

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.8.06+579.22+574.24

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОСАДКОВ КАРСТОВОГО МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА ЧЕРНЫЙ КИЧИЕР ВЫЯВИЛ БОЛЬШОЕ КОЛИЧЕСТВО НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ *THERMOPLASMATOTA*

© 2024 г. В. В. Кадников^а*, А. С. Саввичев^б, И. И. Русанов^б, А. В. Белецкий^а, Н. В. Пименов^б

^аИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

^бИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 01.11. 2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 09.11.2023 г.

Проведены исследования микробного сообщества донных осадков карстового озера Черный Кичиер. Осадки характеризовались высоким содержанием сероводорода, растворенного метана, а также органического вещества. Прямые измерения с применением радиоизотопов показали высокую интенсивность микробных процессов деструкции органического вещества. В микробном сообществе найдены некультивируемые археи филума *Thermoplasmatota*. Анализ метабенома выявил представителей пяти порядков — *Methanomassiliicoccales*, *Thermoprofundales* (первое название Marine Benthic Group D и DHVEG-1), DTX01, SG8-5 и *Candidatus Gimiplasmatales* (бывший UBA10834). Ранее считалось, что эти археи являются исключительно обитателями крайне бедных органическим веществом глубинных морских осадков. Такая находка меняет представление о роли архей пяти порядков филума *Thermoplasmatota* в деструкционном сегменте цикла углерода.

Ключевые слова: *Thermoplasmatota*, меромиктические водоемы, донные отложения, микробные сообщества, 16S рРНК, метабеном

DOI: 10.31857/S0026365624020028

Донные осадки морских и континентальных водоемов являются уникальной экосистемой, в которых формируются микробные сообщества, существующие за счет деструкции органического вещества, поступающего из водной толщи (Кузнецов, 1970; Sarone, Kiene, 1988). Состав микробных сообществ донных отложений зависит, в первую очередь, от трофического статуса водоема, а также от минерализации и степени окисления осадка (Земская и соавт., 2021; Han et al., 2020). Особым типом местообитаний сложных микробных сообществ являются осадки карстовых меромиктических водоемов. В восстановленных осадках таких водоемов со значительным содержанием сероводорода формируются микробные сообщества с наиболее высокой долей некультивируемых архей (Kadnikov et al., 2019).

Целью настоящего исследования было изучение состава микробного сообщества донных отложений богатого органическим веществом карстового озера.

В качестве природного объекта было выбрано меромиктическое озеро Черный Кичиер, в котором уже проводились микробиологические исследования (Gorlenko et al., 1983; Gorbunov, Umanskaya, 2020). Озеро Кичиер (56.07036° с.ш., 48.34592° в.д.) расположено на территории национального парка

“Марий Чодра” в республике Марий Эл. В формировании водоема участвуют сульфатные воды из глубинных палеозойских водоносных горизонтов. Озеро Черный Кичиер имеет максимальную глубину около 10 м. Суммарная минерализация глубинных вод составляет 2 г/л. Плотностное расслоение препятствует перемешиванию водной толщи и является причиной стратификации. Придонный водный слой и донные осадки в оз. Черный Кичиер сохраняют постоянные восстановленные условия (Kuznezov, Gorlenko, 1973; Gorbunov, Umanskaya, 2020).

Thermoplasmatota – широко распространенный филум архей, состоящий из нескольких классов: *Aciduliprofundales*, *Thermoplasmatales*, *Methanomassiliicoccales* и “*Candidatus Poseidoniales*” (первое название Marine Group II). Впервые эти организмы были обнаружены в поверхностных морских водах, однако впоследствии было показано, что некоторые представители *Thermoplasmatota* обитают в глубоких водах и осадках океанов (Rinke et al., 2019). В собранном метабеноме “*Candidatus Pontarchaea*” (первое название Marine Group III) обнаружены гены фототриазы и родопсина, а также гены деградации пептидов и липидов, что указывает на возможность фотогетеротрофного и гетеротрофного метаболизма, известного у архей (Baker

et al., 2020). *Thermoprofundales* (первое название Marine Benthic Group D (MBGD) и DHVEG-1) предполага-ет миксотрофный метаболизм, что определяется на-личием генов внеклеточных пептидаз, а также генов, определяющих восстановительный ацетил-КоА путь Вуда-Льонгдала (Zhou et al., 2019). Новые предста-вители *Thermoplasmatota*, известные под индексом RBG-16-68-12, найдены в глубоководных осадках во-сточной акватории Мексиканского залива на глубине более 3000 м (Dong et al., 2019). На сегодняшний день данные по распространению и экологической функ-ции архей RBG-16-68-12 в морских и континенталь-ных осадках крайне ограничены.

