

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

СТРУКТУРА И СЕЗОННАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МИКРОБНЫХ  
СООБЩЕСТВ ГРУНТОВЫХ ВОД ГОРОДА МОСКВА<sup>1</sup>

© 2023 г. Е. В. Груздев<sup>а</sup>, Ш. А. Бегматов<sup>а</sup>, А. В. Белецкий<sup>а</sup>, А. В. Марданов<sup>а</sup>,  
Н. В. Равин<sup>а</sup>, В. В. Кадников<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 31.10.2022 г.

После доработки 08.11.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Важным экологически значимым элементом водной экосистемы, чувствительным к изменениям условий окружающей среды, являются подземные воды, выходящие на поверхность в виде родников. Связанное с урбанизацией антропогенное воздействие ведет к изменению характеристик грунтовых вод, что, в свою очередь, влияет на состав микробных сообществ вод родников. С помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рибосомной РНК мы охарактеризовали состав микробных сообществ пяти естественных родников на территории Москвы в весенний, летний и зимний сезоны. Микробные сообщества каждого из родников в разные сезоны были близки между собой и четко отличались от микробиомов других родников. Среди архей, составлявших в среднем около 20% микробных сообществ, преобладали аммоний-окисляющие *Crenarchaeota*, а также представители *Nanoarchaeota*. Большинство бактерий относилось к филумам *Proteobacteria*, *Patescibacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Chloroflexi* и *Bacteroidota*. В родниках с предположительно более глубоким залеганием источника воды значительные доли в микробных сообществах составляли автотрофные бактерии, в том числе железоокисляющие бактерии семейства *Gallionellaceae*, нитрификаторы и метанотрофы. Химический и молекулярный анализы не выявили загрязнений вод родников токсичными веществами и нефтепродуктами, а также присутствия патогенных микроорганизмов и индикаторов фекального загрязнения. Однако в весенний сезон в микробиомах воды увеличивались доли галофильных и углеводород-окисляющих бактерий, что может отражать поступление в подземные воды после таяния снега антигололедных реагентов и нефтепродуктов, которые успешно биодеградируются в почве.

**Ключевые слова:** городская экосистема, подземные воды, родники, микробное сообщество, 16S рНК, высокопроизводительное секвенирование

**DOI:** 10.31857/S0026365622600717, **EDN:** AUIHZR

Скорость урбанизации постоянно растет, и, по прогнозам, к 2050 г. 60–80% населения мира будет жить в городах и мегаполисах. Городская среда влияет на значительную часть глобальных выбросов парниковых газов, образования отходов, потребления природных ресурсов и вызывает различные виды загрязнения окружающей среды (Grimm et al., 2008). Зеленая инфраструктура города – это один из важнейших инструментов повышения качества жизни в городах и поддержки устойчивого городского развития (McPhearson et al., 2016; Li et al., 2017). Эффективность предоставления важных экосистемных услуг зависит от состояния городских экосистем, определяемых их способ-

ностью противостоять множеству антропогенных стрессоров, связанных с городской средой.

Родники являются важным, экологически значимым элементом водной экосистемы, чувствительным к изменениям условий окружающей среды. Они имеют непосредственную связь с водноболотными угодьями и множеством поверхностных водоемов, вносящих важный вклад в биоразнообразие региона. Важной ролью родников является использование их населением в качестве источников питьевой воды, а так же развитие вокруг них рекреационной инфраструктуры. Формирование родников напрямую связано с грунтовыми водами. Активное использование водоносных слоев ведет к истощению грунтовых вод (Kløve et al., 2011). С другой стороны, строительство покрытий, препятствующих испарению влаги с поверхности земли, обильный полив газонов и

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600717 для авторизованных пользователей.

утечки вод из центрального водоснабжения, наоборот, способствуют повышению уровня грунтовых вод (Lerner et al., 1990; Sharp et al., 2010). Подпитка водоносного горизонта с участием антропогенного воздействия часто сопряжена с обильным поступлением неорганических питательных веществ. Например, наблюдается положительная корреляция между повышенным содержанием фосфатов в грунтовых водах и уровнем урбанизации (Huang et al., 2020). Подземные воды в городской черте могут иметь повышенные концентрации соединений азота, тяжелых металлов и летучих органических веществ (Kuroda, Fukushi, 2008). Антропогенное воздействие ведет к изменению характеристик грунтовых вод, что, в свою очередь, влияет на состав микробных сообществ родников.

Классический подход к исследованию микробного состава грунтовых вод и родников заключается в использовании микробиологических методик, основанных на культивировании микроорганизмов (Powell et al., 2003; Paul et al., 2004; Ильинский и соавт., 2010). Например, в качестве микробных индикаторов для оценки качества воды используют количество общих колиформ и фекальных колиформ (Plummer, Long, 2009). Однако полноценное определение состава микробного сообщества микробиологическими методами невозможно, поскольку в природных микробных сообществах, как правило, более 95–99% микроорганизмов не могут быть культивированы в стандартных лабораторных условиях и остаются неизвестными.

Использование современных молекулярно-генетических методов анализа микробиомов, основанных на высокопроизводительном секвенировании одновременно десятков тысяч фрагментов генов 16S рРНК, амплифицированных из метагеномной ДНК (т.е. выделенной непосредственно из анализируемого объекта, без культивирования микроорганизмов), позволяет подробно описать таксономическую структуру микробного сообщества и определить соотношение отдельных видов микроорганизмов, вплоть до минорных компонентов (Szekeres et al., 2018; Sonthiphand et al., 2019; Scharping, Garey, 2021).

В исследовании Scharping и Garey (2021) было показано, что в микробных сообществах подземных вод источника Сульфур-Спрингс в черте города Тампа (штат Флорида, США) преобладали представители порядков *Enterobacteriales*, *Betaproteobacteriales* и *Campylobacteriales*. При этом численность *Enterobacteriales* варьировала с течением времени. Другое исследование посвящено определению микробного состава грунтовых вод в Клуж-Напока (Румыния) (Szekeres et al., 2018). С помощью профилирования по генам 16S рРНК были определены составы сообщества грунтовых

вод г. Парма (Италия), где во всех образцах доминирующей таксономической группой является *Proteobacteria* (Zanini et al., 2019). Однако до настоящего времени микробные сообщества подземных вод Московского мегаполиса и влияние на них антропогенного воздействия не были детально изучены современными молекулярно-генетическими методами.

Большинство вышеупомянутых исследований были сосредоточены либо на культивировании патогенных организмов из грунтовых вод, либо на определении состава микробных сообществ загрязненных вод. Исследований по изучению микробных сообществ грунтовых вод мегаполисов методами высокопроизводительного секвенирования очень мало. В этой работе мы представляем результаты молекулярного профилирования состава прокариотических микробных сообществ 5 родников в городе Москва в различные сезоны года.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования и отбор образцов.** Пробы воды отбирали из пяти родников, расположенных на территории города Москва, на протяжении 2021–2022 гг., в весенний (05–06.05.2021), летний (23.08.2021) и зимний период (27–28.01.22). В соответствии с сезоном отбора пробы маркировались sp (весна), sm (лето) и wt (зима). Первый источник (“Ясенево”) расположен на территории природно-исторического парка Битцевский лес, вблизи усадьбы Ясенево (обозначение проб “Ya”, 55.593202° N, 37.558043° E). Второй источник (“Битца”) также расположен в природно-историческом парке Битцевский лес, возле впадения Коньковского ручья в реку Чертановку (обозначение проб “Bi” 55.632274° N, 37.556833° E). Третий источник (“Коломенское”) входит в комплекс родников Кадочка, расположенном в Голосовом овраге парка Коломенское (обозначение проб “Kl” 55.663570° N, 37.663807° E). Четвертый родник (“Воробьевы горы”) расположен на территории природного заказника Воробьевы горы, ниже улицы Косыгина (обозначение проб “Vg” 55.718691° N, 37.538023° E). Проба из пятого родника (“Крылатское”) отбиралась на территории парка Крылатские холмы (обозначение проб “Kr” 55.753744° N, 37.423807° E).

