—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

РАЗНООБРАЗИЕ НОВЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ МИНЕРАЛЬНЫХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД ЕССЕНТУКСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

© 2022 г. С. Н. Гаврилов^{*a*, *, Е. Г. Потапов^{*b*}, М. И. Прокофьева^{*a*}, А. А. Клюкина^{*a*}, А. Ю. Меркель^{*a*}, А. А. Маслов^{*c*}, Д. Г. Заварзина^{*a*}}

^{*а*}Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия ^{*b*}Пятигорский НИИ Курортологии СКФНКЦ ФМБА России, Пятигорск, Россия ^{*c*}МГУ им. М.В. Ломоносова, Геологический факультет, Москва, 119991 Россия **e-mail: sngavrilov@gmail.com* Поступила в редакцию 17.09.2021 г.

После доработки 26.09.2021 г. Принята к публикации 28.09.2021 г.

Регион Кавказские Минеральные Воды (КМВ) является уникальной территорией, где на сравнительно небольшой площади сосредоточены минеральные воды различных типов с суммарными запасами более 16000 м³ в сутки. Широким разнообразием вод отличается Ессентукское месторождение, на котором в наибольших объемах добываются углекислые воды Ессентуки № 17 и Ессентуки № 4. Олним из предполагаемых механизмов генезиса этих вод является биогеохимическая деятельность микроорганизмов, обитающих в подземной гидросфере. В настоящее время влияние микробных сообществ на качество бальнеологических водных ресурсов остается практически неизученным. В нашей работе впервые охарактеризован филогенетический состав двух таких сообществ, населяющих водовмещающие породы и минеральные воды Ессентукского месторождения. Профилирование этих сообществ по гену 16S рРНК выявило доминирование некультивируемых архей филума Hadarchaeota (36.6%) в воде Ессентуки № 17, вскрываемой скважиной 46, и некультивируемых актинобактерий нескольких новых классов (29.4%) в воде Ессентуки № 4, вскрываемой скважиной 49-Э. Обнаружены существенные различия в составе микробных сообществ, населяющих водоносные горизонты этих двух скважин, имеющих разные гидрохимические характеристики. Получены накопительные и чистые культуры микроорганизмов, представляющих малочисленные таксоны исследуемых сообществ. Анализ литературных данных о геномных особенностях прокариот выявленных доминирующих таксонов указывает на их способность к хемолитотрофии и, таким образом, на их потенциальное участие в окислительно-восстановительных преобразованиях водовмещающих пород и газовой составляющей минеральных вод.

Ключевые слова: минеральные воды, подземные экосистемы, микробные сообщества, некультивируемые микроорганизмы, разреженная биосфера, хемолитотрофия **DOI:** 10.31857/S0026365622010037

Природные минеральные воды повсеместно используются в лечебных целях с древнейших времен. Древнегреческий центр врачевания Асклепион в Эпидавре, считающийся "колыбелью" современной курортной медицины, сформировался более 3000 лет назад именно вокруг термальных минеральных источников (Christopoulou-Aletra et al., 2010). Изучение генезиса минеральных вод имеет более чем вековую историю, и предположения о значительном влиянии микроорганизмов на этот процесс возникали достаточно давно, хотя микробиологические исследования минеральных вод до сих пор были фрагментарны. Первоначальные методы изучения микробных сообществ минеральных вод выбирались, в основном, согласно санитарно-эпидемиологическим требованиям в ущерб информации о функциональном разнообразии микроорганизмов и об их влиянии на формирование состава самих вод. Однако с конца 1970-х гг. наблюдался существенный прогресс в исследовании минеральных подземных вод, и культивируемые микроорганизмы были обнаружены даже в очень глубоких водоносных горизонтах. В работах того времени определяли, в основном, численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов в минеральных водах, используя стандартные методы высева на твердые питательные среды. Большинство обнаруженных таким образом бактерий было отнесено к роду *Pseudomonas*, из чего делались выводы о вероятном доминировании представителей этого рода в микробных сообществах минеральных вод (см. обзор Leclerc, da Costa, 2005, и ссылки в нем). Позднее, культуральными методами в минеральных водах было выявлено значительное количество представителей других гетеротрофных бактериальных родов Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter (Ouevedo-Sarmiento et al., 1986). С появлением молекулярно-экологических методов, были охарактеризованы микробные сообщества нескольких типов европейских бутилированных минеральных вод. Во всех проанализированных сообществах доминировали гаммапротеобактерии, однако на уровне порядков и семейств профили сообществ различных вод существенно отличались друг от друга (Lesaulnier et al., 2017; Sala-Comorera et al., 2020). При этом патогенные микроорганизмы не были обнаружены в значимых количествах ни в исходных пробах минеральных вод, ни в бутилированной воде в процессе ее хранения (см. работу Sala-Comorera et al., 2020 и ссылки в ней). Более того, для представителей рода *Pseudomonas*, детектированных в минеральных водах, еще ранее была показана антагонистическая активность против некоторых патогенных тестовых штаммов (Leclerc, da Costa, 2005). Таким образом, если вопрос безопасности естественной микрофлоры минеральных вод на сегодняшний день разрешен, то вопрос об участии этой микрофлоры в формировании состава вод требует подробного изучения. Одной из немногих подобных работ является характеристика микробных сообществ естественных выходов кислых карбонатных минеральных вод Чебского бассейна в Чехии (Krauze et al., 2017). На основании изотопных исследований авторы предположили, что терригенный CO₂ является значимым источником углерода для этих микробных сообществ. Молекулярно-экологические исследования выявили доминирование анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов, предположительно участвующих в биогеохимических циклах серы и железа, в частности, бактерий родов Sulfuricurvum и Sulfurimonas, окисляющих серу, и родов Gallionella и Sideroxydans, окисляющих Fe(II) (Krauze et al., 2017). Помимо этого, исследователи Чебских минеральных источников обнаружили, что микробные сообщества углекислых вод содержали разнообразные малочисленные филотипы - метаногенных архей рода Methanoregula, представителей глубоких филогенетических линий некультивируемых архей Hadesarchaea и Bathyarchaeota, характерных для морских и глубинных подземных экосистем (Parks et al., 2020). Предполагается, что малочисленные популяции прокариот, чьи филотипы в микробном сообществе составляют 1% или менее, могут оказывать значительное влияние на жизнедеятельность такого сообщества. Согласно современным представлениям, такие филотипы – часть глобального феномена "разреженной биосферы" прокариот (Скопина и соавт., 2016; Jousset et al., 2017). Предполагается, что эти организмы могут отвечать за ряд важных экологических функций в разнообразных экосистемах: представлять резерв генетического материала, активируемого при резком изменении условий среды (Jousset et al., 2017); первыми заселять и осваивать новые экологические ниши; использовать редкие субстраты, например, ксенобиотики (Скопина и соавт., 2016); обеспечивать постоянную продукцию важных факторов роста на низком, но критически необходимом постоянном уровне (Sohm et al., 2011; Zhang et al., 2019). В отношении подземных водных экосистем экологическая роль представителей "разреженной биосферы", равно как и функции доминирующих филотипов, еще не были предметом детальных исследований.

Предположения о значительной роли микроорганизмов в формировании состава вод региона КМВ возникли достаточно давно (Шинкаренко, 1941; Кудлаенко, 1976; Муравлёва и соавт., 1989). В ранних исследованиях, в основном, давалась оценка значимости сульфатредуцирующих бактерий как продуцентов сульфидов и окислителей органического вещества, захороненного в водовмещающих породах. В последнее десятилетие были начаты исследования микробных сообществ подземных минеральных вод продуктивных водоносных горизонтов, вскрытых на Ессентукском, Нагутском и Пятигорском месторождениях, для которых была оценена роль культивируемых сульфатредукторов в формировании "бессульфатных" углекислых вод содового типа (Потапов и соавт., 2014). Присутствие углекислоты с примесью изотопнолегкого, биогенного углерода, образующейся при микробном окислении органического вещества, выявленное в ходе анализа газов Ессентукского месторождения, дало основание предполагать высокую активность сульфатредукторов, полностью окисляющих рассеянное органическое вещество до СО₂ (Потапов и соавт., 2017; Потапов, 2019). Оценка влияния активности других физиологических групп прокариот и микробных сообшеств в целом на формирование состава минеральных вод не проводилась.

Наиболее широко используемой стратегией определения структуры сообществ прокариот в настоящее время остается секвенирование и анализ последовательностей генов 16S рРНК (Soriano-Lerma et al., 2020). Эта методика уже позволила охарактеризовать самые разнообразные экосистемы.