Донные осадки озера отбирали лимнологиче-ским стратометром со стеклянной трубкой. Из трубки пробы осадков переносили в 5-мл plasti-ковые шприцы с отрезанной носовой частью, кото-рые, после наполнения образцом структурно нена-рушенного осадка, без доступа воздуха закрывали газонепроницаемой пробкой. Содержание серово-дорода, а также значение щелочности определя-ли стандартными методами. Содержание метана в пробах определяли методом фазово-равновес-ной дегазации. Определение содержания $C_{орг}$ в об-разцах осадков выполняли на анализаторе TOC-L CPN + SSM-5000Au (“Shimadzu”) в ИО РАН. Ин-тенсивности микробных процессов темновой ас-симиляции углекислоты (ТАУ), образования (МГ) и окисления метана (МО) определяли радиоизо-топным методом с использованием меченых со-единений — $NaH^{14}CO_3$ и $^{14}CH_4$ (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006; Savvichev et al., 2021).

Для характеристики состава микробных сооб-ществ отбирали 2 г осадка с разных горизонтов ко-лонки. Выделение ДНК, приготовление библиотек для секвенирования, кластеризацию в оперативные таксономические единицы проводили согласно ра-нее описанным методам (Kadnikov et al., 2019). Ну-клеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу данных Sequence Read Archive NCBI в BioProject PRJNA1007459.

Метагеномную ДНК секвенировали с помощью системы Illumina HiSeq2500 (“Illumina”, США) по

методике, описанной ранее (Kadnikov et al., 2019). Всего просеквенировали около 91.4 Гб парных чте-ний (2×150 нт) с последующей фильтрацией по качеству ($Q > 33$). Чтения были собраны в конти-ги с помощью программы MetaSPAdes v. 3.7.1, как описано ранее (Kadnikov et al., 2019). Полученные контиги группировали в кластеры с помощью про-граммы CONCOCT, что соответствует отдельным микробным геномам (metagenome-assembled genome, MAG) (Alneberg et al., 2014). Полноту собранных MAG и уровень их загрязнения контигами, при-надлежащих другим микроорганизмам, оценивали с помощью программы CheckM (Parks et al., 2015). Таксономическое положение собранных геномов определяли по базе данных GTDB с помощью про-граммы GTDB-Tk v. 0.1.3 (Parks et al., 2018).

Донные осадки озера, в поверхностном слое жидкие, пелитовые, черного цвета, восстановлен-ные, с сильным запахом сероводорода, включа-ли растительные остатки. Глубже 2–5 см осадок немного уплотнялся и приобретал алевроитовую и песчаную фракцию. Содержание метана в осадке оз. Черный Кичиер было однородным и варьирова-ло от 870 до 1300 мкмоль $дм^{-3}$ (табл. 1).

Содержание органического вещества было очень высоким в поверхностном слое осадка (42% от веса сухого вещества) и уменьшалось с глубиной до 30% на горизонте 28–34 см. Высокое значение величины щелочности в поверхностном горизонте осадка (Alk 11.0 мг экв $л^{-1}$) по сравнению с нижеле-жащими горизонтами (Alk 5.2–8.0) свидетельству-ет о высокой интенсивности микробных процессов деструкции органического вещества, протекаю-щих с выделением CO_2 . Интенсивность темно-вой ассимиляции CO_2 (ТАУ), как наиболее общий показатель активности микробных процессов, была весьма высока в поверхностном слое осадка (15 мкмоль $дм^{-3}$) и быстро снижалась с глубиной осадка (табл. 1). Интенсивность гидрогенотрофно-го МГ варьировала от 0.20 до 0.44 мкмоль $дм^{-3} сут^{-1}$, а МО от 3.6 до 6.1 мкмоль $дм^{-3} сут^{-1}$. Все пока-затели активности микробных процессов оказа-лись близки к известным величинам скоростей

Таблица 1. Физико-химические свойства и активность микробных процессов в донных осадках меромикти-ческого озера Черный Кичиер