Для отбора проб использовали PET канистры объемом 5 л (для анализа на нефтепродукты вода отбиралась в стеклянную тару объемом 500 мл). На месте отбора определяли температуру, pH и Eh с использованием pH-метра Hanna HI 8314F (“Hanna Instruments”, США).

Ионный состав проб определяли с использованием методов ионной хроматографии. Определение количественного элементного состава проб проводили с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Содержание нефтепродуктов в воде определяли по методике измерений массовой концентрации флуориметрическим методом на анализаторе жидкости “Флюорат-02” (М 01-05-2012) (ПНД Ф 14.1:2:4.128-98). Диапазон измерений массовой концентрации нефтепродуктов составляет от 0.005 до 50 мг/дм<sup>3</sup>.

Для определения общей численности микроорганизмов (ОЧМ) отбирали 50 мл воды, фиксировали клетки глутаральдегидом (до 2%) и пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Millipore”, США). Затем фильтр окрашивали акридиновым оранжевым (2 мг/мл) и подсчитывали клетки под флуоресцентным микроскопом Olympus BX 41, оснащенный системой визуализации Image Scope Color (M). Клетки считали в 20 полях зрения.

**Выделение ДНК, секвенирование и анализ последовательностей генов 16S рРНК.** Отобранные пробы воды фильтровали с использованием нитроцеллюлозных фильтров с размером пор 0.22 мкм (“Sartorius”, Германия). Каждый фильтр разделяли на 3 равные части и разрушали перетиранием в жидком азоте в керамической ступке.

Суммарную ДНК из каждого образца выделяли с использованием набора DNeasy PowerSoil pro kit (“Qiagen”, Германия) и хранили при –20°C. ПЦР-амплификацию фрагментов гена 16S рибосомной РНК, включающих вариабельные области V3–V4, проводили с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWS-CAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHTCTA-AT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты баркодировали, используя набор Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США), и очищали с помощью Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США). Количество ДНК определяли с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, Carlsbad, CA, США). Затем пулированные ПЦР фрагменты секвенировали на Illumina MiSeq (в формате парных чтений, 2 × 300 нт). Пересекающиеся чтения объединяли с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Фильтрацию по качеству и кластеризацию последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности последовательностей проводили с помощью программы Usearch (Edgar, 2010). Химерные последовательности и синглтоны удаляли при кластеризации алгоритмом Usearch. Для расчета относительной численности ОТЕ все чтения (включая синглтоны и низкокачественные) с помощью Usearch были картированы на последовательности ОТЕ с порогом идентичности 97%. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили в результате поиска по базе данных последовательностей рРНК SILVA v.138 (Quast et al., 2012) с использованием алгоритма VSEARCH v. 2.14.1 (Rognes et al., 2016).

Расчет индексов сходства и дерева Jaccard производили с помощью команды “beta\_div” в USEARCH. Метод главных компонент (principal component analysis) вычислялся на языке программирования R с применением функции cmdscale.

Полученные последовательности фрагментов гена 16S рРНК депонированы в базу данных NCBI и доступны в рамках проекта BioProject PRJNA878171.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Физико-химические характеристики воды и общая численность микроорганизмов.** Основные физические и химические характеристики воды, отобранной из исследуемых родников в весенний, летний и зимний сезоны, представлены в табл. 1. Все образцы воды имели нейтральный pH (6–8), значения которого не проявляли выраженных сезонных изменений. По показателю Eh родники четко разделялись на две группы. В родниках “Ясенево” и “Битца” этот показатель превышал +300 мВ, что соответствует полностью аэробным условиям. В родниках “Воробьевы горы” и “Крылатское” значения Eh были существенно ниже (<+109 мВ), что указывает на происхождение вод из более глубоких частично анаэробных горизонтов. На это же указывает значительно меньшая, чем в остальных родниках, зависимость температуры от сезона отбора (табл. 1). К сожалению, информация о глубине и геологических характеристиках водоносных горизонтов, питающих исследуемые родники, в литературе отсутствует.

Среди измеренных ионов во всех образцах преобладали хлорид, кальций и натрий (рис. 1). Наиболее высокая минерализация была характерна для родника “Коломенское”, в котором, помимо высоких концентраций этих ионов, было детектировано высокое содержание сульфата и магния. Для родника “Битца” характерна натриево-хлоридная соленость. Родники “Воробьевы горы” и “Крылатское” имеют низкую минерализацию, обусловленную кальцием и магнием из числа катионов, хлоридом и сульфатом — из анионов, а содержание натрия значительно ниже. Низко минерализованной является также вода родника “Ясенево”, в которой преобладали кальций и сульфат. Большие различия наблюдались в концентрациях нитрата, которая составляла 10–20 мг/л в родниках “Ясенево”, “Коломенское” и “Крылатское”, а в двух других — лишь 1–3 мг/л. Особенностью родников “Коломенское” и “Воробьевы горы” (и в меньшей степени “Крылатское”) было более высокое содержание железа (рис. 1). Анализ ионного состава не выявил отчетливых сезонных вариаций.

Таблица 1. Основные характеристики родников

Родник	Сезон отбора	pH	Eh, mV	T, °C	ОЧМ, кл./мл
“Ясенево”	Весна	6.25	+333	5.6	Н.о.
	Лето	6.4	+480	9.8	$8.5 \times 10^4$
	Зима	6.86	+377	6.6	Н.о.
“Битца”	Весна	6.28	+311	6.2	Н.о.
	Лето	6.02	+360	9.9	$2.0 \times 10^4$
	Зима	7.38	+341	5.2	Н.о.
“Коломенское”	Весна	6.95	+77	7.3	Н.о.
	Лето	7.2	+260	10.4	$3.7 \times 10^4$
	Зима	7.4	+161	6.0	Н.о.
“Воробьевы горы”	Весна	7.09	+27	9.7	Н.о.
	Лето	7.02	+14	9.6	$17.1 \times 10^4$
	Зима	7.48	+70	7.2	Н.о.
“Крылатское”	Весна	7.1	+59	7.8	Н.о.
	Лето	7.06	+98	7.9	$1.6 \times 10^4$
	Зима	7.89	+109	7.5	Н.о.

Н.о. – не определяли.

Содержание нефтепродуктов во всех образцах воды было ниже детектируемого порога в  $0.005 \text{ мг/дм}^3$ , кроме родника “Воробьевы горы” в весенний сезон, в котором содержание нефтепродуктов было незначительно выше порога детекции,  $0.0055 \pm 0.0028 \text{ мг/дм}^3$ .

