/8.9/5.4	<i>Firmicutes</i>	<i>Thermacetogenium phaeum</i> DSM 12270	89
OTU16	0.5/2.1/1.3	<i>Firmicutes</i>	<i>Cellulosibacter alkalithermophilus</i> A6	94
OTU7	2.4/18.6/7.4	<i>Ignavibacteriae</i>	<i>Ignavibacterium album</i> JCM 16511	83
OTU12	0.8/4.8/2.8	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	90
OTU24	0.0/2.7/0.4	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophus gentianae</i> DSM:8423	92
OTU20	0.6/2.3/1.6	<i>Thermotogae</i>	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> NYC	100
OTU22	0.5/2.4/1.0	Uncultured group 1	<i>Thermosulfidibacter takaii</i> ABI70S6	82

Примечание. Представлены OTU, доли которых в сообществе составляли не менее 1% в среднем или не менее 2% хотя бы в одном образце. Приведены минимальное, максимальное и среднее значения по всем 8 образцам. К постоянной части сообщества отнесены OTU, доли которых во всех образцах находятся в диапазоне 0.5X–2X от среднего значения.

saeta concilii и новым филоотипом этого рода. Относительное содержание этих линий архей менялось в широком диапазоне (табл. 4). Так, доля OTU2, отнесенной к *Methanosaeta thermophila*, составляла 17.7% в образце 2015 г. и была минимальной в образце СНЗ (3.1%), в котором преобладал другой филоотип рода *Methanosaeta* (OTU3, 10.8%), доля которого в остальных образцах не превышала 3.1%. *Methanosaeta concilii* (OTU62) была детектирована в образце 2015 г. (6.1%), но практически отсутствовала во всех остальных образцах кроме СНЗ, в котором ее доля составляла около 1%.

Были обнаружены также представители еще одной группы метаногенов, использующей для образования метана водород и метанол. Первоначально они были обнаружены в составе микробиома кишечника (Dridi et al., 2012), но позднее эта линия, выделенная в порядок *Methanoplasmales* класса *Thermoplasmata*, была найдена в разных природных экосистемах (Paul et al., 2012). Доля этой группы (OTU13) изменялась в широком диапазоне в образцах 2016 г. (от 0.7 до 3.7%), а в образце 2015 г. составляла 0.3% (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Нефтепоисковая скважина 5Р, расположенная в районе пос. Чажемто Томской области, была пробурена до глубины около 2.8 км. Глубина скважины и относительно высокая минерализация воды указывают на ее происхождение из глубинного подземного резервуара. Однако температура воды (около 20°C) существенно ниже ожидаемой с учетом стандартного градиента температуры в 2–3°C на 100 м глубины (Banks, 2012). Вероятным объяснением является охлаждение воды по мере прохождения ствола скважины, хотя нельзя исключить и подток воды из водоносных горизонтов на меньшей глубине.

Изолированность глубинного подземного резервуара предполагает постоянство физико-химических условий этой экосистемы и, следовательно, состава эндогенного микробного сообщества. Характеристики температуры, рН и химического состава воды скважины 5Р не отличались существенно в образцах, отобранных в сентябре 2015 г. и апреле 2016 г. (табл. 2). Исключением является содержание сульфата в воде, которое в образце 2015 г. было существенно ниже, чем в образце 2016 г. (табл. 2). Однако связь этого параметра с составом сообщества остается неясной, поскольку известные группы сульфатредуцирующих микроорганизмов не были обнаружены ни в 2015 г. (Kadnikov et al., 2017), ни в образцах 2016 г.

Исследования микробных сообществ подземных термальных вод Западной Сибири, проведенные для скважины 3Р Парабельского района Томской области на протяжении 5 лет, выявили

существенные изменения в составе микробных сообществ, хотя количественный анализ был проведен только для одного образца (Frank et al., 2016). Помимо постоянной части сообщества, представленной сульфатредуцирующими фирмикутами и метаногенными археями, были обнаружены различные минорные компоненты, состав которых менялся в разные годы (Frank et al., 2016).

В данной работе мы проанализировали суточную динамику изменений в составе микробных сообществ подземных вод, вытекающих из нефтепоисковой скважины 5Р. Поскольку для микроорганизмов подземной биосферы, обитающих в условиях низкой концентрации ростовых субстратов, характерны длительные времена генерации, которые достигают сотен лет (Jørgensen, 2012), возможные вариации состава сообщества могут отражать только гетерогенность самого резервуара, содержимое разных частей которого в различные моменты времени поступает в ствол скважины, а не являться следствием всплеска развития определенной группы микроорганизмов, возможного на более длительных временных интервалах.

