

ISSN 2658-3518



The VI-th Baikal  
Symposium on  
Microbiology

# LIMNOLOGY & FRESHWATER BIOLOGY

**2024, № 4**

- > abiotic and biotic water components;
- > ecosystem-level studies;
- > systematics and aquatic ecology;
- > paleolimnology and environmental histories;
- > laboratory experiments and modeling



# Current state, microbiological monitoring, and prevention of water pollution in Lake Baikal



Drucker V.V.

*Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia*

**ABSTRACT.** Since 2003, Limnological Institute SB RAS has been holding the International Baikal Microbiological Symposia “Microorganisms and Viruses in Aquatic Ecosystems” every four years, and even in the “covid” year 2020, it was held “in remote mode.” The proper functioning of viral and bacterial communities is the basis for the stable quality of aquatic ecosystems. New ecological problems for the Lake Baikal ecosystem are becoming more and more acute, and the scientific research, the results of which are presented and discussed at these symposia for different aquatic ecosystems around the world, should help to find solutions for preserving the water quality now and in the future. We analyze the long-term microbiological studies of the water quality in the littoral and pelagic zones of Lake Baikal carried out by numerous authors, and propose a specific scheme of microbiological monitoring of this unique aquatic ecosystem required by the environmental regulatory authorities. Specific measures to prevent pollution of oligotrophic lake waters are also provided; these measures can be rapidly implemented now.

**Keywords:** Lake Baikal, water quality, sanitary-bacteriological monitoring scheme, measures for preventing water pollution

**For citation:** Drucker V.V. Current state, microbiological monitoring, and prevention of water pollution in Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 785-790. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-785

## 1. Introduction

The Decree of the Government of the Russian Federation dated 18.02.23 No. 260, “On Approval of the Regulations on the State Environmental Monitoring of the Unique Ecological System of Lake Baikal,” obliges to develop in the near future a new monitoring system of the lake by the appropriate environmental regulatory authorities with the participation of scientific organizations of SB RAS. Microbiological monitoring is an obligatory component of integrated environmental monitoring of aquatic ecosystems around the world, as microorganisms are the most sensitive indicators of water quality and the main destructors of their contaminants. However, only Limnological Institute SB RAS has the relevant world-level complex at Lake Baikal, including qualified certified specialists-microbiologists-virologists with high experience, a specialized laboratory for aquatic microbiology, equipped with all the necessary modern instruments and equipment, with annual professional certification, as well as research vessels equipped with a lifting unit and a system of

bathometers for taking water samples and cores at the maximum depths throughout the entire water area of the lake, including small vessels for navigation in the tributaries.

## 2. Results and discussion

A summary of the history of microbiological studies of various sites and water areas of Lake Baikal and water bodies of the Baikal-Angara-Yenisey hydrosystem is described in the monograph (Vinogradova et al., 2004), and information on Lake Baikal is given in detail in the paper (Belykh and Drucker, 2018). The assessment of water quality in the littoral and pelagic zones throughout Lake Baikal in different seasons of the year began to be investigated at the end of the twentieth century (Drucker et al., 1993), as well as studies of the estuaries of the largest tributaries along the perimeter of the whole lake (Drucker and Maslennikov, 1998). Later, for the first time, targeted studies were carried out during different seasons in 1997-2000 to find out the extent of distribution and identification of oppor-

\*Corresponding author.

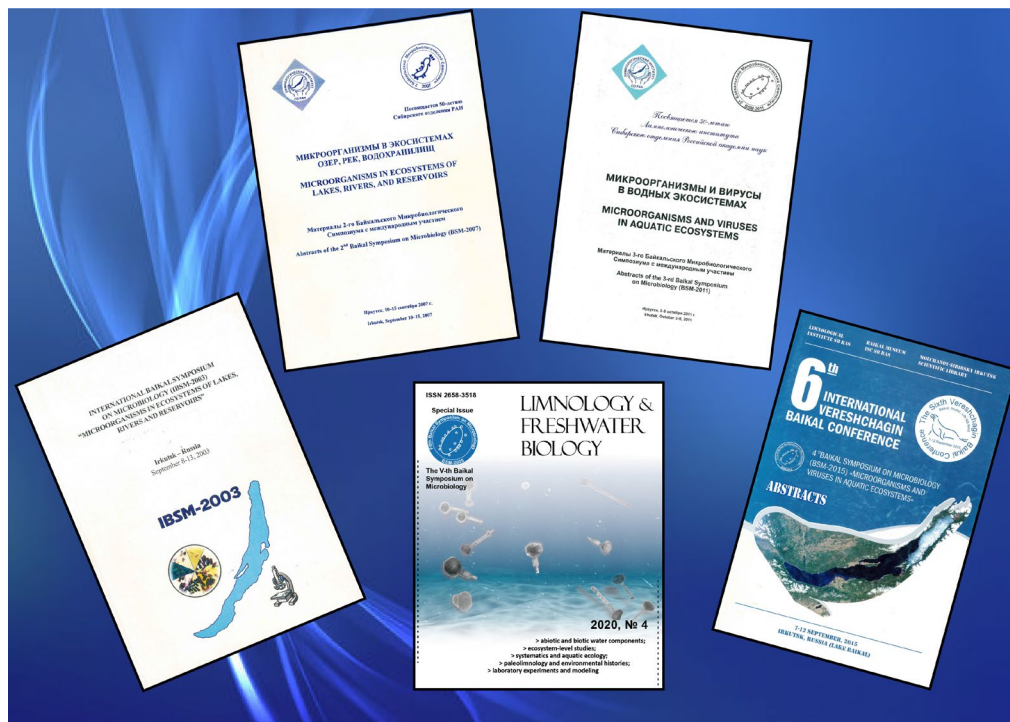
E-mail address: [drucker@lin.irk.ru](mailto:drucker@lin.irk.ru) (V.V. Drucker)

**Received:** July 27, 2024; **Accepted:** August 03, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





tunistic pathogenic bacteria (Panasyuk and Drucker, 2002; Drucker and Panasyuk, 2006). As a result of this research, 898 strains of opportunistic pathogenic bacteria were isolated. At the same time, for the first time in Russia, toxic cyanobacteria dangerous to humans were detected in the waters of Lake Baikal (Tikhonova, 2006; Belykh et al., 2013; Belykh et al., 2015). These results are worthy of attention and, in our opinion, justify their inclusion in the system of microbiological monitoring of the water quality of Lake Baikal.

Nowadays, the ecosystem of Lake Baikal is subjected to serious anthropogenic impacts: an increase in the volume of poorly treated and untreated waste water from settlements, an increased recreational load, and a sharply increased number of tourist vessels not equipped with tanks for collecting domestic and bilge water, which led to a significant decrease in water quality in the littoral zone of the lake. Analysis of systematic annual seasonal sanitary-bacteriological studies of the whole water area of Lake Baikal from 2000 to the present time has shown that opportunistic pathogenic bacteria are constantly present in the littoral zone of the lake (Drucker et al., 2022). In the littoral zone, a significant number of coliform bacteria and enterococci were detected in the southern part of the lake: Listvyanka and Kultuk settlements, Baikalsk town; in the middle basin, in the waters of the Straits Maloye More and Olkhonskiye Vorota, in the Selenga River delta; in the northern part, Severobaikalsk town and Zarechny settlement (Shtykova et al., 2016; Suslova et al., 2017; Podlesnaya et al., 2022). We took into account that from 2022, according to the new changes in SanPin 1.2.3685-21, *E. coli* bacteria and enterococci are mandatory indicators in the sanitary-microbiological assessment of water quality.

In 2021 and 2022, treated effluent from the Slyudyanka and Severobaikalsk wastewater treatment plants was included in the sampling station grid and

was investigated. Significant exceedance of controlled indicators was found: TCB up to 4200 times, *E. coli* up to 17000 times, Enterococci up to 3600 times, which indicates the lack of disinfection efficiency and the influx of opportunistic pathogenic and pathogenic bacteria into Lake Baikal (Potapov et al., 2023). The study of water quality in the pelagic zone of the lake in all years showed full compliance with state standards for drinking and other uses. A collection of 172 culturable opportunistic pathogenic bacterial strains isolated from different water bodies was established. In the waters of the estuaries of the rivers flowing into the lake, the abundance of sanitary-indicative bacterial groups in 2010-2020 was on average an order of magnitude higher than their content in the lake.

Based on the analysis of the results of long-term seasonal studies of the content of sanitary-indicative microorganisms in the water of different parts of Lake Baikal, we propose the “Scheme of sanitary-bacteriological monitoring of Lake Baikal”, according to which the determination of the water quality of littoral and pelagic zones should be carried out annually in all seasons: winter (March), spring (late May-early June), summer (August), and autumn (late September-early October) at 103 sites of the lake (hereinafter - sampling) (Drucker et al., 2023).

To prevent the pollution of Lake Baikal waters, we recommend:

1. to improve constant coordination of administrations, environmental authorities, scientific organizations, and the environmental community of Irkutsk region and the Republic of Buryatia on the implementation of the Law of the Russian Federation dated 01.05.1999 No. 94-FZ “On Protection of Lake Baikal”;
2. to strengthen control over the efficiency of treatment facilities in the towns of Slyudyanka, Severobaikalsk, and Ulan-Ude;

3. to strengthen control over the proper operation of septic tanks at camping sites, holiday homes, etc., paying special attention to the existing system of removal and disposal of household waste;
4. to strengthen control over the collection into special containers and delivery of domestic and bilge water on tourist vessels, up to the prohibition of their use;
5. to begin implementing practical solutions to the problem of recycling and neutralizing of household waste in settlements located in the central ecological zone of the lake;
6. to agree on the proposed “Scheme of sanitary-bacteriological monitoring of Lake Baikal” for joint use with the state regulatory authorities.

## Acknowledgements

The paper is carried out within the State Assignment No. 0279-2021-0015 (121032300269-9).

## References

- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2013. Microcystin-producing cyanobacteria in water bodies of Russia, Belarus, and Ukraine. *Chemistry for Sustainable Development* 21: 363-378. (in Russian)
- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2015. Identification of toxic cyanobacteria in Lake Baikal. *Proceedings of Academy of Sciences* 463: 353-357. DOI: [10/1134/S1607672915040067](https://doi.org/10/1134/S1607672915040067)
- Belykh O.I., Drucker V.V. 2018. Microbiological studies of Lake Baikal in Limnological Institute: Past and present. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 18-27. DOI: [10.31951/2658-3518-2018-A-1-18](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2018-A-1-18)
- Drucker V.V., Kostornova T.Ya., Molozhavaya O.A. et al. 1993. Assessment of Lake Baikal water quality by sanitary-bacteriological indicators. *Geography and Natural Resources* 1: 60-64. (in Russian)
- Drucker V.V., Maslennikov A.A. 1998. Microbiological monitoring of Lake Baikal tributaries. *International Symposium: Control and Rehabilitation of the Environment*: 88. (in Russian)
- Drucker V.V., Panasyuk E.Yu. 2006. Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal. *Hydrobiologia* 568(1): 267-271.
- Drucker V.V., Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu. et al. 2022. Microbiological monitoring. In: Takhteev V.V. (Ed.), *Ecological monitoring of Lake Baikal*. Irkutsk: Publishing house of ISU: 32-49. (in Russian)
- Drucker V.V., Suslova M.Yu., Nebesnykh Yu.R. et al. 2023. Sanitary-bacteriological monitoring of water quality in Lake Baikal-from single/one-off studies to systematic annual expeditions. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 164-179. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-164](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-164)
- Panasyuk E.Yu., Drucker V.V. 2002. Dominant species of potentially pathogenic bacteria isolated from Lake Baikal water. In: *Assessment of the current state of microbiological research in the East Siberian region*: 64. (in Russian)
- Podlesnaya G.V., Galachyants A.D., Shtykova Yu.R. et al. 2022. Sanitary-microbiological assessment of the water quality of Listvenichny Bay during the period of the extreme water content of Lake Baikal. *Geography and Natural Resources* 43(5): 163-169. (in Russian) DOI: [10.15372/GIPR20220517](https://doi.org/10.15372/GIPR20220517)
- Potapov S., Gorshkova A., Krasnopeev A. et al. 2023. RNA-seq virus fraction in Lake Baikal and treated wastewaters. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1-26. DOI: [10.3390/ijms241512049](https://doi.org/10.3390/ijms241512049)
- Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Kostornova T.Ya. et al. 2016. Monitoring of the sanitary-microbiological state of the pelagic zone of Lake Baikal and estuaries of large rivers flowing into it from 2010 to 2015. *Proceedings of the Irkutsk State University* 17: 51-62. (in Russian)
- Suslova M.Yu., Pestunova O.S., Parfenova V.V. 2017. Assessment of the water quality of the Selenga River and its delta by sanitary-microbiological indicators. *Hydrobiological Journal* 53(1): 74-84. DOI: [10.1615/HydroBJ.v53.i3.70](https://doi.org/10.1615/HydroBJ.v53.i3.70)
- Tikhonova I.V. 2006. Morphological and genetic features of picoplanktonic cyanobacteria of Lake Baikal. Abstract of dissertation. Cand. Sc. (Biology) Irkutsk. (in Russian)
- Vinogradova T.P., Kerber E.V., Drucker V.V. et al. 2004. Microbiological heritage of the twentieth century. Part 1: Results of the study of the Baikal-Angara-Yenisei ecosystem. Irkutsk: Publishing house of the Institute of Geography SB RAS. (in Russian)
- Panasyuk E.Yu., Drucker V.V. 2002. Dominant species of potentially pathogenic bacteria isolated from Lake Baikal water. In: *Assessment of the current state of microbiological research in the East Siberian region*: 64. (in Russian)



# Современное состояние, микробиологический мониторинг, предупреждение загрязнения вод озера Байкал

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Дрюккер В.В.\*

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** С 2003 г. Лимнологический институт СО РАН каждые четыре года проводит Международные Байкальские Микробиологические Симпозиумы «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» и даже в «ковидный» 2020 г. он был проведен «удаленно». Нормальное функционирование вирусных и бактериальных сообществ является основой стабильного качества водных экосистем. Новые экологические проблемы для экосистемы оз. Байкал становятся все более острыми и научные исследования, результаты которых заслушиваются и обсуждаются на этих Симпозиумах для различных водных экосистем мира, должны помочь найти решения для сохранения качества вод в настоящем и на будущее. Многолетние микробиологические исследования качества прибрежных и пелагических вод Байкала, проведенные многочисленными авторами, проанализированы нами, предлагается конкретная схема микробиологического мониторинга уникальной водной экосистемы, необходимая для контролируемых природоохранных органов. Так же приводятся конкретные меры предупреждения загрязнения вод олиготрофного озера, которые могут быть оперативно применены в настоящее время.

**Ключевые слова:** озеро Байкал, качество вод, схема санитарно-бактериологического мониторинга, меры предупреждения загрязнения вод

Для цитирования: Дрюккер В.В. Современное состояние, микробиологический мониторинг, предупреждение загрязнения вод озера Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 785-790. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-785

## 1. Введение

Постановление Правительства РФ от 18.02.23 г. № 260 «Об утверждении Положения о государственном экологическом мониторинге уникальной экологической системе озера Байкал» обязывает разработать в ближайшее время новую систему мониторинга озера соответствующими контролирующими природоохранными организациями с привлечением научных организаций СО РАН. Микробиологический мониторинг – обязательная составная часть комплексного экологического мониторинга водных экосистем мира, поскольку микроорганизмы являются самыми чувствительными индикаторами качества воды и основными деструкторами их загрязнений. Однако только Лимнологический институт СО РАН имеет на Байкале необходимый комплекс мирового уровня, состоящий из: квалифицированных аттестованных специалистов-микробиологов-вирусологов с боль-

шим опытом работы, специализированной лаборатории водной микробиологии, оснащенной всеми необходимыми современными приборами и оборудованием, проходящей ежегодную профессиональную аттестацию, а также научно-исследовательских судов, оснащенных лебедками и системой батометров для взятия проб воды и грунта до максимальных глубин по всей акватории озера, включая маломерные суда для прохода в притоки.

## 2. Результаты и обсуждение

Сводка об истории микробиологических исследований различных участков и акваторий оз. Байкал и водоемов Байкало-Ангаро-Енисейской гидросистемы изложена в монографии (Виноградова и др., 2004) и подробно о Байкале - в статье (Belykh and Drucker, 2018). Оценку качества вод в литорали и пелагиали по всему Байкалу в различные сезоны года начали исследовать в конце XX века (Дрюккер

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [drucker@lin.irk.ru](mailto:drucker@lin.irk.ru) (В.В. Дрюккер)

Поступила: 27 июля 2024; Принята: 03 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.







и др., 1993), а также и исследования устьевых участков наиболее крупных притоков по периметру всего озера (Дрюккер и Масленников, 1998). В дальнейшем, впервые целенаправленно были проведены исследования в различные сезоны 1997-2000 гг. по выяснению масштаба распространения и идентификации условно-патогенных бактерий (Панасюк и Дрюккер, 2002; Drucker and Panasyuk, 2006). В результате проведенных исследований было выделено 898 штаммов условно-патогенных бактерий. В это же время впервые в России были обнаружены в воде озера Байкал токсичные цианобактерии, опасные для человека (Тихонова, 2006; Белых и др., 2013; Белых и др., 2015). Эти результаты заслуживают внимания и на наш взгляд, имеют основания для включения в систему микробиологического мониторинга качества вод оз. Байкал.

В настоящее время экосистема оз. Байкал подвержена серьезным антропогенным воздействиям: рост объема некачественно очищенных и неочищенных сточных вод из населенных пунктов, увеличилась рекреационная нагрузка, резко возросло количество туристических судов, не оборудованных емкостями для сбора хозяйственно-бытовых и подсланевых вод, что привело к значительному снижению качества воды в литорали озера. Анализ систематических ежегодных сезонных санитарно-бактериологических исследований всей акватории озера Байкал с 2000 г. по настоящее время показал, что условно-патогенные бактерии постоянно присутствуют в прибрежной части озера (Дрюккер и др., 2022). В литорали значительное количество колиформных бактерий и энтерококков детектировано в южной части озера: пос. Листвянка и Култук, г. Байкальск; в средней котловине: в акватории проливов Малое море, Ольхонские ворота, дельта р. Селенги; в северной части: г. Северобайкальск, пос.

Заречный (Штыкова и др., 2016; Сулова и др., 2017; Подлесная и др., 2022). Мы учитывали, что с 2022 г., согласно новым изменениям в СанПин 1.2.3685-21, бактерия *E. coli* и энтерококки являются обязательными показателями при санитарно-микробиологической оценке качества воды.

