

## МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА В РАЙОНЕ ПОДЗЕМНОГО ГОРЕНИЯ УГЛЯ В КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ ВЫЯВИЛ ДОМИНИРОВАНИЕ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ФИЛУМОВ *DEINOCOCCUS-THERMUS*, *AQUIFICAE* И *FIRMICUTES*

© 2021 г. В. В. Кадников<sup>a, \*</sup>, А. В. Марданов<sup>a</sup>, А. В. Белецкий<sup>a</sup>, О. В. Карначук<sup>b</sup>, Н. В. Равин<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>b</sup>Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 12.05.2021 г.

После доработки 13.05.2021 г.

Принята к публикации 14.05.2021 г.

Подземное горение угольных пластов, сопровождающееся образованием газов, приводит к формированию локальных термальных экосистем. Мы исследовали микробное сообщество нагретого до 72°C грунта в районе выхода на поверхность горячих газов, образующихся при подземном горении отходов добычи угля на угольном месторождении Бунгурский-Северный в Кемеровской области России. Анализ состава микробного сообщества по 16S рРНК показал, что в нем доминируют термофильные бактерии филумов *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae* и *Firmicutes*. В результате секвенирования метагенома получено 18 геномов основных членов микробного сообщества, в том числе полные геномы *Hydrogenobacter thermophiles*, *Thermoflexus hugenholtzii*, *Thermus antranikianii* и представителя кандидатного рода UBA11096 филума *Aquificae* (RBS10-58). Анализ генома RBS10-58 указывает, что эта бактерия может автотрофно фиксировать углерод в восстановительном цикле трикарбоновых кислот и получать энергию за счет окисления водорода и соединений серы с использованием в качестве акцептора электронов кислорода или нитрата. Анализ геномов двух доминирующих представителей *Firmicutes*, *Hydrogenibacillus schlegelii* и некультивируемой линии класса *Thermaerobacteria*, показал, что эти бактерии могут расти аэробно, окисляя водород и монооксид углерода. В целом в сообществе преобладали аэробные бактерии, способные расти автотрофно и получать энергию за счет окисления основных компонентов угольных газов, водорода и монооксида углерода. *Thermus antranikianii*, составляющий около половины микробного сообщества, вероятно, использует органические вещества, образуемые автотрофными представителями *Firmicutes* и *Aquificae*.

**Ключевые слова:** термофилы, угольные газы, микробное сообщество, гидрогенотрофы, *Thermus*, *Aquificae*

**DOI:** 10.31857/S0026365621050086

Исследования термофильных микроорганизмов расширили наши представления о разнообразии микроорганизмов и их эволюции, механизмах адаптации к экстремальным условиям окружающей среды (Urbiet al., 2015; Counts et al., 2017). Большинство исследований термофильных микроорганизмов было сосредоточено на термальных экосистемах, связанных с вулканической активностью, таких как наземные горячие источники и глубоководные гидротермы, или на техногенных биотопах (высокотемпературные биореакторы и т.п.). Помимо вулканической активности, к образованию локальных термальных экологических ниш могут приводить процессы естественного горения ископаемых углеводородов и угля. Характеристика микробных сообществ таких экосистем рас-

ширяет наши знания о разнообразии термофильных микроорганизмов и осуществляемых ими процессах.

Явления подземного горения угольных пластов распространены в природе и встречаются в Австралии, Германии, США, Китае, России, Индии и других странах (Stracher, Taylor, 2004). Такие подземные пожары могут длиться веками, например, угольный пласт в Дудвайлере (Саар, Германия) горит, начиная с 1668 г. Примером длительного естественного подземного горения угля является Пылающая гора (Burning Mountain) в Австралии, продолжительность горения которой оценивается примерно в 6000 лет (Rattigan, 1967).

Горение угля в условиях недостатка кислорода в присутствии воды приводит к образованию

угольных газов в реакциях:  $3C + O_2 + H_2O \rightarrow H_2 + 3CO$  и  $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$  (Shafirovich, Varma, 2009). Подземное горение угля является естественным аналогом процесса получения синтез-газа при газификации угля. Помимо  $CO_2$ , угольные газы содержат в основном водород,  $CO$  и газообразные углеводороды (Stracher, Taylor, 2004; Engle et al., 2012). Эти газы также могут содержать сероводород, оксиды серы, другие токсичные соединения, такие как бензол, ксилол, алифатические и галогенированные соединения (Engle et al., 2012; Zhang et al., 2013). С потоком газа могут переноситься на поверхность сера и другие элементы, присутствующие в угольных пластах (Pone et al., 2007).

В районах, где горячие угольные газы выходят на поверхность, могут образовываться локальные экстремальные экосистемы, для которых характерны высокие температуры ( $>50^\circ C$ ) и присутствие токсичных веществ (Tammy et al., 2005). Содержащиеся в угольных газах высокоэнергетические соединения, такие как водород и  $CO$ , могут использоваться микроорганизмами в качестве субстратов, а кислород — в качестве акцептора электронов, что определяет возможность развития специфических сообществ термофильных микроорганизмов. Однако сравнительно немного известно о составе микробных сообществ таких экосистем и генетическом потенциале входящих в них микроорганизмов.

Явления подземного горения угля встречаются и на угольных месторождениях в России. Кузнецкий угольный бассейн (Кузбасс), расположенный на юге Западной Сибири, является одним из крупнейших районов добычи угля в мире. В настоящее время добыча угля в этом регионе в основном ведется открытым способом, что приводит к образованию больших количеств отходов, включающих вскрышные породы. Породы, содержащие достаточное количество остаточного угля, складировать в виде отвалов непосредственно в местах добычи, где природные и техногенные причины вызывают воспламенение и длительное горение. Широко известным примером экологической катастрофы является горение отвалов угля в непосредственной близости шахтерского города Киселевск в Кузбассе (Kadnikov et al., 2021). В этой работе мы изучили микробное сообщество грунта, ассоциированное с зоной подземного горения угля и выходами горячих угольных газов, на отвалах месторождения Бунгурский-Северный в Новокузнецком районе Кемеровской области.

