

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЭРОБНЫЕ *THERMODESULFOVIBRIO* И АЭРОБНЫЕ *MEIOTHERMUS* СОСУЩЕСТВУЮТ В ГЛУБИННОЙ ТЕРМАЛЬНОЙ ВОДЕ

© 2023 г. А. П. Лукина^а, В. В. Кадников^б, И. И. Русанов^с, М. Р. Авакян^а, А. В. Белецкий^б,
А. В. Марданов^б, Н. В. Пименов^с, Н. В. Равин^б, О. В. Карначук^{а, *}

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

^б Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^с Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 13.12.2022 г.

Изучение микроорганизмов, обитающих в подземных водоносных горизонтах, основано на отборе проб воды, поступающих из глубинных скважин, и редко учитывает физико-химические процессы в системе вода–порода. Остается неясным, как метаболизируют аэробные прокариоты, обнаруживаемые под землей молекулярными методами. Для прямого определения отношения прокариот к кислороду необходимо культивирование. В настоящем исследовании проведено целевое выделение аэробных и анаэробных бактерий, обнаруженных в термальных радоновых водах на курорте Белокуриха молекулярными методами. Профилирование по гену 16S rPHK выявило доминирование представителей группы *Deionococcus*–*Thermus*, относящихся к роду *Meiothermus* (17.6% чтений) и считающихся строгими аэробами. Одновременно в воде присутствовали анаэробные сульфатредуцирующие *Thermodesulfovibrio*. Вода характеризовалась восстановительными и щелочными условиями. Целевое культивирование позволило выделить растущий аэробно *Meiothermus* sp. 1165, являющийся близким родственником *Meiothermus cerebureus*. Одновременно выделен алкалофильный анаэробный сульфатредуктор *Thermodesulfovibrio* sp. 1176. Измерение в воде Белокурихи интенсивности сульфатредукции с $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ продемонстрировало активный процесс, протекающий со скоростью 41.4 ± 1.06 мкг $\text{S}_{\text{восст}}/\text{л/сут}$ (1.29 нмоль S/мл/сут). Анализ генома штамма 1176 выявил присутствие различных механизмов, обеспечивающих относительную устойчивость к кислороду и окислительному стрессу и включающих супероксид редуктазу, рубредоксин, супероксид дисмутазу Fe-Mn семейства, каталазу-пероксидазу KatG и цитохром *bd* убихинол оксидазу. Низкий окислительно-восстановительный потенциал и интенсивный процесс анаэробной сульфатредукции подтверждают, что, в целом, подземные горизонты в Белокурихе характеризуются восстановительными условиями. Можно предположить пространственное разобщение аэробов и анаэробов в системе вода–порода, как это происходит в наземных микробных матах, а также протекание аэробных процессов в микрозонах.

Ключевые слова: подземная биосфера, аэробные и анаэробные прокариоты, сульфатредуцирующие бактерии, *Meiothermus*, *Thermodesulfovibrio*

DOI: 10.31857/S0026365622600833, **EDN:** FWKVNZ

Современные оценки предполагают, что 15% всей биомассы Земли приходится на обитающих в подземных горизонтах бактерий и архей (Bar-On et al., 2018). Микроорганизмы подземных водоносных горизонтов остаются наименее изученной частью микробиоты планеты, прежде всего, в силу малой доступности подземных местообитаний для исследований. Отбор проб водоносных горизонтов возможен через глубинные скважины, которые образно называют “окнами в подземный мир” (Pedersen, 2000). Особое значение имеют артезианские скважины, из которых вода

поступает под давлением, что исключает возможность контаминации наземными микроорганизмами. Однако один только отбор проб воды недостаточен для понимания активности прокариот, связанной с физическими и геологическими характеристиками биотопов. Подземные горизонты представляют насыщенные водой проницаемые породы. Взаимодействие вода–порода является важным фактором, определяющим распространение и активность прокариот. Современные исследования показывают, что минеральная компонента, например, содержание глины, влияет на

скорость роста различных таксонов бактерий в почве (Finley et al., 2022). Увеличение содержания минералов ближнего порядка (аллофана, имоголита, ферригидрита) угнетало рост бактерий. Одна из нерешенных загадок “подземной биосферы” — вопрос о возможности присутствия кислорода в глубинных слоях и использования его аэробными микробами. Традиционно считают, что глубинные горизонты изолированы от атмосферы и характеризуются восстановительными и олиготрофными условиями (Lovley, Chapelle, 1995; Kieft et al., 2005). В условиях “подземной биосферы” энергетический метаболизм ограничивается анаэробным дыханием и брожением.

В предварительных исследованиях термальной воды из подземных водоносных горизонтов, используемых в бальнеологических целях на курорте Белокуриха (Алтайский край), мы обнаружили, что значительную часть микробного сообщества составляет группа *Deionococcus*—*Thermus*, для которых предпочтительным является аэробный метаболизм. Одновременно вода характеризовалась отрицательными значениями окислительно-восстановительного потенциала и присутствием сульфатредуцирующих бактерий, включая *Thermodesulfovibrio*. Молекулярное профилирование сообщества прокариот позволяет определить таксономическое положение филоципов и определить их возможное отношение к присутствию/отсутствию кислорода в среде. Однако для окончательного подтверждения характера роста необходимы эксперименты с культурами.

Настоящее исследование посвящено целевому культивированию доминирующих филоципов бактерий, совмещенному с параллельным профилированием сообщества прокариот по гену 16S рРНК, и выяснению особенностей метаболизма путем измерения скорости процесса сульфатредукции и анализа генома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб, измерение физико-химических характеристик. Отбор проб воды проводили из скважины, обозначаемой 4Э и используемой в качестве источника минеральной радоновой воды на курорте Белокуриха. Пробы были отобраны дважды; для молекулярного анализа использовали воду, отобранную 08.08.2019. Для культивирования, измерения скорости сульфатредукции и параллельного молекулярного анализа пробы воды были отобраны 13.08.2021. Пробы воды отбирали на месте разлива скважины 4Э. Физико-химические параметры воды, рН, температуру и окислительно-восстановительный потенциал измеряли рН-метром HI18314F (“Hanna Instruments”, Германия). Элементный состав воды определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной

плазмой, как описано ранее (Карначук и соавт., 2015).

Измерение скорости сульфатредукции. Для измерения скорости сульфатредукции в условиях, приближенных к *in situ*, пробы воды разливали в пенициллиновые флаконы объемом 30 мл и закрывали резиновой пробкой без доступа воздуха. Аликвоты (300 мкл) $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (4 мкКи; “Perkin-Elmer”, США) вносили в пенициллиновые флаконы шприцем через резиновую пробку. Все измерения скорости сульфатредукции проводили в трех повторностях. Инкубировали флаконы в течение 24 ч при температуре 42°C, после чего фиксировали 1 мл 1 N раствора КОН. В лаборатории проводили разделение восстановленных форм серы кислотной перегонкой (кислотно-растворимые сульфиды) и восстановлением CrCl_2 (элементная, пиритная и органическая сера), как описано ранее (Карначук и соавт., 2006).