В 2021 и 2022 гг. в сетку станций отбора проб были включены и исследованы сточные очищенные воды из очистных сооружений гг. Слюдянка и Северобайкальск. Установлено значительное превышение контролируемых показателей: ОКБ до 4200 раз, *E. coli* до 17000 раз, энтерококков до 3600 раз, что указывает на отсутствие эффективности обеззараживания и поступление условно-патогенных и патогенных бактерий в Байкал (Potarov et al., 2023). Исследование качества воды пелагической части озера во все годы показало полное соответствие государственным нормативам для питьевых и других целей использования. Создана коллекция из 172 культивируемых условно-патогенных штаммов бактерий, выделенных из различных водных объектов. В водах устьев впадающих в озеро рек численность санитарно-показательных групп бактерий в 2010-2020 гг. была в среднем на порядок выше, чем их содержание в озере.

В результате проведенного анализа результатов многолетних сезонных исследований содержания санитарно-показательных микроорганизмов в воде различных участков оз. Байкал, мы предлагаем «Схему санитарно-бактериологического мониторинга оз. Байкал», по которой определение качества вод литоральной и пелагиальной частей необходимо проводить ежегодно во все сезоны: зимний (март), весенний (конец мая-начало июня), летний (август), осенний (конец сентября-начало октября) на 103 станциях озера (в дальнейшем –выборочно) (Drucker et al., 2023).



Для предупреждения загрязнения вод оз. Байкал рекомендуем:

1. усилить постоянную координацию администраций, природоохранных органов, научных организаций и экологической общественности Иркутской области и Республики Бурятия по выполнению Закона РФ от 01.05.1999г. № 94-ФЗ «Об охране озера Байкал»;
2. усилить контроль за эффективностью работы очистных сооружений гг. Слюдянки, Северобайкальска, Улан-Удэ;
3. усилить контроль за правильной эксплуатацией септиков на турбазах, домах отдыха и др., обратив особое внимание на существующую систему вывоза и утилизацию хозяйственно-бытовых отходов;
4. усилить контроль за сбором в специальные емкости и сдачей хозяйственно-бытовых и подсланевых вод на туристических судах, вплоть до запрета их эксплуатации;
5. начать практическое решение вопроса об утилизации и обезвреживании хозяйственно-бытовых отходов в населенных пунктах, расположенных в центральной экологической зоне озера;
6. согласовать предлагаемую «Схему санитарно-бактериологического мониторинга оз. Байкал» для совместного использования с государственными контролирующими органами.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 0279-2021-0015 (121032300269-9).

## Список литературы

- Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г. и др. 2013. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины. *Химия в интересах устойчивого развития* 21: 363-378.
- Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г. и др. 2015. Идентификация токсичных цианобактерий в озере Байкал. *ДАН* 463: 353-357. DOI: [10.1134/S1607672915040067](https://doi.org/10.1134/S1607672915040067)
- Виноградова Т.П., Кербер Е.В., Дрюккер В.В. и др. 2004. Микробиологическое наследие XX века. Часть 1.

Итоги изучения Байкало-Ангаро-Енисейской экосистемы. Иркутск: Изд-во Института географии СО РАН.

Дрюккер В.В., Косторнова Т.Я., Моложавая О.А. и др. 1993. Оценка качества воды оз. Байкал по санитарно-бактериологическим показателям. *География и природные ресурсы* 1: 60-64.

Дрюккер В.В., Масленников А.А. 1998. Микробиологический мониторинг притоков оз. Байкал. *Международный Симпозиум: Контроль и реабилитация окружающей среды*: 88.

Дрюккер В.В., Штыкова Ю.Р., Сулова М.Ю. и др. 2022. Микробиологический мониторинг. В: Тахтеев В.В. (Ред.), *Экологический мониторинг озера Байкал*. Иркутск: Изд-во ИГУ: 32-49.

Панасюк Е.Ю., Дрюккер В.В. 2002. Доминирующие виды потенциально-патогенных бактерий, выделенные из воды озера Байкал. В: *Оценка современного состояния микробиологических исследований в Вост.- Сиб. регионе*: 64.

Подлесная Г.В., Галачьянц А.Д., Штыкова Ю.Р. и др. 2022. Санитарно-микробиологическая оценка качества вод залива Лиственничный в период экстремальной водности озера Байкал. *География и природные ресурсы* 43(5): 163-169. DOI: [10.15372/GIPR20220517](https://doi.org/10.15372/GIPR20220517)

Сулова М.Ю., Пестунова О.С., Парфенова В.В. 2017. Оценка качества вод р. Селенги и ее дельты по санитарно-микробиологическим показателям. *Гидробиологический журнал* 53(1): 74-84. DOI: [10.1615/HydrobJ.v53.i3.70](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v53.i3.70)

Тихонова И.В. 2006. Морфологические и генетические особенности пикопланктонных цианобактерий озера Байкал. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Иркутск, Россия.

Штыкова Ю.Р., Сулова М.Ю., Косторнова Т.Я. и др. 2016. Мониторинг санитарно-микробиологического состояния пелагиали озера Байкал и устьев впадающих в него крупных рек с 2010 по 2015 гг. Иркутск: ИГУ 17: 51-62.

Belykh O.I., Drucker V.V. 2018. Microbiological studies of Lake Baikal in Limnological Institute: Past and present. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 18-27. DOI: [10.31951/2658-3518-2018-A-1-18](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2018-A-1-18)

Drucker V.V., Panasyuk E.Yu. 2006. Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal. *Hydrobiologia* 568(1): 267-271.

Drucker V.V., Suslova M.Yu., Nebesnykh Yu.R. et al. 2023. Sanitary-bacteriological monitoring of water quality in Lake Baikal-from single/one-off studies to systematic annual expeditions. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 164-179. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-164](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-164)

Potapov S., Gorshkova A., Krasnopeev A. et al. 2023. RNA-seq virus fraction in Lake Baikal and treated wastewaters. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1-26. DOI: [10.3390/ijms241512049](https://doi.org/10.3390/ijms241512049)



# Biological diversity and structure of sub-ice algal-bacterial communities in the Maloye More Strait (Lake Baikal)



Bashenkhaeva M.V.\*, Zakharova Yu.R., Petrova D.P., Khanaev I.V., Likhoshway Ye.V.

Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, st. Ulaanbaatarskaya, 3, 664033 Irkutsk, Russia

**ABSTRACT.** An analysis of the taxonomic structure and diversity of sub-ice algal-bacterial communities in the Maloye More Strait of Lake Baikal in two different ecotopes (the bottom surface of the ice and the water column) was carried out. According to high-throughput sequencing of the 18S rRNA fragment and microscopy, the dinoflagellates *Gymnodinium baicalense* and green algae *Binuclearia lauterbornii* predominated on the bottom surface of the ice, while the diatoms *Ulnaria acus* and *Fragilaria radians* and green algae of the genus *Monoraphidium* and *Koliela* predominated in the water column. In the bacterial communities, the most abundant phyla were *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*.

**Keywords:** bacteria, microalgae, ice period, high-throughput sequencing

**For citation:** Bashenkhaeva M.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P., Khanaev I.V., Likhoshway Ye.V. Biological diversity and structure of sub-ice algal-bacterial communities in the Maloye More Strait (Lake Baikal) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 791-794. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-791](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-791)

## 1. Introduction

Lake Baikal is the first among freshwater lakes in the world in terms of depth and volume of water and unique in the diversity of living organisms (Timoshkin, 2011). The Maloye More Strait is a region of Baikal located between the western shore of the lake (in its middle part) and Olkhon Island. In the southwest it is connected to Baikal by the Olkhon Gate Strait. In winter, due to the shallowness of the water, the strait becomes covered with ice faster than other areas of Lake Baikal (Rusinek et al., 2012). Due to the difference in conditions, the ecosystem of the Maloye More Strait differs from the ecosystem of Lake Baikal.

In this work, we present the results of a study of algal-bacterial communities of the bottom surface of ice and under-ice water from a depth of 10 m in the Maloye More Strait.

## 2. Materials and methods

Samples were taken in March 2016 at three stations in the Maloye More Strait: at the entrance to the Olkhon Gate Strait (St1), in the center (St2) and at the exit near Cape Khoboy (St3). Samples from the lower surface of the ice (SI) were taken by divers using syringes; from a depth of 10 m (UW) samples were taken with a Niskin bottle. On St3, hummocks formed under the ice, and

samples were taken from their surface. Quantification and identification of phytoplankton were carried out as described previously (Bashenkhaeva et al., 2020). To isolate DNA 1.5 L of sample was deposited onto a 0.22 µm polycarbonate filter, the sediment was washed into TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) and frozen. DNA extraction was carried out according to a previously described method (Bukin et al., 2023). High-throughput sequencing (HTS) of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene and the V8-V9 region of the 18S rRNA gene was carried out on the basis of the Center for Shared Use “Genome Technologies, Proteomics and Cell Biology” of the Federal State Budgetary Institution All-Russian Research Institute of Agricultural Medicine. HTS data analysis was carried out using Usearch v.10 (Edgar, 2010).

## 3. Results

According to microscopy results, the SI communities St1 and St2 were dominated by the dinoflagellates *Gymnodinium baicalense*, the UW communities St1 were dominated by green algae of the genus *Monoraphidium* and *Koliela*, and in St2 - *G. baicalense* and *Monoraphidium*. The SI microalgae community St3 was dominated by the green algae *Binuclearia lauterbornii*, with a significant proportion of the diatoms *Ulnaria acus* and *Fragilaria radians*, as well as small-

\*Corresponding author.

E-mail address: [maria.bashenkhaeva@gmail.com](mailto:maria.bashenkhaeva@gmail.com) (M.V. Bashenkhaeva)

**Received:** July 16, 2024; **Accepted:** August 03, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



celled nanoflagellates. The UW community St3 was dominated by green algae of the genus *Monoraphidium* and diatoms *U. acus* and *F. radians*.

According to the HTS data, dinoflagellates of the genus *Gymnodinium* dominated in all ecotopes St1 and St2. The SI community St3 was dominated by zOTUs belonging to the family *Chrysophyceae* and the chrysophytes of the genus *Chrysosphaerella*. In addition to them, a significant proportion were zOTUs belonging to the family *Chlorophyceae* and green algae of the genus *Chlamydomonas*. In the St3\_UW community, the most abundant zOTUs classified as *U. acus*, *Chrysosphaerella*, and *Scrippsiella hangoei*.

Bacterial communities SI and UW differed in structure at stations St1 and St3 according to HTS data (Fig.). In the St1\_UW community, the phylum *Actinobacteria* made up the largest percentage, while in the St1\_SI community, *Proteobacteria* dominated. The community structure of the two St2 ecotopes was similar; a significant percentage was made up of representatives of *Actinobacteria*. In the SI community St3, the predominant phylum was *Bacteroidetes*; in St3\_UW, the largest percentage was made up of bacteria from the phylum *Actinobacteria*.

#### 4. Conclusion

Thus, an analysis of the structure of algal-bacterial communities on the bottom surface of the ice and under-ice water of the Maloye More Strait showed that the communities differ depending on the ecotope, as well as on the geographical location.

#### Acknowledgements

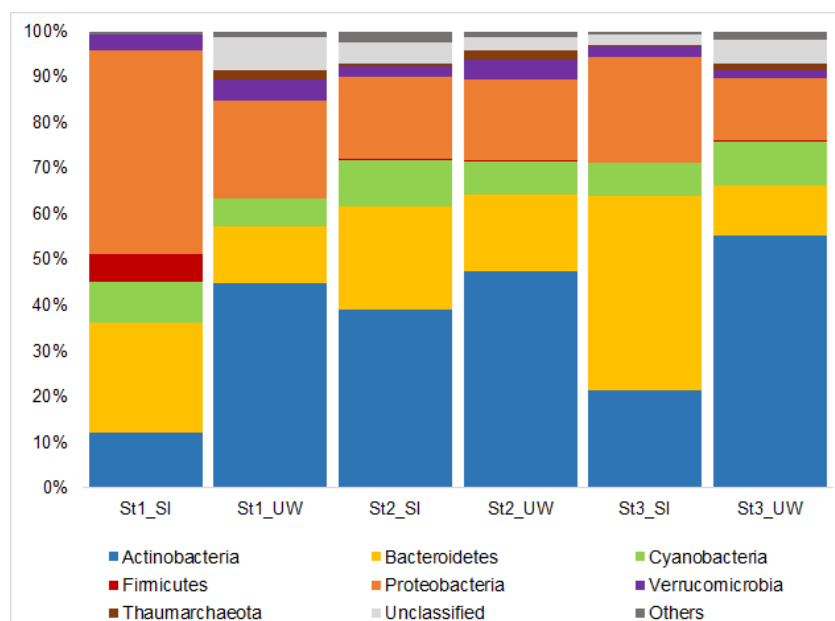
The authors express their gratitude to V.I. Chernykh, I.A. Nebesnykh and L.A. Titova for their assistance in sampling. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project number 121032300186-9). Microscopic analysis was carried out at the Center for Collective Use “Electron Microscopy” (<http://www.lin.irk.ru/copp>) of the Center for Collective Use “Ultramicroanalysis”.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Bashenkhaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal of Great Lakes Research* 46: 508–518.
- Bukin Y.S., Mikhailov I.S., Petrova D.P. et al. 2023. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 229.
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Rusinek O.T., Tahteev V.V., Gladkochub D.P. et al. 2012. *Baykalovedenie* 2(1). Novosibirsk: Nauka (in Russian).
- Timoshkin O.A. 2011. Main tendencies in research of ancient lake biodiversity; most interesting recent discoveries in biodiversity of Lake Baikal. In: Timoshkin O.A. (Ed.), *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Vol. II. Novosibirsk: Nauka, pp. 1423–1428 (in Russian)



**Fig.** Taxonomic composition of bacterial communities in the Maloye More Strait in March 2016 according to high-throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments.



# Биологическое разнообразие и структура подледных альго-бактериальных сообществ пролива Малое Море (озеро Байкал)

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Башенхаева М.В.\* , Захарова Ю.Р., Петрова Д.П., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, 664033 Иркутск, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Проведен анализ таксономической структуры и разнообразия подледных альго-бактериальных сообществ пролива Малое Море озера Байкал двух разных экотопов: нижней поверхности льда и водной толщи. По данным высокопроизводительного секвенирования фрагмента 18S рРНК и микроскопии на нижней поверхности льда преобладали динофлагелляты *Gymnodinium baicalense* и зеленые водоросли *Binuclearia lauterbornii*, в водной толще – диатомеи *Ulnaria acus* и *Fragilaria radians* и зеленые водоросли рода *Monoraphidium* и *Koliela*. В бактериальных сообществах наиболее распространенными филумами были *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*.

**Ключевые слова:** бактерии, микроводоросли, ледовый период, высокопроизводительное секвенирование

Для цитирования: Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В. Биологическое разнообразие и структура подледных альго-бактериальных сообществ пролива Малое Море (озеро Байкал) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 791-794. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-791

## 1. Введение

Озеро Байкал является первым среди пресноводных озер мира по глубине и объему воды и уникальным по разнообразию живых организмов (Timoshkin, 2011). Пролив Малое Море - район Байкала, расположенный между западным берегом озера (в его средней части) и островом Ольхон. На юго-западе оно связано с Байкалом проливом Ольхонские Ворота. В зимний период из-за мелководности пролив покрывается льдом быстрее других районов Байкала (Русинек и др., 2012). Экосистема Малого Моря из-за разницы в условиях отличается от экосистемы Байкала.

В данной работе мы приводим результаты исследования альго-бактериальных сообществ нижней поверхности льда и подледной воды с глубины 10 м пролива Малое Море.

## 2. Материалы и методы

Пробы были отобраны в марте 2016 года на трех станциях в проливе Малое Море: на входе в пролив Ольхонские ворота (St1), в центре (St2) и на выходе в районе мыса Хобой (St3). Образцы с

нижней поверхности льда (SI) отбирали водолазы с помощью шприцов, с глубины 10 м (UW) пробы отобраны батометром Нискина. На St3 подо льдом формировались торосы, пробы были отобраны с их поверхности. Количественную оценку и идентификацию фитопланктона проводили, как описано ранее (Bashenkhaeva et al., 2020). Для выделения ДНК пробы объемом 1,5 л каждая осаждали на 0,22 мкм поликарбонатный фильтр, осадок смывали в ТЕ-буфер (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) и замораживали. Выделение ДНК проводили по описанному ранее методу (Bukin et al., 2023). Высокопроизводительное секвенирование (ВПС) V3-V4 области гена 16S рРНК и V8-V9 области гена 18S рРНК проводили на базе ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ». Анализ данных ВПС проводили с помощью Usearch v.10 (Edgar, 2010).

## 3. Результаты

По результатам микроскопии в составе SI сообществ St1 и St2 доминировали динофлагелляты *Gymnodinium baicalense*, в UW сообществах St1 преобладали зеленые водоросли рода *Monoraphidium*

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [maria.bashenkhaeva@gmail.com](mailto:maria.bashenkhaeva@gmail.com) (М.В. Башенхаева)

Поступила: 16 июля 2024; Принята: 03 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



и *Koliela*, на St2 – *G. baicalense* и *Monoraphidium*. В составе SI сообщества микроводорослей St3 доминировали зеленые водоросли *Binuclearia lauterbornii*, значительную долю составляли диатомеи *Ulnaria acus* и *Fragilaria radians*, а также мелкоклеточные нанофлагелляты. В UW сообществе St3 преобладали зеленые водоросли рода *Monoraphidium* и диатомеи *U. acus* и *F. radians*.

По данным ВПС во всех экотопах St1 и St2 доминировали динофлагелляты рода *Gymnodinium*. В SI сообществе St3 преобладали zOTU, относящиеся к семейству *Chrysophyceae* и к хризифитовым рода *Chrysosphaerella*. Помимо них значительную долю составляли zOTU, относящиеся к семейству *Chlorophyceae* и зеленым водорослям рода *Chlamydomonas*. В сообществе St3\_UW к наиболее многочисленным относились zOTU, классифицированные как *U. acus*, *Chrysosphaerella* и *Scrippsiella hangoei*.

Бактериальные сообщества SI и UW различались по структуре на станциях St1 и St3 по данным ВПС (Рис.). В сообществе St1\_UW наибольшую долю составлял филум *Actinobacteria*, а в сообществе St1\_SI доминировали *Proteobacteria*. Структура сообществ двух экотопов St2 была сходной, значительную долю составляли представители *Actinobacteria*. В SI сообществе St3 преобладающим филумом был *Bacteroidetes*, в St3\_UW наибольшую долю составляли бактерии филума *Actinobacteria*.