Целью исследования было изучение состава и генетического потенциала этого микробного сообщества. Мы приводим данные о составе сообщества, полученные с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК, и метагенома грунта в районе выхода

горячих угольных газов на поверхность. В результате метагеномного анализа были получены высококачественные геномы (metagenome-assembled genomes, MAG) большинства членов сообщества, что позволило охарактеризовать метаболический потенциал входящих в него микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Отбор проб и выделение ДНК.** Пробы были отобраны в месте складирования отходов добычи угля на месторождении угля Бунгурский-Северный в районе поселка Апанас Новокузнецкого района, Кемеровской области (53.542314 N, 86.862370 E). Отобранный на глубине 5–10 см от поверхности образец грунта, обозначенный как RBS10, представлял собой влажный осадок на склоне отвала отходов добычи вблизи места выхода на поверхность горячего пара и газов. Отобранный образец представлял собой мелкодисперсную горную породу, содержащую уголь. Препарат метагеномной ДНК выделяли с использованием набора MO BIO Power Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories, “Qiagen Inc.”, Valencia, США).

**Секвенирование и анализ фрагментов генов 16S рРНК.** ПЦР-амплификацию фрагментов гена 16S рибосомной РНК, включающих гипервариабельные области V3–V6, проводили с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGG-GDBGWCWACAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVG-GGTHTCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР-фрагменты баркодировали, используя набор Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США). Очистку ПЦР-фрагментов проводили с использованием Agen-court AMPure beads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США), количество ДНК определяли с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, Carlsbad, CA, США). Затем ампликоны секвенировали на Illumina MiSeq (парные чтения,  $2 \times 300$  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.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016).

**Секвенирование метагеномной ДНК, сборка контигов и их кластеризация для получения MAG.**

Метагеномную ДНК секвенировали с использованием Illumina HiSeq2500 в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina Inc.”, США). В результате секвенирования библиотеки ДНК TruSeq (парные чтения,  $2 \times 150$  нт) было получено 232885794 пар чтений. Удаление адапторов и исключение низкокачественных последовательностей ( $Q < 30$ ) выполнялись с использованием Cutadapt v.1.8.3 (Martin, 2011) и Sickle v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>) соответственно. Обработанные парные чтения были объединены с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011).

Метагеномную ДНК дополнительно секвенировали на приборе MinION (“Oxford Nanopore”, Великобритания) с использованием набора 1D Genomic DNA by ligation kit (SQK-LSK108). В результате секвенирования этой библиотеки на MinION в проточной ячейке R9.4 (FLO-MIN106) было получено 8280228 прочтений общей длиной 16.12 млрд нт.

Все полученные чтения Illumina (всего около 25 млрд нт) и Nanopore были *de novo* собраны в контиги с помощью metaSPAdes hybrid assembler v.3.13.0 (Nurk et al., 2017). Контиги длиной более 1500 п.н. были объединены в кластеры, представляющие MAG, с использованием MetaBAT v.2.12.1 (Kang et al., 2015). Для улучшения сборки MAG, чтения MinION были картированы на входящие в MAG контиги с помощью BWA v.0.7.15 (Li, Durbin, 2010). Затем программа Npscarf v.1.0 (Cao et al., 2017) была использована для формирования цепочек контигов (скаффолдов) и заполнения пробелов между контигами с использованием консенсусных последовательностей Illumina из графа сборки metaSPAdes.

Кроме того, чтения MinION собирали в контиги *de novo* с использованием Flye v. 2.7 (Kolmogorov et al., 2019). Последовательности контигов были скорректированы с помощью Pilon v.1.2.2 (Walker et al., 2014) в результате двух итераций картирования чтений Illumina на собранные последовательности контигов с использованием Bowtie 2 (Langmead, Salzberg, 2012). Полученные контиги были кластеризованы в MAG с помощью MetaBAT v.2.12.1 (Kang et al., 2015).

**Аннотация и анализ геномов (MAG).** Полноту MAG и их возможное загрязнение (т.е. возможное наличие в них контигов, представляющих другие геномы вследствие неправильной кластеризации) оценивали с помощью CheckM v.1.0.5 (Parks et al., 2015). Собранные MAG были таксономически классифицированы с использованием набора инструментов Genome Taxonomy Database Toolkit (GTDB-Tk) v.0.3.2 (Chaumeil et al., 2020) и Genome Taxonomy Database (GTDB) (Parks et al., 2018).

Поиск генов и аннотацию MAG выполняли с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annota-

tion Pipeline (Tatusova et al., 2016) или RAST server 2.0 (Brettin et al., 2015) с последующей корректировкой аннотации путем сравнения предсказанных последовательностей белков с базами данных National Center for Biotechnology Information (NCBI). N-концевые сигнальные пептиды были предсказаны с помощью Signal P v.5.0, а присутствие трансмембранных доменов – с помощью TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

**Определение уровня сходства между геномами и филогенетический анализ на основе полногеномных данных.** Средние уровни идентичности нуклеотидных (average nucleotide identity, ANI) и аминокислотных (average amino acid identity, AAI) последовательностей между выбранными геномами были рассчитаны с использованием скриптов из Enveomics Collection (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016).