Выделение чистых культур. Для культивирования концентрировали инокулят путем фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Для получения накопительных культур аэробных представителей группы *Deionococcus*—*Thermus* были использованы среды DSMZ256, DSMZ86 и DSMZ1004. Получение накопительных культур проводили на агаризованной среде DSMZ256, DSMZ86 и жидкой среде DSMZ1004. Накопительные культуры инкубировали при температуре 45, 50, 55 и 60°C.

Среда DSMZ1004 была модифицирована добавлением 1 мл/л раствора микроэлементов по Волину (Modified Wolin’s mineral solution, DSMZ141) и 2 мл/л раствора витаминов по Видделю (Widdel, Bak, 1992). Также вносили 1 мл/л раствор селената и вольфрамата и 2 мл/л раствора сульфида натрия по Видделю—Баку (Widdel, Bak, 1992). В качестве донора электронов использовали глюкозу (10 мМ); рН среды доводили раствором NaHCO_3 (8%) до 7.5.

Для получения культуры *Thermodesulfovibrio* использовали пресноводную среду Видделя—Бака (Widdel, Bak, 1992), содержащую (в г/л): Na_2SO_4 — 4, KH_2PO_4 — 0.2, NH_4Cl — 0.25, NaCl — 1, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.4, KCl — 0.5, CaCl_2 — 0.113, 2 мл раствора витаминов, 1 мл раствора микроэлементов, по 1 мл раствора Na_2SeO_3 и Na_2WO_4 . Формиат (7.5 мМ) и ацетат (9 мМ) использовали в качестве донора электронов и $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — в качестве восстановителя.

Для определения филогенетического положения изолятов секвенировали ген 16S рРНК, амплифицированный с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации аналогичны описанным ранее (Frank et al., 2016). Последовательности генов 16S рРНК штаммов *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 и *Meiothermus* sp. 1165 депонированы

ны в GenBank NCBI под номерами OP919603 и OP926023 соответственно.

Анализ состава микробного сообщества. Образцы воды (объемом 50 л) фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры гомогенизировали, растирая с жидким азотом; препарат метабеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, Carlsbad, США).

Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'). Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотеки для секвенирования с помощью набора Nextera XT DNA Library Prep Kit (“Illumina”, США) по протоколам производителя. Полученную библиотеку секвенировали на MiSeq (“Illumina”) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v.3 (в формате парных чтений, 2 × 300 нт). Полученные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы FLASH v 1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011). В результате для образцов 2019 г. и 2021 г. было получено 137780 и 13979 последовательностей фрагментов генов 16S рРНК соответственно.

Последовательности фрагментов генов 16S рРНК кластеризовали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности с помощью программы USEARCH v. 11 (Edgar, 2010). Прочтения низкого качества, химерные последовательности и синглтоны удалялись алгоритмами USEARCH. Чтобы рассчитать относительные представленности ОТЕ, все полученные чтения были картированы на ОТЕ с глобальным порогом идентичности 97% с помощью USEARCH. Таксономическую классификацию ОТЕ проводили по базе последовательностей рРНК SILVA v. 138 с использованием алгоритма VSEARCH v. 2.14.1 (Rognes et al., 2016).

Полученные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номерами SRRXXXXX (образец 2019 г.) и SRRXXXXX (образец 2021 г.).

Секвенирование генома штамма *Thermodesulfovibrio* sp. 1176. Геномную ДНК выделяли с использованием набора Power Soil (“MO BIO Laboratories”, Carlsbad, CA, США) и секвенировали с использованием платформы Illumina MiSeq. Библиотеку готовили с использованием набора NEBNext Ultra II (“New England BioLabs”, Ipswich, MA, США). В результате секвенирования этой библиотеки на Illumina MiSeq с использованием реагентов MiSeq Reagent Kit v.3 (в формате парных чтений, 2 × 300 нт) получено 1051896 чтений.

Перекрывающиеся парные чтения были объединены с помощью FLASH v1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011), а последовательности с низким качеством были удалены с помощью Sickle v1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle/>). Чтения Illumina собирали в контиги с помощью SPAdes v.3.11.1 (Nurk et al., 2013). Поиск и аннотацию генов проводили с помощью сервера RAST (Brettin et al., 2015). Полноту драфт генома оценивали с помощью программы CheckM (Parks et al., 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики воды из скважины 4Э и скорость сульфатредукции. Температура воды скважины 4Э в момент отбора проб 08.08.2019 составляла 38.0°C, pH — 9.12 (табл. 1). Измеренный окислительно-восстановительный потенциал, –40 мВ, мог быть несколько завышен в силу того, что из-за конструкции подводящих путей не было возможности провести измерения непосредственно на изливе скважины. Измерения проводили в бутылки с пробой воды. Концентрация сульфата в воде изменялась от 88.6 мг/л в 2019 г., до 57.0 мг/л — в 2021 г. Заметной особенностью микроэлементного состава воды была высокая концентрация вольфрама, достигавшая 140 мкг/л. Также высокой была концентрация молибдена, составлявшая 38 мкг/л.

Средняя скорость сульфатредукции, измеренная в пробах воды в августе 2021 г., составляла 41.4 ± 1.06 мкг $S_{\text{восст.}}$ /л/сут (1.29 нмоль S/мл/сут). Большая часть (92.5%) восстановленной серы находилась в форме сероводорода (кислоторастворимая сера, КРС). Остальная часть метки находилась в форме серы, восстанавливаемой CrCl_3 (ХВС), которая может включать пирит (FeS_2), элементную и органическую серу.

Состав микробного сообщества. В микробном сообществе воды, отобранной из скважины 4Э в 2019 г., доминировали бактерии, доля архей составляла лишь 0.3% всех последовательностей генов 16S рРНК. На уровне филумов доминировали представители *Proteobacteria* (32.5%), *Deinococcota* (18.5%), *Candidatus Eremiobacterota* (13.8%), *Chloroflexi* (10.3%), *Patescibacteria* (6.8%), *Actinobacteriota* (4.2%), *Armatimonadota* (3.4%), *Planctomycetota* (2.6%), *Acidobacteriota* (2.5%), *Bacteroidota* (1.6%); доли остальных линий уровня филума не превышали 1% (рис. 1).

