
КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

СЕРООКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ДОМИНИРУЮТ В ВОДЕ ЗАТОПЛЕННОЙ УГОЛЬНОЙ ШАХТЫ В КУЗБАССЕ

© 2019 г. В. В. Кадников^а, А. В. Марданов^а, А. В. Белецкий^а, Д. В. Анциферов^б,
А. А. Ковалева^б, О. В. Карначук^б, Н. В. Равин^{а, *}

^аИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

^бЛаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050, Россия

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

Поступила в редакцию 26.09.2018 г.

После доработки 01.10.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

DOI: 10.1134/S0026365619010117

Традиционным способом консервирования угольных шахт после выработки пластов является их затопление. Это наиболее экономичный способ сохранения физической целостности всех подземных конструкций. Затопление существенно меняет физико-химические параметры экосистемы за счет создания анаэробных условий. Микробные консорциумы, формирующиеся в подземных горизонтах затопленных шахт, изучены недостаточно. Целью работы являлся молекулярный анализ микробного сообщества воды затопленной угольной шахты в Кузбассе.

Отбор образцов проводили из дренажной скважины, пробуренной в 1998 г. для контроля уровня воды в закрытой в 1997 г. и в настоящее время затопленной шахте “Северная”, расположенной в непосредственной близости от г. Кемерово, Российская Федерация (45 м вниз по течению от моста через реку Томь). Вода из шахты поступает самоизливом со средней скоростью 166–170 м³/ч через скважину глубиной 260 м. Артезианский характер скважины исключает возможность загрязнения проб воды микроорганизмами, обитающими в поверхностных горизонтах. Глубина подземных горизонтов шахты, разрабатывавшей Кемеровский, Волковский и Владимировский пласты Балахонской свиты, составляла около 360 м. Проба воды из скважины была обозначена как Ку5. Вода, отобранная непосредственно у устья скважины в июле 2017 г., имела температуру 12.1°C и нейтральный pH (табл. 1). Отрицательный окислительно-восстановительный потенциал (–174 mV) указывает на анаэробные условия. Вода содержит 22.5 мг/л сульфата и растворенный сероводород (табл. 1). В отличие от дренажных вод шахт по добыче металлов (Kaksonen et al., 2008; Кадников и соавт., 2016), содержание растворенного железа и других металлов не-

высоко (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии активных окислительных процессов.

Для сбора биомассы микроорганизмов 25 л воды пропускали через фильтры 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 0.5 мкг ДНК. Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего 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'). ПЦР-фрагменты генов 16S рРНК секвенировали на геномном анализаторе GS FLX (“Roche”, Швейцария) по протоколу Titanium. Для последующего анализа отбирали чтения, содержащие праймер U341F, и обрезали их до длины 250 нт. Последовательности низкого качества, а также встречающиеся только один раз (синглтоны) удаляли с помощью Usearch (Edgar, 2010). Кластеризацию в оперативные таксономические единицы (OTU) и удаление химерных последовательностей проводили с помощью Usearch. OTU определяли на уровне 97% идентичности последовательностей (всего 12155 чтений). Таксономическую идентификацию OTU проводили в результате их сравнения с базой данных 16S рРНК Silva. Также для классификации OTU использовали RDP Classifier (Cole et al., 2009) и поиск близких последовательностей в GenBank по протоколу BLASTN. При обнаружении последовательностей, имеющих более 95% сходства с геном 16S рРНК описанного микроорганизма, OTU относили к соответствующему роду. Всего было классифицировано 271 OTU, к которым относились 11563 последовательностей генов 16S рРНК.

Таблица 1. Физико-химические характеристики воды скважины Ку5

Параметр	Значение*
<i>T</i>	12.1°C
pH	7.87
Eh	–174 mV
Щелочность	17.6 mEq/л
Na	402 мг/л
Ca	28.7 мг/л
Sr	1.51 мг/л
Si	7.40 мг/л
K	2.71 мг/л
B	0.67 мг/л
Ba	1.29 мг/л
Mg	12.1 мг/л
Fe	0.18 мг/л
Li	0.48 мг/л
Mn	0.14 мг/л
Cr	0.03 мг/л
Cu	<0.001 мг/л
Al	0.02 мг/л
As	0.002 мг/л
Cl [–]	293.2 мг/л
F [–]	<0.05 мг/л
SO ₄ ^{2–}	22.5 мг/л
NO ₃ [–]	<0.05 мг/л**
H ₂ S	5.4 мг/л

* Концентрация элементов определена методом ICP-MS.