Полученные нами результаты показали наличие как “постоянной” части сообщества, состав которой меняется незначительно, так и групп микроорганизмов, доли которых в различных образцах на протяжении суток менялась в несколько раз (табл. 4). Сравнение образца, отобранного в сентябре 2015 г., и семи образцов, отобранных в течение суток в апреле 2016 г., показало, что вариативность состава сообщества в течение одних суток сопоставима с отличиями между образцами разных лет (рисунок). Особенностью образца 2015 г. является более высокое содержание ацетокластических архей рода *Methanosaeta*, и более низкое содержание бактерий *Ignavibacteriae* и *Deltaproteobacteria* по сравнению с образцами 2016 г. Среди образцов 2016 г. выделялся СНЗ, в котором снижение доли *Firmicutes* сопровождалось увеличением содержания *Ignavibacteriae* и *Chloroflexi*.

Микробное сообщество подземного водного резервуара включает как “планктонную” часть, так и микроорганизмы, иммобилизованные на поверхности пород в виде биопленок, причем на их долю может приходиться более 99% всех клеток (McMahon, Pallner, 2014). Иммобилизованные на породах микроорганизмы могут эпизодически вымываться и, соответственно, детектироваться в вытекающей из скважины воде, что может объяснять наблюдаемые различия в составе микробных сообществ. К планктонным микроорганизмам могут относиться в первую очередь автотрофы, использующие растворенные неорганические соединения. В исследуемом микробном сообществе это, прежде всего, гидrogenотрофные

метаногенные археи порядка *Methanobacteriales*, доля которых была высокой и относительно постоянной. Вторая распространенная в подземных экосистемах группа, гидрогенотрофные сульфат-редукторы, почти отсутствовала. Большинство других микроорганизмов, вероятно, представляют иммобилизованную фракцию или были связаны с ней. Об этом свидетельствует большое число обнаруженных групп гетеротрофных бактерий, деградирующих полисахариды, к числу которых вероятно относятся *Ignavibacteria*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*. Образующий этой иммобилизованной фракцией сообщества ацетат может потребляться метаногенными археями рода *Methanosaeta*. Низкомолекулярные органические соединения могут использоваться синтрофными ассоциациями, включающими *Deltaproteobacteria* и *Firmicutes* в консорциуме с метаногенами. Вариабельность содержания этих групп в сообществе (табл. 2, табл. 4) согласуется с их присутствием в биопленках и/или пространственно локализованных участках подземного водного резервуара.

Дальнейшее изучение этого микробного сообщества с использованием метагеномных подходов позволит лучше понять его состав и функциональную роль отдельных групп входящих в него микроорганизмов.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия”, поддержана РФФИ (грант № 16-34-60124) и ФАНО России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gihring T.M., Moser D.P., Lin L-H., Davidson M., Onstott T.C., Morgan L., Millesson M., Kieft T.L., Trimarco E., Balkwill D.L., Dollhopf M.E. The distribution of microbial taxa in the subsurface water of the Kalahari Shield, South Africa // *Geomicrobiol. J.* 2006. V. 23. P. 415–430.
- Banks D. An Introduction to Thermogeology: Ground Source Heating and Cooling. 2nd edn. Chichester: John Wiley and Sons, 2012. 544 p.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010. V. 7 (5). P. 335–336.
- Chivian D., Alm E., Brodie E., Culley D., Dehal P., DeSantis T., Gihring T., Lapidus A., Lin L-H., Lowry S., Moser D., Richardson P., Southam G., Wanger G., Pratt L., Andersen G., Hazen T., Brockman F., Arkin A., Onstott T. Environmental genomics reveals a single species ecosystem deep within the Earth // *Science.* 2008. V. 322. P. 275–278.
- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 141–145.
- Chen S., Liu X., Dong X. *Syntrophobacter sulfatireducens* sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1319–1324.
- Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1902–1907.
- Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // *Bioinformatics.* 2011. V. 27. P. 2194–2200.
- Edwards K.J., Becker K., Colwell F. The deep, dark energy biosphere: intraterrestrial life on earth // *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* 2012. V. 40. P. 551–568.
- Frank Y.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Banks D., Gerasimchuk A.L., Podosokorskaya O.A., Merkel A.Yu., Chernyh N.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Stable and variable parts of microbial community in Siberian deep subsurface thermal aquifer system revealed in a long-term monitoring study // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7: 2101.
- Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. The Proteobacteria: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria // *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd ed. New York: Springer, 2005. V. 2. Part C. 1388 p.
- Hallbeck L., Pedersen K. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield // *Appl. Geochem.* 2008. V. 23. P. 1796–1819.
- Jørgensen B.B. Shrinking majority of the deep biosphere // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 15976–15977.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Podosokorskaya O.A., Gavrilov S.N., Kublanov I.V., Beletsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. Genomic analysis of *Melioribacter roseus*, facultatively anaerobic organotrophic bacterium representing a novel deep lineage within *Bacterioidetes/Chlorobi* group // *PLoS One.* 2013. V. 8 (1). e53047.
- Kadnikov V.V., Frank Y.A., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ivasenko D. A., Pimenov N. V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Uncultured bacteria and methanogenic archaea predominate in the microbial community of Western Siberian deep subsurface aquifer // *Microbiology (Moscow).* 2017. V. 68. P. 412–415.
- Lever M.A., Rogers K.L., Lloyd K.G., Overmann J., Schink B., Thauer R.K., Hoehler T.M., Jørgensen B.B. Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory- and field-based investigations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. P. 688–728.
- Liu Z., Frigaard N.U., Vogl K., Iino T., Ohkuma M., Overmann J., Bryant D.A. Complete Genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum *Chlorobi* // *Front. Microbiol.* 2012. V. 29. 3:185.
- McMahon S., Parnell J. Weighing the deep continental biosphere // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014. V. 87. P. 113–120.
- Nealson K.H., Inagaki F., Takai K. Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLiMEs): do they exist and why should we care? // *Trends Microbiol.* 2005. V. 13. P. 405–410.
- Moser D.P., Gihring T., Fredrickson J.K., Brockman F.J., Balkwill D., Dollhopf M.E., Sherwood-Lollar B., Pratt L.M., Boice E., Southam G., Wanger G., Welty A.T., Baker B.J., Onstott T.C. *Desulfotomaculum* spp. and *Methanobacterium*