Горизонт осадка	Alk	CH ₄	C _{орг}	ТАУ	МГ	МО	Индексы альфа-разнообразия микробных сообществ			
	мг экв $дм^{-3}$	мкмоль $дм^{-3}$	%	мкмоль $дм^{-3} сут^{-1}$			Berger_Parker	Chao1	Simpson	Shannon_e
0–6	11.0	870	42	15.0	0.32	4.9	0.08	20640	0.02	5.86
6–12	8.0	1100	37	7.2	0.44	4.4	0.06	2292	0.01	6.12
12–18	6.0	1030	35	5.1	0.29	3.4	0.08	2171	0.02	5.82
18–28	5.2	1300	33	2.1	0.20	3.7	0.10	2066	0.02	5.82
28–34	5.5	1100	30	1.1	0.21	6.1	0.08	1979	0.01	5.79

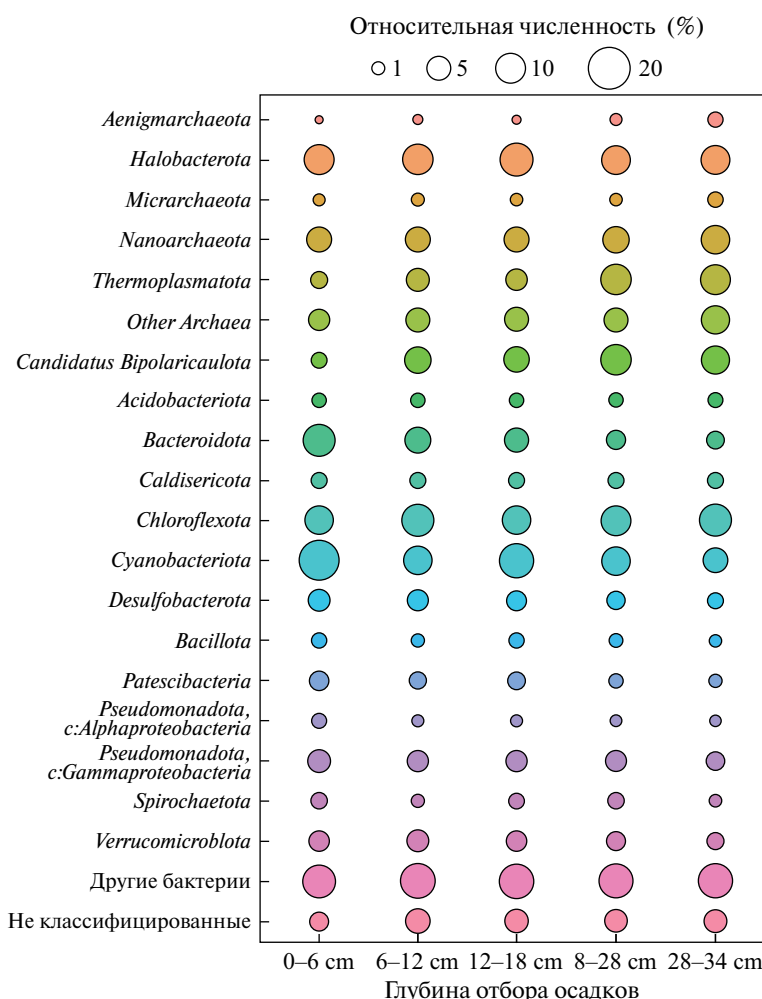


Рис. 1. Состав микробного сообщества в осадках озера Черный Кичиер по результатам высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

микробных процессов в осадках минерализованного бессточного эвтрофного оз. Ши́ра (Саввичев и соавт., 2005), а также в осадках меромиктического оз. Кисло-Сладкое, расположенного на побережье Белого моря (Саввичев и соавт., 2014). Таким образом, по всем выявленным гидрохимическим и биогеохимическим признакам, а также по интенсивности микробных процессов оз. Черный Кичиер является эвтрофным меромиктическим водоемом.

Анализ разнообразия фрагментов гена 16S рРНК показал, что во всех образцах осадка доминировали бактерии, в то время как археи составляли от 23 до 38% сообщества (рис. 1). Индексы альфа-разнообразия указывают на то, что прокариотные сообщества разных слоев осадка разнообразны и имеют примерно 2000 видов (табл. 1).

Придонные слои воды и осадки озера Черный Кичиер представляют собой анаэробные местообитания. Во всех слоях осадка было обнаружено достаточно большое количество цианобактерий, которые, скорее всего, представляют мортмассу (mortmass), осевшую из верхних слоев водной

толщи. Кроме цианобактерий, в осадках были представлены филы *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota* и *Verrucomicrobiota*. Среди бактерий преобладали гетеротрофные бактерии класса *Gammaproteobacteria* (22.2%), а также филумов *Verrucomicrobiota* (16.4%) и *Bacteroidota* (21.5%) (рис. 1). Среди архей доминировали гидрогено-трофные и ацетокластические метаногены филума *Halobacterota*. Некультивируемые археи были представлены филумами *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Micrarchaeota* и *Thermoplasmatota*.