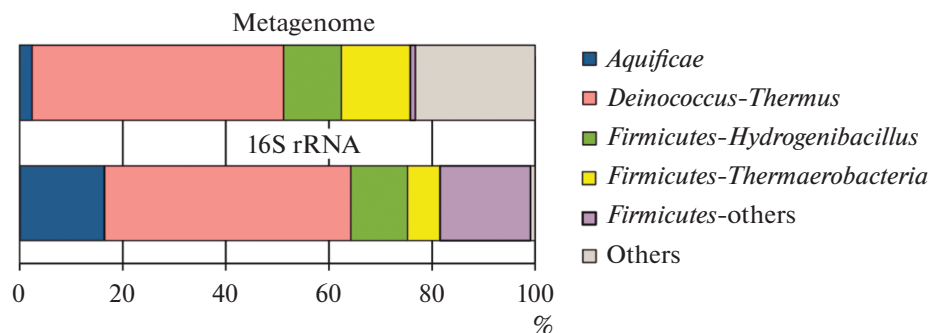
GTDB-Tk v.0.3.2 был использован для поиска однокопийных маркерных генов в MAG и для построения множественного выравнивания конкатенированных последовательностей однокопийных маркерных генов из данного MAG и всех видов из GTDB. Часть множественного выравнивания, созданного в GTDB-Tk, была использована для построения филогенетического дерева с помощью PhyML v.3.3 (Guindon et al., 2010) с использованием параметров по умолчанию. Уровень поддержки внутренних ветвей оценивался с помощью байесовского теста в PhyML.

**Депонирование нуклеотидных последовательностей.** Первичные данные, полученные в результате секвенирования фрагментов гена 16S рРНК и секвенирования метагенома, были депонированы в NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номерами SRX10881305, SRX10881306 и SRX10881307. Аннотированные последовательности MAG депонированы в базе данных GenBank и доступны через BioProject PRJNA728906.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Состав микробного сообщества по результатам анализа ПЦР фрагментов генов 16S рРНК.** Образец грунта был отобран из горящего отвала добычи угля с многочисленными выходами продуктов горения на поверхность. Температура грунта в месте отбора составляла 72°C.

Для характеристики состава микробного сообщества были использованы 57213 последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. В результате кластеризации этих последовательностей было идентифицировано 29 ОТЕ на уровне 97% идентичности. Все выявленные ОТЕ представляли бактерии, архей обнаружено не было. Результаты таксономической классификации ОТЕ представлены на рис. 1.



**Рис. 1.** Состав микробного сообщества по результатам анализа генов 16S рРНК и метагеномного секвенирования. Категория others (прочие) в случае метагенома включает последовательности, не вошедшие в MAG, отнесенные к указанным группам.

В сообществе доминировали представители трех филумов: *Deinococcus-Thermus* (47.7% всех последовательностей генов 16S рРНК), *Firmicutes* (34.9%) и *Aquificae* (16.5%). В минорных количествах были обнаружены представители филумов *Bacteroidetes* (0.48%), *Proteobacteria* (0.27%), *Chloroflexi* (0.02%) и *Actinobacteria* (0.01%).

Филум *Deinococcus-Thermus* был представлен двумя ОТЕ, одна из которых доминировала в сообществе, составляя 47.4% всех последовательностей 16S рРНК. Эта ОТЕ относится к роду *Thermus* со сходством последовательности 98.7% с термофильной гетеротрофной бактерией *Thermus antranikianii*, выделенной из горячих источников в Исландии (Chung et al., 2000).

12 ОТЕ представляли филум *Firmicutes*. Наиболее многочисленная из них (14.1%) представляла род *Brevibacillus* и имела идентичность 98.73% по 16S рРНК с *Brevibacillus borstelensis*, умеренно термофильной гетеротрофной спорообразующей бактерией, встречающейся в почвах и гидротермальных местообитаниях (Shida et al., 1995; Khalil et al., 2018). Около 11% последовательностей представляли одну ОТЕ, отнесенную к роду *Hydrogenibacillus* (порядок *Thermicanales*, семейство *Thermicanaceae* в соответствии с таксономической системой Genome Taxonomy Database). Культивируемый представитель этого рода, *Hydrogenibacillus schlegelii*, – факультативно хемолитотрофная аэробная термофильная бактерия, которая способна окислять водород и, предположительно, СО (Schenk, Aragno, 1979; Kämpfer et al., 2013). Около 6.3% сообщества представляла ОТЕ, филогенетически удаленная от культивируемых представителей филума *Firmicutes* (<87% идентичности по 16S рРНК).

Филум *Aquificae* был представлен одной ОТЕ, филогенетически близкой к роду *Hydrogenobacter* семейства *Aquificaceae*. Представители *Hydrogenobacter* – типичные обитатели высокотемпературных горячих источников, хемолитоавтотрофные термофилы, способные аэробно окислять водо-

род (Reysenbach et al., 2000; Takacs-Verbach et al., 2013).

**Секвенирование метагенома и сборка MAG.** Для получения геномов представителей микробного сообщества мы просеквенировали метагеном образца RBS10, используя комбинацию технологий Illumina и Oxford Nanopore. Собранные контиги были кластеризованы в 18 MAG, имеющих полноту свыше 80% и загрязнение (избыточность) менее 10% по оценке CheckM на основе анализа присутствия набора консервативных однокопийных маркерных генов (табл. 1). В сумме эти MAG представляли около 80% всего метагенома сообщества. Таксономическая принадлежность полученных MAG была определена на основе филогенетического анализа по конкатенированным последовательностями консервативных маркерных генов по Genome Taxonomy Database (Parks et al., 2018).

Таксономическая классификация MAG выявила те же самые основные бактериальные филумы, которые были обнаружены с помощью 16S рРНК. Относительные доли некоторых линий в пуле последовательностей генов 16S рРНК и в полном метагеноме отличались (рис. 1), что, вероятно, обусловлено разным числом копий гена 16S рРНК в геномах и разными размерами самих геномов. Около половины всего метагенома представлял один MAG, RBS10-92, отнесенный к филуму *Deinococcus-Thermus*. Около 26% метагенома составляли 10 MAG, представлявшие филум *Firmicutes*, три MAG были отнесены к *Aquificae* (2.4% метагенома), три – к *Chloroflexi* (3.3% метагенома), два – к *Proteobacteria* (0.5% метагенома) и 0.02% метагенома представлял MAG кандидатного филума WOR-3 (табл. 1).