#### 4. Выводы

Таким образом, анализ структуры альго-бактериальных сообществ нижней поверхности льда и подледной воды пролива Малое Море показал, что сообщества различаются в зависимости от экотопа, а также от географического положения.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность В. И. Черных, И. А. Небесных и Л. А. Титовой за помощь в отборе проб. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (номер проекта 121032300186-9). Микроскопический анализ проводили на базе Центра коллективного пользования «Электронная микроскопия» (<http://www.lin.irk.ru/copp>) ЦКП «Ультрамикроанализ».

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Русинек О.Т., Тахтеев В.В., Гладкочуб Д.П. и др. 2012. Байкаловедение 2(1). Новосибирск: Наука
- Bashenkhaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal of Great Lakes Research* 46: 508–518.
- Bukin Y.S., Mikhailov I.S., Petrova D.P. et al. 2023. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 229.
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Timoshkin O.A. 2011. Main tendencies in research of ancient lake biodiversity; most interesting recent discoveries in biodiversity of Lake Baikal. In: Timoshkin O.A.. (Ed.), *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Vol. II. Novosibirsk: Nauka, pp. 1423–1428 (in Russian)

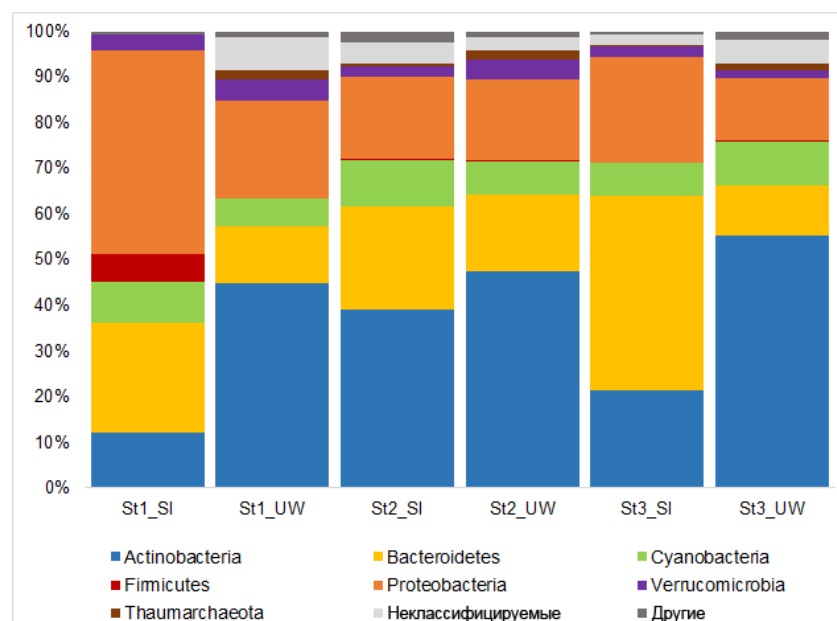


Рис. Таксономический состав бактериальных сообществ пролива Малое Море в марте 2016 г. по данным высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК.



# Ultramicrobacteria and filterable bacteria in the plankton of Lake Baikal

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Belykh O.I.\*, Krasnopeev A.Yu., Potapov S.A., Gutnik D.I., Sorokovikova E.G., Butina T.V., Tikhonova I.V.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** In Lake Baikal, the number, diversity, and structure of femtoplankton – bacteria passing through filters with a 0.2  $\mu\text{m}$  pore size – were studied for the first time using a complex of methods. The bacterial abundance in the femtoplankton fraction was  $7 \times 10^4$  cells/mL in the 0-50 m water layer, as measured by epifluorescence microscopy, and their contribution to the total bacterial number reached an average of 4.4%. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments revealed a significant genetic and taxonomic diversity of femtobacterioplankton in the pelagic and littoral zones of the lake. Dominant and minor phyla, orders, families, genera, and phylotypes of bacteria were identified in two fractions of Lake Baikal bacterioplankton: larger and smaller than 0.2  $\mu\text{m}$ . We determined the contribution of ultra-small bacteria to the taxonomic composition of microbial communities in different parts of the lake. The microbiomes of bacterioplankton and femtobacterioplankton fractions differed significantly, and we described the peculiarities of ultramicrobacteria composition. The results demonstrated an important role of ultra-small bacteria in Lake Baikal's ecosystem.

**Keywords:** ultramicrobacteria, femtoplankton, Lake Baikal, abundance, diversity, metabarcoding

**For citation:** Belykh O.I., Krasnopeev A.Yu., Potapov S.A., Gutnik D.I., Sorokovikova E.G., Butina T.V., Tikhonova I.V. Ultramicrobacteria and filterable bacteria in the plankton of Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 795-820. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-795

## 1. Introduction

Bacterioplankton plays a key role in the cycling of matter and energy in aquatic ecosystems. Most marine and freshwater planktonic bacteria are small in size and cell volume. Their small size is a significant advantage over larger organisms in the competition for nutrients. Thanks to their high surface-to-volume ratio, small-cell bacteria absorb nutrients most efficiently, which is especially important in oligotrophic water bodies with low organic matter concentrations; they are also better protected from predation by predators and can adapt more quickly to extreme environmental conditions (Hirsch, 1986; Schut et al., 1997b; Cavicchioli and Ostrowski, 2003; Hahn et al., 2003).

In the cultivation on “poor” media, most bacteria usually show a decrease in cell size. When the cells are transferred to more favorable conditions, the size is restored or increased. Torrella and Morita (1981), investigating very small marine heterotrophic bacteria, revealed for the first time that they grow very slowly on standard nutrient media and do not increase in

size during prolonged cultivation even on “enriched” media; the authors called these microorganisms ultramicrobacteria (UMB). Ultramicrobacteria have a diameter of proliferating cells less than 0.3  $\mu\text{m}$ , cell volume less than 0.1  $\mu\text{m}^3$ , and genome size between 3.2 and 0.58 Mb; they form microcolonies on low nutrient agar after filtration (Torrella and Morita, 1981; MacDonell and Hood, 1982; Schut et al., 1997b; Velimirov, 2001; Duda et al., 2012; Nakai, 2020). Ultra-small cells with extremely small genome size were also described among archaea; the superphylum DPANN (an acronym of the names of the first phylum included in this superphylum) mainly represents ultramicroarchaea.

Under natural conditions, UMB adapt to low nutrient concentrations and demonstrate a high growth rate. According to numerous studies, in marine and freshwater habitats, UMB reach high abundance and play important roles in biogeochemical cycles, nutrient cycling, and biomass formation (reviewed by Schut et al., 1997b; Cavicchioli and Ostrowski, 2003; Duda et al., 2012; Nakai, 2020).

\*Corresponding author.

E-mail address: [belykh@lin.irk.ru](mailto:belykh@lin.irk.ru) (O.I. Belykh)

**Received:** August 08, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Cultivation of UMB, unlike copiotrophic bacteria, is extremely difficult. The marine oligotrophic alphaproteobacterium *Sphingomonas* sp. (*Sphingopyxis alaskensis*) RB2256 isolated from the Gulf of Alaska water by the dilution-to-extinction culture technique was the first successfully isolated species (Schut et al., 1993; Schut et al., 1997a). Later, some cells exceeding the size of UMB were detected in the cultures (Vancanneyt et al., 2001). Additionally, *S. alaskensis* was found to possess a genome of 3.35 Mb (Lauro et al., 2009).

Subsequently, the first freshwater UMB were isolated from geographically distant lakes of different trophic status, namely actinobacterium species and strains with consistently ultrafine size and cell volume  $< 0.1 \mu\text{m}^3$  (Hahn et al., 2003). The newly developed filtration-dilution-acclimatization method that was subsequently used for other bacterial groups yielded many strains of freshwater UMB, mainly Proteobacteria and Actinobacteriota (e.g. clusters of the species *Polynucleobacter*, *Fonsibacter*, *Planktophila*, and *Rhodoluna*).

Ultra-small bacteria pass through filters with pore size of 0.45 and 0.2  $\mu\text{m}$ . This property plays a role in differentiating and cultivating various size groups, and it is also important to take into account during sterilization of solutions and water treatment. The terms “filterable bacteria” and/or “filtered forms bacteria” also found in literature primarily refer to bacteria capable of passing through a 0.45- $\mu\text{m}$  pore size filter (Oppenheimer, 1952; Anderson and Heffernan, 1965; Tabor et al., 1981; MacDonell and Hood, 1982; Nakai, 2020). The terms “UMB” and “filterable bacteria” were often interchangeable or equivalent in publications. However, it is possible to make a clear distinction between these terms with the introduction of genetic studies, in particular, the determination of the size of the bacterial genome clearly defined in the case of UMB. At the same time, during filtration, pleomorphic bacteria with genome sizes  $> 3.2 \text{ Mb}$  still pass into the fraction  $< 0.2 \mu\text{m}$  due to peculiarities of cell wall structure and morphology. A recent review by Nakai (2020) gives a detailed classification of five types of ultra-small and filterable microorganisms in the environment.

In water bodies, UMB and filterable bacteria (FB) form femtoplankton, the smallest (0.02-0.2  $\mu\text{m}$ ) and less-studied size fraction of plankton, also including viruses. In Lake Baikal, femtobacterioplankton (FBP) and ultrafine bacteria have not been studied in detail, despite numerous studies concerning microbial community diversity in the lake (<http://lin.irk.ru/bibl/>).

This study aims to estimate the number of bacteria from the femtoplankton fraction in Lake Baikal using epifluorescence microscopy and to determine the genetic and taxonomic diversity of bacteria in two bacterioplankton fractions using high-throughput sequencing and bioinformatic analysis methods.

## 2. Materials and methods

Water samples for quantitative assessment and high-throughput sequencing of 16S rDNA amplicon libraries were collected in September in the littoral

zone of the Maloye More Strait (Kurkut Bay) and in the pelagic zone of the lake at the central stations of the following transects: the Listvyanka settlement-the Tankhoy settlement (southern basin of Lake Baikal) and Ukhan Cape-Tonky Cape (central basin of Lake Baikal), at depths of 0, 5, 10, 15, 15, 25, and 50 m (Fig. 1). In late August-early September, water samples were taken in the Barguzin Bay (from the 0-50 m water layer), in the littoral zone near the Turka settlement (from the 0-5 m water layer), and 2 km away from the Severobaikalsk town (from the 0-15 m water layer) (Fig. 1). Sampling was carried out from the board of the LIN SB RAS research vessels using the SBE-3 bathometer system (Carousel Water Sampler, Sea Bird Electronics Inc., USA) and the Rutner bathometer.

To estimate bacterial abundance, 100 mL samples were fixed with formalin (final concentration 2%). Then they were filtered through polycarbonate filters (Millipore, USA). The total bacterioplankton abundance (TBA) was measured on filters with a pore size of 0.2  $\mu\text{m}$ . For counting UMB and FB, samples were passed through filters with a pore diameter of 0.2  $\mu\text{m}$ , and then cells from filtrate were precipitated on polycarbonate filters with a pore diameter of 0.05  $\mu\text{m}$  (Whatman, UK). Cells on filters were stained with DAPI dye (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, USA). The preparations were observed in an Axio Imager M1 microscope (Carl Zeiss, FRG). Cell counting was performed under ultraviolet light ( $\lambda = 358 \text{ nm}$ ) in 20 fields of vision in 3 replicates.

For metabarcoding, the 500 mL plankton samples collected from different depths (0 to 50 m) at one

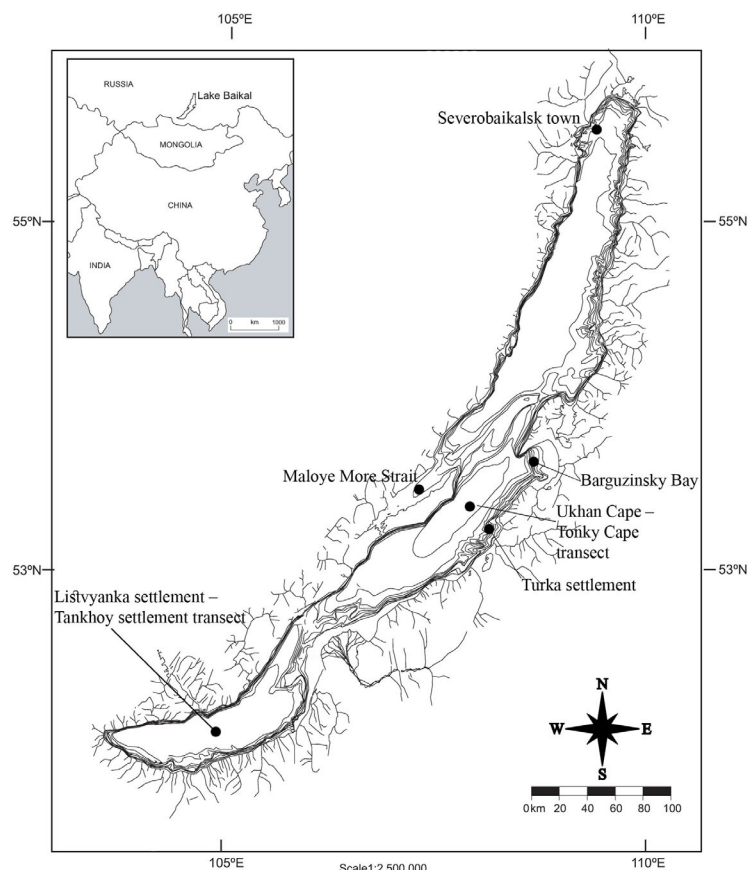


Fig.1. Map of Lake Baikal. Sites of sampling.



site were combined into an integral sample. Samples were then concentrated on polycarbonate filters with a pore diameter of 0.2  $\mu\text{m}$  for fractions  $>0.2 \mu\text{m}$  (bacterioplankton, BP) and on 0.05  $\mu\text{m}$  filters for fractions  $<0.2 \mu\text{m}$  (femtobacterioplankton). The total DNA was isolated from samples after filtration using the DNA-Sorb B kit (InterLabService, Russia). Primers 343F and 806R flanking the V3-V4 region of the 16S rRNA gene were used for amplification. Metagenomic sequencing of samples was performed on a MiSeq Illumina genomic sequencer (Center for Collective Use “Genomika”, Russia).

Assessing the quality of the sequencing data, clustering into OTU, and taxonomic identification of OTU were performed as described previously (Belykh et al., 2023). The taxonomic classification in this paper is given here according to the Silva database 138.1 (<https://www.arb-silva.de>). In the case of unidentified sequences, an additional data search carried out using BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Raw sequencing data is available at Zenodo platform by doi [10.5281/zenodo.13254752](https://doi.org/10.5281/zenodo.13254752).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Abundance of femtobacterioplankton

In the pelagic zone of Lake Baikal, TBA ranged from 0.5 to  $2.5 \times 10^6$  cells/mL. The number of small-cell bacteria in the fraction less than 0.2  $\mu\text{m}$  in the 0-50 m layer averaged  $7.0 \times 10^4$  cells/mL; the maximum ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL) was observed at depths of 10 and 15 m, while uppercase below 25 m, the concentration was two or more times lower. The proportion of ultra-small bacteria in the total bacterial count averaged 4.4%.

In general, the quantitative data on UMB and FB in Lake Baikal exceeded those obtained for other freshwater bodies. For example, in acidic lakes in the northern part of Russia, the number of bacteria passing through 0.2  $\mu\text{m}$  filters was  $1.69\text{--}3.1 \times 10^4$  cells/mL, which amounted to 0.4–3.1% of the TBA (Fedotova et al., 2012). In the Rybinsk reservoir, their number was  $2.28 \pm 0.16 \times 10^4$  cells/mL, reaching 1.6% of TBA (Fedotova et al., 2013). Similar values were observed in the Swiss water bodies; the proportion of bacteria less than 0.2  $\mu\text{m}$  averaged 3.61% of TBA in Lake Zurich, 0.53% was in Lake Greifensee, and 1.9% was in Lake Lugano. At the same time, the contribution of ultra-small cells to TBA in rivers was lower, accounting for 0.03–1.3% (Wang et al., 2007). On the contrary, samples from oligomesotrophic Lake Mondsee contained up to  $3 \times 10^5$  cells of bacteria with a volume of 0.1  $\mu\text{m}^3$  per mL of water, i.e. up to 20% of the total bacterioplankton (Hahn, 2003).

Compared to oligotrophic regions of seas and oceans, the number of femtobacterioplankton in Lake Baikal was lower. In low-productive regions of the oceans, the concentration of ultrafine cells was  $10^5\text{--}10^6$  cells/mL (Schut et al., 1993).

Notably, estimating the number of ultra-small forms of bacteria using the direct microscopic method is very difficult. Literature data vary considerably, mainly

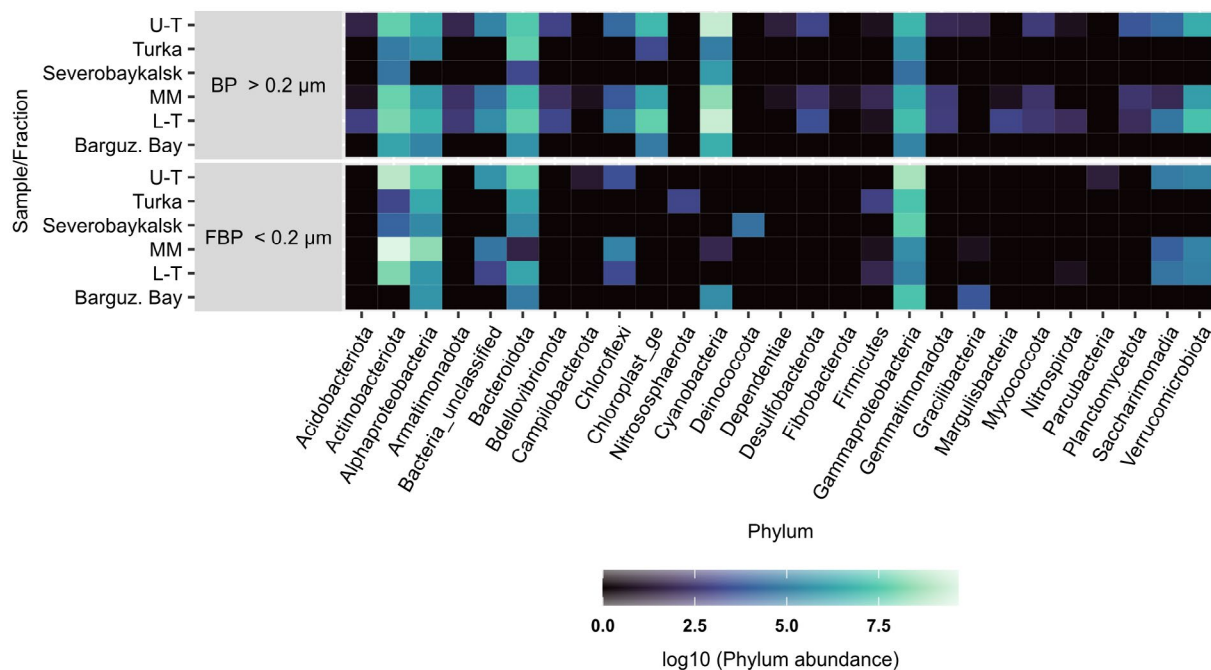
due to the use of different types of filters, and also due to mixing the concepts such as ultramicrobacteria and filterable bacteria, as mentioned above. Nevertheless, the development of filtration techniques, the introduction of fluorescence microscopy and polycarbonate filters with a pore size of 0.2  $\mu\text{m}$  or less, and a range of fluorescent dyes in microbiological research have improved bacterial quantification (Zimmermann and Meyer-Reil, 1974; Hobbie et al., 1977; Porter and Feig, 1980; Kepner and Pratt, 1994). In recent decades, flow cytometry has become the most efficient method for counting natural planktonic bacteria, but, at the same time, it has some drawbacks (Gasol and del Giorgio, 2000). The morphology and ultrastructure of bacterio- and femtoplankton were successfully characterized using electron microscopy (Fischer and Velimirov, 2000; Colombet et al., 2020). Obviously, a reliable estimation of the number of bacteria with different size fractions in aquatic ecosystems using a complex of the latest methods is currently required.