Филум *Thermoplasmatota* был представлен группой MBGD, которая с глубиной увеличивала свою долю (рис. 1). Для получения геномов представителей микробного сообщества мы просеквенировали метагеном образца осадка с глубины 28–34 см. Собранные контиги были кластеризованы в 47 MAGs, имеющих полноту свыше 80% и загрязнение менее 10% по оценке CheckM на основе анализа присутствия набора консервативных однокопийных маркерных генов. Таксономическая классификация MAG выявила те же самые

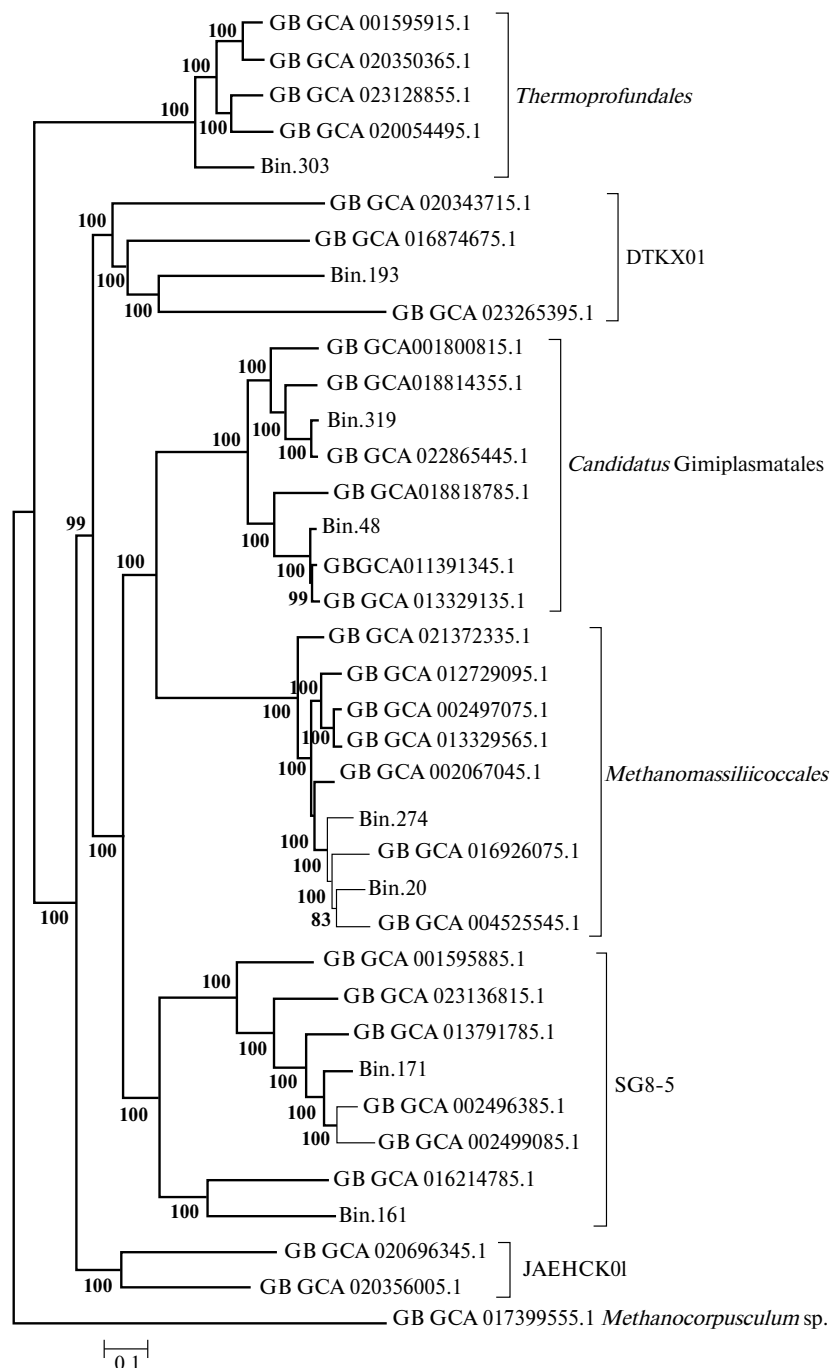


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с использованием сопоставления 53 консервативных белков, полученных из MAG *Thermoplasmata*.