С использованием длинных чтений, полученных с помощью нанопорового секвенирования, были собраны полные кольцевые последовательности четырех геномов, – *Hydrogenobacter thermophiles* (MAG RBS10-74), представителя кандидатного рода UBA11096 филума *Aquificae* (MAG RBS10-58),

Таблица 1. Основные характеристики MAG

MAG ID	Полнота/загрязнение, %	Размер генома, нт	Число контигов	GC, %	Доля в метагеноме, %	Таксономическая принадлежность*
2	97.63/1.36	1699170	143	41.6	0.08	p__Aquificota; g__Hydrogenobacter
74	99.59/0.51	1794458	1**	44	0.17	p__Aquificota; s__Hydrogenobacter thermophilus
58	99.59/0.41	1722082	1**	43.1	2.13	p__Aquificota; g__UBA11096
4	97.27/0.91	3316678	1**	67.6	3.17	p__Chloroflexota; s__Thermoflexus hugenholtzii
7	85.55/1.87	2784472	202	65.1	0.03	p__Chloroflexota; g__Thermomicrobium
30	96.23/0	3717411	433	65.6	0.11	p__Chloroflexota; f__UBA6265
92	100/0	2424424	1**	64.9	48.83	p__Deinococcota; s__Thermus antranikianii
77	93.16/1.82	2294372	228	45	0.16	p__Firmicutes; f__Amphibacillaceae
39	98.09/0.68	2502348	201	37.5	0.12	p__Firmicutes_A; s__Caldanaerobacter subterraneus
35	94.06/0.2	2368455	42	63.5	11.01	p__Firmicutes_E; c__Thermaerobacteria
62	92.57/13.9	4585313	204	68.9	2.34	p__Firmicutes_E; g__Thermaerobacter
82	92.25/2.97	3307331	619	58.5	0.09	p__Firmicutes_G; o__DTU080
36	96.15/2.95	4121736	396	53.4	0.25	p__Firmicutes_I; s__Bacillus_BB thermozeamaize
40	84.97/4.92	2109662	127	64	0.37	p__Firmicutes_I; s__Brockia lithotrophica
8	91.28/1.72	2288228	67	61.8	0.48	p__Firmicutes_I; g__Hydrogenibacillus
49	92.44/8.08	2964420	72	66.1	10.75	p__Firmicutes_I; s__Hydrogenibacillus schlegelii
91	99.19/2.07	4672685	147	66.4	0.18	p__Proteobacteria; g__Paracoccus
48	99.38/1.91	3146152	24	70.2	0.29	p__Proteobacteria; g__Lysobacter
29	92.37/1.69	1580388	114	27.6	0.02	p__WOR-3_A; o__LBFQ01

\* Таксономическая принадлежность по Genome Taxonomy Database, версия R89. Указаны филум и таксон низшего ранга, до которого возможна классификация.

\*\* Полный кольцевой геном.

*Thermoflexus hugenholtzii* филума *Chloroflexi* (MAG RBS10-4) и *Thermus antranikianii* (MAG RBS10-92).

Чтобы получить представление о метаболических возможностях основных представителей микробного сообщества мы подробно проанализировали несколько MAG.

**Геномы представителей *Firmicutes*.** К наиболее многочисленным представителям микробного сообщества относились две бактерии филума *Firmicutes*, представленные MAG RBS10-35 и MAG

RBS10-49. Геном RBS10-35 представлял 11.0% всего метагенома и был идентифицирован только до уровня класса *Thermaerobacteria* в геномной таксономической системе. По-видимому, этот геном соответствует ОТЕ, составлявшей 6.3% последовательностей 16S рРНК и отнесенной к неклассифицируемым фирмикутам. Поиск ближайших родственников RBS10-35 в GenBank выявил только одну последовательность 16S рРНК (FN687452) с идентичностью 91%, обнаруженную в термальном аэробном биореакторе для переработки отрабо-

танного активного ила (Hayes et al., 2011). Анализ генома RBS10-35 показал, что эта бактерия имеет полную аэробную дыхательную цепь и СО дегидрогеназу, что указывает на возможность окисления СО.

Вторым по относительной численности среди фирмикут (10.7% метагенома) был организм, представленный геномом RBS10-49. Этот генотип был идентифицирован как *Hydrogenibacillus schlegelii* на основании 97.68% AAI с геномом штамма *H. schlegelii* MA48 (Maker et al., 2017). Анализ генома RBS10-49 выявил наличие генов аэробной дыхательной цепи, мембранно-связанной поглощающей [NiFe] гидрогеназы группы 1d и респираторной СО дегидрогеназы, что указывает на способность этой бактерии получать энергию за счет окисления компонентов угольных газов – водорода и СО. В геноме также кодируется полный цикл Кальвина, функционирование которого может обеспечивать автотрофную фиксацию углерода.

Следует отметить, что среди собранных MAG отсутствовал геном, относящийся к роду *Brevibacillus*, хотя на его представителей приходилось около 15% всех последовательностей генов 16S рРНК. По-видимому, *Brevibacillus* были представлены несколькими близкими филотипами, что затрудняло сборку протяженных контигов и, соответственно, получение MAG.