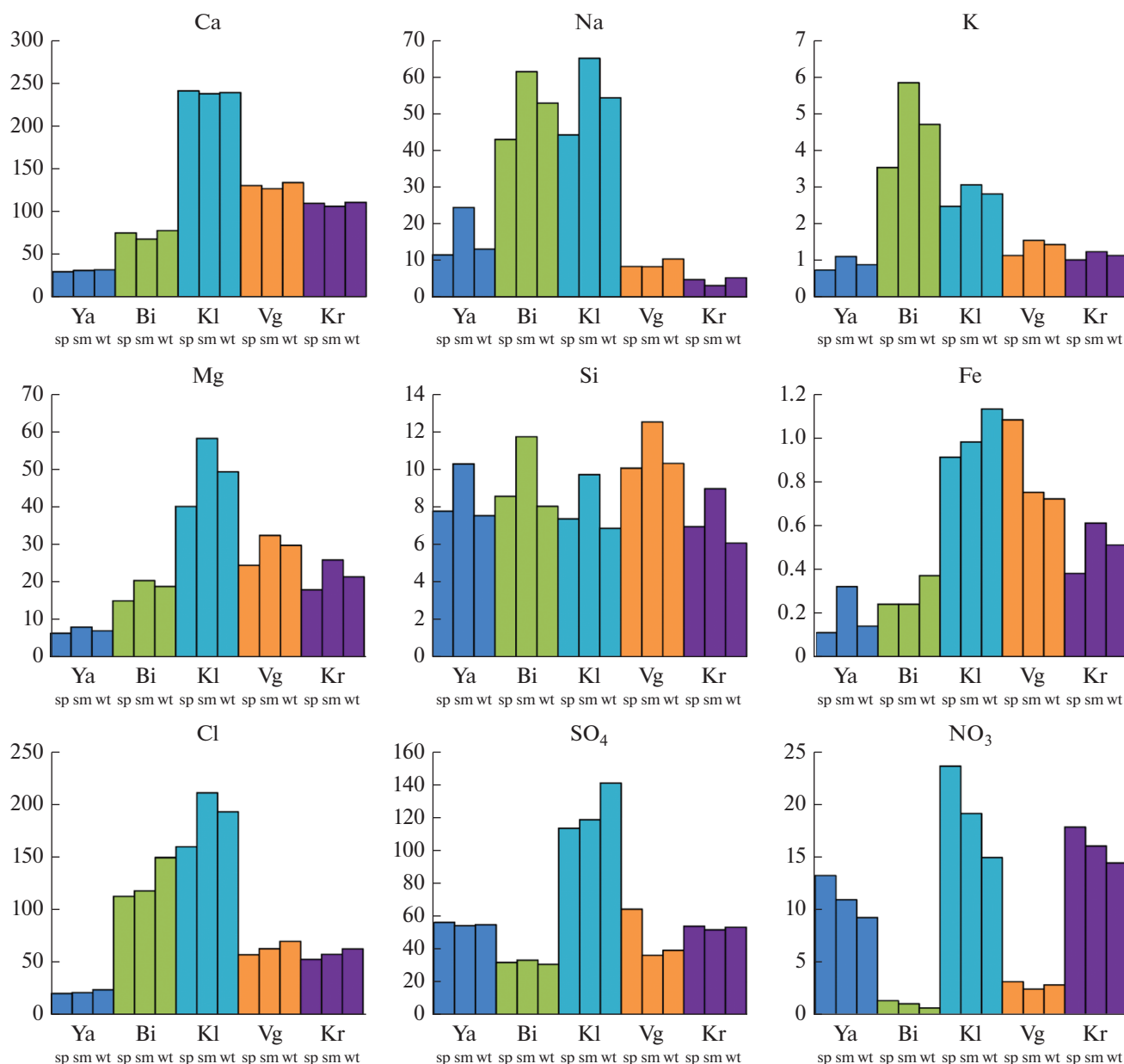
Общая численность микроорганизмов в пробах воды, отобранных в летний сезон, составляла от  $1.6 \times 10^4$  кл./мл (“Крылатское”) до  $17.1 \times 10^4$  кл./мл (“Воробьевы горы”) (табл. 1).

**Разнообразие микробных сообществ и их кластеризация.** Для характеристики разнообразия и состава микробных сообществ воды родников для каждого из 45 образцов воды (5 родников, 3 сезона, 3 повторности) было проведено профилирование состава сообществ по вариабельным V3–V4 фрагментам генов 16S рРНК. Полученные последовательности были кластеризованы в 15840 ОТЕ на уровне 97% идентичности. Количество ОТЕ уровня вида в отдельных образцах находилось в диапазоне от 1834 до 5297.

Кластерный анализ, проведенный на основе индексов сходства Jaccard, показал, что реплики (по 3 на каждый сезон) кластеризуются вместе во всех случаях, за исключением родника “Крылатское”, в котором один из трех весенних образцов образовывал отдельную ветвь (рис. S1). Поэтому далее три реплики для каждого родника и сезона были объединены в один набор данных. Анализ сходства микробных сообществ с использованием метода главных компонент показал, что микробные сообщества каждого из родников в разные сезоны

были близки между собой и четко отличались от микробиомов других родников (рис. 2).

**Состав микробных сообществ: основные таксономические группы.** Археи составляли в среднем около 20% микробных сообществ, причем их доля в различных родниках и сезонах сильно отличалась, в диапазоне от 3 до 50% всех последовательностей генов 16S рРНК (рис. 3). Большинство архей представляли филумы *Crenarchaeota* и *Nanoarchaeota*, в меньших количествах были детектированы *Halobacterota* и *Micrarchaeota*. Обнаруженные *Crenarchaeota* относились к порядкам *Nitrosopumilales* и *Nitrosotales*, представители которых широко распространены в водных экосистемах и являются автотрофами, окисляющими аммоний в аэробных условиях (Stahl, de la Torre, 2012; Cao et al., 2013). Интересно отметить, что в родниках “Ясенево” и “Битца” преобладали *Nitrosotales*, а в трех других – *Nitrosopumilales*. В среднем доля *Crenarchaeota* составляла около 10% сообщества, но в роднике “Воробьевы горы” их было существенно меньше, от 0.8% летом до 4.3% весной. Наиболее многочисленным филумом архей был *Nanoarchaeota*, доля которого достигала 24.8%. Представители этого филума имеют небольшой размер генома и клеток, лишены многих важных биосинтетических путей и, как предполагается, являются симбионтами или паразитами других микроорганизмов (Dombrowski et al., 2019). Функционально важной группой архей являются *Halobacterota*, доля которых была значительной только в роднике “Коломенское” (от 0.4% летом до 2.7% зимой). Большая часть *Halobacterota* относилась к



**Рис. 1.** Химический состав воды. Здесь и далее используются следующие обозначения образцов: Ya – “Ясенево”; Bi – “Битца”; Kl – “Коломенское”; Vg – “Воробьевы Горы”; Kr – “Крылатское”. Сезоны отбора: sp – весна; sm – лето; wt – зима. Концентрации указаны в мг/мл.

семейству *Methanoperedenaceae* (группа ANME-2d), представители которого осуществляют анаэробное окисление метана, сопряженное с восстановлением нитрата или оксидов металлов (Naaroon et al., 2013; Leu et al., 2020).

Среди бактерий в число доминирующих филумов входили *Proteobacteria* (в среднем 27.4%), *Patescibacteria* (17.7%), *Verrucomicrobiota* (4.5%), *Chloroflexi* (3.5%), *Bacteroidota* (3.4%), *Acidobacteriota* (2.9%), *Actinobacteriota* (2.6%), *Methylomirabilota* (2.4%), *Mycobacteriota* (2.2%), *Nitrospirota* (1.9%), *Cyanobacteria* (1.3%), *Elusimicrobiota* (1.2%), *Plancto-*

*mycetota* (1.2%), *Bdellovibrionota* (1.2%) и *Firmicutes* (1.1%), средние доли остальных филумов не превышали 1% (рис. 3).