В нашей работе описывается филогенетическое разнообразие микробных сообществ региона КМВ на основе анализа библиотек ампликонов гена 16S рРНК, полученных из тотальной ДНК, выделенной непосредственно из воды двух скважин Новоблагодарненского участка Ессентукского месторождения. На этом участке добываются баль-

неологически ценные углекислые минеральные воды типов Ессентуки № 17 и Ессентуки № 4, циркулирующие в трещиноватой зоне верхнемеловых известняков на глубине от 500 до 1000 м, где, согласно предварительным геолого-гидрохимическим исследованиям (Потапов и соавт., 2017; Потапов, 2019), можно ожидать высокую геохимическую активность микроорганизмов. Результаты анализа представляют собой одну из первых молекулярно-экологических характеристик подобных экосистем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Пробы для последующего выделения ДНК отбирали непосредственно на устье эксплуатационных скважин 46 и 49-Э с использованием комплектов для мембранной фильтрации ФМ02-1000 объемом 1 л (Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург) с фильтрами из трековой мембраны толщиной 20 мкм с порами 0.2 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия). Предварительно автоклавированные комплекты фильтровальных установок собирали непосрелственно на месте отбора проб, подключали к устьевой арматуре скважин через стерильные резьбовые соединения и гибкие шланги и пропускали через них воды под естественным избыточным давлением скважин (порядка 4-6 атм. на vстье) в объеме 100 л на каждую пробу. Фильтрование начинали сразу после заполнения очередной автоцистерны, поставляющей воду на завод розлива, объемом не менее 19 м³, что обеспечивало получение проб непосредственно из водовмешающих отложений, без примеси вод, отстаивающихся в стволах скважин в период между заполнением автоцистерн. По окончании фильтрования остаточную воду полностью продавливали через фильтры высвобождающимися из скважин газами. От полученных влажных фильтров с микробной биомассой стерильными ножницами отрезали 1/4 часть, переносили ее в стерильный стеклянный флакон объемом 120 мл, полностью заполняли его водой из скважины и укупоривали резиновой пробкой и завинчивающейся крышкой. Полученный материал транспортировали в лабораторию, хранили в холодильнике и использовали в качестве посевного материала. Оставшуюся часть фильтра упаковывали стерильными пинцетами в стерильные пластиковые пробирки типа Falcon объемом 15 мл и полностью покрывали 2-мя мл стерильного буфера A (100 мМ Tris/HCl, 100 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl; pH 8.0) для фиксации ДНК. Плотно закрытые пробирки сразу же помещали в сумку-холодильник на лед, транспортировали в таком виде в лабораторию и далее хранили при -20°С до выделения ДНК.

Выделение ДНК, подготовка и секвенирование библиотек ампликонов гена 16S pPHK. ДНК выделяли непосредственно из фиксированных фильтров при помощи набора FastDNA[™] SPIN Kit for Soil ("MP Biomedicals", США) согласно инструкции производителя.

Подготовку библиотек ампликонов V4 участка гена 16S рРНК проводили по описанной ранее методике (Gohl et al., 2016) с использованием пары праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCG-GTAA-3'; Hugerth et al., 2014) - Pro-mod-805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Меркель и соавт., 2019). Секвенирование библиотек проводили на системе MiSeq[™] ("Illumina Inc", США) с использованием картриджа для получения парно-концевых прочтений длиной 150 нуклеотидов. Биоинформатический анализ проводили аналогично Merkel et al. (2021). Все данные секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA760784.

Получение накопительных и чистых культур. В качестве посевного материала для засева (10% по объему) использовали воду из флаконов, содержащих 1/4 часть фильтра для выделения ДНК. Перед отбором аликвоты флакон энергично встряхивали. Для получения накопительных культур микроорганизмов был использован модифицированный метод селективных сред. В качестве минеральной основы для приготовления питательных сред использовали бутилированную воду Ессентуки № 4 и № 17, полученную из тех же скважин, что и посевной материал. Использование воды из скважин как минеральной основы питательной среды увеличивало вероятность накопления целевых групп микроорганизмов и одновременно обеспечивало их развитие в оптимальных физико-химических условиях.

Среды готовили с соблюдением техники анаэробного культивирования путем кипячения бутилированной воды Ессентуки № 4 (Холдинг "Аква", ГОСТ Р 54316-2011), pH 7.0, для накопительных культур из скважины 49-Э или бутилированной воды Ессентуки № 17 (Холдинг "Аква", ГОСТ Р 54316-2011), рН 6.8, для накопительных культур из скважины 46 с последующим охлаждением под током СО₂ (100%). В охлажденную среду добавляли в растворы витаминов (1 мл/л) (Wolin et al., 1963) и микроэлементов (1 мл/л) (Кевбрин, Заварзин, 1992). При необходимости рН подводили до требуемых значений 1 н раствором HCl. Среды разливали при помощи дозатора в пробирки Хангейта по 10 мл, в которые были предварительно добавлены следующие минералы железа в качестве донора или акцептора электронов (20 г/л): природные глауконит

 $K_{0.8}(Mg_{0.4}Fe_{0.1}^{2+})(Fe_{1.1}^{3+}Al_{0.4})[(Si_{3.7}Al_{0.3})O_{10}]$ (OH)₂ (месторождение Маасду, Эстония), биотит ($K_{0.89}Na_{0.03}$)- $(Mg_{0.9}Fe_{1.1}^{2+}Al_{0.43}Fe_{0.22}^{3+}Ti_{0.09}Mn_{0.03})$ [Al_{1.26}Si_{2.8}O₁₀]-(OH,F)₂ (Карелия, Россия), сидерит (FeCO₃) (Ба-

кальское месторождение, Россия) или синтези-

35

рованный магнетит (Fe₃O₄, расчетная конечная суммарная концентрация двух- и трехвалентного железа – 50 мМ). Синтезированный магнетит (CM), смешанный оксил Fe(II/III), готовили титрованием эквимолярных растворов FeSO₄ · 7H₂O и Fe₂(SO₄)₃ · 6H₂O 10%-ым раствором NaOH при постоянном перемешивании до рН 8.5. Полученный магнитный осадок трижды отмывали от Na-СІ дистиллированной водой, центрифугировали 3 мин при 1000 g и добавляли в среду перед разливом по пробиркам. В газовую фазу добавляли 2 мл СН₄ (до его конечной объемной концентрации 30%), после чего пробирки автоклавировали при 121°С 30 мин. Первичные накопительные культуры инкубировали в течение 7 сут при 37 и 47°С. Состояние накопительных культур контролировали по изменению численности прямым подсчетом клеток, окрашенных красителем акридиновым оранжевым, с помощью флуоресцентного микроскопа (Axio Lab.A1, "Zeiss", Германия), по изменению состава газовой фазы, либо окраски добавленных минералов железа. В случае подтверждения роста микроорганизмов в первичных накопительных культурах их пересевали (5% по объему) в пробирки со свежей стерильной средой, в те же условия, что использовались для соответствующих первичных накопительных культур. От трех до пяти последовательных пересевов обеспечивали получение устойчивых накопительных культур, из которых в дальнейшем предпринимались попытки выделения чистых культур доминирующих в них микроорганизмов методом предельных десятикратных разведений.

Аэробное культивирование чистых культур вели на разлитой на воздухе по 5 мл в пробирки Хангейта бутилированной воде Ессентуки № 17 с добавлением тиосульфата (10 мМ) в качестве донора электронов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геолого-гидрохимическая характеристика объектов исслелований. Новоблаголарненский участок, расположенный в 5-10 км к северу от города Ессентуки, был разведан в 1949-1956 годах. В настоящее время запасы минеральных вод на этом участке составляют 65 м³/сут воды Ессентуки № 17 и 80 м³/сут воды Ессентуки № 4. Скважины 46 и 49-Э, из которых идет добыча подземных углекислых минеральных вод Новоблагодарненского участка, имеют глубину 685.8 м, (водоприемный интервал на глубине 552.0-685.8 м) и 770 м (водоприемный интервал на глубине 508.0-770.0 м) соответственно, и расположены в 3 км друг от друга. Скважины работают в режиме регулируемого кранового самоизлива и используются для промышленного розлива в бутылки. Температура вод на устьях скважин достигает 45°С. По составу воды являются хлоридно-гидрокарбонатными натриевыми с минерализацией 8.0-14.0 г/л, содержание растворенного углекислого газа в них составляет 0.6-1.4 г/л. Газовая фаза этих вод, помимо CO₂ (40–70%), содержит CH₄ (10–40%) и N₂ (1-5%). Химический состав добываемых вод двух исследованных нами эксплуатационных скважин Новоблагодарненского участка по формуле Курлова представлен ниже:

Ессентукский тип № 17, скважина 46:

$$CO_2 0.7 M10.5 \frac{HCO_3 63 Cl37}{(Na + K)93Mg4 Ca3} H_3 BO_3 0.051 H_2 SiO_3 0.029 pH 6.9 T 36^{\circ}C;$$

Ессентукский тип № 4, скважина 49-Э:

$$CO_2 0.7 M 8.6 \frac{HCO_3 60 Cl40}{(Na + K)96 (Mg2 Ca2)} H_3 BO_3 0.053 H_2 SiO_3 0.031 pH 7.0 T41 °C.$$

Филогенетический состав микробного сообщества воды типа Ессентуки № 17 из скважины 46. По результатам микроскопии отобранных вод количество клеток в них колеблется от 10⁵ до 10⁶ кл./мл. Для образцов воды данной скважины были получены результаты профилирования по двум временным повторностям – по пробам, отобранным в августе и октябре 2019 г. Для каждой временной повторности было получено по несколько экспериментальных повторностей библиотек генов 16S рPHK. Суммарно для библиотек скважины 46 было получено более 28 тысяч последовательностей ампликонов V4-участка гена 16S pPHK. Филогенетические профили микробного сообщества в различных повторностях были, в целом, схожи между собой, что позволило нам далее оперировать средними значениями представленности таксонов. Среднее значение индекса Шеннона составило 2.7, индекса Симпсона – 0.1, что указывает на относительно низкое разнообразие изучаемого микробного сообщества.