#### 3.2. Composition and structure of microbial communities based on metagenomic analysis

In littoral zones of Lake Baikal, members of the phylum Proteobacteria (Pseudomonadota) with a prevalence of Gammaproteobacteria dominated bacterioplankton (Fig. 2, Fig. 3). Proteobacteria averaged 55% of all nucleotide sequences (NS) in the littoral microbial communities, of which femtoplankton fraction accounted for 48% of NS. Bacteria of the phyla Bacteroidota (26%) and Cyanobacteria (11%) were subdominants. Among them, ultramicrobacteria were not abundant (6% and 2%, respectively). The proportion of Actinobacteriota in the littoral zone of the lake was 6.2% of the total bacterioplankton, of which 5.6% in the fraction of larger-sized bacterioplankton and 0.6% – in the femtoplankton. Bacteria of the phyla Deinococcota, Firmicutes, and Patescibacteria (class Gracilibacteria), as well as the Nitrososphaerota archaea, were minor; these groups were found only in femtoplankton.

Actinobacteria predominated in samples from the deep-water zone of Lake Baikal, up to 37% of the total number of NS in the pelagic bacterioplankton, while the proportion of ultra-small cells reached 29% (Fig. 2, Fig. 3). In the pelagic zone, the dominant phyla included Cyanobacteria (26%), Proteobacteria (19%), and Bacteroidota (9%).

Among Proteobacteria, ultra-small morphotypes were abundant (14%). On the contrary, Bacteroidota more often had large-sized cells (6%), and cyanobacteria contained almost only picoplanktonic genera of the *Cyanobium/Synechococcus* cluster, with cell diameters exceeding 0.3  $\mu\text{m}$  (26%). In the pelagic zone, Alphaproteobacteria were more abundant than Gammaproteobacteria. The composition of bacterial communities in the pelagic zone was more diverse compared to the littoral zone due to minor phyla, including Acidobacteriota, Armatimonadota, Bdellovibrionota, Campilobacterota, Chloroflexi, Dependientiae, Desulfobacterota, Fibrobacterota,



**Fig.2.** Bacterial abundance heatmap at the levels of phylum and some classes (alpha- and gammaproteobacteria) in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 µm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 µm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaikalsk – near the town of Severobaikalsk, L-T – central station of the Listvyanka settlement – Tankhoy settlement transect, U-T – central station of the Ukhan Cape – Tonky Cape transect, and MM – Maloye More Strait (Kurkut Bay).

Firmicutes, Gemmatimonadota, Margulisbacteria, Myxococcota, Nitrospirota, Patescibacteria (Gracilibacteria, Parcubacteria, and Saccharimonadia), Planctomycetota, and Verrucomicrobiota. Of these, UMBs were detected among the phyla Campilobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Nitrospirota, Verrucomicrobiota and Patescibacteria including Gracilibacteria, Parcubacteria, and Saccharimonadia classes.

Analysis of the diversity of the microbial community in Lake Baikal at the level of taxa below the phylum rank revealed the following peculiarities in its composition (Fig. 4, Fig. 5).

**Actinobacteriota.** Two classes represented the ultrafine actinobacteria: Acidimicrobiia and Actinobacteria. Microtrichales was the most abundant order of the class Acidimicrobiia, among which the family Ilumatobacteraceae, namely, CL500-29\_marine\_group, was the most common. This group was often detected in two bacterioplankton fractions of the deep-water zone. Perhaps, they enter the femtoplankton fraction by filtration. The CL500-29\_marine\_group lacks culturable species. Bacteria of this group are widespread in the epilimnion of lakes and can use aerobically some different carbon sources (acetate, pyruvate, amino acids, glucose, and glycolate). Presumably, members of the CL500-29 group play some role in the degradation of dissolved organic carbon, especially high-molecular-weight compounds such as humic substances (Guo et al., 2023).

The Actinobacteria class contained many UMB belonging to the order Frankiales, family Sporichthyaceae, mainly representatives of the can-

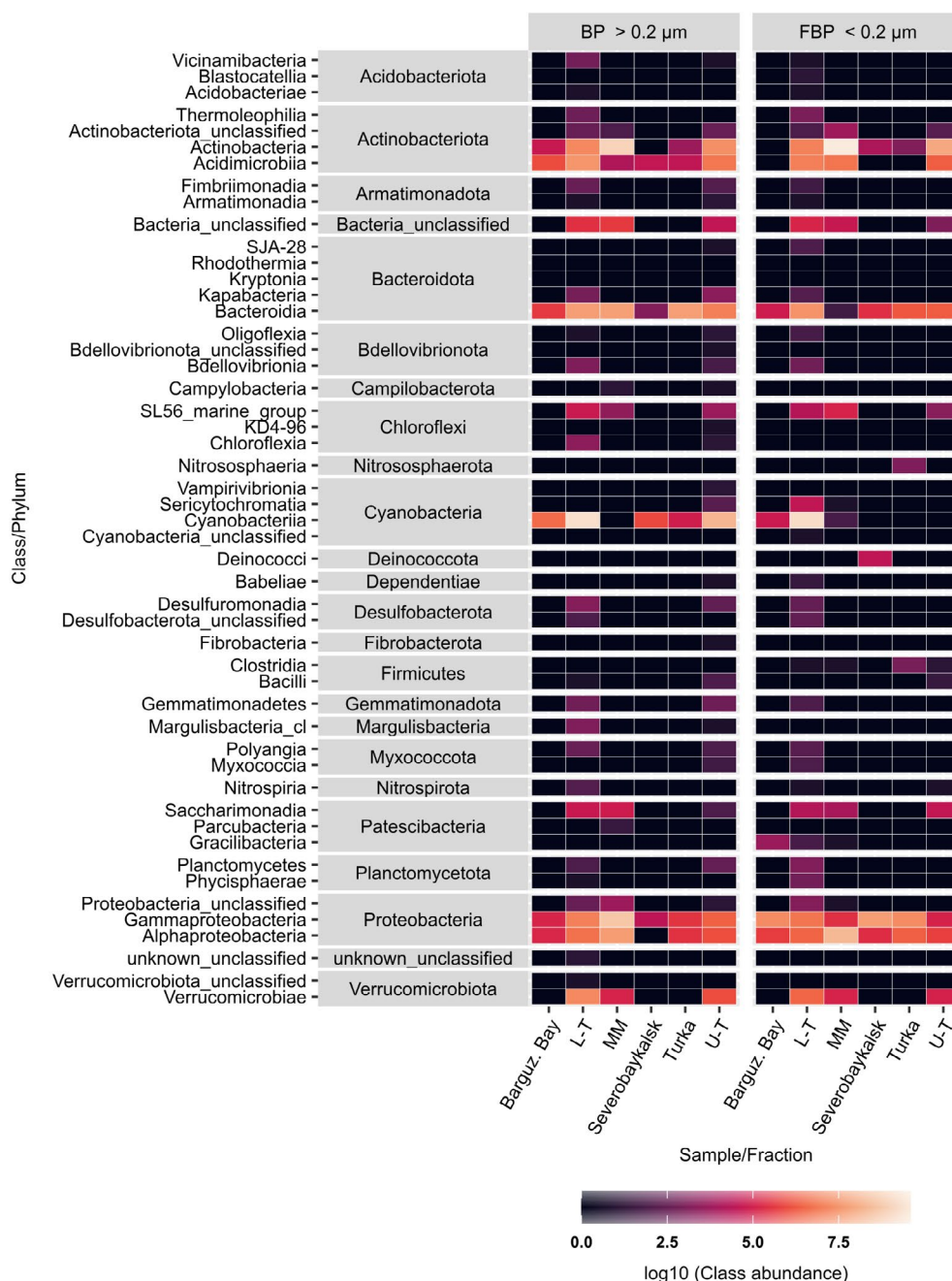
didate genus ‘*Ca. Planktophila*’ and unidentified sequences of the *aci/hgcI* clade and Sporichthyaceae.

*Planktophila* genotypes were numerous and diverse (five of them were among the first 100 “top” OTUs). The identity of the Baikal OTUs with the known ones from Genbank database was more than 97%, and the closest relatives were ‘*Ca. planktophila limnetica*’ (OTU5), ‘*Ca. Planktophila sulfonica*’ (OTU13), ‘*Ca. Planktophila lacus*’ (OTU29), and ‘*Ca. Planktophila versatilis*’ (OTU65) from Lake Zurich. Type species ‘*Ca. Planktophila limnetica*’ was first isolated in the mixed culture with other UMBs from a small lake in Austria. The strain had C-shaped cells of 0.4-0.5 µm in diameter and 1.0-1.2 µm in length, showing a good growth in the presence of L-alanine (Jezbera et al., 2009).

A significant proportion of the sequences of the *aci/hgcI* clade from Lake Baikal belonged to the genus ‘*Ca. Nanopelagicus*’ based on the BLAST analysis. The most abundant bacterioplankton genotype (OTU1) was 100% identical to ‘*Ca. Nanopelagicus hibericus*’ from Lake Zurich (Neuenschwander et al., 2018). ‘*Ca. Nanopelagicus hibericus*’ was characterized by extremely small cell volume (0.012 µm<sup>3</sup>) and streamlined small genome (1.22 Mb) along with other obtained strains of the genera ‘*Ca. Nanopelagicus*’ and ‘*Ca. Planktophila*’. The two candidate genera are now unified into a new order ‘*Ca. Nanopelagicales*’ that includes only true UMBs (Neuenschwander et al., 2018).

Actinobacteria of the *aci/hgcI* clade are among the most successful and widespread in freshwater lakes of different trophic status, where they account for more than 50% of all bacteria (Newton et al., 2007; 2011).





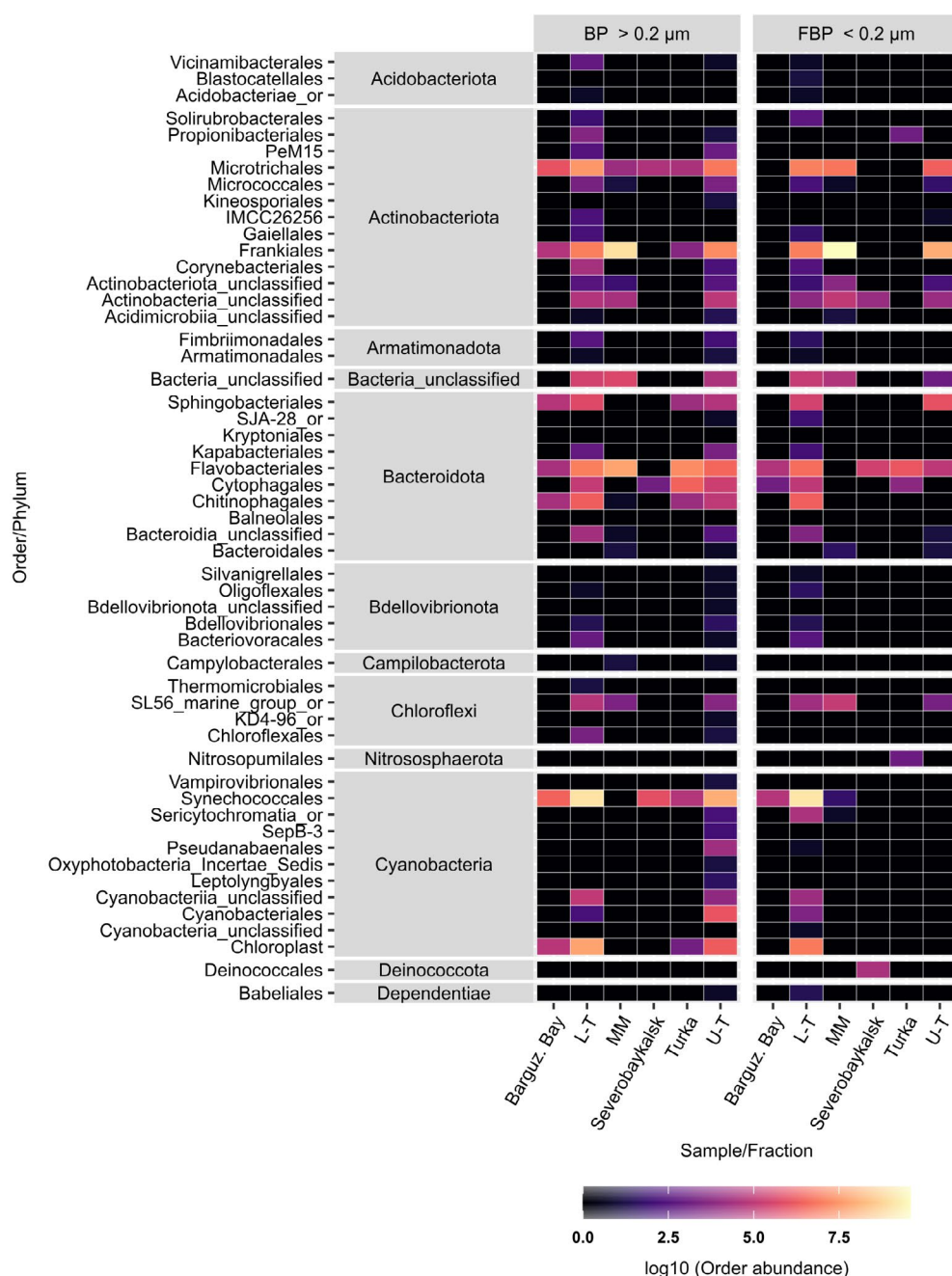
**Fig.3.** Bacterial abundance heatmap at the levels of phylum and classes in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaikalsk – near the town of Severobaikalsk, L-T – central station of the Listvyanka settlement – Tankhoy settlement transect, U-T – central station of the Ukhan Cape – Tonky Cape transect, and MM – Maloye More Strait (Kurkut Bay).

They often contain actinorhodopsins, allowing them to transform sunlight energy into ATP and leading a photoheterotrophic lifestyle. Among all UMBs from Lake Baikal, bacteria of the *acI/hgcI* clade predominated in the number of NS and OTUs. It is suggested that bacteria of the *acI/hgcI* clade lineage are abundant during the mass development of phytoplankton because they utilize polysaccharide-rich algal exudates (Garcia et al., 2013; Salcher et al., 2013; Pérez et al., 2015) in addition to allochthonous carbon sources (Buck et al., 2009; Pérez and Sommaruga, 2006). A characteristic feature of ‘*Ca. Nanopelagicus*’ is their ability to consume nitrogen-rich compounds; they can assimilate ammonia, amino acids, and the polyamines spermi-

dine and putrescine. Moreover, all ‘*Ca. Nanopelagicus*’ degrade cyanophycin, an accumulative polymer of cyanobacteria consisting of arginine and L-aspartic acid (Neuenschwander et al., 2018).

A small number of the Microbacteriaceae (Micrococcales) OTUs was detected in the femtoplankton fraction. Well-known bacteria of the genus ‘*Ca. Aquiluna*’ were rarely identified in the pelagic zone of the lake; sequences of the genus ‘*Ca. Planktoluna*’ were determined only in the fraction greater than 0.2 μm.

**Bacteroidota.** In Lake Baikal, ultrafine Bacteroidota belonged to the class Bacteroidia, the orders Bacteroidales, Chitinophagales, Cytophagales, Flavobacteriales, and Sphingobacteriales. Among



**Fig.4A.** Bacterial abundance heatmap at the levels of orders in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaykalsk – near the town of Severobaykalsk, L-T – central station of the Listvyanka settlement – Tankhoy settlement transect, U-T – central station of the Ukhan Cape – Tonky Cape transect, and MM – Maloye More Strait (Kurkut Bay).