spp. dominate a 4- to 5-kilometer deep fault // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 8773–8783.

Paul K., Nonoh J.O., Mikulski L., Brune A. "Methanoplasmatales," *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 8245–8253.

Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. P. 1759–1771.

Sahl J.W., Schmidt R., Swanner E.D., Mandernack K.W., Templeton A.S., Kieft T.L., Smith R.L., Sanford W.E., Callaghan R.L., Mitton J.B., Spear J.R. Subsurface microbial diversity in deep granitic-fracture water in Colorado // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 143–152.

Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van

Horn D.J., Weber C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 7537–7541.

Takai K., Moser D.P., DeFlaun M.F., Onstott T.C., Fredrickson J.K. Archaeal diversity in waters from deep South African Gold mines // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 5750–5760.

Wanger G., Southam G., Onstott T.C. Structural and chemical characterization of a natural fracture surface from 2.8 kilometers below land surface: biofilms in the deep subsurface // Geomicrobiol. J. 2006. V. 23. P. 443–452.

Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Current protocols in molecular biology. 1987. P. 2.4.1–2.4.5.

Yamada T., Sekiguchi Y., Hanada S., Imachi H., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. *Anaerolinea thermolimos* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1331–1340.

Variability of the Composition of the Microbial Community from a Deep Subsurface Thermal Aquifer in Western Siberia

V. V. Kadnikov^{1,2}, Yu. A. Frank³, A. V. Mardanov², A. V. Beletsky², D. A. Ivasenko³,
N. V. Pimenov⁴, O. V. Karnachuk³, and N. V. Ravin^{1,2,#}

¹ Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁴ Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

#e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Received June 26, 2017

Abstract—The deep subsurface biosphere is one of the least studied ecosystems on Earth, containing communities of extremophilic microorganisms. The present work was aimed at molecular genetic characterization of microbial communities of underground thermal waters in Western Siberia, lying at depths of 2–3 km. Water samples were collected from the 5P oil-exploration well in the area of the village Chazhemto (Tomsk region), drilled to a depth of 2.8 km. The water had a temperature of about 20°C, a neutral pH and a low redox potential (–304 mV). Underground aquifers have a complex structure and may contain both planktonic microorganisms and those immobilized on the surface of rocks in the form of biofilms, which may be washed out and detected in the water flowing out of the well. Community composition was analyzed by amplification and pyrosequencing of the 16S rRNA gene fragments in seven water samples taken at different times during 26 h. Bacteria, which constituted about half of the community, were represented mainly by uncultured lineages of the phyla *Firmicutes*, *Ignavibacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria*. Archaea belonged mainly to known methanogens of the genera *Methanothermobacter*, *Methanosaeta*, and *Methanomassiliicoccus*. Analysis of the samples taken at different times revealed large variations in the content of most groups of bacteria, with a decrease in *Firmicutes* abundance accompanied by an increase in the shares of *Ignavibacteria* and *Chloroflexi*. The share of archaea of the genus *Methanothermobacter* varied slightly during the day, while significant variations were observed for the phylotypes assigned to *Methanosaeta* and *Methanomassiliicoccus*. Hydrogenotrophic archaea of the genus *Methanothermobacter* are probably a permanent component of the microbial community occurring in the planktonic state, while most of the identified groups of bacteria are present in biofilms or spatially localized parts of the underground water reservoir, the material of which periodically enters the well.

Keywords: subsurface biosphere, thermal waters, microbial community, molecular analysis, methanogens