Анализ библиотек генов 16S рРНК выявил доминирование некультивируемых архей в воде скважины 46. Археи составляют более половины (59.3%) всего микробного разнообразия экосистемы (табл. 1), причем наибольшую численность

(36.6% всех прочтений) имеют филотипы порядка Hadarchaeales. Его первые представители были обнаружены молекулярными методами в технической и трещинной воде южноафриканских сверхглубоких золотоносных шахт и изначально были обозначены как SAGMEG (англ. South-African Gold Mine Miscellaneous Euryarchaeal Group – "группа разнообразных эвриархей из южноафриканской золотоносной шахты"; Takai et al., 2001). На основе анализа полногеномных данных эта группа была выделена в отдельный филум Hadarchaea, у представителей которого была предсказана способность к автотрофии с использованием СО₂ в качестве единственного источника углерода и акцептора электронов при ацетогенезе, а также к гидрогеногенному окислению СО до СО₂ (Baker et al., 2016). Представители Hadarchaea были детектированы в разнообразных анаэробных экосистемах, характеризующихся широким разбросом температур от 4 до 80°С: в подземной материковой биосфере, в наземных горячих источниках, в подземных экосистемах океанского дна, в морских глубоководных, мелководных, а также в пресноводных осадках (Parkes et al., 2005; Biddle et al., 2006). Однако ни в одной из этих экосистем такие археи не являлись доминирующим филотипом. Таким образом, подземные минеральные воды и водовмещающие горные породы, вскрываемые скважиной 46 Ессентукского месторождения, являются первым описанным экотопом, физико-химические условия которого способствуют доминированию этой некультивируемой и пока еще малоизученной группы архей. Вероятно, именно эти организмы являются ключевыми первичными продуцентами органического вещества в микробном сообществе водовмещающих пород и воды скважины 46, где их численность и метаболическая активность может оказывать существенное влияние на содержание СО₂ в газовой фазе минеральных вод.

Второй по численности группой архей (10.8%) всех прочтений) в воде Ессентуки № 17 скважины 46 оказались филотипы, составляющие новый порядок класса Thermoplasmata филума Thermoplasmatota. Все описанные виды Thermoplasmata были выделены из кислых шахтных дренажей, либо из кислых горячих источников вулканического происхождения. Большинство из них - это факультативно аэробные органотрофные ацидофилы, в том числе, гиперацидофилы с оптимальным pH роста около 0 (Rosenberg et al., 2014). Отдельные представители класса способны к автотрофному росту, сопряженному с аэробным окислением железа(II). Ближайший культивируемый организм, родственный филотипам Thermoplasmata из скважины 46, относится к виду Methanomassiliicoccus *luminiensis* порядка *Methanomassiliicoccales* (табл. 1) нейтрофильному облигатному метилотрофу, образующему метан из метанола или метиламинов

и водорода (Iino et al., 2013). Однако очень низкое сходство этого организма с ессентукскими филотипами *Thermoplasmata* (80.7%) затрудняет предсказание физиологических свойств последних и, в частности, их способности к метилотрофному метаногенезу.

Третья по численности группа некультивируемых архей (7.3% сообщества) в воде скважины 46 представлена филотипами кластера ANME-1а в филуме Halobacterota. Сравнение полученных последовательностей генов 16S pPHK ANME-1a с базой данных NCBI Nucleotide collection (версия от 14.09.2021), выявило их высокую гомологию с филотипом ANME-1, детектированным в морских прибрежных осадках. Именно для этой группы впервые был получен ряд доказательств функционирования процесса анаэробного окисления метана до углекислого газа (Hinrichs et al., 1999; Lloyd et al., 2011). Высокое (10-40%) содержание метана в газовой фазе воды скважины 46, коррелирующее со значительным представительством ANME-1а, дает основание предполагать, что в исследуемой экосистеме этот субстрат является существенным ресурсом формирования биомассы. При этом важно отметить, что анаэробная метанотрофия термодинамически выгодна только в консорциумах с сульфат- или железоредуширующими бактериями, которые выступают акцепторами восстановленных эквивалентов, высвобождающихся при окислении метана (Timmers et al., 2017). Альтернативными акцепторами электронов для метанотрофов ANME-1а могут служить минеральные вещества, обладающие электронной проводимостью, в частности, минералы железа магнетит и маггемит. Такую возможность археям группы ANME обеспечивают присутствующие в их геномах гены электронтранспортных белков (Wang et al., 2014). Процессы использования нерастворимых акцепторов электронов распространены в подземной биосфере и могут быть активными в водоносных горизонтах скважины 46. В свою очередь, частицы минералов железа могут служить значимым звеном межвидового переноса электронов между организмами различного метаболизма в процессах синтрофного метаногенеза (Kato et al., 2012). Эти процессы особенно важны для водоносных горизонтов, где обилие микрониш в водовмещающих породах создает селективные условия для развития микробных ассоциаций, закрепленных на минералах. Помимо некультивируемых архей, в сообществе воды скважины 46 достаточно широко представлены (4.0% всех прочтений) известные автотрофные гидрогенотрофные метаногенные археи рода *Methanobacterium* (Whitman, 2015). Гипотетически, эти археи могут служить источником метана для ANME-1а.

Бактерии составляют 40.1% микробного сообщества воды скважины 46. Среди них преобладают филотипы некультивируемой группы уровня

(а 1. Представленность основных филотипов (в % от общего состава) в микробных сообществах минеральных вод скважин 46 и 49-Э Ессентук-
рождения по результатам профилирования по гену 16S рРНК. Жирным шрифтом выделены филогенетические группы, представленность
обществах составляет >1%

МИІ	ского месторождения по результатам профилирован которых в сообществах составляет >1%	ния по ге	ну 165 рР	НК. Жирным шрифтом выделены ф	илогенетические группы, представленность
кроби	Таксономическое положение (финм унасс нованоу семейство топ)	Пр из ски	обы зажин	Ближайший валидный вид (>80% соотство)	Ближайшие клоны
олс	(pulition, blace, itopados, comencipo, pod)	46	6-95	(~ 00/0 CAUGETER)	
оги	АРХЕИ				
Я то	Crenarchaeota Bathyarchaeia	0.5	2.5	Archaeoglobus lithotrophicus (82.4%)	КР341421.1 (98.1%), горячий источник Filwoha, Эфиопия
м 91	Euryarchaeota Methanobacteria Methanobacteriales	4.0	0.0	Methanobacterium subterraneum (100%)	МК472013.1 (100%), анаэробный
N	Methanobacteriaceae Methanobacterium			Methanobacterium formicicum (100%)	биореактор; MG001723.1 (100%), метановый резервуар
2 1 2					в угольном пласте (глубина 1.2 км, 62°С), Индия
2022	Euryarchaeota Methanobacteria Methanobacteriales	0.0	11.5	Methanothermobacter	MT013481.1 (100%), ил мезофильного
	Methanothermobacteriaceae Methanothermobacter			thermautotrophicus Delta H (100%)	метантенка
	Hadarchaeota <i>Hadarchaeia Hadarchaeales</i>	36.6	0.0		АВ476720.1 (100%), серная дренажная вода
					Готардского тоннеля, Альпы, Швейцария; иссолетие 1 (100%) осолого токи Опрода
					NC/20/40.1 (100%), ОСАДОК РСКИ ОУЦЗИН, Китай:
					АВ802437.1 (98.6%), керн океанского дна,
					шельф о. Хонсю;
					JQ315350.1 (98.1%), пластовая вода
					Ромашинского нефтяного месторождения,
					Россия;
					с глубины до 2.3 км, Новая Зеландия
		0.0	2.4		FJ936679.1 (97.6%), грязь Авачинского
					вулкана, Россия
	Halobacterota ANME-1 ANME-1a	7.3	0.4	Methanosaeta pelagica (85.4%)	GU120524.1 (99.5%), прибрежное природ-
					ное оитумное озеро пич-леик, о. тринидад, Карибское море:
					JN605063.1 (99.1%), донный осадок эстуария
					White Oak River, западное побережье США
	Halobacterota прочие (2 филотипа)	0.1	0.1		