Большинство протеобактерий представляли классы альфа (24.3%) и гамма (8.2%). Наиболее многочисленная ОТЕ альфапротеобактерий, представлявшая 9.9% сообщества, имела 97.6%-ю гомологию последовательности гена 16S рРНК с *Parvibaculum lavamentivorans*, — аэробной гетеротрофной бактерией, идентифицированной в сточных водах (Schleheck et al., 2004). Также среди

Таблица 1. Физико-химические параметры воды скважины 4Э

Параметры и единицы измерения	Значения
pH	9.12
Температура, °C	38.0
Eh, мВ	–40
Содержание в воде, мг/л:	
SO ₄ ^{2–}	88.6
Cl [–]	11.3
NO ₃ [–]	4.6
F [–]	17.6
Na	69.3
Mg	0.0017
Ca	2.75
Si	26.2
K	1.06
Sr	0.070
W	0.140
Mo	0.038
Cs	0.030
B	0.29
Li	0.50
Fe	<0.02
Ba	0.00025
Se	0.00083
P	<0.2
Rb	0.012
Mn	0.000068
Al	0.0024
Ge	0.0050
Zn	0.0013
Cr	<0.0005
As	0.0026

альфапротеобактерий были обнаружены представители порядков *Caulobacterales* (2.0%), *Rhizobiales* (3.4%), *Rhodobacterales* (1.6%), *Sphingomonadales* (5.5%), *Acetobacterales* (0.3%) и *Azospirillales* (0.4%). На уровне рода были идентифицированы *Brevundimonas* (1.8%), *Rubellimicrobium* (1.3%), *Novosphingobium* (2.4%), *Sphingomonas* (2.9%), среди культивируемых представителей которых преобладают аэробные гетеротрофы, встречающиеся в почвах и водоемах (Dastager et al., 2008; Asaf et al., 2020; Liu et al., 2021). Среди гаммапротеобактерий были обнаружены семейства *Comamonadaceae* (2.3%) и *Hydrogenophilaceae* (5.4%); последнее включало род *Thiobacillus* (3.8%) и неклассифицируемые на

уровне рода филотипы. Представители *Thiobacillus* являются хемолитоавтотрофами, способными окислять железо или восстановленные соединения серы (Rawlings, Kusano, 1994).

Во втором по относительной численности филуме, *Deinococcota*, доминировал род *Meiothermus* (17.6%), наиболее многочисленный филотип которого (15.4%) был близок к *Meiothermus ruber* (99.1% идентичности по 16S рРНК). Представители этого рода – умеренно термофильные гетеротрофы, встречающиеся в термальных водах, включая подземные (Tindall et al., 2010). Около 0.9% сообщества составляли представители семейства *Deinococcaceae*.

Третья по численности линия, кандидатный филум *Eremiobacterota* (WPS-2), был представлен одной ОТЕ. Этот филум включает представителей с разнообразными путями метаболизма, включая аноксигенный фотосинтез, автотрофный рост за счет окисления атмосферного водорода и СО, анаэробное дыхание и органотрофию (Ji et al., 2021).

Около 6.8% сообщества составляют *Patescibacteria*, большая часть которых относится к одной ОТЕ кандидатного класса WWE3 (по таксономии Silva). Возможно, реальное содержание *Patescibacteria* даже выше, поскольку из-за небольших размеров клеток представителей этого филума часть их может теряться при использовании для сбора биомассы 0.2 мкм фильтра (Herrmann et al., 2019). Представители *Patescibacteria* характерны для грунтовых вод и преимущественно распространены в бескислородных средах, реже встречаются в подземных водах, содержащих кислород (Nelson, Stegen, 2015). *Patescibacteria* обладают небольшими геномами (обычно менее ~1 млн нт) и лишены многих ключевых биосинтетических путей (Brown et al., 2015). Предположительно, *Patescibacteria* являются паразитами или симбионтами других микроорганизмов (Ji et al., 2022).

Остальные филумы бактерий были в основном представлены линиями гетеротрофов, характерных для почв и подземных вод. Это *Chloroflexi* (в основном класс *Anaerolineae*), *Actinobacteria* (в основном *Corynebacteriales*, *Micrococcales* и *Solirubrobacterales*), *Armatimonadetes* (*Fimbriimonadales*), *Planctomycetes* (*Phycisphaerales*, *Gemmatales* и *Isosphaerales*), *Acidobacteria* (*Bryobacteriales* и *Blastocatellales*) и *Bacteroidota*.

Среди известных линий диссимиляционных сульфатредукторов были детектированы представители порядка *Desulfitobacteriales* филума *Firmicutes*, – *Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* и *Desulfurispora*, но их суммарная доля составляла менее 0.02%. Около 0.03% сообщества представлял ‘*Desulfurudis audaxviator*’, – эндемичная для глубинной подземной биосферы бактерия, ранее выделенная нами из подземных вод Западно-Сибирского региона (Karnachuk et al., 2019). Потенциальными

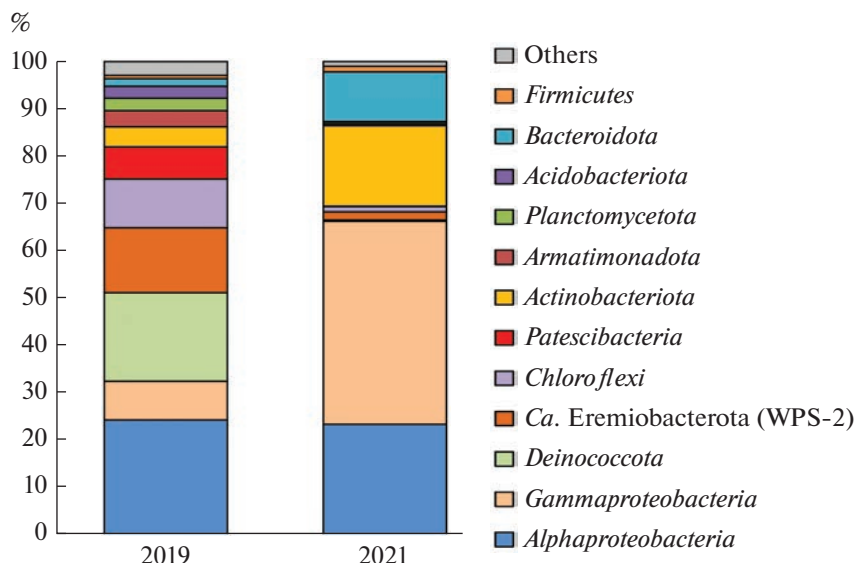


Рис. 1. Состав микробного сообщества на уровне филумов по данным профилирования гена 16S рРНК в 2019 и 2021 гг.

сульфатредукторами также могут быть представители класса *Thermodesulfovibrionia* филума *Nitrospirota* (0.6% сообщества), который включает термофильных сульфатредукторов рода *Thermodesulfovibrio*. Однако детектированные ОТЕ были филогенетически удалены от культивируемых *Thermodesulfovibrio* и не были классифицированы даже на уровне порядка. Отметим, что известные сульфатредукторы филума *Desulfibacterota* не были обнаружены.