Протеобактерии в основном представляли классы  $\alpha$  (4.8%) и  $\gamma$  (22.6%). Среди  $\alpha$ -протеобактерий были обнаружены в основном представители *Sphingomonadaceae* родов *Novosphingobium*, *Sphingobium* и *Sphingomonas* (до 7.8% в роднике “Коломенское”), *Xanthobacteraceae* и *Thalassospiraceae* (до 1.8 и 1.4% соответственно в роднике “Ясенево”).  $\gamma$ -Протеобактерии относились к семи порядкам, – *Burkholderiales*, *Acidiferrobacterales*,

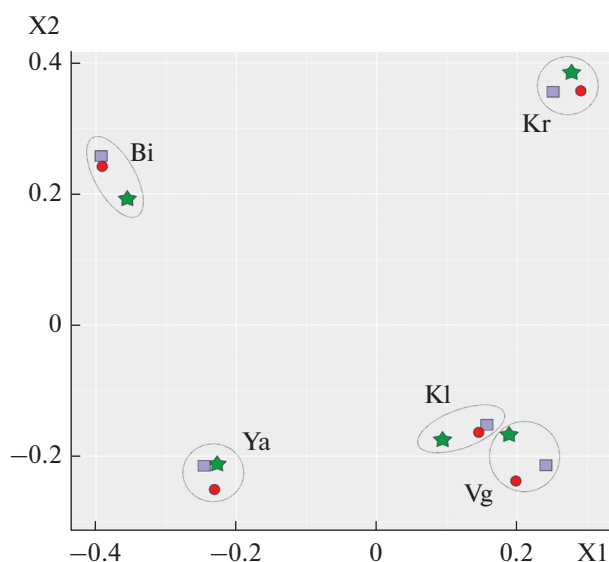


Рис. 2. Сравнение состава микробных сообществ с помощью метода главных компонент. Весенние образцы обозначены звездочками, летние – квадратами, зимние – кругами.

*Diplorickettsiales*, *Enterobacterales*, JG36-TzT-191, *Methylococcales* и *Pseudomonadales*, из которых первый был наиболее многочисленным (в среднем 13.3%, максимальная доля – 42% в роднике “Воробьевы горы”). Доли многих из них сильно отличались как между разными родниками, так и

по сезонам отбора. Бактерии семейства *Gallionellaceae*, культивируемые представители которого являются умеренными ацидофилами, способны окислять железо и серу (Emerson et al., 2013), составляли до 34% в роднике “Воробьевы горы”, и входили в число доминирующих групп в родниках “Коломенское” (3.0–4.3%) и “Крылатское” (4.4–6.4%), но практически отсутствовали в родниках “Ясенево” и “Битца”. Метилотрофы семейства *Methylophilaceae* (Chistoserdova, 2011) составляли 3.1–3.3% микробного сообщества в “Коломенском” и менее 1% в остальных родниках. В этом же роднике в число доминирующих групп бактерий входили метанотрофы семейства *Methylomonadaceae* (7.1–9.8%) (Orata et al., 2018), доля которых не превышала 2% в остальных родниках. Отметим высокое содержание  $\gamma$ -протеобактерий рода *Rhodospirillum rubrum* в летнем образце из родника “Крылатское” (15.6%), хотя в остальных образцах их доля не превышала 2%. *Rhodospirillum rubrum* – психротолерантные бактерии, отдельные представители данного рода способны к фототрофии, восстановлению Fe(III) или нитратов (Finneran et al., 2003).

Вторым по средней численности филумом бактерий является *Patescibacteria*, которые были наиболее многочисленны в источниках “Ясенево” и “Битца”, составляя от 20 до 33% микробных сообществ. Возможно, реальное содержание *Patescibacteria* даже выше, поскольку из-за небольших размеров клеток представителей

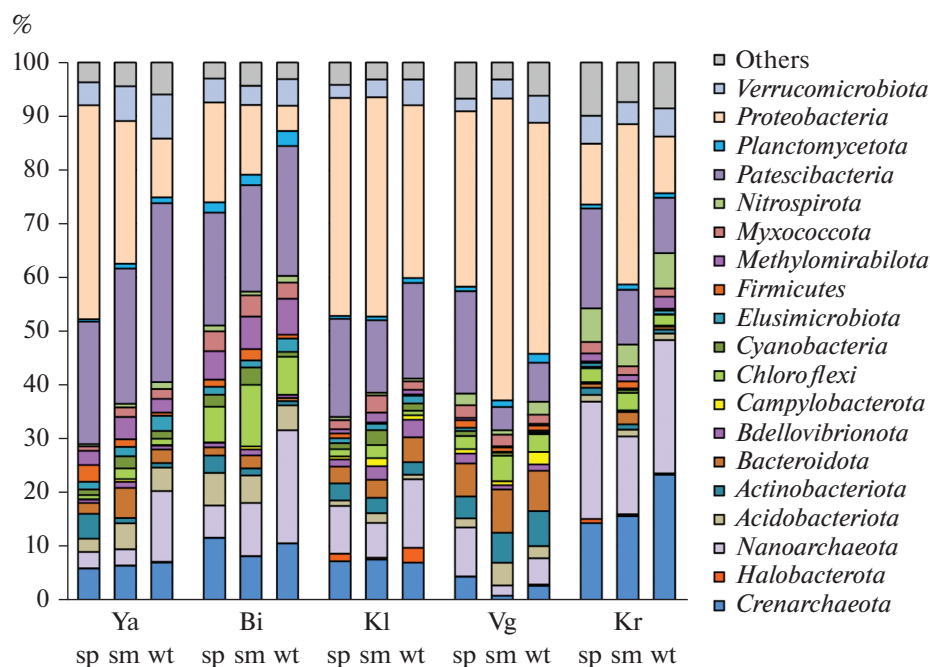


Рис. 3. Составы микробных сообществ в воде родников согласно результатам анализа генов 16S рРНК. Результаты анализа разнообразия представлены на уровне филумов. Показаны проценты от общего числа последовательностей генов 16S рРНК.

этого филума часть их может теряться при использовании для сбора биомассы 0.2 мкм фильтра (Herrmann et al., 2019). Несмотря на значительную долю *Patescibacteria* в исследуемых микробных сообществах выделить отдельные ключевые организмы затруднительно. Из 3971 ОТЕ, относящихся к *Patescibacteria*, только 11 имели долю более 1% хотя бы в одном из образцов. Наибольшее количество *Patescibacteria* в исследованных пробах относится к классу *Parcubacteria*, также были детектированы представители *ABY1*, *Berkelbacteria*, *Gracilibacteria*, *Microgenomatia* и *Saccharimonadia*. Представители *Patescibacteria* характерны для грунтовых вод и преимущественно распространены в бескислородных средах, реже встречаются в подземных водах, содержащих кислород (Nelson, Stegen, 2015). Как и наноархеи, *Patescibacteria* обладают небольшими геномами (обычно менее ~1 м.п.н) и лишены многих ключевых биосинтетических путей (Brown et al., 2015). Предположительно *Patescibacteria* способны существовать только в паразитической и/или симбиотической ассоциации с другими организмами (Kuroda et al., 2022). Однако существует и обратная точка зрения, согласно которой большинство *Patescibacteria* не являются симбионтами или паразитами, а малые размеры генома связаны с особенностями примитивного энергетического метаболизма (Beam et al., 2020). Предполагается, что некоторые *Parcubacteria* способны принимать участие в процессах денитрификации (David et al., 2021).