** Концентрация нитрата в январе 2017 г. составляла 6.7 мг/л.

К бактериям было отнесено 74% всех классифицированных последовательностей генов 16S рРНК, остальные представляли археи (табл. 2). Большинство бактерий составляли протеобактерии классов гамма (39.12% от общего числа последовательностей генов 16S рРНК) и эpsilon (18.65%), филогенетически близкие к известным организмам. Среди гаммапротеобактерий были обнаружены представители родов *Thiovirga* (18.52%), *Thiothrix* (9.52%) и *Thiomicrothrix* (2.25%). Культивируемые представители родов *Thiovirga* и *Thiomicrothrix* являются хемолитоавтотрофами, аэробно окисляющими восстановленные соединения серы (Ito et al., 2005; Boden et al., 2017), а *Thiomicrothrix hydrogeniphila* — также и водород (Boden et al., 2017). Окислять восстановленные соединения серы также способны и бактерии рода *Thiothrix*, часто встречающиеся в виде нитчатых биопленок в проточной воде, содержащей растворенный сульфид (Larkin, Strohl,

1983). Эти бактерии растут в аэробных или микроаэробных условиях и могут быть как автотрофами, так и хемоорганотрофами (Howarth et al., 1999). Помимо *Thiovirga*, к семейству *Halothiobacillaceae* автотрофных сероокисляющих бактерий (Boden, 2017) было отнесено еще 7.84% последовательностей генов 16S рРНК, не классифицированных на уровне рода. Вторая основная группа бактерий, бетапротеобактерии, были представлены родами *Sulfurovum* (11.09%) и *Sulfuricurvum* (6.33%). Культивируемые представители этих родов являются хемолитоавтотрофами, окисляющими восстановленные соединения серы, используя в качестве акцептора электронов кислород или нитрат (Inagaki et al., 2004; Kodama et al., 2004). Окислять восстановленные соединения серы, возможно, также могут и обнаруженные представители некультивируемого филума Omnitrophica (OP3), составляющие 3.92% сообщества. Описанный на геномном уровне представитель этого филума “*Candidatus Omnitrophus magneticus*” SKK-01 является магнетотактической бактерией и, вероятно, может окислять серу в анаэробных условиях, используя в качестве акцептора электронов железо (Kolinko et al., 2012). Присутствие в воде организмов, способных к окислению восстановленных соединений серы с использованием альтернативных кислороду акцепторов электронов, согласуется с анаэробными условиями экосистемы.

Почти все обнаруженные археи представляли некультивируемые линии, которые удалось классифицировать только на уровне таксонов высокого уровня. Большинство архей (14.48% всех последовательностей) представляли недавно описанный суперфилум DPANN (Rinke et al., 2013; Castelle et al., 2015). Археи этой группы имеют небольшие размеры клеток и генома, лишены многих биосинтетических путей и рассматриваются как облигатные паразиты или симбионты (Castelle et al., 2015). Около 3.23% всех последовательностей генов 16S рРНК были отнесены к филуму *Euryarchaeota*. Среди эуриархей были обнаружены органотрофы группы Marine Benthic Group D (0.7%), метилотрофные метаногены порядка *Methanomassiliicoccales* (0.59%) (Paul et al., 2012) и “*Candidatus Methanoperedens*” (0.86%), — метанотрофные археи группы ANME-2d, анаэробно окисляющие метан и восстанавливающие нитрат или Fe(III) (Naroon et al., 2013; Cai et al., 2018).

Несмотря на значительную долю некультивируемых микроорганизмов с неизвестным метаболизмом, полученные результаты позволяют сделать ряд предположений о функционировании исследуемого микробного сообщества. Присутствие в качестве доминирующих групп хемолитоавтотрофных сероокисляющих бактерий указывает на то, что именно этот процесс обеспечивает продукцию органического вещества. Необходи-

Таблица 2. Состав микробного сообщества подземных термальных вод скважины Ку5

Таксономическая группа	Доля в сообществе (% последовательностей генов 16S рРНК)
Бактерии:	74.18
<i>Gammaproteobacteria</i>	39.12
<i>Epsilonproteobacteria</i>	18.65
<i>Omnirothica</i> (OP3)	3.92
Группа CPR**	3.22
<i>Chloroflexi</i>	1.77
<i>Actinobacteria</i>	0.71
<i>Betaproteobacteria</i>	0.49
<i>Cyanobacteria</i>	0.49
<i>Dependentiae</i>	0.48
<i>Chlamydiae</i>	0.47
<i>Nitrospirae</i>	0.42
Другие линии*	0.98
Неклассифицируемые бактерии	3.46
Археи:	25.82
DPANN суперфилум	14.48
<i>Euryarchaeota</i> (<i>Methanomicrobia</i>)	1.24
<i>Euryarchaeota</i> (MBGD)	0.70
<i>Euryarchaeota</i> (<i>Methanomassiliicoccales</i>)	0.59
<i>Euryarchaeota</i> (прочие)	0.70
<i>Bathyarchaeota</i>	0.47
Неклассифицируемые археи	7.64

* С долями менее 0.15%.

** Candidate phyla radiation.

мый кислород, возможно, поступает в подземный водоносный горизонт с фильтрующимися через горные породы поверхностными водами. В локальных анаэробных микронизах могут проходить процессы метаногенеза и анаэробного окисления метана.