**Полный геном *Thermus antranikianii* RBS10-92.** В результате секвенирования метагенома был собран полный геном бактерии RBS10-92. Это геном имеет 97.79% AAI с *Thermus antranikianii* DSM 12462 (GCF\_000423905), что позволяет отнести его к этому виду. Геном *T. antranikianii* RBS10-92 был просеквенирован с 5030-кратным средним покрытием, имеет длину 2424424 п.н. и является первым известным полным геномом *T. antranikianii*. Относительная численность RBS10-92 в метагеноме составляет 48.8%, что хорошо согласуется с 47.64% долей соответствующей ОТЕ в чтениях 16S рРНК. В результате аннотации генома RBS10-92 было идентифицировано 2636 потенциальных белок-кодирующих генов, функции только половины из которых были предсказаны. В геноме были идентифицированы две копии оперона рРНК и 50 генов транспортных РНК (тРНК).

Анализ генома *T. antranikianii* RBS10-92 показал, что эта бактерия, вероятно, является аэробным гетеротрофом, способным гидролизовать различные углеводы. Этот микроорганизм также имеет возможности для роста в анаэробных условиях, используя нитрат в качестве акцептора электронов. Эти предсказания согласуются с микробиологическими характеристиками изолятов *T. antranikianii* (Chung et al., 2000).

**Полный геном *Hydrogenobacter thermophilus* RBS10-74.** Собраны три генома представителей филума *Aquificae* с полнотой более 97% и загряз-

нением менее 2%. Для двух из этих организмов были получены полные кольцевые геномные последовательности. RBS10-74, на который приходится 0.17% всего метагенома, был классифицирован как *Hydrogenobacter thermophilus* на основании 95.7% ANI с *H. thermophilus* ТК-6 (GCA\_000010785), изолированным из горячего источника в Японии (Arai et al., 2010).

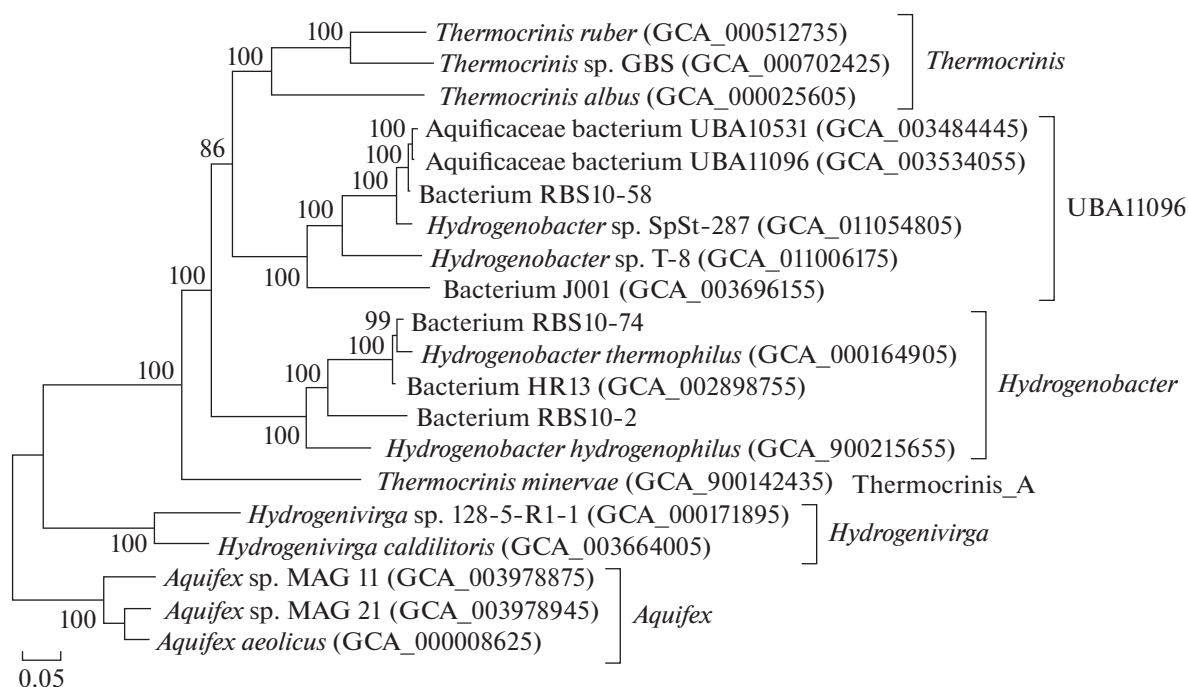
Анализ генома *H. thermophiles* RBS10-74 предсказал, что, как и культивируемые штаммы *H. thermophiles*, он является облигатным автотрофным организмом, способным окислять водород и фиксировать СО<sub>2</sub> через восстановительный цикл трикарбоновых кислот. При росте в анаэробных условиях эта бактерия может использовать нитрат в качестве акцептора электронов. RBS10-74 также может окислять элементную серу или тиосульфат.

**Полный геном MAG RBS10-58 – представителя кандидатного рода UBA11096.** Второй полный геном представителя филума *Aquificae* был отнесен к роду UBA11096 семейства *Aquificaceae* в соответствии с геномной таксономической системой. До настоящего времени этот род не имеет культивируемых представителей и описан на основе нескольких собранных из метагеномов драфт-геномов, анализ которых ранее не проводился.

Геном RBS10-58 был просеквенирован с 309-кратным средним покрытием и собран в кольцевую хромосому длиной 1722082 п.н. Относительная для этого генотипа в метагеноме составляет 2.13%. В результате аннотации генома RBS10-58 было идентифицировано 1848 потенциальных белок-кодирующих генов, функции половины из которых были предсказаны, а также один оперон 16S–23S–5S рРНК и 42 гена тРНК.

Для определения филогенетического положения бактерии RBS10-58 было построено филогенетическое дерево на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей консервативных маркерных генов представителей всех родов семейства *Aquificaceae*, определяемых в геномной таксономической системе. Полученные результаты показывают, что RBS10-58 вместе с несколькими другими MAG представляет отдельную линию уровня рода, наряду с родами *Aquifex*, *Hydrogenivirga*, *Hydrogenobacter*, *Thermocrinis* и *Thermocrinis minervae*, представлявшим отдельный род *Thermocrinis\_A* в геномной таксономии (рис. 2).