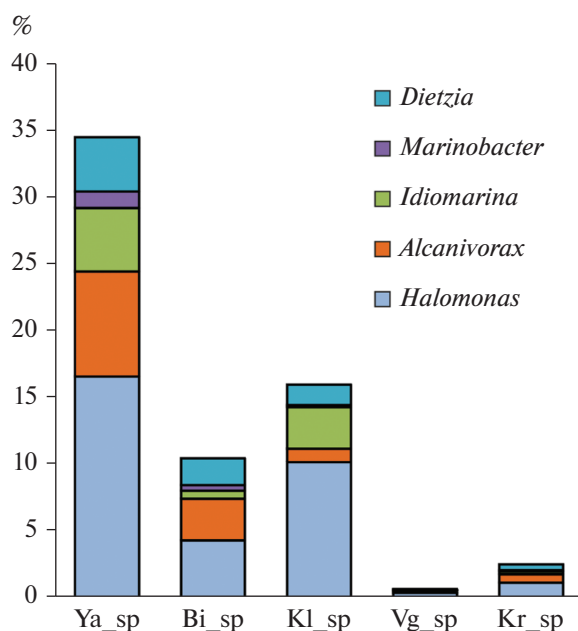
Бактерии филума *Verrucomicrobiota* были детектированы во всех образцах, их доля составляла от 2.4 до 8.2%. Большая часть *Verrucomicrobiota* представляла семейства *Omnitrophaceae* (*Ca. Omnitrophus*) и *Pedosphaeraceae*. Известные представители *Ca. Omnitrophus* – хемолитоавтотрофные магнетотактические бактерии (Kolinko et al., 2016), которые распространены в подземных водах с высоким содержанием металлов (Bägenstrauch et al., 2022). Филум *Chloroflexi* также был детектирован во всех образцах, причем наибольшую долю он составлял в роднике “Битца” (6.6–11.4%), что обусловлено, в первую очередь, многочисленностью в этом роднике некультивируемой группы SAR202. Эта группа гетеротрофных бактерий распространена в батипелагическом слое Мирового океана и играет важную роль круговороте серы (Mehrshad et al., 2018). *Acidobacteriota* были представлены в основном порядками *Acidobacteriales* и *Vicinamibacteriales*, а также некультивируемыми группами 2, 7 и 22. Среди *Actinobacteriota* преобладали представители порядков *Micrrotrichales* (*Plumatobacteraceae* и *Microtrichaceae*), *Corynebacteriales* (*Dietziaceae*), *Micrococcales* (*Microbacteriaceae*) и некультивируемой линии PeM15. Доля *Bacteroidota* (класс *Bacteroidia*) в разных образцах составляла от 0.5 до 8.1%, наиболее многочисленными бактерии этого филума, как и

*Actinobacteriota*, были в роднике “Воробьевы горы” (6–8%). Функционально важной группой, входящей в число доминирующих групп в родниках “Ясенево” (2.5–4.2%) и “Битца” (5.3–6.7%), является филум *Methylomirabilota* (ранее известный как NC10). Бактерии этого филума относились к двум порядкам – *Methylomirabiales* и *Rokubacteriales*. Представители *Methylomirabiales*, составлявшие 1.5–2.1% сообщества в роднике “Битца” и в среднем менее 0.5% в остальных родниках, являются нитрит-зависимыми метанотрофами (Ettwig et al., 2010). Вторая группа, *Rokubacteriales*, на долю которой приходилось 2.5–4.5% сообществ как в роднике “Ясенево”, так и в “Битце” не способны к окислению метана и, по-видимому, являются гетеротрофами, использующими короткоцепочечные углеводороды (Ivanova et al., 2021). Бактерии филума *Nitrospirota*, в основном, рода *Nitrospira*, были многочисленны в родниках “Крылатское” (4.0–6.5%) и “Воробьевы горы” (0.8–2.4%) и присутствовали в минорных количествах в остальных. Бактерии этого рода являются автотрофами, окисляющими нитрит, но некоторые виды могут осуществлять и полный процесс нитрификации (коммамокс) (Van Kessel et al., 2015).

#### Состав микробных сообществ: сезонная динамика.

Три многочисленные группы  $\gamma$ -протеобактерий имели явно выраженную сезонную динамику – представители родов *Halomonas*, *Alcanivorax* и *Idiomarina*. В родниках “Ясенево”, “Битца” и “Коломенский” в весенний период доли этих родов достигали 5–17%, а в зимний и летний родов не превышали 0.1% (рис. 4). В родниках “Воробьевы горы” и “Крылатское” доли этих семейств значительно ниже, но сезонная динамика аналогична.

Бактерии рода *Halomonas* – характерные обитатели соленых вод, адаптированные к широкому диапазону концентрации NaCl и KCl и условиям повышенной щелочности (Yin et al., 2015). Отмечается способность *Halomonas* участвовать в разложении полициклических ароматических углеводородов (Govarathanan et al., 2020). *Alcanivorax* встречается преимущественно в морской воде, используют в качестве субстрата узкий спектр углеводородов. Реже представители *Alcanivorax* встречаются в наземных средах с высоким содержанием солей и обязательным присутствием углеводородов – в соленых подземных водах и засоленной почве (Yakimov et al., 2007; Rezaei Somee et al., 2018). Еще одним родом галотолерантных бактерий, потенциально способных к разложению углеводородов, является *Marinobacter* (Huu et al., 2003), который также был обнаружен только в весенних образцах. Это космолитный род бактерий, встречающийся как в океанических водах, так и в засоленных почвах и грунтовых водах (Martín et al., 2003; Singer et al., 2011). *Idiomarina*, наряду с *Halomonas* и *Marinobacter*, способны к разложению углеводородов



**Рис. 4.** Относительная численность бактерий, характерных для образцов, отобранных в весенний сезон. Показаны проценты от общего числа последовательностей генов 16S рРНК.

(Fakhrzadegan et al., 2019; Zare et al., 2019). Примечательно, что одновременное присутствие в среде представителей *Halomonas*, *Marinobacter* и *Alcanivorax* характерно для загрязненных нефтепродуктами морских вод (Harayama et al., 2004). Сходный состав микробного сообщества описан для грязевых вулканов в Италии, в которых были обнаружены бактерии родов *Alcanivorax* и *Marinobacter* (Yakimov et al., 2002).

Аналогичное распределение по родникам и сезонам наблюдалось и для некоторых представителей других филумов (рис. 4). Например, бактерии семейства *Dietziaceae* (*Actinobacteriota*, порядок *Corynebacteriales*) были многочисленны в родниках “Ясенево”, “Битца” и “Коломенское” только в весенний период. Многие представители *Dietzia* также способны деградировать углеводороды (Akbari et al., 2021). Другим примером являются фирмикуты рода *Oceanobacillus* (порядок *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*), которые были детектированы только в весенний сезон. Некоторые представители этого рода являются умеренными галофилами, встречающимися в почвах и соленых озерах (Zhu et al., 2021).

Интересно, что таксономических групп, которые были бы характерны для зимних или летних образцов в нескольких родниках, обнаружено не было. По-видимому, увеличение численности галофильных углеводородоокисляющих бактерий в весенних пробах (особенно выраженное в родниках с неглубоким залеганием источника воды) отражает

смыв с тальми водами солей и нефтепродуктов, микробная биодеградация которых происходит в почве. Однако отсутствие весеннего “пика” содержания натрия и хлора, а также повышенного содержания нефтепродуктов указывает на разбавление засоленных вод и эффективную биодеградацию углеводов в почве, до поступления подземных вод в родники.

**Микроорганизмы циклов метана, азота, железа и серы.** Подземные воды, выходящие на поверхность в виде родников, имеют изначально поверхностное происхождение, но проходят через слой почвы, в процессе чего происходит их очистка от биогенных загрязнений. Хотя большинство обнаруженных групп “культивируемых” микроорганизмов являются облигатными или факультативными аэробами, в небольших количествах были детектированы и анаэробы, по-видимому, вымываемые из глубинных слоев почвы.

Прежде всего, это микроорганизмы—участники цикла метана. В небольших количествах были обнаружены метаногенные археи, прежде всего, семейства *Methanosaetaceae*, доля которых была максимальна (до 0.76%) в роднике “Крылатское”, вода в котором, судя по Eh и небольшим сезонным вариациям температуры, поступает из более глубоких слоев почвы, чем в других родниках. Анаэробное окисление метана может осуществляться двумя группами микроорганизмов — археями *Ca. Methanoperedens* и бактериями *Ca. Methyloimrabilis*. Обе группы были обнаружены во всех родниках, но везде составляют минорную часть сообществ. Намного большие доли в сообществах составляют известные аэробные метанотрофы, в первую очередь,  $\gamma$ -протеобактерии семейства *Methylomonadaceae*, относящиеся к родам *Crenothrix*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* и *Methylovulum* которые составляют до 10% микробиома в роднике “Коломенское”. Доля аэробных метанотрофов семейства *Methylomonadaceae* минимальна в роднике “Крылатское” (0.01–0.13%), в котором в больших количествах (0.25–0.76%) были детектированы метаногенные археи.