Микробное сообщество воды, отобранной в 2021 г., содержало те же основные таксономические группы микроорганизмов, хотя их соотношения заметно отличались. Преобладали представители трех филумов *Proteobacteria* (66.3%, в основном класса гамма), *Actinobacteriota* (17.1%) и *Bacteroidota* (10.5%), доли филумов *Deinococcota*, *Candidatus Eremiobacterota*, *Chloroflexi* и *Patescibacteria* были намного ниже, чем в образцах 2019 г. (0.3, 1.7, 1.1 и 0.03% соответственно). Наиболее многочисленный филотип 2021 г. (21.9%), представляющий род *Cavicella* семейства *Moraxellaceae*, не был детектирован в 2019 г. Представитель этого рода, *Cavicella subterranea*, является органотрофным аэробом и был выделен из подземного водоносного горизонта глубиной 150 м в Португалии (França et al., 2015). Второй по численности филотип, актинобактерии рода *Dietzia*, представители которого могут окислять углеводороды (Ali et al., 2022), составляли 16.7% сообщества в 2021 г. и лишь 0.7% в 2019 г. Тем не менее, представители рода *Meiothermus* и неклассифицируемые *Thermodesulfovibrionia* были обнаружены и в образцах 2021 г., составляя, соответственно, 0.3 и 0.2% сообщества.

Выделение чистых культур. Учитывая результаты профилирования по гену 16S рРНК, полученные в 2019 г., целевыми филотипами для выделения в культуру были выбраны аэробные *Meiothermus* и строго анаэробные *Thermodesulfovibrio*. Для получения накопительных культур аэробных *Meiothermus* была использована среда DSMZ256, содержащая пептон и крахмал, и DSMZ86, содержащая триптон. Однако рост на агаризованной среде в условиях температур от 45 до 60°C отсутствовал. Одновременно наблюдали присутствие морфологически однородных палочковидных клеток, образующих тяжи, на среде DSMZ1004 с глюкозой для *Chloroflexi* при культивировании в анаэробных условиях при температуре 50°C. Последующее культивирование накопительной культуры в аэробных условиях на качалке (160 об./мин) на модифицированной среде DSMZ1004 привело к выделению чистой культуры, обозначенной как штамм 1165. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 1165 показал, что он относится к роду *Meiothermus* (рис. 2). Ближайшими родственниками являются *Meiothermus cerbereus* и *Meiothermus ruber* со сходством последовательностей гена 16S рРНК 99.13 и 97.8% соответственно. Штамм рос в узком диапазоне температур от 40 до 50°C, оптимальная температура роста составляла 50°C. При росте на жидкой среде штамм 1165 мог использовать в качестве субстрата крахмал, глюкозу, сахарозу, фруктозу, триптон, пептон и соевый пептон.

Целевое выделение *Thermodesulfovibrio* проводили на пресноводной среде Видделя–Бака с формиадом и ацетатом в качестве донора электронов и источника углерода и сульфитом в качестве акцептора, при 70°C; pH среды увеличивали до 8.5 с учетом

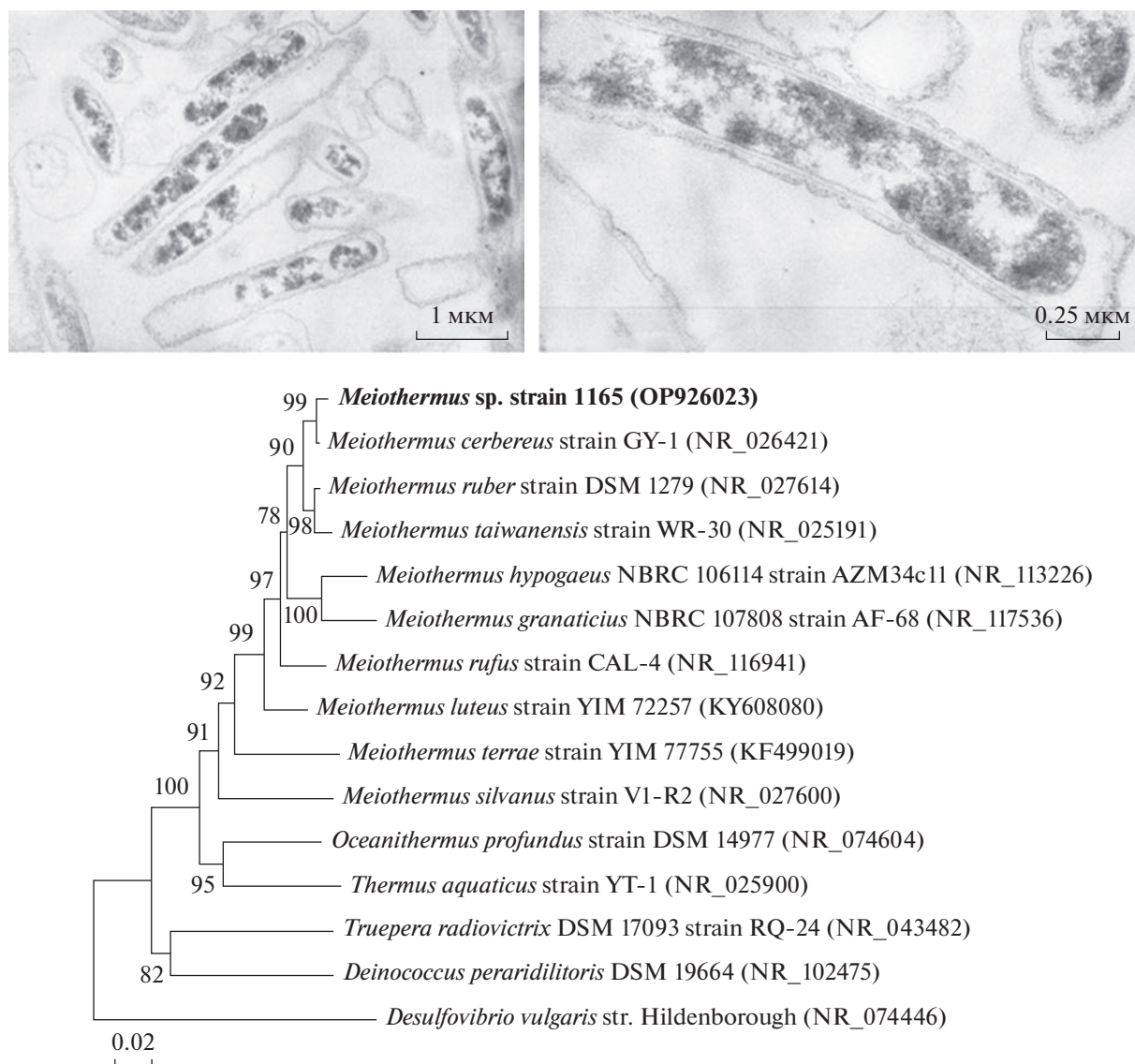


Рис. 2. Микрофотографии ультратонких срезов клеток и дерево, показывающее филогенетическое положение штамма *Meiothermus* sp. 1165 на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом Neighbor-Joining. Бутстреппы рассчитаны из 1000 итераций.