Анализ генома RBS10-58 выявил полный набор генов восстановительного цикла трикарбоновых кислот, который используется у *Aquificae* для автотрофной фиксации СО<sub>2</sub> (Hügler et al., 2007), а также генов пути глюконеогенеза. Пентозофосфатный путь у RBS10-58 отсутствует. В геноме обнаружен полный набор генов пути окислительного фосфорилирования, в том числе NADH дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, цитохром *bc1* комплекса и нескольких цитохром *c* оксидаз. Наличие



**Рис. 2.** Филогенетическое положение RBS10-58 в семействе *Aquificaceae*. Филогенетическое дерево построено по методу maximum likelihood, основанной на основе конкатенированных последовательностей консервативных маркерных генов. Уровни поддержки ветвей определены с помощью Байесовского теста в PhyML. Таксономия показана на основе системы GTDB (g – род).

поглощающих мембранно-связанных [NiFe] гидrogenаз групп 2a и 1d указывает на возможность использования молекулярного водорода в качестве донора электронов при дыхании, что характерно для представителей филума *Aquificae*. Другим субстратом может служить формиат, о чем свидетельствует наличие мембранно-связанной формиатдегидрогеназы.

В анаэробных условиях акцептором электронов может служить нитрат, на что указывает присутствие мембранно-связанной нитратредуктазы, которая восстанавливает нитрат до нитрита. Далее нитрит может восстанавливаться цитохром *cd1* нитритредуктазой с образованием оксида азота(II). Последующие стадии денитрификации могут осуществляться редуктазой окиси азота (nitric oxide reductase) и редуктазой закиси азота (nitrous oxide reductase) с образованием молекулярного азота.

В качестве донора электронов бактерия RBS10-58 может использовать и соединения серы. Окисление сероводорода может осуществляться сульфид:хинон оксидоредуктазой (sulfide:quinone oxidoreductase) и флавоцитохром *c*:сульфид дегидрогеназой (flavocytochrome *c*:sulfide dehydrogenase). В геноме также кодируется Sox-Hdr-Soe вариант пути окисления соединений серы до сульфата (Watanabe et al., 2019), включающий кластер *sox*-генов *soxYZAXB*, гены сульфитдегидрогеназы *soeABC* и

кластер генов, кодирующих субъединицы гетеросульфидредуктазы *hdrCBAhyphdrCB*.

Таким образом, бактерия RBS10-58 является хемолитоавтотрофом, способным получать энергию за счет окисления молекулярного водорода и соединений серы в процессе аэробного дыхания, а в анаэробных условиях осуществлять все стадии денитрификации.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что один из первых описанных термофилов, *Thermoplasma acidophilum*, был выделен из проб отходов горящего угля группой Томаса Брока в конце 60-х годов прошлого столетия (Darling et al., 1970), состав микробного сообщества этих экосистем остается малоизученным. Исследования состава микробных сообществ почв в районах подземных угольных пожаров были выполнены в Пенсильвании, США (Tobin-Janzen et al., 2005; Lee et al., 2017). Анализ микробных сообществ по 16S рРНК выявил присутствие архей филума *Crenarchaeota*, а также бактерий филумов *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia* и *Gemmatimonadetes*. В последующих метагеномных исследованиях было показано, что микроорганизмы с меньшими размерами клеток и геномов преобладают на участках почвы с более высокой температурой (Sorensen et al., 2019).

Микробные сообщества нагретой почвы в районе выходов на поверхность горячих угольных газов в Синьцзяне, Китай, были исследованы с использованием T-RFLP анализа и клональных библиотек генов 16S рРНК (Zhang et al., 2013). Среди доминирующих групп микроорганизмов обнаружены представители филумов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* и *Actinobacteria*. Самой многочисленной группой были *Firmicutes*, в основном представители родов *Bacillus* и *Paenibacillus*.

В обоих этих случаях объектами исследования были нагретые за счет выхода горячих газов “обычные”, богатые органикой почвы, что обусловило преобладание в сообществах типичных почвенных групп микроорганизмов. В настоящей же работе объектом исследования были не почвы, а отвалы карьера по добыче угля, представляющие собой углесодержащие горные породы. Предполагается, что в такой экосистеме будут формироваться специфические сообщества термофилов, развитие которых поддерживается за счет угольных газов. Наиболее близким аналогом исследованного нами объекта было микробное сообщество нагретых горных пород в районе подземного горения угля на территории Горного Алтая (Kadnikov et al., 2018). Оно было простым по составу и включало всего три доминирующих филотипа, все они представляли филум *Firmicutes*. Это аэробный гетеротроф *Ca. Carbobacillus altaicus*, анаэробный хемолитоавтотроф *Brockia lithotrophica* и аэробная бактерия *Hydrogenibacillus schlegelii*, способная как использовать органические соединения, так и расти автотрофно. Все эти микроорганизмы могут получать энергию за счет окисления молекулярного водорода (а некоторые также и СО; Kadnikov et al., 2018). Также в этом сообществе были обнаружены некультивируемые линии фирмикут, относящиеся к *Thermaerobacteria*.

Еще одним близким аналогом являются горящие отвалы угольного разреза у города Киселевск Кемеровской области. В микробном сообществе поверхностного слоя нагретого до 58°C грунта доминировали представители *Ktedonobacteria* (филум *Chloroflexi*), способные окислять водород и СО, а термофильные гидрогенотрофные фирмикуты составляли небольшую часть сообщества (Kadnikov et al., 2021). Возможно, отличия от исследованного в этой работе объекта обусловлены различной температурой и влажностью.