Рассматривая цикл азота, прежде всего, отметим присутствие во всех образцах родниковой воды большого количества (до 23% сообщества в роднике “Крылатское”) кренархей, способных осуществлять окисление аммония до нитрита. В родниках “Ясенево” и “Битца” преобладали представители семейства *Nitrosotaleaceae*, а в остальных трех — *Nitrosopumilaceae*, причем явно выраженной сезонной динамики не наблюдалось. Окисление аммония может также осуществляться  $\gamma$ -протеобактериями семейства *Nitrosomonadaceae*, доли которых не превышали 2%. За вторую стадию нитрификации, окисление нитрита до нитрата, могут отвечать бактерии филумов *Nitrospinota* (некультивируемые линии) и *Nitrospirota* (в основном род *Nitrospira*). Как и



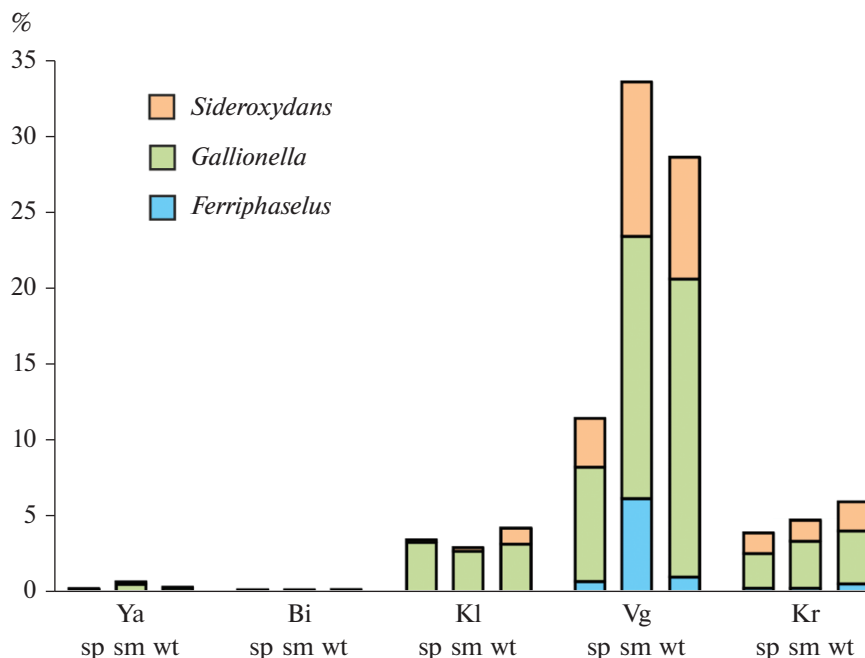


Рис. 5. Относительная численность железокисляющих бактерий родов *Sideroxydans*, *Gallionella* и *Ferriphaseus* семейства *Gallionellaceae*. Показаны проценты от общего числа последовательностей генов 16S рНК.

аммоний-окисляющие кренархеи, эти группы были наиболее многочисленны в роднике “Крылатское”, где их доли достигали 1 и 6.5% сообществ соответственно.

$\gamma$ -Протеобактерии семейства *Gallionellaceae*, представители родов *Gallionella*, *Ferriphaseus* и *Sideroxydans*, составляли до трети сообщества в роднике “Воробьевы горы”, 3–6% в родниках “Коломенское” и “Крылатское”, и менее 1% в родниках “Ясенево” и “Битца” (рис. 5). Представители этих родов, встречающиеся в водных экосистемах с высоким содержанием железа, могут получать энергию за счет окисления Fe(II) и восстановленных соединений серы (Emerson et al., 2013; Kato et al., 2015; Zhou et al., 2022). Они также распространены в пресных грунтовых водах (Emerson et al., 2010; Kato et al., 2014), например, *Ferriphaseus* был впервые обнаружен в богатых железом просачиваниях грунтовых вод в Токийском парке Охято (Kato et al., 2014). Отметим, что наиболее высокое содержание железа наблюдалось именно в родниках “Коломенское” и “Воробьевы горы”, а минимальным – в “Ясенево” и “Битца”. По-видимому, окисление железа является экологически значимым процессом в городских подземных водах и может обеспечивать развитие сообществ железокисляющих бактерий.

Несмотря на то, что содержание сульфата было относительно высоким во всех родниках, особенно в “Коломенском” (рис. 1), микроорганизмы-участники цикла серы составляли минорные доли в микробных сообществах. Известные суль-

фатредукторы филумов *Desulfobacterota* и *Firmicutes* были обнаружены в небольших количествах, что, вероятно, объясняется преимущественно аэробными условиями. Среди сероокисляющих бактерий были обнаружены представители семейства *Sulfurimonadaceae* (филум *Campylobacterota*), относящиеся к родам *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum* и *Sulfurovum*. На них приходилось 2.2% сообщества в зимней пробе в роднике “Воробьевы горы”, а в остальных образцах их содержание не превышало 0.7%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный в данной работе анализ состава микробных сообществ вод городских родников Москвы выявил разнообразные микробные сообщества, по составу отличающиеся от типичных микробиомов почв, через которые проходят грунтовые воды до их выхода на поверхность в форме родников. Концентрация микроорганизмов в летних образцах воды находилась в диапазоне  $10^4$ – $10^5$  кл./мл, что намного ниже, чем в почвах и открытых водоемах. По-видимому, этот показатель не отражает реальную численность микроорганизмов в подземных водоносных горизонтах, где они могут развиваться в форме биопленок. Среди типичных почвенных микроорганизмов, обнаруженных в воде родников, можно выделить аммоний-окисляющие кренархеи и многих гетеротрофов, относящихся к *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -протеобактерий. Однако, как показали полученные

результаты, автотрофные бактерии составляют значительные доли в микробных сообществах, особенно в родниках с предположительно более глубоким залеганием источника воды (“Коломенское”, “Воробьевы горы” и “Крылатское”). Помимо метанотрофов семейства *Methylomonadaceae*, которые составляли 7–10% сообщества в роднике “Коломенское”, это, прежде всего, железоокисляющие бактерии семейства *Gallionellaceae*, которые были доминирующей группой в роднике “Воробьевы горы” (12–34%) и в значительных количествах присутствовали в “Коломенском” и “Крылатском”. Содержание железа в воде этих родников также было выше, чем в “Ясенево” и “Битце”. Вероятно, причиной может быть загрязнение подземных вод железом, находящимся в почве, через которую проходит питающая родники вода, или прохождение воды через железные трубы.