основные архейные и бактериальные филумы, которые были обнаружены с помощью 16S рРНК. Чтобы получить представление о метаболических возможностях основных представителей филума *Thermoplasmata*, мы подробно проанализировали 8 MAGs. Все они имели полноту более 85% и составляли 2.1% от всего метабенома (контиги более 1500 нт). Эти MAGs были отнесены к 5 порядкам — *Methanomassiliicoccales*, *Thermoprofundales* (в прошлом называемых Marine Benthic Group D

и DHVEG-1), DTKX01, SG8-5 и “*Candidatus Gimiplasmatales*” (бывший UBA10834) (рис. 2) (Hu et al., 2021; Zheng et al., 2022).

Во всех геномах отсутствовали гены, отвечающие за гликолиз и ЦТК, что показывает их неспособность к использованию глюкозы как источника углерода для роста. Глюконеогенез был представлен только в двух MAGs — bin303 и bin161. Ассимиляция формальдегида по RuMP пути была обнаружена в трех MAGs (bin303, bin193, bin161).

Автотрофная фиксация углерода по пути Вуда–Льонгдала была показана только для bin20, bin274 и bin48. Также в bin20 и bin274 были обнаружены гены, ответственные за метаногенез. Метаногенез совместно с путем Вуда–Льонгдала считается одним из древнейших для образования энергии и фиксации углерода у архей (Borrel et al., 2016).

Таким образом, нами впервые показано, что некультивируемые археи филума *Thermoplasmatota* содержатся в значительном количестве в составе микробного сообщества богатого органическим веществом и сероводородом донного осадка континентального водоема. Ранее считалось, что эти археи являются исключительно обитателями крайне бедных органическим веществом глубоководных морских осадков. Такая находка меняет представление о роли архей пяти порядков филума *Thermoplasmatota* в деструкционном сегменте цикла углерода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллективу санатория Кичиер (Республика Марий Эл) за организационную помощь в оборудовании временной лаборатории.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Полевые работы, обработка образцов и анализ молекулярно-биологических данных выполнены сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН при поддержке проекта РНФ № 22-14-00038. Радиоизотопные исследования выполнены И.И. Русановым в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Земская Т.И., Букин С.В., Ломакина А.В., Павлова О.Н. Микроорганизмы донных отложений Байкала — самого глубокого и древнего озера мира // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 286–303.

Zemskaya T.I., Bukin S.V., Lomakina A.V., Pavlova O.N. Microorganisms in the sediments of lake Baikal, the deepest and

oldest lake in the world // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 298–313.

Кузнецов С.И. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Л.: Наука, 1970. 440 с.

Саввичев А.С., Русанов И.И., Розозин Д.Ю., Захарова Е.Е., Лунина О.Н., Брянцева И.А., Юсупов С.К., Пименов С.К., Дегерменджи А.Г., Иванов М.В. Микробиологические и изотопно-геохимические исследования меромиктических озер Хакасии в зимний сезон // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 552–561.

Savvichev A.S., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Lunina O.N., Bryantseva I.A., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V., Rogozin D.Yu., Degermendzhi A.G. Microbiological and isotopic-geochemical investigations of meromictic lakes in Khakasia in winter // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 477–485.

Саввичев А.С., Лунина О.Н., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Иванов М.В. Микробиологические и изотопно-геохимические исследования озера Кисло-Сладкое — меромиктического водоема в Кандалакшском заливе Белого моря // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 191–203.

Savvichev A.S., Lunina O.N., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Ivanov M.V. Microbiological and isotopic geochemical investigation of lake Kiso-Sladkoe, a meromictic water body at the Kandalaksha Bay shore (White Sea) // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 56–66.

Alneberg J., Bjarnason B.S., De Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Lahti L., Loman N.J., Andersson A.F., and Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 1144–1146.

Baker B.J., De Anda V., Seitz K.W., Dombrowski N., Santoro A.E., Lloyd K.G. Diversity, ecology, and evolution of Archaea // Nat. Microbiol. 2020. V. 5. P. 887–900.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>

Borrel G., Adam P.S., and Gribaldo S. Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association // Genome Biol. Evol. 2016. V. 8. P. 1706–1711.

Capone D.G., Kiene R.P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments — contrasts in anaerobic carbon catabolism // Limnol. Oceanogr. 1988. V. 33. P. 725–749.