В исследованном нами сообществе RBS10 фирмикуты составляли около трети и были представлены термофильными группами. *H. schlegelii* и некультивируемые представители *Thermaerobacteria* входили в число доминирующих групп, в небольших количествах была обнаружена и *Brockia lithotrophica*. Однако, помимо фирмикотов, доминирующими группами в сообществе

RBS10 были представители рода *Thermus* и семейства *Aquificaceae*, характерные для гидротермальных экосистем (Counts et al., 2017; Bonch-Osmolovskaya, 2020). Ранее об их присутствии в почвах в районах подземного горения угля не сообщалось. Будучи способными к автотрофной фиксации углерода и получению энергии за счет окисления водорода и соединений веры, *Aquificaceae*, как и фирмикуты, представляют автотрофную часть сообщества, поддерживаемую угольными газами. Составляющий около половины микробного сообщества *T. antranikianii*, в свою очередь, использует в качестве субстратов органические вещества, образуемые автотрофными фирмикутами и *Aquificaceae*.

Исследованная нами термальная экосистема, ассоциированная с горящими угольными отвалами, и другие подобные объекты в Кемеровской области и на Алтае, возникли не более нескольких десятков лет назад и являются “молодыми” по сравнению с геотермальными объектами. Ранее было высказано предположение, что термофильные *Firmicutes*, споры которых могут распространяться на большие расстояния (Bonjour et al., 1988; Aullo et al., 2013), могут быть первыми “колонизаторами” таких новых термальных экологических ниш (Kadnikov et al., 2018). Обнаружение нами представителей *Thermus* и *Aquificaceae* свидетельствует о том, что распространение неспорообразующих термофилов, источником которых могут быть встречающиеся на юге Сибири горячие источники и другие геотермальные объекты, также может быть достаточно быстрым.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично поддержана Российским научным фондом (грант № 19-74-00142).

#### 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 проб и выделение ДНК проведены В.В. Кадниковым. Секвенирование генов 16S рРНК и метагеномной ДНК проведены В.В. Кадниковым и А.В. Мардановым. Биоинформационный анализ результатов секвенирования выполнен А.В. Белецким. Анализ данных и подготовка статьи выполнены В.В. Кадниковым, О.В. Карначук и Н.В. Равиным. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arai H., Kanbe H., Ishii M., Igarashi Y. Complete genome sequence of the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 // J. Bacteriol. 2010. V. 192. P. 2651–2652.
- Aüllo T., Ranchou-Peyruse A., Ollivier B., Magot M. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments // Front. Microbiol. 2013. V. 4. P. 362.
- Bonch-Osmolovskaya E. *Aquificales* // eLS. 2020. V. 1. P. 433–441.
- Bonjour F., Graber A., Aragno M. Isolation of *Bacillus schlegelii*, a thermophilic, hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and nongeothermal environments // Microb. Ecol. 1988. V. 16. P. 331–337.
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A. III, Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. 8365.  
<https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Cao M.D., Nguyen S.H., Ganesamoorthy D., Elliott A.G., Cooper M.A., Coin L.J. Scaffolding and completing genome assemblies in real-time with nanopore sequencing // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 1–10.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chung A.P., Rainey F.A., Valente M., Nobre M.F., da Costa M.S. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 209–217.
- Counts J.A., Zeldes B.M., Lee L.L., Straub C.T., Adams M.W.W., Kelly R.M. Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2017. V. 9. e1377.
- Darling G., Brock T.D., Samsonoff W., Conti S.F. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile // Science. 1970. V. 170. P. 1416–1418.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Engle M.A., Radke L.F., Heffern E.L., O'Keefe J.M., Hower J.C., Smeltzer C.D., Hower J.M., Olea R.A., Eatwell R.J., Blake D.R., Emsbo-Mattingly S.D., Stout S.A., Queen G., Aggen K.L., Kolker A., Prakash A., Henke K.R., Stracher G.B., Schroeder P.A., Román-Colón Y., Schure A. Gas emissions, minerals, and tars associated with three coal fires, Powder River Basin, USA // Sci. Total Environ. 2012. V. 420. P. 146–159.
- 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.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // Syst. Biol. 2010. V. 59. P. 307–321.
- Hayes D., Izzard L., Seviour R. Microbial ecology of autothermal thermophilic aerobic digester (ATAD) systems for treating waste activated sludge // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 127–138.
- Hügler M., Huber H., Molyneux S.J., Vetriani C., Sievert S.M. Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum *Aquificae*: evidence for two ways of citrate cleavage // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 81–92.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Grigoriev M.A., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Thermophilic *Chloroflexi* dominate in the microbial community associated with coal-fire gas vents in the Kuznetsk Coal Basin, Russia // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 948.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Ivasenko D.A., Antsiferov D.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Lignite coal burning seam in the remote Altai Mountains harbors a hydrogen-driven thermophilic microbial community // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 1–12.
- Kämpfer P., Glaeser S.P., Busse H.J. Transfer of *Bacillus schlegelii* to a novel genus and proposal of *Hydrogenibacillus schlegelii* gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 2013. V. 63. P. 1723–1727.
- Kang D.D., Froula J., Egan R., Wang Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities // PeerJ. 2015. V. 3. e1165.
- Khalil A.B., Sivakumar N., Arslan M., Saleem H., Qarawi S. Insights into *Brevibacillus borstelensis* AK1 through whole genome sequencing: a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Saudi Arabia // Biomed. Res. Int. 2018. Art. 5862437.
- Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 540–546.
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. 2012. V. 9. P. 357–359.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee S.H., Sorensen J.W., Grady K.L., Tobin T.C., Shade A. Divergent extremes but convergent recovery of bacterial and archaeal soil communities to an ongoing subterranean coal mine fire // ISME J. 2017. V. 11. P. 1447–1459.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 589–595.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Maker A., Hemp J., Pace L.A., Ward L.M., Fischer W.W. Draft genome sequence of *Hydrogenibacillus schlegelii* MA48, a deep-branching member of the *Bacilli* class of *Firmicutes* // Genome Announc. 2017. V. 5. e00380-16.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // EMBnet. J. 2011. V. 17. P. 10–12.
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // Genome Res. 2017. V. 27. P. 824–834.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // Genome Res. 2015. V. 25. P. 1043–1055.
- Pone J.D.N., Hein K.A., Stracher G.B., Annegarn H.J., Finkleman R.B., Blake D.R., McCormack J.K., Schroeder P. The spontaneous combustion of coal and its by-products in the Witbank and Sasolburg coalfields of South Africa // Int. J. Coal Geol. 2007. V. 72. P. 124–140.