РАЗНООБРАЗИЕ НОВЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ

Таксономическое положение	Про из скв	обы ажин	Ближайший валидный вид	Ближайшие клоны
(филум, класс, порядок, семеиство, род)	46	49-Э	(~au% cxodctba)	
Thermoplasmatota <i>Thermoplasmata</i>	10.8	0.0	Methanomassiliicoccus luminyensis (80.7%)	АВ665421.1 (93.2%), вода подземного горячего источника (с глубин 0.25–1 км), Япония; FJ900727.1 (91.8%), производственная вода нефтяной скважины, Китай
БАКТЕРИИ				
Acidobacteriota Aminicenantia Aminicenantales	0.0	2.3	Moorella glycerini (83.2%)	MK067121.1 (100%), нефгезагрязненная почва, Нигерия
Actinobacteriota Coriobacteriia FS118-23B-02	0.0	10.9	Egibacter rhizosphaerae (85.8%)	GU982852.1 (89.2%), донный осадок из западной части Тихого океана
Actinobacteriota Coriobacteriia OPB41	1.4	5.2	Olegusella massiliensis (87.7%)	МК035808.1 (100%), электротрофное метаногенное микробное сообщество из водоносного горизонта газового месторождения, Япония
Actinobacteriota RBG-16-55-12	0.1	11.0	Caldalkalibacillus thermarum (88.9%)	MF895411.1 (100%), угольный пласт, Австралия
Caldisericota Caldisericia Caldisericales TTA-B15	0.0	4.6	Calditerricola yamamurae (84.4%)	КР109901.1 (100%), попутная вода нефтяного месторождения, Китай; КМ373089.1 (100%), термофильный метантенк, перерабатывающий терефталат
Chloroflexi Dehalococcoidia Sh765B-AG-111	0.1	1.6	Dehalogenimonas formicexedens (90.6%)	ЕU385911.1 (100%), керн со дна Южно-Китайского моря
Firmicutes D8A-2	3.2	2.3	Moorella humiferrea (88.7%)	KX576599.1 (99.5%), подземное газохранилище (0.8 км), Франция
Firmicutes Desulfitobacteriia Desulfitobacteriales Desulfitobacteriaceae Desulfitobacterium	0.1	10.4	Desulfitobacterium metallireducens (93.9%)	MF895721.1 (99.1%), угольный пласт, Австралия
Firmicutes Desulfotomaculta Ammonifexales Ammonificaceae	4.0	0.2	Thermodesulfitimonas autotrophica (88.7%)	МF628593.1 (99.5%), микрокосм из угольного пласта
Firmicutes Desulfotomaculia Desulfotomaculales Desulfurisporaceae SCADC1-2-3	0.0	1.4	Desulfofundulus kuznetsovii (97.2%)	МF897964.1 (100%), угольный пласт, Австралия

38

Таблица 1. Продолжение

ГАВРИЛОВ и др.

№ 1 2022

Таксономическое положение	Про из ски	обы зажин	Ближайший валидный вид	Ближайшие клоны
(филум, класс, порядок, семейство, род)	46	49-Э	- (>80% сходства)	
Firmicutes Incertae Sedis DTU014	0.1	3.3	Koleobacter methoxysyntrophicus (90.7%)	MF950564.1 (92.3%), почва рисового поля, Китай
Firmicutes прочие (18 филотипов)	1.0	5.0		
Nitrospirota Thermodesulfovibrionia Thermodesulfovibrionales Thermodesulfovibrionaceae Thermodesulfovibrio	0.0	2.3	Thermodesulfovibrio yellowstonii (100%)	LC480817.1 (100%), ил термофильного метантенка; МF894795.1 (100%), угольный пласт, Австралия
Nitrospirota <i>Thermodesulfovibrionia</i>	23.5	0.2	Dissulfurispira thermophila (88.2%); Thermodesulfovibrio aggregans (85.3%)	GQ921458 (99.5%), трещинная вода глубинной (1.7 км) шахты Northam, ЮАР; KX974515.1 (96.2%), городской водозабор Сингапура
Patescibacteria <i>Parcubacteria</i> <i>Candidatus</i> Yanofskybacteria	0.1	1.1		FR727651.1 (93.4%), горячий источник, Дакс, Франция
Patescibacteria Parcubacteria Paceibacterales Paceibacteraceae Candidatus Paceibacter	0.0	4.0		АВ(45175.1 (93.9%), керн океанского дна, шельф о. Хонсю; JN123513.1 (93.4%), керн океанского дна, хребет Tainan, шельф Тайваня
Proteobacteria Alphaproteobacteria Rhizobiales Rhizobiaceae Ciceribacter	0.0	1.3	Ciceribacter azotifizens (100%); Ciceribacter thiooxidans (100%)	КХ714809.1 (100%), горячий источник, Иран
Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Moraxellaceae	3.0	0.0	Cavicella subterranea (97.6%)	КТ014926.1 (100%), почва, загрязненная Cr(VI), Китай
Proteobacteria Gammaproteobacteria Halothiobacillales Halothiobacillaceae Halothiobacillus	0.3	0.0	Halothiobacillus neapolitanus (100%)	КХ714819.1 (100%), газоперерабатываю- ший завод, Иран
Прочие бактерии (всего 44 филотипа)	3.1	10.5		
Неопределенное таксономическое положение (No relative)	0.6	5.4	1	1

РАЗНООБРАЗИЕ НОВЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ

39

Таблица 1. Окончание

МИКРОБИОЛОГИЯ том 91 № 1 2022

нового порядка в классе Thermodesulfovibrionia (23.5% сообщества). По полногеномной таксономии (GTDB) к этому классу нитроспир относят несколько кластеров некультивируемых бактерий и два культивируемых рода, сульфатредукторов Thermodesulfovibrio (Whitman, 2015) и автотрофных диспропорционаторов серы и тиосульфата Dissulfurispira (Umezawa et al., 2021). Выявленные нами филотипы имеют низкий уровень сходства с ближайшей к ним D. thermophila (уровень сходства V4-участка гена 16S рРНК 88.2%; табл. 1), что не позволяет сделать однозначных выводов об их физиологии и, соответственно, экологической роли в сообществе. Филотипы известных сульфатредукторов, близких к роду Desulfovibrio, в сообществе воды скважины 46 представлены в минорных количествах (≤1% прочтений гена 16S pPHK). Тем не менее, вместе с нитроспирами, их можно рассматривать в качестве возможных синтрофных партнеров архей ANME-1a.

Существенно меньшую, чем нитроспиры, но значимую долю микробного сообщества воды скважины 46 составляют филотипы семейства "Ammonificaceae" (4.0%), к которому относятся три культивируемых вида хемолитотрофов, восстанавливающих нитраты, серу или ее соединения с водородом или формиатом в качестве доноров электронов (https://gtdb.ecogenomic.org/searches?s= al&q=ammonificaceae). Схожие доли в составе этого микробного сообщества (3.2 и 3.0% соответственно) приходятся на филотипы некультивируемой группы D8A-2 уровня нового класса в филуме Firmicutes и новой некультивируемой группы гаммапротеобактерий семейства Moraxel*laceae*. Метаболические свойства группы D8A-2 в настоящее время не описаны. Интересна работа, в которой зафиксирован резкий рост численности D8А-2 в микробных консорциумах при стимуляции продукции ими метана из комплексных органических субстратов, например, путем внесения частиц магнетита, активизирующих межвидовой перенос электронов (Lee et al., 2019). Организм, близкородственный к ессентукскому филотипу Moraxellaceae. Cavicella subterranea (97.6% сходства гена 16S рРНК), является органотрофом, выделенным из скважины минеральной подземной воды в Португалии (Franca et al., 2015).

К преобладающим бактериальным группам сообщества воды Ессентуки № 17 можно также отнести некультивируемых актинобактерий группы OPB41 класса *Coriobacteriia* (1.4% сообщества). Первоначально детектированные в горячих источниках, эти организмы были впоследствии обнаружены в самых разнообразных экосистемах. На основании геномного анализа у них предполагается наличие гидролитической активности (Bird et al., 2019).

Из минорных компонентов микробного сообщества воды скважины 46, на долю каждого из которых приходится ≤1% прочтений гена 16S pPHK, заслуживают внимания филотипы, относящиеся к бактериальным органотрофным родам *Paracoccus, Halothiobacillus, Cellulomonas*, чьи культивируемые представители способны, соответственно, к денитрификации, окислению разнообразных серных соединений, гидролизу полисахаридов (Rosenberg et al., 2014).

Филогенетический состав микробного сообщества воды типа Ессентуки № 4 из скважины 49-Э. По результатам микроскопии отобранных вод этого типа количество клеток в них составляет менее 10⁵ кл./мл. Для образцов волы данной скважины были получены результаты профилирования лишь по одной временной повторности (отбор проб в августе 2019 г.), для которой было сделано две экспериментальных повторности анализа библиотек генов 16S рРНК. Суммарно для библиотек скважины 49-Э было получено более 6 тысяч последоампликонов V4-участка вательностей гена 16S рРНК. Среднее значение индекса Шеннона составило 2.9, индекса Симпсона – 0.08, что также указывает на относительно низкое разнообразие изучаемого микробного сообшества, которое. однако, выше, чем в воде скважины 46.

Профилирование микробного сообщества воды из скважины 49-Э выявило доминирование в нем некультивируемых актинобактерий, филотипы которых суммарно составляют 27.1% прочтений (табл. 1). В отличие от воды типа Ессентуки № 17, микробное сообщество воды Ессентуки № 4 содержит существенно меньшую долю архей (всего 16.9%). В то же время, бактериальная его часть более разнообразна - около 80% сообщества представлено 20-ю бактериальными филотипами, тогда как в воде Ессентуки № 17 на 90% сообщества приходится всего 8 филотипов, из которых большинство составляют архейные (табл. 1). Одной из причин большего филогенетического разнообразия микробного сообщества воды скважины 49-Э по сравнению с таковым в воде скважины 46, является сниженное, по сравнению со скважиной 46, содержание CO_2 , которое, по-видимому, обусловлено подмешиванием пресных гидрокарбонатных натриевых вод, циркулирующих в верхнемеловых известняках, к минеральным водам в горизонтах, вскрываемых скважиной 49-Э (Потапов, 2017).