Как химический, так и молекулярно-генетический анализы вод родников не выявили очевидных загрязнений токсичными веществами и нефтепродуктами, а также присутствия патогенных микроорганизмов и индикаторов фекального загрязнения (*Escherichia–Shigella* и т.п.). Однако наблюдаемые сезонные изменения состава микробных сообществ, вероятнее всего, являются результатом действия антропогенных факторов. Во всех родниках в пробах, отобранных в весенний сезон, наблюдается резкое увеличение численности галофильных бактерий и видов, способных деградировать углеводороды (*Halomonas, Alcanivorax, Idiomarina, Marinobacter, Dietzia* и др.). Этот эффект наиболее ярко выражен в родниках с, предположительно, менее глубоким залеганием источника воды. Вероятно, такая динамика отражает поступление в подземные воды после таяния снега антигололедных реагентов и нефтепродуктов. Однако весеннего увеличения содержания в родниковых водах нефтепродуктов не наблюдалось, что свидетельствует об их эффективной биодеградациии, а поступающие в почву засоленные воды “разбавлялись” до поступления в родники. Вероятно, размножение галотолерантных углеводородокисляющих бактерий происходило локально в местах загрязнения почвы, а их присутствие в вытекающей из родника воде может служить молекулярным маркером его наличия, но не признаком неблагоприятного состояния родниковой воды.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы (проект № 21-34-70027) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Отбор образцов воды и их физико-химическая характеристика, выделение метагеномной ДНК – Е.В. Груздев и В.В. Кадников; секвенирование библиотек генов 16S рРНК – А.В. Марданов; профилирование микробного сообщества на основе результатов секвенирования – Ш.А. Бегматов и А.В. Белецкий; анализ данных и подготовка статьи – Е.В. Груздев, В.В. Кадников и Н.В. Равин; руководство проектом – В.В. Кадников. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильинский В.В., Шадрин Н.А., Комарова Т.И.* Гетеротрофные бактерии городских родников: Московский заповедник “Крылатские холмы” // Водные ресурсы. 2010. Т. 37. С. 494–501.
- Akbari A., David C., Rahim A.A., Ghoshal S.* Salt selected for hydrocarbon-degrading bacteria and enhanced hydrocarbon biodegradation in slurry bioreactors // Water. Res. 2021. V. 202. P. 117424.
- Bärenstrauch M., Vanhove A.S., Allégra S., Peuble S., Gallice F., Paran F., Lavastre V., Girardot F.* Microbial diversity and geochemistry of groundwater impacted by steel slag leachates // Sci. Total. Environ. 2022. V. 843. P. 156987.
- Beam J.P., Becraft E.D., Brown J.M., Schulz F., Jarett J.K., Bezuidt O., Poulton N., Clark K., Dunfield P., Ravin N., Spear J., Hedlund B., Kormas K., Sievert S., Elshahed M., Barton H., Stott M., Eisen J., Moser D., Onstott T., Woyke T., Stepanauskas R.* Ancestral absence of electron transport chains in *Patescibacteria* and DPANN // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1848.
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C., Sharon I., Castelle C.J., Singh A., Wilkins M., Wrighton K., Williams K., Banfield J.F.* Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria // Nature. 2015. V. 523. P. 208–211.
- Cao H., Auguet J.C., Gu J.D.* Global ecological pattern of ammonia-oxidizing archaea // PLoS One. 2013. V. 8. P. e52853.
- Chistoserdova L.* Methylophony in a lake: from metagenomics to single-organism physiology // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 4705–4711.
- David G.M., López-García P., Moreira D., Alric B., Deschamps P., Bertolino P., Restoux G., Rochelle-Newall E., Thébaud E., Simon M., Jardillier L.* Small freshwater ecosystems with dissimilar microbial communities exhibit similar temporal patterns // Mol. Ecol. 2021. V. 30. P. 2162–2177.

- Dombrowski N., Lee J.H., Williams T.A., Offre P., Spang A. Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea // FEMS Microbiol. Lett. 2019. V. 366. P. fnz008.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Emerson D., Field E.K., Chertkov O., Davenport K.W., Goodwin L., Munk C., Nolan M., Woyke T. Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics // Front. Microbiol. 2013. V. 4. Art. 254.
- Emerson D., Fleming E.J., McBeth J.M. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 561–583.
- Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J.C.T., van Alen T., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., den Camp H.J.M.O., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.-J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S.M., Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // Nature. 2010. V. 464. P. 543–548.
- Fakhrzadegan I., Hassanshahian M., Askari Hesni M., Saadatfar A. A study of crude oil-degrading bacteria from mangrove forests in the Persian Gulf // Mar. Ecol. 2019. V. 40. e12544.
- Finneran K.T., Johnsen C.V., Lovley D.R. *Rhodoferrax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 669–673.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. fiw018.
- Govarthanan M., Khalifa A.Y., Kamala-Kannan S., Srinivasan P., Selvankumar T., Selvam K., Kim W. Significance of allochthonous brackish water *Halomonas* sp. on biodegradation of low and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons // Chemosphere. 2020. V. 243. Art. 125389.
- Grimm N.B., Foster D., Groffman P., Grove J.M., Hopkinson C.S., Nadelhoffer K.J., Pataki D.E., Peters D.P. The changing landscape: ecosystem responses to urbanization and pollution across climatic and societal gradients // Front. Ecol. Environ. 2008. V. 6. P. 264–272.
- Harayama S., Kasai Y., Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater // Curr. Opin. Biotechnol. 2004. V. 15. P. 205–214.
- Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // Nature. 2013. V. 500. P. 567–570.
- Herrmann M., Wegner C.E., Taubert M., Geesink P., Lehmann K., Yan L., Lehmann R., Totsche K.U., Küsel K. Predominance of *Cand.* Patescibacteria in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 1407.
- Huang G., Liu C., Zhang Y., Chen Z. Groundwater is important for the geochemical cycling of phosphorus in rapidly urbanized areas: A case study in the Pearl River Delta // Environ. Pollut. 2020. V. 260. Art. 114079.
- Huu N.B., Nga V.H., Ha D.T.C. Survey of the petroleum hydrocarbon-degrading capacity of three bacteria strains isolated from the oil sludge in Vietnam // Academia J. Biol. 2003. V. 25. № 4. P. 62–68.
- Ivanova A.A., Oshkin I.Y., Danilova O.V., Philippov D.A., Ravin N.V., Dedysh S.N. *Rokubacteria* in northern peatlands: habitat preferences and diversity patterns // Microorganisms. 2021. V. 10. Art. 11.
- Kato S., Krepski S., Chan C., Itoh T., Ohkuma M. *Ferriphaselus amnicola* gen. nov., sp. nov., a neutrophilic, stalk-forming, iron-oxidizing bacterium isolated from an iron-rich groundwater seep // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 921–925.
- Kato S., Ohkuma M., Powell D.H., Krepski S.T., Oshima K., Hattori M., Shapiro N., Woyke T., Chan C.S. Comparative genomic insights into ecophysiology of neutrophilic, microaerophilic iron oxidizing bacteria // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1265.
- Kløve B., Allan A., Bertrand G., Druzynska E., Ertürk A., Goldscheider N., Henry S., Karakaya N., Karjalainen T.P., Koundouri P., Kupfersberger H., Kværner J., Lundberg A., Muotka T., Preda E., Pulido-Velazquez M., Schipper P. Groundwater dependent ecosystems. Part II. Ecosystem services and management in Europe under risk of climate change and land use intensification // Environ. Sci. Policy. 2011. V. 14. P. 782–793.
- Kolinko S., Richter M., Glöckner F.O., Brachmann A., Schüler D. Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 21–37.
- Kuroda K., Fukushi T. Groundwater contamination in urban areas // Groundwater Management in Asian Cities / Ed. Takizawa S. Tokyo: Springer, 2008. V. 2. P. 125–149.
- Kuroda K., Yamamoto K., Nakai R., Hirakata Y., Kubota K., Nobu M.K., Narihiro T. Symbiosis between *Candidatus* Patescibacteria and Archaea discovered in wastewater-treating bioreactors // mBio. 2022. e01711-22.
- Lerner D.N. Groundwater recharge in urban areas // Atmos. Environ. 1990. V. 24. P. 29–33.
- Leu A.O., Cai C., McIlroy S.J., Southam G., Orphan V.J., Yuan Z., Hu S., Tyson G.W. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae* // ISME J. 2020. V. 14. P. 1030–1041.
- Li F., Liu X., Zhang X., Zhao D., Liu H., Zhou C., Wang R. Urban ecological infrastructure: an integrated network for ecosystem services and sustainable urban systems // J. Clean. Prod. 2017. V. 163. P. S12–S18.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.