щелочной реакции среды в термальной воде. Полученный сульфидоген был обозначен как штамм 1176. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 1176 подтвердил, что бактерия относится к роду *Thermodesulfovibrio* (рис. 3). Ближайшим родственником штамма 1176 является алкалотолерантный *Thermodesulfovibrio* sp. N1, выделенный из термальных подземных вод мезозойских отложений в поселке Белый Яр Томской области (Frank et al., 2016). Проведенный анализ сходства нуклеотидных последовательностей геномов показал, что среднее сходство (ANI) штаммов 1176 и N1 составляет 99.13% и не превышает порог 95%, предложенный для разграничения видов (Chun et al., 2018). Молекулярные дан-

ные свидетельствуют о принадлежности штаммов N1 и 1176 к одному виду. Штамм 1176 рос в диапазоне температур от 37 до 65°C с оптимумом при 55°C. Штамм характеризовался широким диапазоном pH для роста от 5.5 до 12, с оптимумом 10.5.

Анализ генома *Thermodesulfovibrio* sp. 1176. Геном штамма *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 был получен в виде 32 контигов суммарной длиной 2083381 нт. Полнота собранного драфт генома оценивается CheckM в 99.1%. Проведенный анализ сходства нуклеотидных последовательностей геномов показал, что ANI между геномами штаммов 1176 и N1 (GCA_001707915) составляет 99.61%, что указывает на их принадлежность к одному виду (Chun et al., 2018). В геноме предсказано 2222 белок-ко-

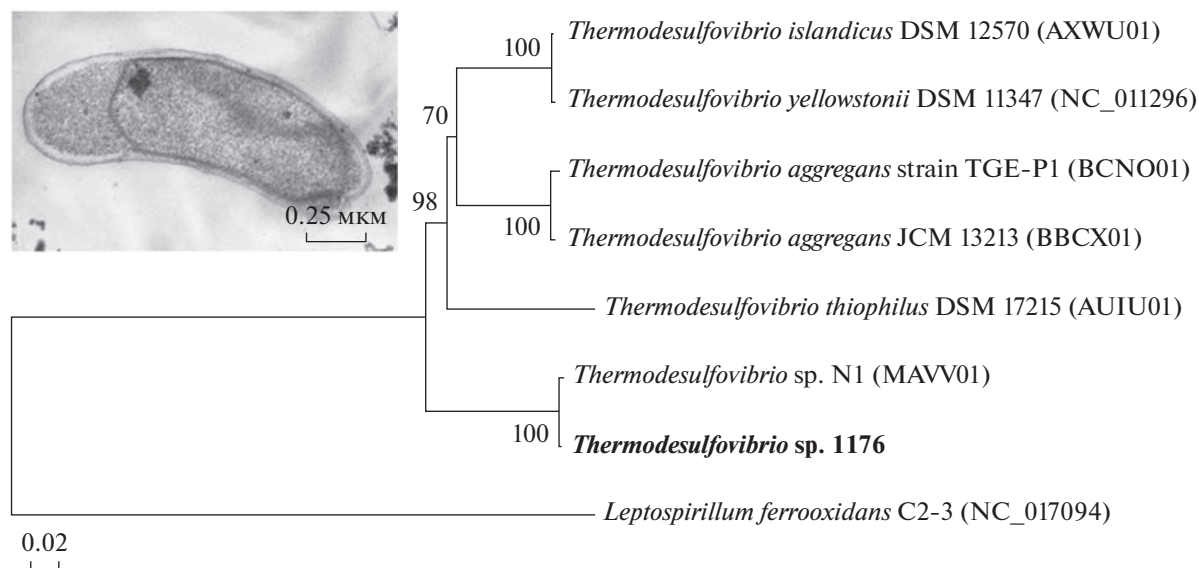


Рис. 3. Микрофотографии ультратонких срезов клеток и дерево, показывающее филогенетическое положение штамма *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 на основе анализа конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 одноклеточных белков-маркеров. Дерево построено методом Neighbor-Joining. Бутстреппы рассчитаны из 1000 итераций. Неясные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (pairwise deletion option). Общее количество позиций — 5040. Эволюционный анализ проведен в MEGA11.

дирующих гена, 3 гена рРНК и 46 генов транспортных РНК (тРНК). Сравнение геномов этих штаммов выявили минимальные отличия в наборах присутствующих у них генов; штамм-специфические гены, в основном, кодировали белки мобильных элементов и гипотетические белки с неизвестными функциями.

Анализ генома штамма 1176 показал, что он содержит набор генов диссимиляционной сульфат-редукции, включая сульфатаденил трансферазу, аденозин-фосфосульфат редуктазу AprAB, мембранно-связанный электрон-транспортный комплекс QmoABC, диссимиляционную сульфитредуктазу DsrABC и ассоциированный с ней комплекс DsrMKJOP. Наличие поглощающей гидрогеназы и форматдегидрогеназы указывает на возможность окисления водорода и формата. Помимо сульфата, штамм 1176 может использовать в качестве акцепторов электронов нитрит и тиосульфат, о чем свидетельствует присутствие соответствующих мембранно-связанных оксидоредуктаз. В отличие от *T. yellowstonii*, *T. aggregans* и *T. islandicus*, у штамма 1176, как и у штамма N1, отсутствует нитрогеназа. Общим для штаммов 1176 и N1 адаптивным признаком, связанным с алкалофилией, является наличие мультисубъединичного Na^+/H^+ антипортера Mnh семейства.