Остается загадкой источник восстановленных соединений серы, в частности сероводорода, в воде затопленной угольной шахты. В литературе нет свидетельств о возможном геологическом источнике сульфата в углях этой свиты. Высокое содержание сероводорода в воде может быть косвенным свидетельством процессов микробной сульфатредукции. Однако низкое содержание железа в воде свидетельствует об отсутствии развитых процессов окисления пирита и, следовательно, об отсутствии постоянного источника сульфата в воде. В то же время, в пробе воды мы не обнаружили организмы с известной способностью к диссимиляционному восстановлению сульфата. Решение этого вопроса требует дальнейших исследований, прежде всего по определению изотопного состава сульфатов и сероводорода.

Интересно, что наряду с сероокисляющими микроорганизмами значительную долю микробного сообщества составляют бактерии и археи, предположительно являющиеся паразитами или симбионтами других микроорганизмов (Brown et al. 2015; Castelle et al., 2015), — бактерии группы Candidate phyla radiation, доля которых составляет 3.22%, и археи суперфилума DPANN (14.48%). Возможно, именно они составляют гетеротрофную часть сообщества, потребляющую органику, которая могла бы ингибировать развитие хемоли-тоавтотрофов.

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

Работы по молекулярному анализу микробного сообщества выполнены с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” и поддержаны Российским научным фондом (грант № 14-14-01016). Работы по отбору проб,

определению физико-химических параметров воды и элементному анализу поддержаны РФФИ (грант № 18-34-00472).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кадников В.В., Ивасенко Д.А., Белецкий А.В., Марданов А.В., Данилова Э.В., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Влияние содержания металлов на состав микробных сообществ кислых дренажных вод месторождения полиметаллических руд // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 732–739.
- Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Ivashenko D.A., Karnachuk O.V., Danilova E.V., Pimenov N.V. Effect of metal concentration on the microbial community in acid mine drainage of a polysulfide ore deposit // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 745–751.
- Boden R. Reclassification of *Halothiobacillus hydrothermalis* and *Halothiobacillus halophilus* to *Guyparkeria* gen. nov. in the *Thioalkalibacteraceae* fam. nov., with emended descriptions of the genus *Halothiobacillus* and family *Halothiobacillaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3919–3928.
- Boden R., Scott K.M., Rae A.W., Hutt L.P. Reclassification of *Thiomicrospira hydrogeniphila* (Watsuji et al., 2016) to *Thiomicrothabodus hydrogeniphila* comb. nov., with emended description of *Thiomicrothabodus* (Boden et al., 2017) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4205–4209.
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C., Sharon I., Castelle C.J., Singh A., Wilkins M.J., Wrighton K.C., Williams K.H., Banfield J.F. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain *Bacteria* // Nature. 2015. V. 523. № 7559. P. 208–211.
- Cai C., Leu A.O., Xie G.J., Guo J., Feng Y., Zhao J.X., Tyson G.W., Yuan Z., Hu S. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction // ISME J. 2018. V. 12. P. 1929–1939.
- Castelle C.J., Wrighton K.C., Thomas B.C., Hug L.A., Brown C.T., Wilkins M.J., Frischkorn K.R., Tringe S.G., Singh A., Markillie L.M., Taylor R.C., Williams K.H., Banfield J.F. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. 690–701.
- 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 // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37 (Suppl. 1). P. D141–D145.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- 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. № 7464. P. 567–570.
- Howarth R., Unz R.F., Seviour E.M., Seviour R.J., Blackall L.L., Pickup R.W., Jones J.G., Yaguchi J., Head I.M. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 1817–1827.
- Inagaki F., Takai K., Nealson K.H., Horikoshi K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-*Proteobacteria* isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1477–1482.
- Ito T., Sugita K., Yumoto I., Nodasaka Y., Okabe S. *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 1059–1064.
- Kaksonen A.H., Dopson M., Karnachuk O., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. Biological iron oxidation and sulfate reduction in the treatment of acid mine drainage at low temperatures // Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology / Eds. Margesin R., Schinner F., Marx J.-C., Gerday C. Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 2008. P. 429–454.
- Kodama Y., Watanabe K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2297–2300.
- Kolinko S., Jogler C., Katzmann E., Wanner G., Peplies J., Schüller D. Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3 // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 1709–1721.
- Larkin J.M., Strohl W.R. *Beggiatoa*, *Thiothrix*, and *Thioploca* // Annu. Rev. Microbiol. 1983. V. 37. P. 341–367.
- 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.
- Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A., Ivanova N.N., Anderson I.J., Cheng J.F., Darling A., Malfatti S., Swan B.K., Gies E.A., Dodsworth J.A., Hedlund B.P., Tsiamis G., Sievert S.M., Liu W.T., Eisen J.A., Hallam S.J., Kyrpides N.C., Stepanauskas R., Rubin E.M., Hugenholtz P., Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter // Nature. 2013. V. 499. № 7459. P. 431–437.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Current Protocols in Molecular Biology / Eds. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., et al. New York: Wiley, 1987. P. 2.4.1.–2.4.5.