Некультивируемые актинобактерии, доминирующие в микробном сообществе воды скважины 49-Э, относятся к классу *Coriobacteriia* и филогенетической группе уровня нового класса RBG-16-55-12. Культивируемые представители класса *Coriobacteriia*, сосредоточенные все в порядках *Coriobacteriales* и *Eggerthellales*, являются эпибионтами животных и человека (Rosenberg et al., 2014), од-

нако филотипы, обнаруженные в воде скважины 49-Э, относятся к новым порядкам, представители которых были детектированы в разнообразных экосистемах, не связанных с организмами животных. В частности, ближайший клон, родственный ессентукскому филотипу группы FS118-23B-02 (10.9% в исследуемом сообществе), был выявлен в донных осадках Тихого океана (табл. 1). Предполагается, что микроорганизмы этой группы (Huber et al., 2006) являются свободноживущими органотрофами, хотя их физиология пока остается неизученной. Предполагаемые гидролитические кориобактерии группы ОРВ41 составили 5.2% сообщества воды скважины 49-Э, хотя их основной субстрат в этой белной органикой экосистеме остается неясным. Мало сведений и о метаболизме некультивируемых бактерий группы RBG-16-55-12 уровня класса – это самая массовая форма актиномицет в воде Ессентукского типа № 4 (11.0% от всех прочтений). Бактерии этой группы ранее были обнаружены в разнообразных экстремальных экосистемах. В частности, близкородственный ессентукскому RBG-16-55-12 клон был выявлен в австралийском угольном пласте. Для представителей RBG-16-55-12 из японского термального щелочного источника был предложен таксон "Candidatus Hakubanella thermoalkaliphilus" и выполнен анализ геномов SAGs, который показал возможность фиксации СО₂ этими организмами при миксотрофном росте через путь Вуда-Льюнгдаля, прежде не описанный у актинобактерий. У одного из филотипов была также выявлена способность к нитратредукции (Merino et al., 2020). Актинобактерии могут разлагать сложные органические вещества в составе микробных ассоциаций, формирование которых может быть обусловлено способностью актинобактерий к образованию сложно организованных колоний на твердых субстратах (Rosenberg et al., 2014). Кроме того, с учетом обнаружения генов пути Вуда-Льюнгдаля у актинобактерий, для их отдельных представителей, детектированных в воде скважины 49-Э, можно предположить роль первичных продуцентов.

Роль продуцентов органического вещества в сообществе воды скважины 49-Э могут выполнять и археи вида *Methanothermobacter thermautotrophicus*, составляющие вторую по численности группу прокариот (11.5% сообщества, табл. 1). Эти археи являются строгими анаэробами, умеренными термофилами, типичными гидрогенотрофными метаногенами, восстанавливающими CO_2 в метан с водородом или формиатом в качестве доноров электронов (Wasserfallen et al., 2000). Помимо них, в микробном сообществе воды скважины 49-Э в значительном количестве присутствуют еще 2 группы некультивируемых архей с предполагаемой способностью к автотрофному ацетогенному росту. Это археи вышеописанного

порядка Hadarchaeales филума Hadarchaeia (2.4% сообщества) и класса Bathvarchaeia филума Crenarchaeota (2.5%). У последних на основании геномного анализа предполагается наличие способности к гидрогенотрофному метаногенезу из СО, СО₂ и метанола, к ацетогенезу, а также к диссимилянионному восстановлению соелинений азота и серы (Evans et al., 2015; He et al., 2016; Thomas et al., 2020). Интересно, что в воде скважины 49-Э представлен филотип Hadarchaeales, не встречавшийся в воде скважины 46, где археи этого класса доминировали, а его наиболее близкородственный клон был детектирован в термальном вулканическом местообитании, тогда как клоны, родственные Hadarchaeales из воды Ессентуки № 17, происходили из холодных подземных экосистем (табл. 1). Подобное различие может отражать разницу в гидрохимических характеристиках этих вод, способствующих накоплению в них организмов с различными метаболическими свойствами.

Вероятнее всего, разницей в физико-химических условиях объясняется и существенное различие представленности фирмикут рода Desulfitobacterium, относящихся к обособленному классу Desulfitobacteriia (Parks et al., 2020), в водах Ессентуки № 4 (свыше 10% разнообразия сообщества) и Ессентуки № 17 (менее 0.3% сообщества). Бактерии этого рода являются органотрофами, способными к различным типам анаэробного дыхания, наиболее геохимически значимым из которых можно считать железоредукцию. В частности, Desulfitobacterium metallireducens — культивируемый организм, наиболее близкородственный ессентукскому филотипу этого рода (94% сходства V4-участка гена 16S pPHK; табл. 1) - способен к восстановлению Fe(III), Mn(IV) и к восстановительному дегалогенированию хлоруглеводородов (Finneran et al., 2002). В осадках морского происхождения, составляющих водоносный горизонт, вскрываемый скважиной 49-Э, хлоруглеводороды могут локально присутствовать как продукты пиролиза или термолиза терпенов, аминокислот, флавоноидов и других компонентов биомассы водорослей (Paul, Pohnert, 2011).

Доля остальных фирмикут в сообществе воды Ессентуки № 4 составляет 13.2% и распределена между 21 филотипом. Из них наибольшую представленность имеют филотипы некультивируемых групп D8A-2 (2.3%) и DTU014 Incertae sedis (3.3%), а также филотипы, относящиеся к классам *Clostridia* (2.3% суммарно) и *Desulfotomaculia* (2.0% суммарно). Последняя группа филотипов включает в себя термофильных анаэробных автотрофов родов *Ammonifex* и *Thermodesulfitimonas*, восстанавливающих нитраты, серу, или ее соединения с водородом или формиатом в качестве донора электронов, а также синтрофных органотрофов рода *Pelotomaculum* и группу некультивируемых бактерий SCADC1-2-3 в семействе термофильных сероредукторов *Desulfurisporaceae*. Ближайший культивируемый организм, родственный филотипу SCADC1-2-3 скважины 49-Э, относится к виду *Desulfofundulus kuznetsovii* (97.0% сходства, табл. 1), выделенному из минеральной подземной термальной воды, и является термофильным органотрофным сульфатредуктором (Назина и соавт., 1988; Watanabe et al., 2018).

Помимо актинобактерий, метаногенных архей и фирмикут, заметную долю микробного сообщества воды типа Ессентуки № 4 составляют филотипы некультивируемой группы Parcubacteria уровня класса в филуме Patescibacteria (5.1%). Класс Parcubacteria включает в себя несколько различных групп некультивируемых организмов, метаболизм которых остается плохо охарактеризованным, несмотря на публикацию нескольких неполных геномов их представителей. Некультивируемые бактерии класса Parcubacteria были ранее детектированы в разнообразных анаэробных экосистемах с высокой концентрацией органики, например, в донных осадках и рубце жвачных, однако наибольшая их численность была зафиксирована в холодных пресноводных экосистемах Шпицбергена (Sułowicz et al., 2020).

Филотип ТТА-В15 уровня семейства в порядке Caldisericales (4.6% сообщества), обнаруженный в воде скважины 49-Э, относится к филуму Caldisericota. Ранее этот филотип был детектирован в различных термальных экосистемах (Chen et al., 2004). Клоны, наиболее близкородственные ессентукским ТТА-В15 также были выявлены в анаэробных термальных местах обитания — в глубинном нефтяном месторождении и термофильном метантенке (табл. 1). Данные о физиологии и геномике этих организмов пока отсутствуют. Единственный культивируемый представитель филума – вид Caldisericum exile – не является близкородственным ессентукским филотипам ТТА-В15, которые имеют большее сходство гена 16S рРНК (84.0%) с гипертермофильным органотрофным фирмикутом Calditerricola yamamurae (табл. 1).

Некультивируемая группа бактерий Sh765B-AG-111 уровня порядка в классе *Dehalococcoidia* (филум Chloroflexi, 1.6% сообщества) была впервые детектирована в образцах почвы из хвостохранилища уранового рудника в бассейне Колорадо (https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/26005692). Геномные данные и, соответственно, сведения о возможном типе метаболизма представителей этой группы в настоящее время отсутствуют. Клон, филогенетически идентичный (100% сходства) ессентукским последовательностям группы Sh765B-AG-111, был детектирован в керне морской осадочной породы, в анаэробной среде (табл. 1). Ближайший родственный культивируемый организм имеет довольно низкое сходство гена 16S pPHK с ессентукскими представителями Sh765B-AG-111 (90.6%; табл. 1) и относится к виду *Dehalogenimonas formicexedens* (табл. 1), катаболизм которого основан на восстановительном дегалогенировании хлоруглеводородов с формиатом или водородом в качестве доноров электронов (Key et al., 2017).