У штамма 1176 имеются различные механизмы, которые могут обеспечивать его относительную устойчивость к кислороду и окислительному стрессу. Наряду с обычно встречающимися у анаэробов супероксид редуктазой и рубредокси-

ном, в геноме кодируются характерные для аэробов супероксиддисмутаза Fe-Mn семейства и каталаза-пероксидаза KatG, которые могут обеспечивать детоксификацию супероксид-радикала. Также у штамма 1176 имеется мембранно-связанная цитохром *bd* убухинол оксидаза. Эти ферменты имеют высокое сродство к кислороду (Jünemann, 1997) и могут обеспечивать не только защиту от окислительного стресса в микроаэробных условиях (Vogtsov et al., 2021), но и генерацию трансмембранного протонного градиента. Наряду с ферментативными механизмами, толерантность штамма 1176 к кислороду может обеспечиваться за счет внеклеточного полисахаридного матрикса. Его формирование возможно благодаря *bcsABZC*-оперону, кодирующему целлюлоз-синтазу. Помимо штамма 1176, это оперон имеется у родственного штамма N1 и у *T. aggregans* (Frank et al., 2016), но отсутствует у других видов *Thermodesulfovibrio*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный анализ термальной радоновой воды выявил присутствие как аэробных, так и анаэробных бактерий. Однако для окончательного подтверждения характера роста необходимы эксперименты с культурами. Несмотря на снижение численности *Meiothermus* в воде в 2021 г., представитель этого рода, штамм 1165, был успешно культивирован, и продемонстрирован его аэробный рост на сахарах и белках. *Meiothermus* sp. 1165 сохранял жизнеспособность и в анаэробных условиях. До последнего времени представителей

Meiothermus рассматривали как строго аэробных умеренно термофильных гетеротрофов (Habib et al., 2017). Некоторые представители *Meiothermus* могут использовать нитрат в качестве акцептора электронов. Достаточное для протекания нитратредукции количество NO_3^- (4.6 мг/л) обнаружено в воде скважины 4Э.

Представители *Meiothermus* устойчивы к радиации (Masurat et al., 2005). Авторы обнаружили биопленки *Meiothermus* внутри системы для хранения отходов отработанного ядерного топлива. Анализ по гену 16S рРНК показал, что *Meiothermus*, образующий микробные обрастания в радиоактивных местообитаниях, представляет удаленную ветвь внутри рода, но его ближайшим родственником является *M. cerbereus*. Дальнейшего описания бактерии не было проведено. Термальные воды курорта Белокуриха содержат радон и природную радиоактивность. Содержание радона в скважине 4Э составляет 5–8 нКи/л (Джабарова и соавт., 2016). Возможная устойчивость штамма 1165 к радиоактивности обуславливает его распространение в воде подземных горизонтов. Сходство последовательностей генов 16S рРНК штамма 1165 и *M. cerbereus* составляло 99.13% и превышало установленный порог для разграничения видов 98.7% (Kim et al., 2014). Вероятно, бактерия, выделенная из термальных вод в Белокурихе, представляет новый штамм *M. cerbereus*. Штамм 1165 отличается от типового штамма GY-1 активным ростом на жидкой среде, в то время как вид получил свое латинское название “*cerbereus*” из-за трудностей, связанных с выращиванием на жидкой среде (Chung et al., 1997). Штамм 1165 рос только на жидкой среде и не поддавался культивированию на агаризованных средах.

Несмотря на более ранние представления об отсутствии кислорода и существовании восстановленных условий в подземных горизонтах, последние исследования демонстрируют возможность существования низкого парциального давления O_2 . В частности, 0.42–2.3 мл/л растворенного O_2 было обнаружено в водах шахты по добыче золота в Южной Африке (Weinstein et al., 2019) на глубине 1.3 км. Из этого биотопа была выделена подземная нематода *Halicephalobus mephisto* (Borgonie et al., 2011). Нематода поддерживала аэробный метаболизм в условиях гипоксии при парциальном давлении кислорода всего 0.4 кПа. Авторы предполагают, что нематода питается населяющими глубинные слои прокариотами. Для поддержания энергетического метаболизма животное должно находиться в микробных биопленках, развивающихся во вмещающих породах. Наши исследования подземной термофильной спирохеты *Longineta margulisiae* предполагают возможность образования микробных обрастаний в глубинных водоносных горизонтах, аналогичных развивающимся в наземных условиях микробным матам (Karnachuk

et al., 2021). Прямые доказательства существования сестонных форм в подземной биосфере были получены при изучении колонок фракционных пород (Wanger et al., 2006). Авторы наблюдали участки органического вещества и микроколонии клеток, связанные с породой в колонках фракционной зоны шахты Мпоненг в Южной Африке, в водах которой ранее был обнаружен ‘*Desulforudis audaxviator*’.

Несмотря на общепризнанный факт широкого распространения сульфатредуцирующих прокариот в термальных подземных водоносных горизонтах (Bell et al., 2020), измерение скорости процесса сульфатредукции в этих биотопах фактически не проводили. Нам известно единственное сообщение об определении скорости сульфатредукции с использованием радиоактивного сульфата в воде офолитов Самаил (Samail Ophiolite) в султанате Оман (Glombitza et al., 2021). Авторы провели измерение скорости процесса в воде, полученной из 12 скважин, глубиной от 78 до 472 м и температурой от 30.0 до 35.7°C. Скорость сульфатредукции была низкой, максимальная величина составляла 2.1 пмоль мл/сут, что было на три порядка меньше измеренной нами в воде Белокурихи. Интересно отметить, что профилирование микробного сообщества по гену 16S рРНК в водах офолитов выявило доминирование представителей *Meiothermus* (6.78% всех чтений) и *Thermodesulfovibrio* (5.33% всех чтений) (Rempfert et al., 2017). Подземную воду офолитов и изученную нами радоновую подземную воду объединяет щелочная реакция среды; pH в воде скважин офолитов Самаил изменялась в пределах от 7.6 до 11.4. *Meiothermus* также доминировали в щелочной термальной воде офолитов Замбала (Zambala) на Филиппинах (Woychese et al., 2015), где они составляли 45% всего сообщества. Исследованные пробы воды характеризовались низкими значениями окислительно-восстановительного потенциала (от –194 до –580 мВ) и pH около 10.

Высокие концентрации вольфрама и молибдена, зафиксированные в воде скважины 4Э в Белокурихе, известны для геотермальных вод (Planer-Friedrich et al., 2020; Zhao et al., 2021). Интересно отметить, что оба металла являются важными кофакторами формилдегидрогеназ у классических сульфатредукторов *Desulfovibrionales* (Zhang, Gladyshev, 2008). Недавно на примере модельного *Desulfovibrio vulgaris* Heldenborough были описаны новые регуляторы транскрипции TaoR, контролирующие экспрессию транспортеров вольфрама и молибдена (Rajeev et al., 2018). Оба микроэлемента используются в питательных средах для выращивания сульфатредукторов (Widdel, Bak, 1992), и их доступность в подземной воде может быть дополнительным фактором, способствующим развитию СРБ.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют в пользу существования гетерогенных