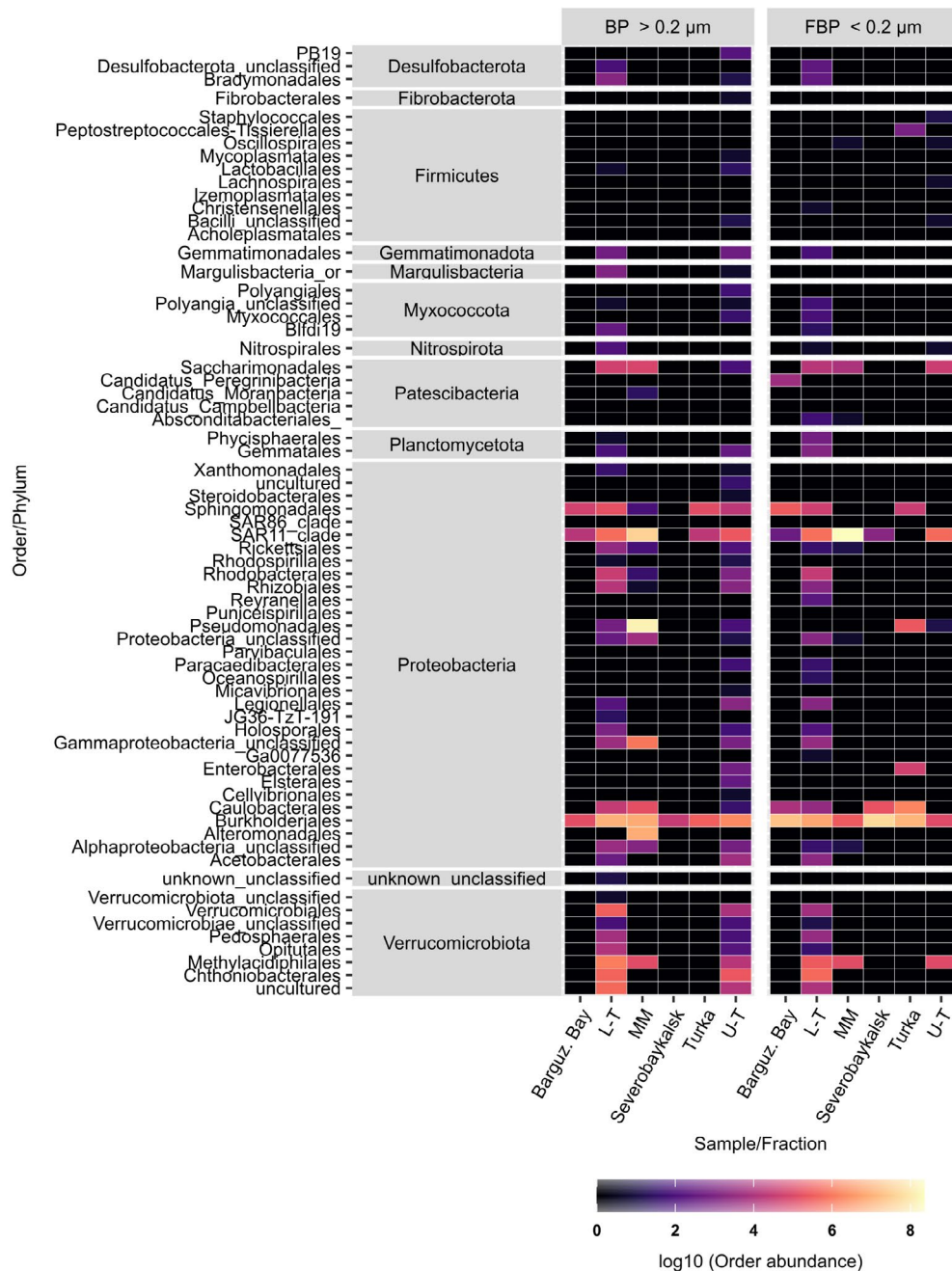
the classified genotypes, we identified members of the genera *Dinghuibacter*, *Emticia*, *Pseudarcicella*, *Flavobacterium*, *Fluviicola*, and *Solitalea*; a significant part of Bacteroidota contained unidentified OTUs. It should be noted that Bacteroidota typically have by a low number of ultra-small cells; perhaps some of them occur the femtoplankton fraction as a result of filtration and are filterable bacteria.

**Proteobacteria.** In Lake Baikal, ultra-small bacteria of the phylum Proteobacteria are classified as Alpha- and Gammaproteobacteria and unidentified Proteobacteria. Among Alphaproteobacteria, we identified members of the orders Caulobacteriales, Rhodobacteriales, Rickettsiales, Sphingomonadales,

SAR11\_clade, and Sphingomonadales.

SAR11\_clade, one of the most abundant groups in Lake Baikal, contained a diverse and abundant Clade\_III\_ge lineage, dominant in the femtoplankton in the pelagic zone of Lake Baikal. The ‘*Ca. Fonsibacter ubiquis*’ phylotypes, including the third-ranked one by a number of OTU sequences in the lake microbiomes, represented clade\_III\_ge.

The SAR11 clade, originally known as the marine clade, is one of the most abundant clades in water bodies, and its bacteria are particularly well-adapted to oligotrophic conditions (Giovannoni, 2017; Chiriac et al., 2023). The family ‘*Ca. Pelagibacteraceae*’ includes four clades: SAR11-I and SAR11-II are found almost



**Fig.4B.** Bacterial abundance heatmap at the levels of orders in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaikalsk – near the town of Severobaikalsk, L-T – central station of the Listvyanka settlement – Tankhoy settlement transect, U-T – central station of the Ukhan Cape – Tonky Cape transect, and MM – Maloye More Strait (Kurkut Bay).

exclusively in marine waters, SAR11-IIIa is detected in brackish waters, and the SAR11-IIIb clade (also called LD12 or ‘*Ca. Fonsibacter ubiquis*’) found only in freshwater bodies (Henson et al., 2018; Tsementzi et al., 2019). SAR11\_clade consists of photoheterotrophic bacteria capable of oxidizing a wide range of one-carbon compounds and utilizing light as an energy source via proteorhodopsin. In the stratified oligotrophic water column of Lake Baikal, their role is probably great but has not been studied at all. Marine SAR11\_clade bacteria, mainly *Pelagibacter* spp. consume low molecular weight dissolved organic matter. We did not detect phylotypes closely related to *Pelagibacter* spp.

in Lake Baikal. Previously, two SAR11 genomes from Lake Baikal pelagic samples, which were part of marine clade I, were recovered (Cabello-Yeves et al., 2020); they showed no identity to our sequences.

Genotypes of *Brevundimonas* spp. (Caulobacterales) were one of the most abundant genera in the littoral and pelagic zones of the lake. They were less abundant in the large-sized fraction. The genus *Brevundimonas* consists of obligately aerobic, moderately psychrophilic bacteria that are highly resistant to environmental factors. Members of this genus can cause infections in humans and animals; they pass through filters with a pore size of 0.45 μm. *Brevundimonas* spp. are often iso-





**Fig.5.** Heatmap of major OTUs (55 top) across samples at the levels of phylum and orders in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaikalsk – near the town of Severobaikalsk, L-T – central station of the Listvyanka settlement – Tankhoy settlement transect, U-T – central station of the Ukhan Cape – Tonky Cape transect, and MM – Maloye More Strait (Kurkut Bay).

lated from treated water, including drinking water, and are resistant to antiseptics and disinfectants. Detection of filterable bacteria of the genus *Brevundimonas* in a fraction less than 0.2 μm indicates the need for careful sample preparation of natural water when it is used as drinking water.

Opportunistic species of the genus *Wolbachia* (Rickettsiales) were identified as a part of femtoplankton in the Maloye More Strait and in the central basin of Lake Baikal. *Wolbachia* are obligate intracellular symbionts of arthropods and nematode filariae; that can infect humans.

Among Sphingomonadales, genotypes of the genera *Sphingomonas* and *Sphingorhabdus* were iden-

tified in large numbers in both fractions. Members of *Sphingomonas* were abundant near the Turka settlement; *Sphingorhabdus* – in the Barguzin Bay.

Gammaproteobacteria included 12 orders, with ultrafine bacteria found in Alteromonadales, Burkholderiales, Enterobacterales, and Pseudomonadales.

The genus *Rheinheimera* (Alteromonadales) ranks fourth in terms of the NS abundance among the UMB of gammaproteobacteria. The genus *Rheinheimera* includes aerobic chemoheterotrophic bacteria that utilize a wide range of carbohydrates. Perhaps, in our case, they are filterable forms of bacteria rather than true UMBs because the size of cells of the genus *Rheinheimera*

exceeds the limits of UMBs.

Burkholderiales (formerly Betaproteobacteria) is the most abundant order in terms of the number of UMB NS. The Burkholderiaceae family contained a significant number of the smallest morphotypes. For example, *Ralstonia* spp. were often detected in the littoral zone, and genotypes of *Polynucleobacter* spp. were often found in the pelagic zone of Lake Baikal. Members of the genus *Polynucleobacter* are the most frequently detected Proteobacteria in fresh waters with different degrees of trophicity and pH. Numerous strains of free-living aerobic heterotrophic ultramicrobacteria of this genus (mainly from subclades PnecC and PnecD) were isolated from various freshwaters (Hahn, 2003; Hahn et al., 2005; Wu and Hahn, 2006a; Vannini et al., 2007; Chiriac et al., 2023).

Noteworthy is denitrifying organoheterotrophic bacteria of the genus *Vogesella* within the family Chromobacteriaceae. The family Comamonadaceae had diverse genera and species in Lake Baikal and included bacteria of the genera *Limnohabitans*, *Rhodoferrax*, *Acidovorax*, *Delftia*, *Malikia*, and *Paucibacter*.

The family Methylophilaceae with ultramicrobacteria of the genus '*Ca. Methylophilum*' was identified in two plankton fractions from the pelagic zone of Lake Baikal; phylotypes of this genus were among 100 "top" OTUs. Bacteria of the family Methylophilaceae recognized as one of the most important methylotrophs that play a key role in carbon cycling in aquatic habitats (Chistoserdova, 2015; Salcher et al., 2019). Methylophilaceae specialize in using reduced one-carbon (C1) compounds such as methanol, methylamine, and formaldehyde as sole sources of energy and carbon (Salcher et al., 2019). Two strains of the genus '*Ca. Methylophilum*' were isolated from the Lake Zurich: '*Ca. Methylophilum planktonicus*' (LD28) and '*Ca. Methylophilum turicensis*' (PRD01a001B), with genome sizes of 1.36 Mb and 1.76 Mb, respectively (Salcher et al., 2015). Freshwater '*Ca. Methylophilum planktonicus*' are ubiquitous and abundant in lakes with the abundance maxima of up to  $11.3 \times 10^4$  cells/mL (4% of total prokaryotes) during mass development of diatoms and/or cyanobacteria (Salcher et al., 2015; Salcher et al., 2019).

In the family Oxalobacteraceae, two ultrafine members of the genera *Duganella* and *Rugamonas* and two uncultivated genera were observed in the pelagic zone. Bacteria of the order Enterobacterales with the genus *Serratia* were identified only in the femtoplankton from coastal zone.

Pseudomonadales is the second order of Gammaproteobacteria in terms of the number of ultramicrobacteria NS, among which the genus *Pseudomonas* is most diverse in phylotypes and abundance. The genus *Pseudomonas*, facultatively aerobic, chemoorganoheterotrophic bacteria, show great metabolic diversity and can colonize a wide range of niches. UMB morphotypes of this genus with streamlined small genome inhabit Lake Baikal, as shown in the analysis of recovered MAGs from metagenomic samples using the "shotgun" method.

**Verrucomicrobiota.** Diverse and abundant 16S

rRNA gene sequences (208 OTUs) were found in the pelagic femtoplankton with 98.8% identity to uncultured Methylophilaceae according to Silva v.138.1. Members of the family '*Ca. Methylophilaceae*' are described as thermoacidophilic methane-oxidizing bacteria with a growth optimum at 55-60°C and in the pH range of 0.8 to 6. In the GTDB database (<https://gtdb.ecogenomic.org/>), 26 genomes and three genera: *Methylophilum*, *Methylophilum*, '*Ca. Methylophilum*', with genomes ranging in size from 1.88 to 2.77 Mb, represent '*Ca. Methylophilaceae*'. The '*Ca. Methylophilaceae*' genomes contain three pmoCAB operons encoding methane monooxygenase (pMMO) (Kruse et al., 2019; Awala et al., 2023). BLAST analysis revealed a high identity of Lake Baikal isolates with uncultured sequences from freshwater lakes in North America (Martinez-Garcia et al., 2012), from the alpine Lake Bourget, where they formed an LD19 clade characterized by a high proportion of free-living OTUs (Parveen et al., 2013), and Lake Baikal itself (more than 98%). The environmental conditions in Lake Baikal are unsuitable for known cultured bacteria, as shown by a functional analysis of recovered genomes of this family. Obviously, further detailed study of the smallest verrucomicrobia in the lake is required.

**Chloroflexi.** Chloroflexi of the SL56\_marine\_group\_fa lineage (47 OTUs) were often present in the deep-water zone Lake Baikal. For example, in the Řimov Reservoir (Czech Republic), the maximum proportion of SL56 group was 1.1% of all bacterioplankton based on 16S rDNA and CARD-FISH analysis (Mehrshad et al., 2018; Chiriac et al., 2023). Genomes of the uncultured SL56 lineage of ~1.0 Mb were reconstructed from different water bodies in Europe, North and South America. According to ANI (average nucleotide identity), they belonged to nine different species (Mehrshad et al., 2018). The genome of the SL56 lineage, *Limnocyclus* sp009692905, was also recovered from deep-water samples of Lake Baikal (Cabello-Yeves et al., 2020). Chloroflexi of the SL56 lineage utilize light energy due to the presence of rhodopsins. Some species can fix CO<sub>2</sub> through the Calvin-Benson-Bassett cycle, and contain a group of NiFe-hydrogenases that provide electrons to RuBisCO (West-Roberts et al., 2021; Chiriac et al., 2023). Mehrshad et al. (2018) proposed to classify the Chloroflexi SL56 lineage as the candidate genus '*Ca. Limnocyclus*' within the order '*Ca. Limnocyclus*' and the class '*Ca. Limnocyclus*'.

**Patiscibacteria.** Uncultured, with some exceptions, bacteria with relatively small cell sizes (~0.7 µm (Albertsen et al., 2013) and genomes (<~1 Mb) represent the CPR/Patiscibacteria superphylum, which is often associated with symbiotic and parasitic lifestyles (Lemos et al., 2019). In the pelagic zone of Lake Baikal, there were members of the Saccharimonadia class (18 OTUs), having the 97.8% identity to the candidate species '*Ca. Mycosynbacter amalyticus*' (OTU86). '*Ca. Mycosynbacter amalyticus*' is a parasitic species with a genome size of 1.0 Mb, which was isolated from wastewater together with the host strains, *Gordonia amarae* and *Gordonia pseudoamarae*, contributing to foam stabilization in wastewater treatment plants and making

wastewater treatment difficult (Batinovic et al., 2021).

Bacteria of the genus '*Ca. Moranbacteria\_ge*' of the class Parcubacteria were present only in the pelagic femtoplankton of Lake Baikal. Based on the analysis of reconstructed genomes, it is known that Moranbacteria ferment organic matter to acetate and degrade chitin, playing a key intermediate role in carbon and methane cycling in subarctic lakes (Vigneron et al., 2020).

Members of the class Gracilibacteria were detected in Barguzin Bay and the Maloye More Strait: '*Ca. Peregrinibacteria\_ge*' and unidentified Absconditabacteriales. '*Ca. Peregrinibacteria\_ge*' have highly streamlined small genomes encoding a set of large extracellular proteins, some of which are very rich in cysteine and may have an attachment function, possibly to other cells. Overall, the cell envelope features combined with a lack of ability to biosynthesize many essential cofactors, fatty acids and most amino acids indicate a symbiotic lifestyle (Anantharaman et al., 2016).

Previously recovered genomes and 16S rRNA gene sequences of Patescibacteria were described in Lake Baikal in deep-water layers of Lake Baikal (Cabello-Yeves et al., 2020; Haro-Moreno et al., 2023).

**Other phyla.** 16S rRNA gene sequences belonging to the phyla Deinococcota, Firmicutes, Campilobacterota, and Nitrospirota were detected in small amounts in femtoplankton fraction. Sequences of *Deinococcus* sp. (Deinococcota) are homologous (100%) to *Deinococcus aquaticus* were detected in the coastal zone near the Severobaikalsk town. Firmicutes are represented by phylotypes closely related (97-99%) to bacteria associated with human and animal microbiomes: *Gemella sanguinis*, *Peptoniphilus lacydonensis*, *Blautia wexlerae* and *Ruminococcus* spp. Sequences identical (98%) to *Arcobacter* sp. (Campilobacterota), a psychrophilic denitrifying bacterium of bacilliform form, were identified in the pelagic zone and in the Maloye More Strait. The phylum Nitrospirota contained phylotypes of *Nitrospira* spp. – ubiquitous nitrifying bacteria that oxidize nitrite at the second stage of nitrification. Most likely, Lake Baikal members of the above taxa are filtering forms; larger cell sizes than UMB characterize their close relatives.

Picoplanktonic cyanobacteria showed mass development during the study period. This phenomenon is typical of Lake Baikal, being observed annually from July to September. The maximum number of the small cyanobacteria of the *Cyanobium/Synechococcus* genera with the size of 0.2-2.0 µm can reach 3 million cells/mL (Belykh et al., 2006). Genotypes of the *Cyanobium/Synechococcus* cluster dominated the microbial communities, e.g. OTUs 2, 4, 12, 15, 16, 21, etc. Probably, the summer-autumn period is extremely favorable for the development of ultra-small heterotrophic bacteria also because of the elevated concentration of organic substances supporting their growth, which are produced by photoautotrophic cyanobacteria.

#### 4. Conclusions

We assessed for the first time the bacterial abun-

dance in the Lake Baikal plankton fraction less than 0.2 µm. Lake Baikal demonstrated a high abundance of ultrafine bacteria, which is consistent with the concept of the predominance of the smallest bacteria in oligotrophic aquatic ecosystems. Comparative analysis of the abundance of ultra-small bacteria in Lake Baikal and other water bodies revealed a need to improve the methods of femtoplankton counting.

In Lake Baikal, high-throughput sequencing and bioinformatic analysis were used to determine for the first time the genetic composition and structure of femtoplankton communities; showing a high diversity of ultra-small bacteria. The microbiomes of large-sized bacterioplankton and femtoplankton (ultramicrobacteria) differed considerably in their composition and structure at all taxonomic levels. Bacterio- and femtoplankton in the littoral zone and pelagic zone of Lake Baikal were also characterized by significant differences.

In the littoral zone, Proteobacteria, with Bacteroidota and Cyanobacteria as subdominants, prevailed the bacterioplankton. Actinobacteriota predominated in the pelagic zone; the dominant phyla also included Cyanobacteria, Proteobacteria, and Bacteroidota. Bacteria of phylum Deinococcota, class Parcubacteria (Patescibacteria) and archaea Nitrososphaerota were detected only in the femtoplankton fraction.

In Lake Baikal, the phyla Actinobacteriota and Proteobacteria were characterized by the largest number of ultra-small bacteria. Within the Saccharimonadia (Patescibacteria) class, more than half of 16S rDNA sequences were identified in the femtoplankton fraction; among the phyla Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidota, Nitrospirota, class Gracilibacteria (Patescibacteria), and Verrucomicrobiota, less than half of the sequences belonged to ultra-small cell morphotypes.

In the femtoplankton, we detected multiple sequences of five orders of Actinobacteriota (IMCC26256, Microtrichales, Frankiales, Micrococcales, and Propionibacteriales), nine orders of Proteobacteria (Caulobacterales, Rhodobacterales, Rickettsiales, Sphingomonadales, SAR11\_clade, Alteromonadales, Burkholderiales, Enterobacteriales, and Pseudomonadales), five orders of Bacteroidota (Bacteroidales, Chitinophagales, Cytophagales, Flavobacteriales, and Sphingobacteriales), Chloroflexi (SL56\_marine\_group), Verrucomicrobiota (Methylacidiphilaceae) and class Saccharimonadia (Patescibacteria) were identified. Members of archaea, such as Nitrososphaerota (*Nitrosopumilus*), Deinococcota (*Deinococcus*), Firmicutes (*Gemella*, *Peptoniphilus*, *Blautia*, and *Ruminococcus*), Nitrospirota (*Nitrospira*), and classes Gracilibacteria (Absconditabacteriales and '*Ca. Peregrinibacteria*') and Parcubacteria ('*Ca. Moranbacteria*') (Patescibacteria) were present in small numbers.