Некультивируемые ацидобактерии класса *Aminicenantales* (2.3% сообщества), были впервые детектированы в Обсидиановом горячем источнике Йеллоустоунского парка как филотип OP8 и в настоящее время идентифицированы в разнообразных наземных и морских экосистемах. На основании реконструкции генома представителя этого таксона из глубинной нефтепоисковой скважины в Томской области удалось предсказать экологическую роль этих организмов как деструкторов полисахаридов в анаэробных условиях путем сбраживания или сопряжения с нитритным дыханием (Kadnikov et al., 2019).

Бактерии класса *Thermodesulfovibrionia*, доминировавшие в воде Ессентуки № 17, составили существенно меньшую (2.3%) долю микробного сообщества в воде из скважины 49-Э и были представлены видом *Thermodesulfovibrio yellowstonii* — термофильного органотрофного сульфатредуктора (табл. 1). Также были обнаружены филотипы (1.1% сообщества), близкородственные сульфатредуцирующим бактериям рода *Desulfobacca* филума Desulfobacterota.

Клостридии представлены в сообществе воды скважины 49-Э широким разнообразием малочисленных филотипов, из которых наибольшую численность имеют термофильные анаэробы рода *Thermincola* (0.8%). Представители этого рода способны восстанавливать минералы Fe(III), а также осуществлять электрогенез – перенос электронов на химически инертные аноды, либо на твердые соединения, обладающие электронной проводимостью (Wrighton et al., 2008). Такими соединениями могут служить минералы переменновалентных элементов в водовмещающих пластах скважины 49-Э.

Минорная часть микробных сообществ вод обеих исследованных скважин 46 и 49-Э представлена широким разнообразием филотипов, различных по метаболическим свойствам их культивируемых представителей. Большинство из них обладает тем или иным типом органотрофного метаболизма и также может выполнять функцию деструкторов органического вещества в сообществе. Их геохимическая роль неопределенна, особенно, учитывая их низкую численность. Определение конкретной экологической роли малочисленных представителей "разреженной биосферы" в том или ином микробном сообществе невозможно без изучения их культуральными методами, которое зачастую затруднено низкой концентрацией клеток таких микроорганизмов.

		43

Субстраты	Вода из скважины 46	Вода из скважины 49-Э
Сидерит + CO ₂	Halothiobacillus (82.1%) Desulfovibrio (3.4%) Aerosphaera (3.0%) Comamonas (1.7%) Pseudomonas (1.0%)	Actinotalea (93.5%) Pseudomonas (1.2%)
Биотит + CH_4	Halothiobacillus (99.9%)	Halothiobacillus (95.7%) Actinotalea (3.8%)
Глауконит + CH ₄	Halothiobacillus (99.8%)	Cellulomonas (95.7%) Peptostreptococcaceae uncultured (0.6%)
Магнетит + CH ₄	Halothiobacillus (99.7%)	Halothiobacillus (92.7%) Actinotalea (6.6%)

Таблица 2. Филогенетический состав накопительных культур, полученных из проб воды Ессентуки № 17 и № 4 скважин 46 и 49-Э, с минералами железа в качестве доноров или акцепторов электронов. Указаны филогенетические группы, представленность которых в культурах составляет ≥1%

Накопительные и чистые культуры из вод скважин 46 и 49-Э. При использовании проб воды скважин 46 и 49-Э в качестве посевного материала на селективных средах (см. Методы) были получены первичные накопительные культуры с минералами железа глауконитом, биотитом, сидеритом и синтезированным магнетитом, выбранными как наиболее распространенные доноры или акцепторы электронов, которые могут быть использованы микроорганизмами, населяющими глубинные водовмещающие породы. Сидерит – минерал, содержащий только Fe(II) — может служить только источником энергии (донором электронов) для микроорганизмов. Все остальные минералы содержат как окисленную (Fe(III)), так и восстановленную (Fe(II)) форму железа и могут быть использованы микроорганизмами как высокопотенциальные акцепторы или доноры электронов. С учетом полученных данных о преобладании СО₂ и метана в газовой фазе вод Ессентуки № 4 и № 17, а также данных о существенной доле потенциальных автотрофов и метанотрофов в микробных сообществах этих вод, в качестве основных источников углерода и, соответственно, акцептора и донора электронов для накопительных культур были выбраны газообразные CO₂ и CH₄. Рост каждой из культур с сидеритом сопровождался изменением цвета минерала с рыжего на светлосерый, окраска остальных минералов в культурах не изменялась. Потребления метана не было зафиксировано ни в одном из вариантов. Во всех культурах доминировали морфотипы некрупных палочек, ассоциированных с минеральными частицами и зачастую образующих плотные агрегаты (рис. 16, 1г). Из-за плотной колонизации поверхности минералов определение численности микроорганизмов было затруднено. Приблизительная численность клеток в культурах с метаном составила не менее 5×10^6 кл./мл, а в культурах с

сидеритом и CO₂ — на порядок ниже, 5 × 10⁵ кл./мл. Добавление витаминов стимулировало рост всех накопительных культур, поэтому дальнейшие их пересевы проводили уже на средах с добавлением раствора витаминов. Второй пересев первичных накопительных культур в те же условия не привел к уменьшению численности микроорганизмов и их морфотипов. Для вторых пересевов накопительных культур был определен филогенетический состав методом высокопроизводительного секвенирования V4-участков генов 16S рРНК. Результаты анализа представлены в табл. 2. В большинстве накопительных культур доминировали гаммапротеобактерии рода Halothiobacillus (Whitman, 2015). В культуре из скважины 49-Э, выросшей на глауконите с метаном (рис. 1в, 1г) преобладали актинобактерии рода Cellulomonas, а в культуре, выросшей на сидерите с СО₂ – актинобактерии рода Actinotalea. Вторые пересевы накопительных культур из воды скважины 46, с метаном и смешанными минералами Fe(II/III), привели к получению почти чистых культур, содержащих до 99.9% Halothiobacillus по данным 16S-профилирования.

Методом 10-кратных разведений представитель *Halothiobacillus* из воды типа Ессентуки № 17 скважины 46 был выделен в чистую культуру и обозначен как штамм Es46-Z0520. Анализ полной последовательности гена 16S pPHK выявил 99.6% сходства нового штамма с типовым штаммом вида и рода *Halothiobacillus neapolitanus* (Whitman, 2015). Дальнейшие эксперименты выявили способность выделенного штамма к аэробному росту с тиосульфатом в качестве донора электронов, что позволяет отнести его к факультативным анаэробам.

Численность гаммапротеобактерий этого рода в сообществе воды скважины 46 не превышала 0.3%. Типовой штамм вида *H. neapolitanus* является



Рис. 1. Фотографии накопительных культур из воды скважины 49-Э (вторые пересевы), выросших на магнетите (а, б) и глауконите (в, г) в присутствие метана в газовой фазе. Слева (а, в) – препараты в световом фазовоконтрастном микроскопе, справа (б, г) – те же препараты, окрашенные красителем акридиновым оранжевым, в флуоресцентном микроскопе. Клетки образуют плотные агрегаты вокруг частиц минералов, обозначенных стрелками. Масштабные линей-ки – 10 мкм.

хемолитоавтотрофом, окисляющим серу в аэробных условиях и фиксирующим CO₂ посредством цикла Кальвина. Этот штамм служит модельным организмом для изучения структуры и функций карбоксисом, содержащих ключевой фермент цикла Кальвина рибулозобисфосфаткарбоксилазу (Menon et al., 2008). Экологическая роль этого минорного компонента микробных сообществ вод типов Ессентуки № 17 и № 4 требует дальнейшего изучения. Не исключено, что численность бактерий данного штамма и его значимость в сообществе как продуцента органического вещества резко возрастает в случае подмешивания аэрированных пресных вод к бескислородным минеральным.

Таким образом, анализ микробных сообществ минеральных вод скважин 46 и 49-Э выявил доминирование в обоих из них некультивируемых микроорганизмов глубоких филогенетических линий (уровня филумов, классов, порядков), которые, по-видимому, эволюционировали обособленно от поверхностной биосферы и могут представлять собой реликты верхнемеловой микрофлоры. Интересно, что наиболее близкородственные клоны большинства выявленных нами филотипов были детектированы в термальных водных экосистемах или в анаэробных экотопах, приуроченных к месторождениям различных углеводородов (табл. 1). В обоих исследованных нами микробных сообществах широко представлены потенциальные хемосинтезирующие микроорганизмы, способные к фиксации СО₂ в биомассу, метан и/или ацетат, большинство которых еще не выделено в чистые культуры. Такие организмы обусловливают формирование замкнутых сообществ, не связанных непосредственными трофическими связями с поверхностными экосистемами Земли и их фотосинтетической продукцией биомассы. Анализ микробного сообщества воды скважины 46 выявил структуру,

характерную для классической пищевой пирамиды. В нем преобладают потенциально автотрофные микроорганизмы (такие, как Hadarchaeota), в то время как органотрофные организмы, зависящие от первичной продукции биомассы и специализирующиеся на потреблении различных ее компонентов (например, археи класса Thermoplasmata, нитроспиры класса Thermodesulfovibrionia или фирмикуты группы D8A-2), имеют меньшую представленность, но отличаются большим разнообразием (табл. 1, рис. 2а). Микробное сообщество воды скважины 49-Э характеризуется иной структурой, а именно: значительно большим филогенетическим разнообразием; значительной долей прокариот с неидентифицированным филогенетическим положением (5.4% сообщества, табл. 1); сниженной долей потенциальных автотрофов; широким разнообразием органотрофов, потенциально способных разлагать сложные органические вещества, в том числе, захороненную органику (полисахариды, белки, углеводороды); преобладанием культивируемых гидрогенотрофных метаногенов среди организмов с газовым питанием (рис. 2б). Одной из наиболее вероятных причин этих отличий является нестабильность температурного режима скважины 49-Э (Потапов, 2017), которая, в свою очередь, может быть связана с подмешиванием пресных гидрокарбонатных натриевых вод к минеральным в водоприемном интервале скважины 49-Э (на глубинах 580-865 м). Отсюда и отсутствие классического соотношения авто- и гетеротрофных микроорганизмов в сообществе воды скважины 49-Э, характерного для сбалансированного микробного сообщества воды скважины 46.