условий в глубинных водоносных горизонтах в Белокурихе, что обеспечивает одновременное присутствие аэробных *Meiothermus* и анаэробных *Thermodesulfovibrio*. Низкий окислительно-восстановительный потенциал и интенсивный процесс анаэробной сульфатредукции подтверждают, что, в целом, подземные горизонты характеризуются восстановительными условиями. Можно предположить пространственное разобщение аэробов и анаэробов в системе вода–порода, как это происходит в наземных микробных матах. Кроме того, выделенный нами *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 может образовывать внеклеточные полисахариды, благодаря *bcsABZC* оперону, кодирующему целлюлоз-синтазу. Очевидно, что гетерогенность водоносных горизонтов может обеспечивать существование микрочон, известных для морских осадков. Только в случае анаэробных водоносных горизонтов, характеризующихся восстановительными условиями, можно ожидать существование микрочон с низким парциальным давлением кислорода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Андрея Александровича Миллера за помощь с электронной микроскопией и Эдуарда Владимировича Галажинского за поддержку и установление контактов на курорте Белокуриха.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выделение чистой культуры *Meiothermus* sp. 1165 поддержано стипендией Президента РФ для молодых ученых в 2021–2023 гг. (СП-3706.2021.1 А.П.Л.). Отбор проб, определение физико-химических параметров воды, определение скорости сульфатредукции, культивирование и характеристика сульфидогенов поддержана Российским научным фондом (грант № 21-14-00114, О.В.К.). Молекулярный анализ состава сообщества и секвенирование генома штамма 1176 поддержано Российским научным фондом (грант № 22-14-00178, Н.В.Р.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Отбор проб и определение физико-химических параметров воды проведен А.П. Лукиной, В.В. Кадниковым, И.И. Русановым, О.В. Карначук и Н.В. Равиным. Культивирование, получение чистых культур и их характеристика проведена А.П. Лукиной. Определение скорости сульфатредукции проводили И.И. Русанов и

Н.В. Пименов. Профилирование по гену 16S рРНК, определение последовательности и анализ генома проведен В.В. Кадниковым, А.В. Белецким и А.В. Мардановым. Филогенетический анализ проведен М.Р. Авакяном. Анализ данных и подготовка статьи выполнены О.В. Карначук и Н.В. Равиным. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Джабарова Н.К., Яковенко Э.С., Сидорина Н.Г., Коханенко А.А., Воробьев В.А., Зайцев А.А., Коваленко Т.С., Жияков И.В. Перспективы развития Белокурихинской курортной зоны Алтайского края // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2016. № 2. С. 43–47.
- Карначук О.В., Пименов Н.В., Юсупов С.К., Франк Ю.А., Пухакка Я.А., Иванов М.В. Распределение, разнообразие и активность сульфатредуцирующих бактерий в водной толще озера Гек-Гель, Азербайджан // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 101–109.
- Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Yu.A., Puhakka Ya.A., Ivanov M.V. Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 82–89.
- Карначук О.В., Курганская И.А., Авакян М.Р., Франк Ю.А., Искерт О.П., Филенко Р.А., Данилова Э.В., Пименов Н.В. Ацидофильный *Desulfosporosinus* из окисленных отходов добычи металлов в Забайкальском крае // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 595–605.
- Karnachuk O.V., Kurganskaya I.A., Avakyan M.R., Frank Y.A., Ikkert O.P., Filenko R.A., Danilova E.V., Pimenov N.V. An acidophilic *Desulfosporosinus* isolated from the oxidized mining wastes in the Transbaikalian area // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 677–686.
- Ali N., Khanafer M., Al-Awadhi H. Indigenous oil-degrading bacteria more efficient in soil bioremediation than microbial consortium and active even in super oil-saturated soils // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 950051.
- Asaf S., Numan M., Khan A.L., Al-Harrasi A. *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. P. 138–152.
- Bar-On Y.M., Phillips R., Milo R. The biomass distribution on Earth // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 6506–6511.
- Bell E., Lamminmäki T., Alneberg J., Andersson A.F., Qian C., Xiong W., Hettich R.L., Fruttschi M., Bernier-Latmani R. Active sulfur cycling in the terrestrial deep subsurface // ISME J. 2020. V. 14. P. 1260–1272.
- Borgonie G., García-Moyano A., Litthauer D., Bert W., Bester A., van Heerden E., Möller C., Erasmus M., Onstott T.C. Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa // Nature. 2011. V. 474. P. 79–82.
- Borisov V.B., Siletsky S.A., Nastasi M.R., Forte E. ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria // Antioxidants (Basel). 2021. V. 10. Art. 839.
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A. 3rd, 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.

Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C., Sharon I., Castelle C.J., Singh A., Wilkins M.J., Wrighton K.C., Williams K.H., Banfield J.F. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain *Bacteria* // Nature. 2015. V. 523. P. 208.

Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.

Chung A.P., Rainey F., Nobre M.F., Burghardt J., da Costa M.S. *Meiothermus cerbereus* sp. nov., a new slightly thermophilic species with high levels of 3-hydroxy fatty acids // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 1225–1230.

Dastager S.G., Lee J.C., Ju Y.J., Park D.J., Kim C.J. *Rubellimicrobium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, pigmented bacterium isolated from soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1797–1800.

Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics 2010. V. 26. P. 2460–2461.

Finley B.K., Mau R.L., Hayer M., Stone B.W., Morrissey E.M., Koch B.J., Rasmussen C., Dijkstra P., Schwartz E., Hungate B.A. Soil minerals affect taxon-specific bacterial growth // ISME J. 2022. V. 16. P. 1318–1326.

França L., Albuquerque L., da Costa M.S. *Cavicella subterranea* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep mineral-water aquifer, and emended description of the species *Perlucidibacca piscinae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 3812–3817.

Frank Y.A., Kadnikov V.V., Lukina A.P., Banks D., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Sen'kina E.I., Avakyan M.R., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Characterization and genome analysis of the first facultatively alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* isolated from the deep terrestrial subsurface // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 2000.

Glombitza C., Putman L.I., Rempfert K.R., Kubo M.D., Schrenk M.O., Templeton A.S., Hoehler T.M. Active microbial sulfate reduction in fluids of serpentinizing peridotites of the continental subsurface // Commun. Earth Environ. 2021. V. 2. Art. 84.

Habib N., Khan I.U., Hussain F., Zhou E.M., Xiao M., Dong L., Zhi X.Y., Li W.J. *Meiothermus luteus* sp. nov., a slightly thermophilic bacterium isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2910–2914.

Herrmann M., Wegner C.E., Taubert M., Geesink P., Lehmann K., Yan L., Lehmann R., Totsche K.U., Küsel K. Predominance of *Cand.* *Patescibacteria* in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 1407.

Ji M., Williams T.J., Montgomery K., Wong H.L., Zaugg J., Berengut J.F., Bissett A., Chuvochina M., Hugenholtz P., Ferrari B.C. *Candidatus eremiobacterota*, a metabolically and phylogenetically diverse terrestrial phylum with acid-tolerant adaptations // ISME J. 2021. V. 15. P. 2692–2707.

Ji Y., Zhang P., Zhou S., Gao P., Wang B., Jiang J. Widespread but poorly understood bacteria: Candidate Phyla Radiation // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 2232.

Jünemann S. Cytochrome *bd* terminal oxidase // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1321. P. 107–127.

Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME J. 2019. V. 13. P. 1947–1959.