- Martín S., Márquez M.C., Sánchez-Porro C., Mellado E., Arahal D.R., Ventosa A. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1383–1387.*
- McPhearson T., Pickett S.T., Grimm N.B., Niemelä J., Alberti M., Elmqvist T., Weber C., Haase D., Breuste J., Qureshi S. Advancing urban ecology toward a science of cities // Bioscience. 2016. V. 66. P. 198–212.*
- Mehrshad M., Rodriguez-Valera F., Amoozegar M.A., López-García P., Ghai R. The enigmatic SAR202 cluster up close: shedding light on a globally distributed dark ocean lineage involved in sulfur cycling // ISME J. 2018. V. 12. P. 655–668.*
- Nelson W.C., Stegen J.C. The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 713.*
- Orata F.D., Meier-Kolthoff J.P., Sauvageau D., Stein L.Y. Phylogenomic analysis of the gammaproteobacterial methanotrophs (order *Methylococcales*) calls for the reclassification of members at the genus and species levels // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 3162.*
- Paul M., Wolf L., Fund K., Held I., Winter J., Eiswirth M., Gallert C., Hoetzl H. Microbiological condition of urban groundwater in the vicinity of leaky sewer systems // Acta Hydrochim. Hydrobiol. 2004. V. 32. P. 351–360.*
- Plummer J.D., Long S.C. Identifying sources of surface water pollution: A toolbox approach // J. Am. Water. Works. Assoc. 2009. V. 101. № 9. P. 75–88.*
- Powell K.L., Taylor R.G., Cronin A.A., Barrett M.H., Pedley S., Sellwood J., Trowsdale S.A., Lerner D.N. Microbial contamination of two urban sandstone aquifers in the UK // Water. Res. 2003. V. 37. P. 339–352.*
- 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 Res. 2013. V. 41 (Database issue). P. D590–D596.*
- Rezaei Somee M., Shavandi M., Dastgheib S.M.M., Amoozegar M.A. Bioremediation of oil-based drill cuttings by a halophilic consortium isolated from oil-contaminated saline soil // 3 Biotech. 2018. V. 8. Art. 229.*
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // PeerJ. 2016. V. 4. e2584.*
- Scharping R.J., Garey J.R. Relationship between aquifer biofilms and unattached microbial indicators of urban groundwater contamination // Mol. Ecol. 2021. V. 30. P. 324–342.*
- Sharp J.M. The impacts of urbanization on groundwater systems and recharge // Aqua Mundi. 2010. P. 51–56. <https://doi.org/10.4409/Am-004-10-0008>*
- Singer E., Webb E.A., Nelson W.C., Heidelberg J.F., Ivanova N., Pati A., Edwards K.J. Genomic potential of *Marinobacter aquaeolei*, a biogeochemical “opportunotroph” // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 2763–2771.*
- Sonthiphand P., Ruangroengkulrith S., Mhuantong W., Charoensawan V., Chotpantararat S., Boonkaewwan S. Metagenomic insights into microbial diversity in a groundwater basin impacted by a variety of anthropogenic activities // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2019. V. 26. P. 26765–26781.*
- Stahl D.A., de la Torre J.R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea // Annu. Rev. Microbiol. 2012. V. 66. P. 83–101.*
- Szekeress E., Chiriac C.M., Baricz A., Szőke-Nagy T., Lung I., Soran M.L., Rudi K., Dragos N., Coman C. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas // Environ. Pollut. 2018. V. 236. P. 734–744.*
- Van Kessel M.A., Speth D.R., Albertsen M., Nielsen P.H., Op den Camp H.J., Kartal B., Jetten M.S.M., Lüscher S. Complete nitrification by a single microorganism // Nature. 2015. V. 528. P. 555–559.*
- Yakimov M.M., Denaro R., Genovese M., Cappello S., D’Auria G., Chernikova T.N., Timmis K.N., Giluliano L. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 1426–1441.*
- Yakimov M.M., Timmis K.N., Golyshin P.N. Obligate oil-degrading marine bacteria // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. V. 18. P. 257–266.*
- Yin J., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. P. 1433–1442.*
- Zanini A., Petrella E., Sanangelantoni A.M., Angelo L., Ventosi B., Viani L., Rizzo P., Remelli S., Bartoli M., Bolpagni R., Chelli A., Feo A., Francese R., Iacumin P., Menta C., Raccetti E., Selmo E.M., Tanda M.G., Ghirardi M., Boggio P., Pappalardo F., De Nardo M.T., Segadelli S., Celico F. Groundwater characterization from an ecological and human perspective: An interdisciplinary approach in the Functional Urban Area of Parma, Italy // Rend. Lincei. Sci. Fis. Nat. 2019. V. 30. P. 93–108.*
- Zare N., Bonakdarpour B., Amoozegar M.A., Shavandi M., Fallah N., Darabi S., Taromsary N.B. Using enriched water and soil-based indigenous halophilic consortia of an oilfield for the biological removal of organic pollutants in hypersaline produced water generated in the same oilfield // Process. Saf. Environ. Prot. 2019. V. 127. P. 151–161.*
- Zhou N., Keffer J.L., Polson S.W., Chan C.S. Unraveling Fe(II)-oxidizing mechanisms in a facultative Fe(II) oxidizer, *Sideroxydans lithotrophicus* strain ES-1, via culturing, transcriptomics, and reverse transcription-quantitative PCR // Appl. Environ. Microbiol. 2022. V. 88. e01595–21.*
- Zhu W.Y., Yang L., Zhang Z.T.L., Mu C.G., Wang Y., Kou Y.R., Jiang G.Q., Yin M., Tang S.K. *Oceanobacillus salinisoli* sp. nov., a bacterium isolated from saline soil of Turpan city in Xinjiang province, north-west China // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. P. 2919–2924.*

## Structure and Seasonal Variability of Groundwater Microbial Communities in the City of Moscow

E. V. Gruzdev<sup>1</sup>, Sh. A. Begmatov<sup>1</sup>, A. V. Beletsky<sup>1</sup>, A. V. Mardanov<sup>1</sup>, N. V. Ravin<sup>1</sup>, and V. V. Kadnikov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*\*e-mail: vkadnikov@bk.ru*

Received October 31, 2022; revised November 8, 2022; accepted November 9, 2022

**Abstract**—Groundwater, which appears on the surface in the form of springs, is an important ecologically significant component of the aquatic ecosystem, sensitive to changes in environmental conditions. The anthropogenic impact associated with urbanization leads to a change in the characteristics of groundwater, which in turn affects the composition of microbial communities in spring waters. Using high-throughput sequencing of the 16S ribosomal RNA gene fragments, we characterized the composition of microbial communities in five natural springs in the city of Moscow in the spring, summer, and winter seasons. The microbial communities of each spring in different seasons were similar to each other and clearly differed from the microbiomes of other springs. Among the *Archaea*, which averaged about 20% of microbial communities, ammonium-oxidizing *Crenarchaeota* predominated, as well as *Nanoarchaeota*. Most of the *Bacteria* belonged to the phyla *Proteobacteria*, *Patescibacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Chloroflexi*, and *Bacteroidota*. Autotrophic bacteria, including iron-oxidizing bacteria of the family *Gallionellaceae* and nitrifiers, as well as methanotrophs, accounted for significant proportions in microbial communities in the springs with a presumably deeper water source. Chemical and molecular analyzes did not reveal contamination of spring waters with toxic substances and oil-derived products, as well as the presence of pathogenic microorganisms and indicators of fecal pollution. However, during the spring season, the proportions of halophilic and hydrocarbon-oxidizing bacteria increased in water microbiomes, which may reflect entry into groundwater after snow thawing of deicin reagents and hydrocarbons, which are successfully biodegraded in the soil.

**Keywords:** urban ecosystem, groundwater, springs, microbial community, 16S rRNA gene profiling, high-throughput sequencing