Filtering bacteria belonging to different taxa were found in the femtoplankton of Lake Baikal; their homologs and closest relatives were identified in the large-sized bacterioplankton. Opportunistic bacteria were identified among the filtering bacteria, which may



pose a potential hazard to human and animal health.

The first results of the quantitative and qualitative assessment of the femtoplankton of Lake Baikal indicate the high importance of the smallest fraction of bacterioplankton for the lake ecosystem and require further study.

## Acknowledgements

This study was carried out within the State Project No. 0279-2021-0015. The authors thank the crews of the R/V “Titov” and R/V “Vereshchagin” for assistance in sampling.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Albertsen M., Hugenholtz P., Skarshewski A. et al. 2013. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nature Biotechnology* 31(6): 533-538. DOI: [10.1038/nbt.2579](https://doi.org/10.1038/nbt.2579)
- Anantharaman K., Brown C.T., Burstein D. et al. 2016. Analysis of five complete genome sequences for members of the class Peribacteria in the recently recognized Peregrinibacteria bacterial phylum. *PeerJ* 4: e1607 DOI: [10.7717/peerj.1607](https://doi.org/10.7717/peerj.1607)
- Anderson J.I., Heffernan W.P. 1965. Isolation and characterization of filterable marine bacteria. *Journal Bacteriology* 90(6): 1713-1718. DOI: [10.1128/jb.90.6.1713-1718](https://doi.org/10.1128/jb.90.6.1713-1718)
- Awala S.I., Gwak J.H., Kim Y. et al. 2023. *Methylacidiphilum caldifontis* gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic methane-oxidizing bacterium from an acidic geothermal environment, and descriptions of the family *Methylacidiphilaceae* fam. nov. and order *Methylacidiphilales* ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 73: 6085. DOI: [10.1099/ijsem.0.006085](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006085)
- Batinovic S., Rose J.J.A., Ratcliffe J. et al. 2021. Cocultivation of an ultrasmall environmental parasitic bacterium with lytic ability against bacteria associated with wastewater foams. *Nature Microbiology* 6(6): 703-711. DOI: [10.1038/s41564-021-00892-1](https://doi.org/10.1038/s41564-021-00892-1)
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Saphonova T.A. et al. 2006. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: composition, abundance and structure. *Hydrobiologia* 568 (1): 9-17. DOI: [10.1007/s10750-006-0340-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0340-8)
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Tomberg I.V. et al. 2023. Water quality, toxicity and diversity of planktonic and benthic cyanobacteria in pristine ancient Lake Khubsugul (Hövsgöl), Mongolia. *Toxins* 15(3): 213. DOI: [10.3390/toxins15030213](https://doi.org/10.3390/toxins15030213)
- Buck U., Grossart H.P., Amann R. et al. 2009. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. *Environmental Microbiology* 11(7): 1854-1865. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.01910.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01910.x)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya, T.I., Zakharenko A.S. et al. 2020. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat. *Limnology and Oceanography* 65: 1471-1488. DOI: [10.1002/lno.11401](https://doi.org/10.1002/lno.11401)
- Cavicchioli R., Ostrowski M. 2003. Ultramicrobacteria. In: eLS. Chichester, pp. 1-8. DOI: [10.1038/npg.els.0000309](https://doi.org/10.1038/npg.els.0000309)
- Chiriac M.C., Haber M., Salcher M.M. 2023. Adaptive genetic traits in pelagic freshwater microbes. *Environmental Microbiology* 25(3): 606-641. DOI: [10.1111/1462-2920.16313](https://doi.org/10.1111/1462-2920.16313)
- Chistoserdova L. 2015. Methylotrophs in natural habitats: current insights through metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology* 99(14): 5763-5779. DOI: [10.1007/s00253-015-6713-z](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6713-z)
- Colombet J., Fuster M., Billard H. 2020. Femtoplankton: What's New? *Viruses* 12(8): 881. DOI: [10.3390/v12080881](https://doi.org/10.3390/v12080881)
- Duda V.I., Suzina N.E., Polivtseva V.N. et al. 2012. Ultramicrobacteria: Formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology. *Microbiology* 81(4): 379-390. DOI: [10.1134/S0026261712040054](https://doi.org/10.1134/S0026261712040054)
- Fedotova A.V., Belova S.E., Kulichevskaya I.S. et al. 2012. Molecular identification of bacteria and archaeobacteria in acid lakes in Northern regions of Russia. *Mikrobiologiya* 81(3): 306-313. (in Russian)
- Fedotova A.V., Serkebaeva Iu.M., Sorokin V.V. et al. 2013. Filterable microbial forms in the Rybinsk water reservoir. *Mikrobiologiya* 82(6): 715-722. DOI: [10.7868/S0026365613060050](https://doi.org/10.7868/S0026365613060050) (in Russian)
- Fischer U.R., Velimirov B. 2000. Comparative study of the abundance of various bacterial morphotypes in an eutrophic freshwater environment determined by AODC and TEM. *Journal of Microbiological Methods* 39(3): 213-224. DOI: [10.1016/S0167-7012\(99\)00121-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00121-9)
- Garcia S.L., McMahon K.D., Martinez-Garcia M. et al. 2013. Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *ISME Journal* 7(1): 137-147. DOI: [10.1038/ismej.2012.86](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.86)
- Gasol J.M., Del Giorgio P.A. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina* 64: 197-224. DOI: [10.3989/scimar.2000.64n2197](https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2197)
- Giovannoni S.J. 2017. SAR11 Bacteria: The Most Abundant Plankton in the Oceans. *Annual Review Marine Science* 9: 231-255. DOI: [10.1146/annurev-marine-010814-015934](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015934)
- Guo Y., Gu S., Wu K. et al. 2023. Temperature-mediated microbial carbon utilization in China's lakes. *Global Change Biology* 29(17): 5044-5061. DOI: [10.1111/gcb.16840](https://doi.org/10.1111/gcb.16840)
- Hahn M.W. 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5248-5254. DOI: [10.1128/AEM.69.9.5248-5254.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5248-5254.2003)
- Hahn M.W., Lünsdorf H., Wu Q. et al. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3): 1442-1451. DOI: [10.1128/AEM.69.3.1442-1451.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1442-1451.2003)
- Hahn M.W., Pöckl M., Wu Q.L. 2005. Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4539-4547. DOI: [10.1128/AEM.71.8.4539-4547.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4539-4547.2005)
- Haro-Moreno J.M., Cabello-Yeves P.J., Garcillán-Barcia M.P. et al. 2023. A novel and diverse group of Candidatus Patescibacteria from bathypelagic Lake Baikal revealed through long-read metagenomics. *Environmental Microbiome* 18(1): 12. DOI: [10.1186/s40793-023-00473-1](https://doi.org/10.1186/s40793-023-00473-1)
- Henson M.W., Lanclos V.C., Faircloth B.C. et al. 2018. Cultivation and genomics of the first freshwater SAR11 (LD12) isolate. *The ISME Journal* 12: 1846-1860. DOI: [10.1038/s41396-018-0092-2](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0092-2)
- Hirsch P. 1986. Microbial life at extremely low nutrient levels. *Advances in Space Research* 6(12): 287-298. DOI: [10.1016/0273-1177\(86\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0273-1177(86)90097-9)
- Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 33(5): 1225-1228. DOI: [10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977](https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977)
- Jezbera J., Sharma A.K., Brandt U. et al. 2009. ‘Candidatus Planktophila limnetica’, an actinobacterium representing

one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(11): 2864-2869. DOI: [10.1099/ijs.0.010199-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.010199-0)

Kepner R.L., Pratt J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews* 58(4): 603-615. DOI: [10.1128/mr.58.4.603-615.1994](https://doi.org/10.1128/mr.58.4.603-615.1994)

Kruse T., Ratnadevi C.M., Erikstad H.A. et al. 2019. Complete genome sequence analysis of the thermoacidophilic verrucomicrobial methanotroph “*Candidatus Methylacidiphilum kamchatkense*” strain Kam1 and comparison with its closest relatives. *BMC Genomics* 20: 642. DOI: [10.1186/s12864-019-5995-4](https://doi.org/10.1186/s12864-019-5995-4)

Lauro F.M., McDougald D., Thomas T. et al. 2009. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 106(37): 15527-15533. DOI: [10.1073/pnas.0903507106](https://doi.org/10.1073/pnas.0903507106)

Lemos L.N., Medeiros J.D., Dini-Andreote F. et al. 2019. Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultra-small Saccharimonadia (phylum CPR/Patescibacteria) suggest a symbiotic lifestyle. *Molecular Ecology* 28(18): 4259-4271. DOI: [10.1111/mec.15208](https://doi.org/10.1111/mec.15208)

Macdonnell M.T., Hood M.A. 1982. Isolation and characterization of ultramicrobacteria from a gulf coast estuary. *Applied and Environmental Microbiology* 43(3): 566-571. DOI: [10.1128/aem.43.3.566-571.1982](https://doi.org/10.1128/aem.43.3.566-571.1982)

Martinez-Garcia M., Swan B.K., Poulton N.J. et al. 2012. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *The ISME Journal* 6(1): 113-23. DOI: [10.1038/ismej.2011.84](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.84)

Mehrshad M., Salcher M.M., Okazaki Y. et al. 2018. Hidden in plain sight-highly abundant and diverse planktonic freshwater Chloroflexi. *Microbiome* 6(1): 176. DOI: [10.1186/s40168-018-0563-8](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0563-8)

Nakai R. 2020. Size Matters: ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *Microbes and Environments* 35(2): ME20025. DOI: [10.1264/jjsme2.ME20025](https://doi.org/10.1264/jjsme2.ME20025)

Neuenschwander S.M., Ghai R., Pernthaler J. et al. 2018. Microdiversification in genome-streamlined ubiquitous freshwater Actinobacteria. *The ISME Journal* 12(1): 185-198. DOI: [10.1038/ismej.2017.156](https://doi.org/10.1038/ismej.2017.156)

Newton R.J., Jones S.E., Helmus M.R. et al. 2007. Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria acI lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22): 7169-7176. DOI: [10.1128/AEM.00794-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00794-07)

Newton R.J., Jones S.E., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(1): 14-49. DOI: [10.1128/MMBR.00028-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10)

Oppenheimer C.H. 1952. The membrane filter in marine microbiology. *Journal of Bacteriology* 64(6): 783-786. DOI: [10.1128/jb.64.6.783-786.1952](https://doi.org/10.1128/jb.64.6.783-786.1952)

Parveen B., Mary I., Vellet A. et al. 2013. Temporal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated *Verrucomicrobia* communities in relation to environmental variables in a mesotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 83(1): 189-201. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2012.01469.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01469.x)

Pérez M.T., Sommaruga R. 2006. Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnology and Oceanography* 51: 2527-2537. DOI: [10.4319/lo.2006.51.6.2527](https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.6.2527)

Pérez M.T., Rofner C., Sommaruga R. 2015. Dissolved organic monomer partitioning among bacterial groups in two oligotrophic lakes. *Environmental Microbiology Reports* 7(2):

265-272. DOI: [10.1111/1758-2229.12240](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12240)

Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948. DOI: [10.4319/lo.1980.25.5.0943](https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943)

Salcher M.M., Posch T., Pernthaler J. 2013. In situ substrate preferences of abundant bacterioplankton populations in a prealpine freshwater lake. *The ISME Journal* 7(5): 896-907. DOI: [10.1038/ismej.2012.162](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.162)

Salcher M.M., Neuenschwander S.M., Posch T. 2015. The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign. *The ISME Journal* 9(11): 2442-2453. DOI: [10.1038/ismej.2015.55](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.55)

Salcher M.M., Schaeffle D., Kaspar M. et al. 2019. Evolution in action: habitat transition from sediment to the pelagial leads to genome streamlining in Methylophilaceae. *The ISME Journal* 13(11): 2764-2777. DOI: [10.1038/s41396-019-0471-3](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0471-3)

Schut F., de Vries E.J., Gottschal J.C. et al. 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 59(7): 2150-2160. DOI: [10.1128/aem.59.7.2150-2160.1993](https://doi.org/10.1128/aem.59.7.2150-2160.1993)

Schut F., Gottschal J.C., Prins R.A. 1997a. Isolation and characterisation of the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *FEMS Microbiology Reviews* 20 (3-4): 363-369. DOI: [10.1111/j.1574-6976.1997.tb00321.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00321.x)

Schut F., Prins R., Gottschal J. 1997b. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: Facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology* 12(2): 177-202. DOI: [10.3354/ame012177](https://doi.org/10.3354/ame012177)

Tabor P.S., Ohwada K., Colwell R.R. 1981. Filterable marine bacteria found in the deep sea: Distribution, taxonomy, and response to starvation. *Microbial Ecology* 7(1): 67-83. doi: org/ DOI: [10.1007/BF02010479](https://doi.org/10.1007/BF02010479)

Torrella F., Morita R.Y. 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 41(2): 518-527. DOI: [10.1128/aem.41.2.518-527.1981](https://doi.org/10.1128/aem.41.2.518-527.1981)

Tsementzi D., Rodriguez R.L., Ruiz-Perez C.A. et al. 2019. Ecogenomic characterization of widespread, closely-related SAR11 clades of the freshwater genus “*Candidatus Fonsibacter*” and proposal of ‘*Ca. Fonsibacter lacus*’ sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42: 495-505. DOI: [10.1016/j.syapm.2019.03.007](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.03.007)

Vancanneyt M., Schut F., Snauwaert C. et al. 2001. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 73-79. DOI: [10.1099/00207713-51-1-73](https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-73)

Vannini C., Pöckl M., Petroni G. et al. 2007. Endosymbiosis in *statu nascendi*: close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (Betaproteobacteria) *Environmental Microbiology* 9(2): 347-359. DOI: [10.1099/00207713-51-1-73](https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-73)

Velimirov B. 2001. Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium. *Microbes and Environments* 16: 67-77. DOI: [10.1264/jjsme2.2001.67](https://doi.org/10.1264/jjsme2.2001.67)

Vigneron A., Cruaud P., Langlois V. et al. 2020. Ultra-small and abundant: candidate phyla radiation bacteria are potential catalysts of carbon transformation in a thermokarst lake ecosystem. *Limnology Oceanography Letters* 5: 212-220. DOI: [10.1002/lo.2.10132](https://doi.org/10.1002/lo.2.10132)

Wang Y., Hammes F., Boon N. et al. 2007. Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1 µm pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities. *Environmental Science and Technology* 41(20): 7080-7086. DOI: [10.1021/](https://doi.org/10.1021/)

[es0707198](#)

West-Roberts J.A., Matheus-Carnevali P.B., Schoelmerich M.C. et al. 2021. The Chloroflexi supergroup is metabolically diverse and representatives have novel genes for non-photosynthesis based CO<sub>2</sub> fixation. bioRxiv Available from: DOI: [10.1101/2021.08.23.457424](https://doi.org/10.1101/2021.08.23.457424)

Wu Q.L., Hahn M.W. 2006. Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiology Ecology* 57(1): 67-79. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x)

Zimmermann R., Meyer-Reil L.A. 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforschungen* 30(1): 24-27.



# Ультрамикробактерии и фильтрующиеся бактерии в планктоне оз. Байкал



Белых О.И.\*, Краснопеев А.Ю., Потапов С.А., Гутник Д.И., Сороковицова Е.Г., Бутина Т.В., Тихонова И.В.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской Академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, г. Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В озере Байкал комплексом методов впервые изучены численность, разнообразие и структура фемтобактериопланктона – бактерий, проходящих через фильтры с размером пор 0.2 мкм. Численность бактерий во фракции фемтопланктона составила  $7 \times 10^4$  кл/мл в слое воды 0-50 м по данным эпифлуоресцентной микроскопии, их вклад в общую численность бактерий достигал в среднем 4.4%. С помощью ДНК-метабаркодирования гена 16S рРНК выявлено высокое генетическое и таксономическое разнообразие бактерий фемтопланктона в пелагиали и литорали озера. В двух фракциях бактериопланктона оз. Байкал размером более и менее 0.2 мкм установлены доминирующие и минорные филумы, порядки, семейства, рода и филотипы бактерий, определен вклад ультрамелких бактерий в таксономический состав микробных сообществ в различных участках озера. Выявлены значительные различия микробиомов двух фракций бактериопланктона, описаны особенности состава ультрамикробактерий и фильтрующихся форм бактерий. Результаты показали значительную роль ультрамелких бактерий в экосистеме оз. Байкал.

**Ключевые слова:** ультрамикробактерии, фемтопланктон, оз. Байкал, численность, разнообразие, метабаркодирование

Для цитирования: Белых О.И., Краснопеев А.Ю., Потапов С.А., Гутник Д.И., Сороковицова Е.Г., Бутина Т.В., Тихонова И.В. Ультрамикробактерии и фильтрующиеся бактерии в планктоне оз. Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 795-820. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-795

## 1. Введение

Бактериопланктон играет ключевую роль в круговороте вещества и энергии в водных экосистемах. Большинство морских и пресноводных планктонных бактерий имеют небольшие размеры и объем клеток. Малые размеры являются значительным преимуществом в конкуренции за питательные вещества по сравнению с крупными организмами. Благодаря высокому соотношению поверхности к объему мелкоклеточные бактерии наиболее эффективно поглощают нутриенты, что особенно важно в олиготрофных водоемах с низким содержанием органического вещества, также они лучше защищены от выедания хищниками и быстрее адаптируются к экстремальным условиям среды (Hirsch, 1986; Schut et al., 1997b; Cavicchioli and Ostrowski, 2003; Hahn et al., 2003).

У большинства бактерий при культивировании на «бедных» средах, как правило, отмечается уменьшение размеров клеток, при переносе клеток

в более благоприятные условия размеры восстанавливаются или увеличиваются. Впервые Torrella и Morita (1981), исследуя мелкие морские гетеротрофные бактерии, обнаружили, что они очень медленно растут на стандартных питательных средах и не увеличиваются в размерах при длительном культивировании даже на «богатых» средах; авторы назвали эти микроорганизмы ультрамикробактериями (УМБ). Ультрамикробактерии – это бактерии с диаметром пролиферирующих клеток менее чем 0.3 мкм, объемом менее 0.1 мкм<sup>3</sup>, размером генома от 0.58 до 3.2 Мб (Torrella and Morita, 1981; MacDonell and Hood, 1982; Schut et al., 1997b; Velimirov, 2001; Duda et al., 2012). Ультрамелкие формы клеток с крайне малым размером генома описаны также и среди архей; ультрамикрoarхеи представлены, в основном, суперфилумом DPANN (Duda et al., 2012; Nakai, 2020).