Karnachuk O.V., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Sherbakova V.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Targeted isolation based on metagenome-assembled genomes reveals a phylogenetically distinct group of thermophilic spirochetes from deep biosphere // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 3585–3598.

Kieft T.L., McCuddy S.M., Onstott T.C., Davidson M., Lin L.-H., Mislowack B., Pratt L., Boice E., Lollar B.S., Lipmann-Pipke J., Pfiffner S.M., Phelps T.J., Gihring T., Moser D., van Heerden A. Geochemically generated, energy-rich substrates and indigenous microorganisms in deep, ancient groundwater // Geomicrobiol. J. 2005. V. 22. P. 325–335.

Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 346–351.

Liu L., Feng Y., Wei L., Zong Z. Genome-based taxonomy of *Brevundimonas* with reporting *Brevundimonas huaxiensis* sp. nov. // Microbiol. Spectr. 2021. V. 9. e001121.

Lovley D.R., Chapelle F.H. Deep subsurface microbial processes // Rev. Geophys. 1995. V. 33. P. 365–381.

Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.

Masurat P., Fru E.C., Pedersen K. Identification of *Meiothermus* as the dominant genus in a storage system for spent nuclear fuel // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 98. P. 727–740.

Nelson W.C., Stegen J.C. The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 713.

Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Prijbelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y., Stepanauskas R., Clingenpeel S.R., Woyke T., McLean J.S., Lasken R., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products // J. Comput. Biol. 2013. V. 20. P. 714–737.

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.

Pedersen K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 185. P. 9–16.

Planer-Friedrich B., Forberg J., Lohmayer R., Kerl C.F., Boeing F., Kaasalainen H., Stefánsson A. Relative abundance of thiolated species of As, Mo, W, and Sb in hot springs of Yellowstone National Park and Iceland // Environ. Sci. Technol. 2020. V. 54. P. 4295–4304.

Rajeev L., Garber M.E., Zane G.M., Price M.N., Dubchak I., Wall J.D., Novichkov P.S., Mukhopadhyay A., Kazakov A.E. A new family of transcriptional regulators of tungstoenzymes and molybdate/tungstate transport // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. P. 784–799.

Rawlings D.E., Kusano T. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* // Microbiol. Rev. 1994. V. 58. P. 39–55.

- Rempfert K.R., Miller H.M., Bompard N., Nothhaft D., Matter J.M., Kelemen P., Fierer N., Templeton A.S. Geological and geochemical controls on subsurface microbial life in the Samail Ophiolite, Oman // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 56.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *Peer J. Preprints.* 2016. V. 4. e2409v1.
- Schleheck D., Tindall B.J., Rosselló-Mora R., Cook A.M. *Parvivaculum lavamentivorans* gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzene-sulfonate // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1489–1497.
- Tindall B.J., Sikorski J., Lucas S., Goltsman E., Copeland A., Glavina Del Rio T., Nolan M., Tice H., Cheng J.F., Han C., Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Fährnich R., Goodwin L., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.J., Jeffries C.D., Rohde M., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Lapidus A. Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21) // *Stand. Genomic Sci.* 2010. V. 3. P. 26–36.
- Wanger G., Southam G., Onstott T.C. Structural and chemical characterization of a natural fracture surface from 2.8 kilometers below land surface: biofilms in the deep subsurface // *Geomicrobiol. J.* 2006. V. 23. P. 443–452.
- Weinstein D.J., Allen S.E., Lau M.C.Y., Erasmus M., Asalone K.C., Walters-Conte K., Deikus G., Sebra R., Borgonie G., van Heerden E., Onstott T.C., Bracht J.R. The genome of a subterrestrial nematode reveals adaptations to heat // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Art. 5268.
- Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer, 1992. P. 3352–3378.
- Woycheese K.M., Meyer-Dombard D.R., Cardace D., Argayosa A.M., Arcilla C.A. Out of the dark: transitional subsurface-to-surface microbial diversity in a terrestrial serpentinizing seep (Manleluag, Pangasinan, the Philippines) // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 44.
- Zhang Y., Gladyshev V.N. Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 379. P. 881–899.
- Zhao Q., Guo Q., Luo L., Yan K. Tungsten accumulation in hot spring sediments resulting from preferred sorption of aqueous polytungstates to goethite // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021. V. 18. P. 12629.

Anaerobic *Thermodesulfovibrio* and Aerobic *Meiothermus* Coexist in Deep Thermal Water

A. P. Lukina¹, V. V. Kadniko², I. I. Rusanov³, M. R. Avakyan¹, A. V. Beletsky², A. V. Mardanov², N. V. Pimenov³, N. V. Ravin², and O. V. Karnachuk^{1, *}

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

²Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Received December 9, 2022; revised December 13, 2022; accepted December 13, 2022

Abstract—Research on the microorganisms inhabiting deep aquifers is based on sampling the water released from deep wells and is seldom concerned with the physicochemical processes of the water-rock system. The issue of metabolism of aerobic prokaryotes revealed in deep habitats by molecular techniques remains unclear. Cultivation is required for direct determination of relation of prokaryotes to oxygen. In the present work, aerobic and anaerobic bacteria, which were revealed in thermal radon baths of the Belokurikha resort by molecular techniques, were isolated. Profiling by the 16S rRNA gene revealed predominance of members of the *Deionococcus-Thermus* group belonging to the genus *Meiothermus* (17.6% reads) and considered strictly aerobic. Anaerobic sulfate-reducing *Thermodesulfovibrio* were also present in the sample. The habitat was characterized by reductive, alkaline conditions. Target-oriented cultivation revealed aerobically growing *Meiothermus* sp. 1165, which was closely related to *Meiothermus cerebureus*. An alkaliphilic anaerobic sulfate reducer *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 was also isolated. The rate of sulfate reduction measured in the Belokurikha water using $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ yielded the value of $41.4 \pm 1.06 \mu\text{M S}_{\text{red}} \text{L}^{-1} \text{day}^{-1}$, or $1.29 \text{ nmol S mL}^{-1} \text{day}^{-1}$. Analysis of the genome of strain 1176 revealed the presence of various mechanisms responsible for its relative resistance to oxygen and oxidative stress, which included superoxide reductase, rubredoxin, a Fe-Mn family superoxide dismutase, a KatG catalase-peroxidase, and a cytochrome *bd* ubiquinol oxidase. The low redox potential and intense anaerobic sulfate reduction provide evidence for the generally reduced conditions in the Belokurikha deep horizons. Spatial separation of aerobes and anaerobes in the water-rock system, similar to the one occurring in the terrestrial microbial mats, may be hypothesized, as well as occurring of aerobic processes in microniches.

Keywords: deep biosphere, aerobic and anaerobic prokaryotes, sulfate-reducing bacteria, *Meiothermus*, *Thermodesulfovibrio*