- Rattigan J.H. Phenomena about Burning Mountain, Wingen, NSW // Aust. J. Sci. 1967. V. 30. P. 183–184.
- Reysenbach A.L., Ehringer M., Hershberger K. Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the *Aquificales* and “Korarchaeota” coexist // *Extremophiles*. 2000. V. 4. P. 61–67.
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // *PeerJ Preprints*. 2016. e1900v1.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. 2016. V. 4. e2584.
- Schenk A., Aragno M. *Bacillus schlegelii*, a new species of thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium oxidizing molecular hydrogen // *Microbiology (SGM)*. 1979. V. 115. P. 333–341.
- Shafirovich E., Varma A. Underground coal gasification: A brief review of current status // *Ind. Eng. Res.* 2009. V. 48. P. 7865–7875.
- Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Udaka S., Nakamura L.K., Komagata K. Proposal of *Bacillus reuszeri* sp. nov., *Bacillus formosus* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus borstelensis* sp. nov., nom. rev. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995. V. 45. P. 93–100.
- Sorensen J.W., Dunivin T.K., Tobin T.C., Shade A. Ecological selection for small microbial genomes along a temperate-to-thermal soil gradient // *Nat. Microbiol.* 2019. V. 4. P. 55–61.
- Stracher G.B., Taylor T.P. Coal fires burning out of control around the world: Thermodynamic recipe for environmental catastrophe // *Int. J. Coal Geol.* 2004. V. 59. P. 7–17.
- Takacs-Verbach C., Inskeep W.P., Jay Z.J., Herrgard M.J., Rusch D.B., Tringe S.G., Kozubal M.A., Hamamura N., March R.E., Fouke B.W., Reysenbach A.L., McDermott T.R., Jennings R.deM., Hengartner N.W., Xie G. Metagenome sequence analysis of filamentous microbial communities obtained from geochemically distinct geothermal channels reveals specialization of three *Aquificales* lineages // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 84.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Tobin-Janzen T., Shade A., Marshall L., Torres K., Beblo C., Janzen C., Lenig J., Martinez A., Ressler D. Nitrogen changes and domain bacteria ribotype diversity in soils overlying the Centralia, Pennsylvania underground coal mine fire // *Soil Sci.* 2005. V. 170. P. 191–201.
- Urbietta M.S., Donati E.R., Chan K.G., Shahar S., Sin L.L., Goh K.M. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 633–647.
- Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C.A., Zeng Q., Wortman J., Young S.K., Earl A.M. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement // *PLoS One*. 2014. V. 9. e112963.
- Watanabe T., Kojima H., Umezawa K., Hori C., Takasuka T.E., Kato Y., Fukui M. Genomes of neutrophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophs representing 9 proteobacterial species from 8 genera // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 316.
- Zhang T., Xu J., Zeng J., Lou K. Diversity of prokaryotes associated with soils around coal-fire gas vents in MaNasi county of Xinjiang, China // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 23–36.

## Metagenomic Analysis of the Microbial Community in the Underground Coal Fire Area (Kemerovo Region, Russia) Revealed Predominance of Thermophilic Members of the Phyla *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae*, and *Firmicutes*

V. V. Kadnikov<sup>1</sup>\*, A. V. Mardanov<sup>1</sup>, A. V. Beletsky<sup>1</sup>, O. V. Karnachuk<sup>2</sup>, and N. V. Ravin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

\*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Received May 12, 2021; revised May 13, 2021; accepted May 14, 2021

**Abstract**—Underground burning of coal seams, accompanied release of gases, leads to the development of local thermal ecosystems. We investigated the microbial community of the ground heated to 72°C in the release area of hot gases resulting from underground combustion of coal mining waste at the Bungurskiy-Severnoy coal deposit in the Kemerovo region of Russia. Analysis of the composition of the microbial community by 16S rRNA gene profiling revealed predominance of thermophilic bacteria of the phyla *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae*, and *Firmicutes*. As a result of metagenomic analysis, 18 genomes of the main members of the microbial community were obtained, including the complete genomes of *Hydrogenobacter thermophiles*, a member of the candidate genus UBA11096 of the phylum *Aquificae* (RBS10-58), *Thermoflexus hugenholtzii*, and *Thermus antranikianii*. Analysis of the RBS10-58 genome indicates that this bacterium can autotrophically fix carbon in the reductive tricarboxylic acids cycle and obtain energy via the oxidation of hydrogen and sulfur compounds with oxygen or nitrate as electron acceptors. Genome analysis of the two dominant *Firmicutes* species, *Hydrogenibacillus schlegelii* and an uncultured member of the class *Thermaerobacteria*, showed that these bacteria could grow aerobically by oxidizing hydrogen and carbon monoxide. Overall, the community was dominated by aerobic bacteria capable of growing autotrophically and receiving energy via the oxidation of the main components of coal gases, hydrogen and carbon monoxide. *Thermus antranikianii*, which makes up about half of the microbial community, probably uses organic matter produced by the autotrophic members of *Firmicutes* and *Aquificae*.

**Keywords:** thermophiles, coal gases, microbial community, hydrogenotrophs, *Thermus*, *Aquificae*