В природных условиях УМБ адаптированы к низкой концентрации нутриентов и характеризуются высокой скоростью роста. Установлено, что

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [belykh@lin.irk.ru](mailto:belykh@lin.irk.ru) (О.И. Белых)

Поступила: 08 августа 2024; Принята: 21 августа 2024; Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



в морских и пресноводных средах обитания УМБ достигают высокой численности и выполняют важную роль в биогеохимических циклах, круговороте питательных веществ и в образовании биомассы (обзоры Schut et al., 1997b; Cavicchioli and Ostrowski, 2003; Duda et al., 2012; Nakai, 2020).

Культивирование УМБ в отличие от копиотрофных бактерий представляет собой чрезвычайно трудную задачу. Первым успешно выделенным видом является морская олиготрофная альфапротеобактерия *Sphingomonas* sp. (*Sphingopyxis alaskensis*) RB2256, изолированная из воды залива Аляска методом предельных разведений (Schut et al., 1993; Schut et al., 1997a). При дальнейшем изучении в культурах обнаружили некоторое количество клеток, превышающих размеры УМБ (Vancanneyt et al., 2001). Кроме того, установили, что *S. alaskensis* обладает геномом равным 3.35 Мб (Lauro et al., 2009). Позднее из географически удаленных озер разного трофического статуса были изолированы первые пресноводные УМБ, а именно, девять штаммов актинобактерий со стабильно ультрамелкими размерами и объемом клетки  $<0.1 \text{ мкм}^3$  (Hahn et al., 2003). Благодаря разработанному методу «фильтрация-разведения-акклиматизации», который начал широко применяться для других групп бактерий, получено множество штаммов пресноводных УМБ, в основном, протеобактерий и актинобактерий, например, кластеры видов *Polynucleobacter*, *Fonsibacter*, *Planktophila*, *Rhodoluna*.

Ультрамелкие формы бактерий проникают через фильтры с диаметром пор 0.45 и 0.2 мкм, это свойство используют для дифференциации и культивирования различных размерных групп, а также необходимо учитывать при стерилизации растворов и водоподготовки. Для бактерий, способных проходить через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм, обычно используют названия «фильтруемые» и/или «фильтрующиеся» бактерии, (Oppenheimer, 1952; Anderson and Heffernan, 1965; Tabor et al., 1981; MacDonell and Hood, 1982; Nakai, 2020). Термины УМБ и фильтрующиеся бактерии нередко применяли как взаимозаменяемые или равнозначные, однако с появлением генетических исследований, в частности, с определением размера генома, который в случае с УМБ имеет установленные границы, стало возможным четко разделить эти понятия. Вместе с тем следует учитывать, что при фильтрации плеоморфные бактерии с размером генома более 3.2 Мб все же проникают во фракцию менее 0.2 мкм благодаря особенностям строения клеточной стенки. Подробная классификация пяти типов ультрамелких и фильтрующихся форм микроорганизмов приведена в недавнем обзоре Nakai (2020).

В водоемах УМБ и фильтрующиеся бактерии (ФБ) формируют фемтопланктон – мельчайшую (0.02-0.2 мкм) и наименее изученную размерную фракцию планктона, включающую также и вирусы. В Байкале фемтобактериопланктон (ФБП) и ультрамелкие бактерии не были детально изучены, не смотря на многочисленные работы по анализу разнообразия микробных сообществ озера ([http://](http://lin.irk.ru/bibl/)

[lin.irk.ru/bibl/](http://lin.irk.ru/bibl/)). Метагеномные исследования планктона последних лет, направленные на восстановление геномов (metagenome-assembled genomes, MAGs) из фракции размером более 0.2 мкм, позволили выявить бактерии разных таксономических групп с высокоупорядоченными малыми размерами геномов в границах УМБ (Cabello-Yeves et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020; Haro-Moreno et al., 2023). Ранее из ила оз. Байкал выделена эпибионтная ультрамикробактерия рода *Chryseobacterium* с размером генома ~1.7 Мб, паразитирующая на *Bacillus subtilis* (Suzina et al., 2011).

Цель работы – оценить численность бактерий во фракции фемтопланктона в оз. Байкал с помощью эпифлуоресцентной микроскопии, определить генетическое и таксономическое разнообразие бактерий в двух фракциях бактериопланктона методами высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа и провести их сравнительный анализ.

## 2. Материалы и методы

Пробы воды для количественной оценки и ДНК-метабаркодинга гена 16S рРНК отобраны в сентябре в литоральной зоне пролива Малое Море (залив Куркутский) и в пелагиали озера на центральных станциях разрезов пос. Листвянка – пос. Танхой (Южный Байкал), м. Ухан – м. Тонкий (Средний Байкал) на глубинах: 0, 5, 10, 15, 25, 50 м (Рис. 1). В конце августа-начале сентября пробы воды взяты в Баргузинском заливе в слое 0-50 м, в прибрежном участке около пос. Турка в слое 0-5 м, в 2 км от г. Северобайкальска в слое 0-15 м (Рис. 1).

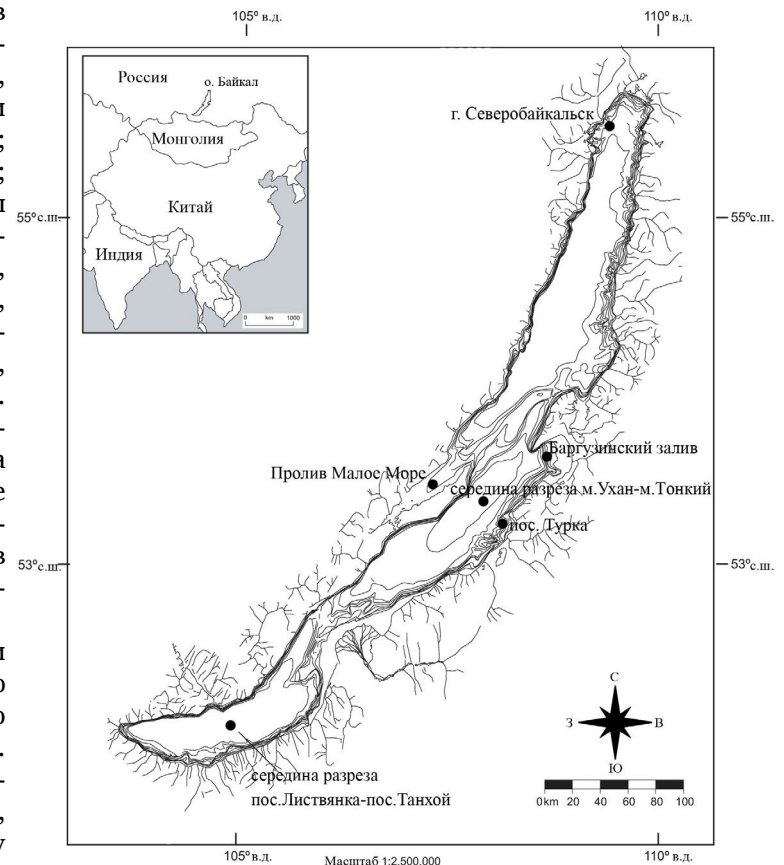


Рис. 1. Карта озера Байкал. Места отбора проб.

Отбор проб проводили на научно-исследовательских судах ЛИН СО РАН, используя систему батометров SBE-3 (Carousel Water Sampler, Sea Bird Electronics Inc., США) и батометр Нискина.

Для оценки численности бактерий пробы объемом 100 мл фиксировали формалином (конечная концентрация 2%). Далее их фильтровали через поликарбонатные фильтры (Millipore, США). Учет общей численности бактериопланктона (ОЧБ) выполняли на фильтрах с диаметром пор 0.2 мкм, для учета УМБ и ФБ пробы воды пропускали через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм, затем клетки из фильтрата осаждали на поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0.05 мкм (Whatman, Великобритания). Клетки на фильтрах окрашивали красителем ДАФИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) (Sigma, США). Препараты просматривали под микроскопом Axio Imager M1 (Carl Zeiss, ФРГ). Подсчет клеток проводили в ультрафиолетовом свете ( $\lambda = 358$  нм) в 20 полях зрения в 3-х повторностях.

Для метабаркодинга пробы воды объемом 500 мл, отобранные с разных глубин от 0 до 50 м на одной станции, объединяли в интегральную пробу. Далее образцы концентрировали на поликарбонатных фильтрах с диаметром пор 0.2 мкм для фракции размером более 0.2 мкм (бактериопланктон, БП) и на фильтрах 0.05 мкм для фракции размером менее 0.2 мкм (фемтобактериопланктон, ФБП). Суммарную ДНК из образцов выделяли после фильтрации с помощью набора «ДНК-Сорб В» (ИнтерЛабСервис», Россия). Для амплификации использовали праймеры 343F и 806R, фланкирующие участок V3-V4 гена 16S рРНК. Метагеномное секвенирование образцов произведено на геномном секвенаторе Miseq Illumina (ЦКП «Геномика», ИХБФМ СО РАН, Россия).

Контроль качества результатов секвенирования, кластеризацию в ОТЕ и таксономическую идентификацию проводили как описано ранее (Belykh et al., 2023). Таксономическая классификация в данной работе дана согласно базе данных Silva v.138.1 (<https://www.arb-silva.de>). В случае неидентифицированных последовательностей осуществляли дополнительный поиск данных с помощью BLAST-анализа (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Данные секвенирования доступны на платформе Zenodo (doi [10.5281/zenodo.13254752](https://doi.org/10.5281/zenodo.13254752)).

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Численность фемтобактериопланктона

В пелагиали оз. Байкал ОЧБ варьировала от  $0.5$  до  $2.5 \times 10^6$  кл/мл в слое 0-50 м. Численность бактерий во фракции размером менее 0.2 мкм в слое 0-50 м составила в среднем  $7.0 \times 10^4$  кл/мл, на исследуемых станциях максимум  $1.0 \times 10^5$  кл/мл отмечен на глубинах 10 и 15 м. Ниже 25 м численность бактерий в двух фракциях уменьшается в два и более раз. Доля ультрамелких бактерий в общей численности бактерий достигала в среднем 4.4%.

В целом, количественные данные УМБ и ФБ в оз. Байкал превышали показатели, полученные для других пресных водоемов. Так, в кислотных озерах севера России численность бактерий, проникающих через фильтры 0.2 мкм, была  $1.69-3.1 \times 10^4$  кл/мл клеток, что составило 0.4-3.1% от ОЧБ (Fedotova et al., 2012), в Рыбинском водохранилище их численность равнялась  $2.28 \pm 0.16 \times 10^4$  кл/мл или 1.6% от ОЧБ (Fedotova et al., 2013). Сходные показатели отмечены в восьми пресных водоемах Швейцарии; доля бактерий, прошедших через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм, составила в среднем 3.61% от ОЧБ в оз. Цюрих, в оз. Грейфензе – 0.53%, в оз. Лугано – 1.9%, в реках вклад ультрамелких клеток ниже, до 0.03-1.3% (Wang et al., 2007). Напротив, пробы из олиготрофного озера Мондзее в Австрии содержали  $3.0 \times 10^5$  клеток бактерий селеноидной формы и объемом менее  $0.1$  мкм<sup>3</sup> в 1 мл воды, т.е. до 20% от всего бактериопланктона (Hahn, 2003).

По сравнению с олиготрофными районами морей и океанов в Байкале численность фемтобактериопланктона ниже. В малопродуктивных районах океанов концентрация клеток с объемом менее  $0.1$  мкм<sup>3</sup> составляла  $10^5-10^6$  кл/мл по данным точной цитометрии (Schut et al., 1993).

Необходимо отметить, что при оценке численности малых форм бактерий прямым микроскопическим методом возникает много трудностей. В литературе данные существенно разнятся преимущественно из-за использования различных типов фильтров, а также вследствие подмены таких понятий как ультрамикробактерии и фильтрующиеся формы бактерий, как уже упоминалось выше. Несмотря на возникающие сложности с развитием методик фильтрования, внедрением в практику микробиологических исследований флуоресцентной микроскопии и поликарбонатных фильтров с диаметром пор 0.2 мкм и менее, а также широкого спектра флуоресцентных красителей, количественный учет бактерий стал более успешным (Zimmermann and Meyer-Reil, 1974; Hobbie et al., 1977; Porter and Feig, 1980; Kepner and Pratt, 1994). В последние десятилетия проточная цитометрия стала наиболее эффективным методом подсчета природных планктонных бактерий, однако и она не лишена недостатков (Gasol et al., 1999; Gasol and del Giorgio, 2000). Морфология и ультраструктура бактерио- и фемтопланктона успешно описана с использованием электронной микроскопии (Fischer and Velimirov, 2000; Colombet et al., 2020). Очевидно, что в настоящее время требуется достоверная оценка численности бактерий различных размерных фракций в водных экосистемах с применением комплекса новейших методов.

#### 3.2. Состав и структура микробных сообществ по данным метагеномного анализа

В прибрежных районах оз. Байкал в бактериопланктоне доминировали представители филомы Proteobacteria (Pseudomonadota) с преоб-



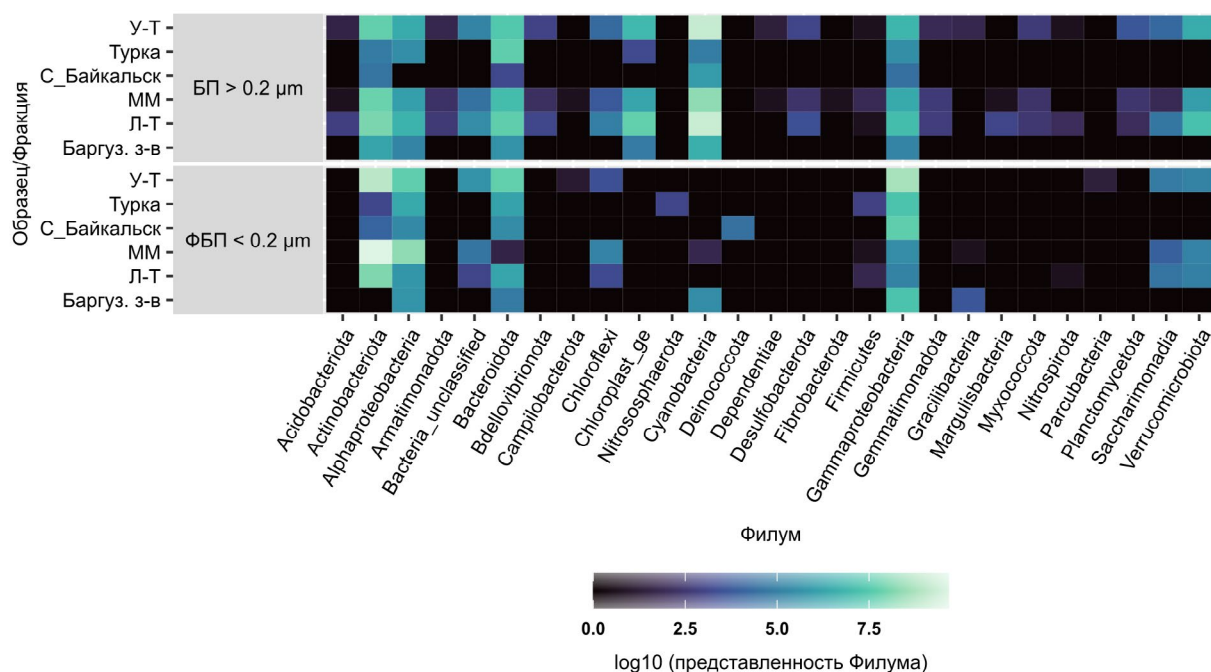
ладанием класса Gammaproteobacteria (Рис. 2, Рис. 3). Протеобактерии составляли в среднем 55% от всех нуклеотидных последовательностей (НП) гена 16S рРНК микробных сообществ литорали, из них на фракцию УМБ приходилось 48% НП. Субдоминантами выступали бактерии филумов Bacteroidota (26%) и Cyanobacteria (11%), ультрамелкие формы среди них были немногочисленны, 6% и 2% соответственно. Доля Actinobacteriota в литорали озера насчитывала 6.2% от НП всего бактериопланктона, из них во фракции более 0.2 мкм – 5.6% и менее 0.2 мкм – 0.6%. Минорные филумы представлены Deinococcota, Firmicutes, Patescibacteria (класс Gracilibacteria) и археями Nitrososphaerota, эти группы встречались исключительно во фракции менее 0.2 мкм.