Gorbunov M.Yu., Umanskaya M.V. Karst lakes of Mari Chodra National Park: stratification and vertical distribution of phototrophic plankton 4th Conference on actual problems of specially protected natural areas // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2020. V. 607. Art. 012019.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/607/1/012019>

Gorlenko V.M., Dubinina G.A., Kuznetsov S.I. The ecology of aquatic microorganisms. Stuttgart: E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, 1983. 252 p.

Dong X., Greening C., Rattray J.E., Chakraborty A., Chuvochina M., Mayumi D., Dolfing J., Li C., Brooks J.M., Bernard B.B., Groves R.A., Lewis I.A., Hubert C.R.J. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments // Nat. Commun. 2019. V. 10. Art. 1816.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09747-0>

Han X., Schubert C.J., Fiskal A., Dubois N., Lever M.A. Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments // Environ. Microbiol. 2020. V. 22. P. 3446–3462.

- Hu W., Pan J., Wang B., Guo J., Li M., Xu M. Metagenomic insights into the metabolism and evolution of a new *Thermoplasmata* order (*Candidatus Gimiplasmatales*) // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 3695–3709.
- Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Merkel A.Y., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial communities involved in the methane cycle in the near-bottom water layer and sediments of the meromictic subarctic Lake Svetloe // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. V. 112. P. 1801–1814. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01308-1>
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Banks D., Pimenov N.V., Frank Y.A., Karnachuk O.V., Ravin N.V. A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition // FEMS Microbiol. Ecol. 2018. V. 94. Art. fty152.
- Kuznezov S.I., Gorlenko V.M. Limnologische und Mikrobiologische Eigenschaften von Karstseen der A.S.R. Mari // Arch. Hydrobiol. 1973. V. 71. P. 475–486.
- 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.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. 2 in situ activity studies in thermal environments // Method. Microbiol. 2006. V. 35. P. 29–53.
- Rinke C., Rubino F., Messer L.F., Youssef N., Parks D.H., Chuvochina M., Brown M., Jeffries T., Tyson G.W., Seymour J.R., Hugenholtz P. A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant Marine Group II archaea (*Ca. Poseidoniales* ord. nov.) // ISME J. 2019. V. 13. P. 663–675. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0282-y>
- Savvichev A., Rusanov I., Dvornikov Y., Kadnikov V., Kallistova A., Veslopolova E., Chetverova A., Leibman M., Sigalevich P., Pimenov N., Ravin N., Khomutov A. The water column of the Yamal tundra lakes as a microbial filter preventing methane emission // Biogeosci. 2021. V. 18. P. 2791–2807. <https://doi.org/10.5194/bg-18-2791>
- Zheng P.F., Wei Z., Zhou Y., Li Q., Qi Z., Diao X., Wang Y. Genomic evidence for the recycling of complex organic carbon by novel *Thermoplasmatota* clades in deep-sea sediments // Msystems. 2022. V. 7. Art. e00077–22.
- Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G., Pan J., Yang Y., Gu J.-D., Li M. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermoprofundales* (MBG-D archaea) // ISME J. 2019. V. 13. P. 885–901. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0321-8>

SHORT COMMUNICATIONS

Metagenomic Analysis of Bottom Sediments of the Karst Meromictic Lake Black Kichier Revealed Abundant Unculturable *Thermoplasmatota*

V. V. Kadnikov^{1, *}, A. S. Savvichev², I. I. Rusanov², A. V. Beletskii¹, and N. V. Pimenov²

¹Skryabin Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Received November 1, 2023; revised November 9, 2023; accepted November 9, 2023

Abstract—Investigations into the microbial community of bottom sediments in the karst lake Black Kichier were conducted. These sediments exhibited elevated levels of sulfide, dissolved methane, and organic matter. Direct radiotracer experiments revealed substantial rates of microbial processes involved in the decomposition of organic matter. Uncultivated archaea belonging to the phylum *Thermoplasmatota* were identified within the microbial community. Metagenomic analysis unveiled representatives from five orders: *Methanomassiliicoccales*, *Thermoprofundales* (formerly known as Marine Benthic Group D and DHVEG-1), DTX01, SG8-5, and *Candidatus Gimiplasmatales* (formerly UBA10834). These archaea were previously believed to occur exclusively in deep marine sediments characterized by extreme organic matter scarcity. This discovery reshapes our understanding of the role played by *Thermoplasmatota* archaea, spanning five orders, in the degradation segment of the carbon cycle.

Keywords: *Thermoplasmatota*, meromictic lakes, bottom sediments, microbial communities, 16S rRNA, metagenome