Важной общей особенностью микробных сообществ исследованных минеральных подземных вод является преобладание в них микроорганизмов с газовым питанием — в первую очередь, метанотрофов и метаногенов, соответственно, образующих и поглощающих СО₂. Это наблюдение хорошо согласуется с преобладанием углекислоты в газовой составляющей минеральных вод, а также с существенным (десятки процентов) содержанием в них метана. Таким образом, охарактеризованные микробные сообщества могут оказывать влияние на газовую компоненту вскрываемых минеральных вод, а, следовательно, и на их бальнеологическую ценность. Метаболическая активность доминирующих групп микроорганизмов этих сообществ может быть одной из причин наблюдаемых флуктуаций содержания растворенной и свободной углекислоты, а также концентрации гидрокарбонат-иона в минеральных водах скважин 46 и 49-Э. Высокая численность анаэробных метанотрофов в водах скважины 46 и широкое разнообразие анаэробно дышащих органотрофов в водах скважины 49-Э подразумевают формирование различных синтрофных ассоциаций в микробных сообществах этих вод, повышающих термодинамическую эффективность процессов окисления метана или органического вещества в анаэробной восстановительной обстановке. Такие синтрофные ассоциации, как правило, формируются в биопленках, обрастающих твердые поверхности. В условиях водовмещающих пород биопленки могут возникать на поверхности минералов переменновалентных элементов, в первую очередь, серы и железа, которые могут быть использованы в качестве доноров или акцепторов при межвидовом переносе электронов. При высокой метаболической активности синтрофные ассоциации будут оказывать существенное влияние на состав и подвижность соединений железа и серы в водовмешающих отложениях. вскрываемых скважинами 46 и 49-Э Новоблагодарненского участка Ессентукского месторождения. Косвенным подтверждением такого влияния может служить повышенное содержание железа в водах, выведенных скважинами 46 и 49-Э, которое, в свою очередь, может отражать повышенное содержание этого элемента в водовмещающих породах и его активное вовлечение в биогеохимические циклы. Это предположение соотносится с обнаружением в водах, выведенных скважинами 46 и 49-Э, разнообразных таксонов микроорганизмов, для которых показана способность к диссимиляционному восстановлению соединений Fe(III) или серы.

Выявленное нами доминирование некультивируемых микроорганизмов новых глубоких филогенетических линий в обоих микробных сообществах и вероятная независимость этих сообществ от поверхностной биосферы, обеспечиваемая хемосинтетической продукцией биомассы, указывают на необходимость дальнейшего детального изучения функционирования подземных экосистем водовмещающих пород Ессентукского месторождения минеральных вод и региона КМВ в целом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по геолого-гидрохимической характеристике объектов, определению филогенетического состава микробного сообщества, выделению накопительных и чистых культур и анализу данных выполнены при поддержке проекта РНФ № 21-14-00333. Кроме того, работы СНГ, ААМ, ДГЗ по отбору и фиксации проб для хранения и дальнейшей обработки проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с использованием животных в качестве объектов.



Рис. 2. Предполагаемые трофические связи в микробных сообществах вод и водовмещающих пород, вскрываемых скважинами 46 (а) и 49-Э (б). Пунктиром указаны взаимосвязи, предсказанные с малой достоверностью из-за отсутствия геномных данных об участвующих в них микроорганизмах. Подчеркнуты названия таксонов, для представителей которых имеются достоверные сведения о физиологических свойствах или их геномных детерминантах. РОВ – растворенное органическое вещество, C_xH_yCl – хлоруглеводороды, которые могут присутствовать в исследованных водах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильюй гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 812–817.

Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. The influence of sulfurcompounds on the growth of halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* // Microbiology (Moscow). 1992. V. 61. P. 563–571.

Кудлаенко Л.Н. О роли биохимических процессов в изменении состава титонских и валанжинских минеральных вод // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. 1976. № 3. С. 70–74.

Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тощаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655– 664.

Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.

Муравлева Р.Е., Рублева Г.А., Тимашёва И.Н. Санитарно-бактериологическая оценка и биологическая активность минеральной воды скважины 9-бис Нагутского месторождения // Курортные ресурсы и их использование. Сб. научных трудов Пятигорского НИИ курортологии и физиотерапии / Под ред. Кривобокова Н.Г. Пятигорск, 1989. С. 113–119.

Назина Т.Н., Иванова А.Е., Канчавели Л.П., Розанова Е.П. Новая спорообразующая термофильная метилотрофная сульфатвосстанавливающая бактерия Desulfotomaculum kuznetsovii sp. nov. // Микробиология. 1988. Т. 57. С. 823–827.

Nazina T.N., Ivanova A.E., Kanchaveli L.P., Rozanova E.P. Desulfotomaculum kuznetsovii sp. nov., a new spore-forming thermophilic methylotrophic sulfate-reducing bacterium // Microbiology (Moscow). 1988. V. 57. P. 823–827.

Потапов Е.Г., Дубинина Г.А., Данилов С.Р., Гаджиханова С.У., Щелкунов А.В., Грабович М.Ю. Физико-химические и микробиологические исследования подземных минеральных вод района КМВ // Курортная медицина. 2014. № 4. С. 14–20.

Потапов Е.Г., Данилов С.Р., Гаджиханова С.У. Генезис углекисло-сероводородных минеральных вод Ессентукского месторождения по данным гидрохимических, микробиологических и изотопных исследований // Курортная медицина. 2017. № 1. С. 11–16.

Потапов Е.Г. Аноксическое маастрихт-датское событие и его влияние на гидрохимический облик подземных минеральных вод района Кавказских Минеральных Вод // Курортная медицина. 2019. № 3. С. 4–15.

Скопина М.Ю., Васильева А.А., Першина Е.В., Пиневич А.В. Разнообразие малочисленности: феномен "Разреженной бактериальной биосферы" // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 248–260.

Skopina M.Yu., Vasileva A.A., Pershina E.V., Pinevich A.V. Diversity at low abundance: the phenomenon of the Rare

МИКРОБИОЛОГИЯ том 91 № 1 2022

Bacterial Biosphere // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 272–282.

Шинкаренко А.Л. Гидрогеологическая характеристика и вопросы генезиса Ессентукских углекислых вод. Отчет. Пятигорск: Пятигорский НИИ курортологии и физиотерапии, 1941. 86 с.

Baker B.J., Saw J.H., Lind A.E., Lazar C.S., Hinrichs K.-U., Teske A.P., Ettema T.J.G. Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface Archaea, Hadesarchaea // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. Art. 16002.

Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. Bergey's Manual Trust, Hoboken, New Jersey, Wiley, 2015.

Biddle J.F., Lipp J.S., Lever M.A., Lloyd K.G., Sørensen K.B., Anderson R., Fredricks H.F., Elvert M., Kelly T.J., Schrag D.P., Sogin M.L., Brenchley J.E., Teske A., House C.H., Hinrichs K.U. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems of Peru // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3846–3851.

Bird J.T., Tague E.D., Zinke L., Schmidt J.M., Steen A. D., Reese B., Marshall I.P.G., Webster G., Weightman A., Castro H.F., Campagna S.R., Lloyd K.G. Uncultured microbial phyla suggest mechanisms for multi-thousand-year subsistence in Baltic Sea sediments // mBio. 2019. V. 10. e02376-18.

Chen C.-L., Macarie H, Ramirez I., Olmos A., Ong S.L., Monroy O., Liu W.-T. Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate // Microbiology (SGM). 2004. V. 150. P. 3429– 3440.

Christopoulou-Aletra H., Togia A., Varlami C. The "smart" Asclepieion: A total healing environment // Arch. Hellenic Med. 2010. V. 27. P. 259–263.

Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genomecentric metagenomics // Science. 2015. V. 350. P. 434–438. Finneran K.T., Forbush H.M., VanPraagh C.V.G, Lovley D.R. Desulfitobacterium metallireducens sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals

and humic acids as well as chlorinated compounds // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1929–1935. *França L., Albuquerque L., da Costa M.S. Cavicella subterranea* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep mineral-water acquifer and emended description of the species *Parlusidib*.

aquifer, and emended description of the species *Perlucidibaca piscinae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 3812–3817.

Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // Protoc. Exch. 2016.

https://doi.org/10.1038/protex.2016.030

He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Fang J., Xie J., Sievert S.M., Wang F. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyar-chaeota widespread in marine sediments // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. Art. 16035.

Hinrichs K.-U., Hayes, J.M., Sylva S.P., Brewer P.G., De-Long E.F. Methane-consuming archaebacteria in marine sediments // Nature. 1999. V. 398. P. 802–805.

Huber J.A., Johnson H.P., Butterfield D.A., Baross J.A. Microbial life in ridge flank crustal fluids // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 88–99. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.

Lino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K., Igarashi Y., Haruta S. Candidatus Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata* // Microbes Environ. 2013. V. 28. P. 244–250.

Jousset A., Bienhold C., Chatzinotas A., Gallien L., Gobet A., Kurm V., Küsel K., Rillig M.C., Rivett D.W. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings // ISME J. 2017. V. 11. P. 853–862.

Kadnikov V., Mardanov A., Beletsky A., Karnachuk O., Ravin N. Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle // Extremophiles. 2019. V. 23. P. 189–200.

Kato S., Hashimoto K., Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via semiconductive FeO_x minerals // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 1646–1654.

Key T.A., Bowman K.S., Lee I., Chun J., Albuquerque L., da Costa M.S., Rainey F.A., Moe W.M. Dehalogenimonas formicexedens sp. nov., a chlorinated alkane-respiring bacterium isolated from contaminated groundwater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1366–1373.

Krauze P., Kämpf H., Horn F., Liu Q., Voropaev A., Wagner D., Alawi M. Microbiological and geochemical survey of CO₂dominated mofette and mineral waters of the Cheb Basin, Czech Repoublic // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 2446.

Lloyd K.G., Alperin M.J., Teske A. Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 2548–2564.

Leclerc H., da Costa M.S. Microbiology of natural mineral waters // Technology of Bottled Water. Second edn. / Eds. Senior D., Dege N. Blackwell Publishing Ltd., 2005. P. 325–387.

Lee J., Koo T., Yulisa A., Hwang S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition // J. Environ. Manage. 2019. V. 241. P. 418–426.

Lesaulnier C.C., Herbold C.W., Pelikan C., Berry D., Gérard C., Le Coz X., Gagnot S., Niggemann J., Dittmar T., Singer G.A., Loy A. Bottled aqua incognita: microbiota assembly and dissolved organic matter diversity in natural mineral waters // Microbiome. 2017. V. 5. P. 126.

Menon B.B., Dou Z., Heinhorst S., Shively J.M., Cannon G.C. Halothiobacillus neapolitanus carboxysomes sequester heterologous and chimeric RubisCO species // PLoS One. 2008. Art. 0003570.

Merino N., Kawai M., Boyd E.S., Colman D. R., McGlynn S.E., Nealson K.H., Kurokawa K., Hongoh Y. Single-cell genomics of novel actinobacteria with the Wood–Ljungdahl pathway discovered in a serpentinizing system // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1031.

Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // Life. 2021. V. 11. P. 953.

Parkes R.J., Webster G., Cragg B.A., Weightman A.J., Newberry C.J., Ferdelman T.G., Kallmeyer J., Jørgensen B.B., Fry J.C. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time // Nature. 2005. V. 436. P. 390– 394.

Parks D.H., Chuvochina M., Chaumeil PA., Rinke C., Mussig A.J., Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 1079–1086.

Paul C., Pohnert G. Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae // Nat. Prod. Rep. 2011. V. 28. P. 186–195.

Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A., Gonzalez-Lopez J. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjaron area (Spain) // J. Appl. Bacteriol. 1986. V. 61. P. 365–372.

Sala-Comorera L., Caudet-Segarra L., Galofréc B., Lucena F., Blanch A.R., García-Aljaro C. Unravelling the composition of tap and mineral water microbiota: Divergences between next-generation sequencing techniques and culture based methods // Int. J. Food Microbiol. 2020. V. 334. Art. 108850.

Sohm J.A., Webb E.A., Capone D.G. Emerging patterns of marine nitrogen fixation // Nature Rev. Microbiol. 2011. V. 9. P. 499–508.

Soriano-Lerma A., Pérez-Carrasco V., Sánchez-Marañón M., Ortiz-González M., Sánchez-Martín V., Gijón J., Navarro-Mari J.M., García-Salcedo J.A., Soriano M. Influence of 16S rRNA target region on the outcome of microbiome studies in soil and saliva samples // Sci. Rep. 2020. V. 10. Art. 13637.

Sułowicz S., Bondarczuk K., Ignatiuk D., Jania J.A., Piotrowska-Seget Z. Microbial communities from subglacial water of naled ice bodies in the forefield of Werenskioldbreen, Svalbard // Sci. Total Environ. 2020. V. 723. Art. 138025.

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

The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2014.

Thomas C., Francke A., Vogel H., Wagner B., Ariztegui D. Microbial life in ridge flank crustal fluids settings // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 1736.

Timmers P.H.A., Welte C.U., Koehorst J.J., Plugge C.M., Jetten M.S.M., Stams A.J.M. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea // Archaea. 2017. P. 1654237.

https://doi.org/10.1155/2017/1654237

Umezawa K., Kojima H., Kato Y., Fukui M. Dissulfurispira thermophila gen. nov., sp. nov., a thermophilic chemolithoautotroph growing by sulfur disproportionation, and proposal of novel taxa in the phylum Nitrospirota to reclassify the genus *Thermodesulfovibrio* // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126184.

Wang F.P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., Hinrichs K.U., Zhang X.X., Xiao X., Boon N. Methanotrophic archaea pos-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 91 № 1 2022

sessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways // ISME J. 2014. V. 8. P. 1069–1078.

Wasserfallen A., Nölling J., Pfister P., Reeve J., Conway de Macario E. Methanothermobacter gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, Methanothermobacter thermautotrophicus comb. nov., Methanothermobacter wolfeii comb. nov. and Methanothermobacter marburgensis sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 43–53.

Watanabe M., Kojima H., Fukui M. Review of Desulfotomaculum species and proposal of the genera Desulfallas gen. nov., Desulfofundulus gen. nov., Desulfofarcimen gen. nov. and Desulfohalotomaculum gen. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 2891–2899. *Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S.* Formation of methane by bacterial extracts // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. w2882–w2888.

Wrighton K.C., Agbo P., Warnecke F., Weber K.A., Brodie E.L., DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Andersen G.L., Coates J.D. A novel ecological role of the Firmicutes identified in thermophilic microbial fuel cells // ISME J. 2008. V. 2. P. 1146– 1156.

Zhang Y., Shuikui D., Qingzhu G., Ganjurjav H., Xuexia W., Wei G. "Rare biosphere" plays important roles in regulating soil available nitrogen and plant biomass in alpine grassland ecosystems under climate changes // Agricult. Ecosyst. Environ. 2019. V. 279. P. 187–193.

Diversity of Novel Uncultured Prokaryotes in Microbial Communities of the Yessentukskoye Underground Mineral Water Deposit

S. N. Gavrilov^{1, *}, E. G. Potapov², M. I. Prokof'eva¹, A. A. Klyukina¹, A. Yu. Merkel¹, A. A. Maslov³, and D. G. Zavarzina¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Pyatigorsk Research Institute of Balneology, Pyatigorsk, 357601 Russia
³Geological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Received September 17, 2021; revised September 26, 2021; accepted September 28, 2021

Abstract—Caucasean Mineral Waters is a unique territory, where various types of mineral waters with overall daily flow over 16000 m³ are concentrated in a relatively small area. The Yessentukskove deposit is characterized by high diversity of water types, of which Yessentuki nos. 17 and 4 are produced in the greatest amounts. Biogeochemical activity of microorganisms inhabiting the subsurface hydrosphere is one of the proposed mechanisms responsible for the genesis of these waters. The influence of microbial communities on the quality of balneological water resources is presently quite poorly studied. This is the first report on characterization of two communities inhabiting the water-bearing rocks and mineral waters of the Yessenukskove deposit. The 16S rRNA gene profiling of these communities revealed predominance of uncultured archaea of the phylum Hadarchaeota (36.6%) in the Yessentuki no. 17 water retrieved from the well 46 and of several new classes of uncultured actinobacteria (29.4%) in the Yessentuki no. 4 water retrieved from the well 49-E. Significant differences were revealed in the structure of microbial communities inhabiting the water-bearing horizons of these two wells having different hydrochemical characteristics. Enrichment and pure cultures of the microorganisms belonging to the less abundant taxa were obtained. Analysis of metadata on genomic properties of prokaryotes of the dominant taxa revealed in this work indicates their ability to grow chemoautotrophically and thus, their potential involvement in redox transformations of the water-bearing rocks and the gas component of mineral waters.

Keywords: mineral waters, subsurface ecosystems, microbial communities, uncultured microorganisms, rare biosphere, chemolithotrophy