На глубоководных станциях оз. Байкал преобладали актинобактерии, до 37% от общего количества НП в пелагических пробах, доля УМБ здесь достигала 29%; в состав доминирующих филумов входили Cyanobacteria (26%), Proteobacteria (19%) и Bacteroidota (9%) (Рис. 2, Рис. 3). У протеобактерий были многочисленны ультрамелкие морфотипы (14%), напротив, у бактериоидов чаще встречались крупноразмерные формы (6%), а цианобактерии содержали практически только пикопланктонные рода кластера *Cyanobium/Synechococcus*, диаметр клеток которых превышал 0.3 мкм (26%). В пелагиали в большем количестве присутствовали Alphaproteobacteria, чем Gammaproteobacteria. Состав бактериальных сообществ в пелагиали являлся более разнообразным по сравнению с литоралью за счет минорных филумов, которые включали Acidobacteriota, Armatimonadota,

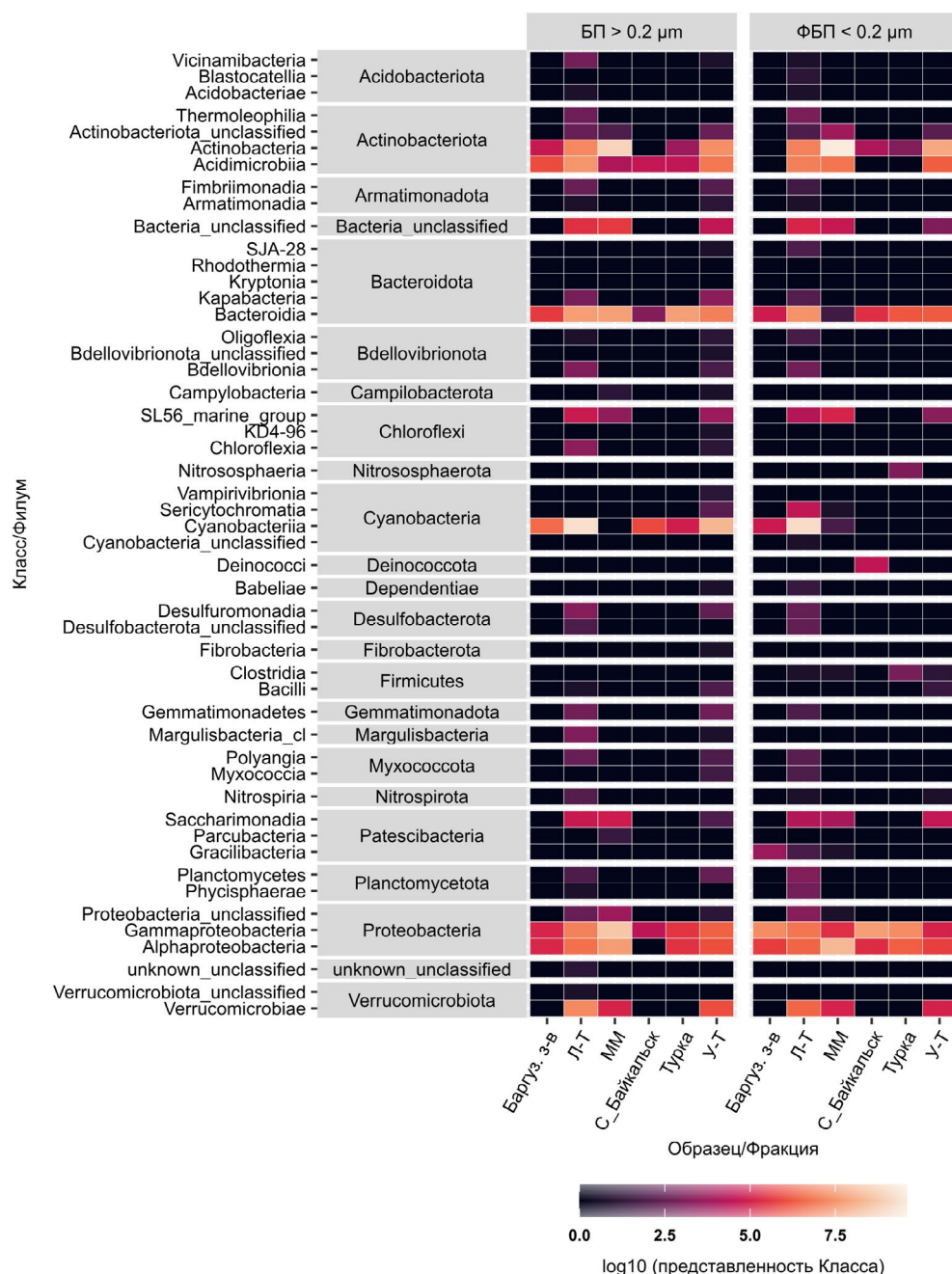
Bdellovibrionota, Campilobacterota, Chloroflexi, Dependientiae, Desulfobacterota, Fibrobacterota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Margulisbacteria, Muxococcota, Nitrospirota, Patescibacteria (Gracilibacteria, Parcubacteria, Saccharimonadia), Planctomycetota, Verrucomicrobiota. Из них УМБ обнаружены среди филумов Campilobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Nitrospirota, Verrucomicrobiota и Patescibacteria, включая Gracilibacteria, Parcubacteria, Saccharimonadia.

Анализ разнообразия микробных сообществ бактериопланктона оз. Байкал на уровне таксонов ниже ранга филумов, позволил выявить некоторые особенности в его составе (Рис. 4, Рис. 5).

**Actinobacteriota.** Ультрамелкие актинобактерии были представлены двумя классами: Acidimicrobiia и Actinobacteria. Наиболее многочисленный порядок класса Acidimicrobiia – Microtrichales, среди которого по обилию выделяется семейство Plumetobacteraceae, а, именно, CL500-29\_marine\_group (ОТЕ6, 11, 19, 35, 83 и др.). Эта группа часто встречалась в двух фракциях бактериопланктона в пелагиали озера, возможно, во фракцию фемтопланктона они попадают путем фильтрации. В CL500-29\_marine\_group нет культивируемых видов. Бактерии этой группы широко распространены в эпилимнионе озер, как показывают молекулярно-генетические исследования, в том числе реконструкция геномов. CL500-29\_marine\_group бактерии способны аэробно использовать несколько различных источников углерода (ацетат, пируват, аминокислоты, глюкоза и гликолат). Предполагается, что представители группы CL500-29 играют роль в разложении растворенного орга-



**Рис.2.** Тепловая карта представленности бактерий на уровне филумов и классов (альфа- гаммапротеобактерии) в двух фракциях бактериопланктона оз. Байкал: более 0.2 мкм (крупноразмерный бактериопланктон, БП) и менее 0.2 мкм (фемтобактериопланктон, ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. з-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, Л-Т – центральная станция разреза пос. Листвянка-пос. Танхой, У-Т – центральная станция разреза м. Ухан–м. Тонкий, ММ – пролив Малое Море (з-в Куркутский).



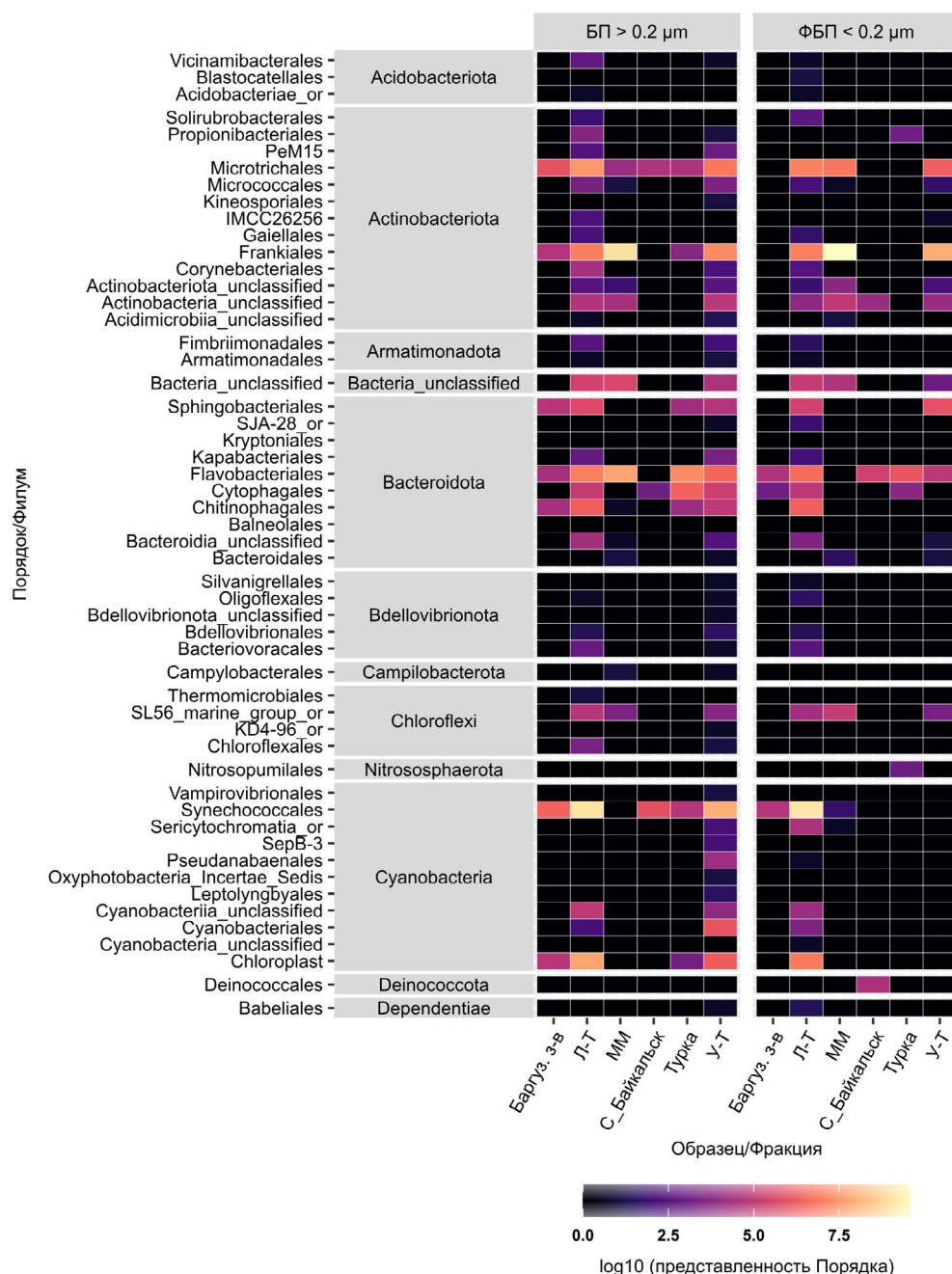
**Рис.3.** Тепловая карта представленности бактерий на уровне классов в двух фракциях бактериопланктона оз. Байкал: более 0.2 мкм (БП – крупноразмерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП – фемтобактериопланктон). Станции отбора проб: Баргуз. 3-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, Л-Т – центральная станция разреза пос. Листвянка–пос. Танхой, У-Т – центральная станция разреза м. Ухан–м. Тонкий, ММ – пролив Малое море (3-в Куркутский).

нического углерода, особенно высокомолекулярных соединений, таких как гуминовые вещества (Guo et al., 2023).

Класс Actinobacteria содержал большое количество последовательностей УМБ, принадлежащих семейству Sporichthyaceae (порядок Frankiales), включая представителей кандидатного рода ‘*Candidatus Planktophila*’, неидентифицированные последовательности линии acI (=hgcI\_clade) и Sporichthyaceae. Генотипы *Planktophila* были многочисленны и разнообразны (пять из них входили в первые 100 «топовых» ОТЕ), сходство байкальских ОТЕ с известными из БД Genbank составляло более 97%, наиболее близкими родственниками являлись

‘*Ca. Planktophila limnetica*’ (ОТЕ5), ‘*Ca. Planktophila sulfonica*’ (ОТЕ13), ‘*Ca. Planktophila lacus*’ (ОТЕ29), ‘*Ca. Planktophila versatilis*’ (ОТЕ65) из Цюрихского озера. Типовой вид ‘*Ca. Planktophila limnetica*’ впервые изолировали в смешанной культуре с другими УМБ из небольшого озера в Австрии, штамм имел С-образные клетки диаметром 0.4-0.5 мкм и длиной 1.0-1.2 мкм и демонстрировал хороший рост в присутствии L-аланина (Jezbera et al., 2009).

Значительная доля последовательностей линии acI/hgcI\_clade из оз. Байкал принадлежала согласно BLAST-анализу роду ‘*Candidatus Nanopelagicus*’. Самый многочисленный генотип бактериопланктона (ОТЕ1) был на 100% сходен с



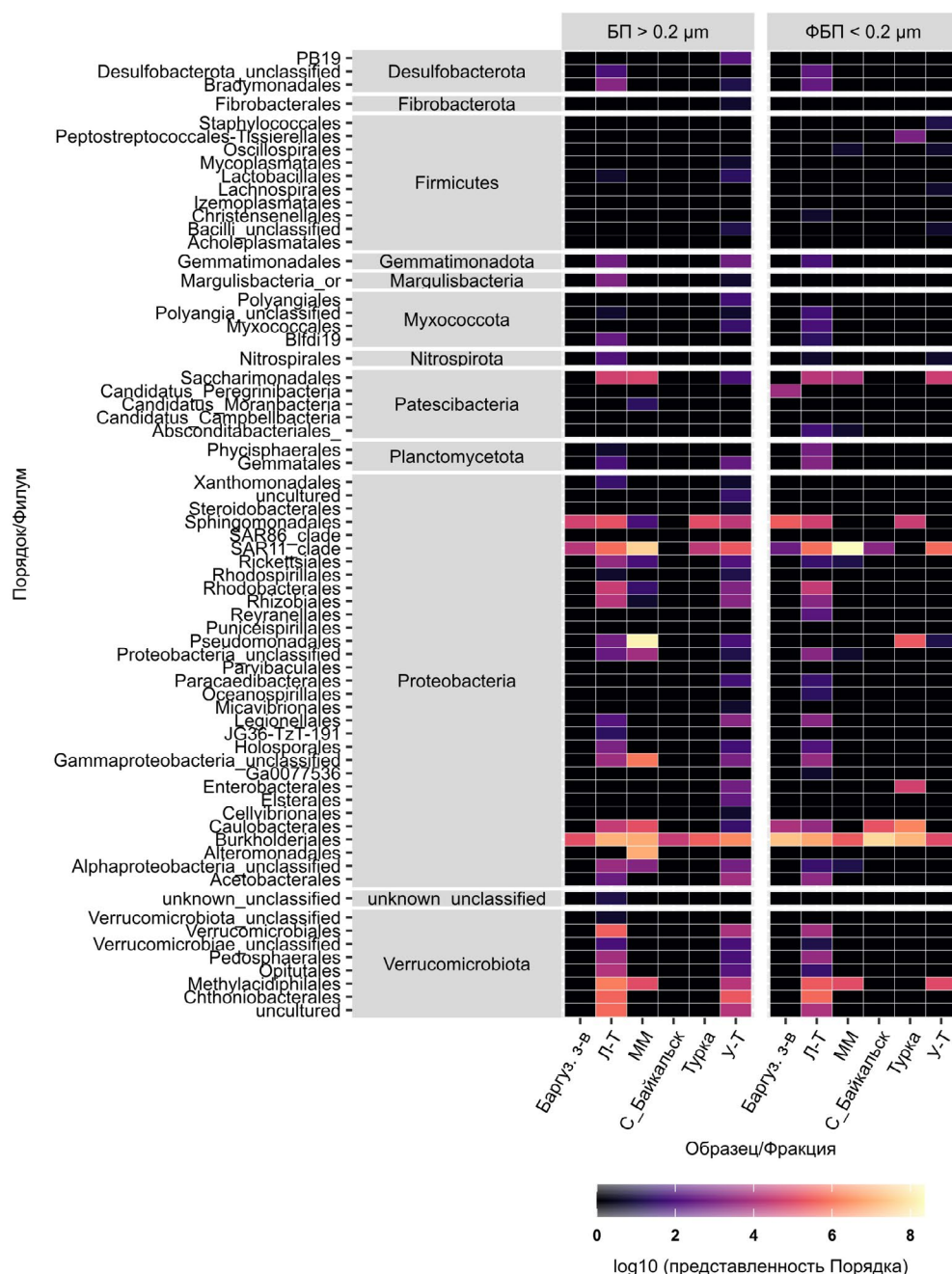
**Рис.4А.** Тепловая карта представленности бактерий на уровне порядков: более 0.2 мкм (БП – крупноразмерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. 3-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, Л-Т – центральная станция разреза пос. Листвянка-пос. Танхой, У-Т – центральная станция разреза м. Ухан–м. Тонкий, ММ – пролив Малое Море (3-в Куркутский).

‘*Ca. Nanopelagicus hibericus*’ из Цюрихского озера (Neuenschwander et al., 2018). ‘*Ca. Nanopelagicus hibericus*’ характеризовался чрезвычайно малыми размерами клеток (объем 0.012 мкм<sup>3</sup>) и упорядоченным небольшим геномом (1.22 Мб) наряду с другими полученными штаммами родов ‘*Ca. Nanopelagicus*’ и ‘*Ca. Planktophila*’. В настоящее время два кандидатных рода объединены в новый порядок ‘*Ca. Nanopelagicales*’, включающий только истинные УМБ (Neuenschwander et al., 2018).

Актинобактерии линии acI/hgcI clade являются одними из наиболее успешных и широко распространенных микроорганизмов в пресных озерах различного трофического статуса, составляя более 50% всех бактерий (Newton et al., 2007,

Newton et al., 2011; Neuenschwander et al., 2018). Они часто содержат актинородопсины, с помощью которых трансформируют энергию солнечного света в АТФ, и ведут фотогетеротрофный образ жизни. Бактерии acI/hgcI clade доминировали по количеству НП и ОТЕ среди всех УМБ оз. Байкал. Предполагается, что бактерии линии acI/hgcI clade многочисленны во время массового развития фитопланктона, т.к. используют богатые полисахаридами экссудаты водорослей (García et al., 2013; Salcher et al., 2013; Pérez et al., 2015) помимо аллохтонных источников углерода (Buck et al., 2009; Pérez and Sommaruga, 2006). Характерной особенностью ‘*Ca. Nanopelagicales*’ является их способность поглощать богатые азотом соединения,





**Рис.4Б.** Тепловая карта представленности бактерий на уровне порядков: более 0.2 мкм (БП – крупноразмерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. з-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, Л-Т – центральная станция разреза пос. Лиственянка-пос. Танхой, У-Т – центральная станция разреза м. Ухан–м. Тонкий, ММ – пролив Малое Море (з-в Куркутский).

они могут ассимилировать аммиак, аминокислоты, а также полиамины спермидин и путресцин. Кроме того, все ‘*Ca. Nanorelagicales*’ разлагают цианофизин – накопительный полимер цианобактерий, состоящий из аргинина и L-аспарагиновой кислоты (Neuenschwander et al., 2018).

Небольшое количество ОТЕ семейства *Microbacteriaceae* (*Micrococcales*) обнаружено во фракции фемтопланктона. Так, хорошо известные УМБ кандидатных родов ‘*Ca. Aquiluna*’ и ‘*Ca. Planktoluna*’ (Hahn, 2009) редко встречались в пелагиали озера, последовательности ‘*Ca. Planktoluna*’ определены только во фракции более 0.2 мкм.

**Bacteroidota.** В оз. Байкал ультрамелкие бактерии принадлежали классу *Bacteroidia*, поряд-

кам *Bacteroidales*, *Chitinophagales*, *Cytophagales*, *Flavobacteriales*, *Sphingobacteriales*. Среди классифицированных генотипов определены представители родов *Dinghuibacter*, *Emticicia*, *Pseudarcicella*, *Flavobacterium*, *Fluviicola*, *Solitalea*, значительная часть *Bacteroidota* содержала неидентифицированные ОТЕ. Следует отметить, что для бактериоидов характерно низкое количество ультрамелких форм клеток, возможно, многие из них попали во фракцию УМБ в результате фильтрования и являются фильтрующимися бактериями.

**Proteobacteria.** Бактерии филума *Proteobacteria*, обнаруженные во фракции размером менее 0.2 мкм в оз. Байкал, отнесены к *Alpha-* и *Gammaproteobacteria* и неидентифициро-



**Рис.5.** Тепловая карта представленности доминирующих бактериальных ОТЕ (топ-53): более 0.2 мкм (БП – крупно-размерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. з-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, ЛТ-Т – центральная станция разреза пос. Листвянка-пос. Танхой, У-Т – центральная станция разреза м. Ухан-м. Тонкий, ММ – пролив Малое Море (з-в Куркутский).

ванным Proteobacteria. Ультрамелкие формы альфапротеобактерий детектированы среди порядков Caulobacterales, Rhodobacterales, Rickettsiales, Sphingomonadales, SAR11\_clade.

SAR11\_clade – одна из самых многочисленных групп в оз. Байкал – содержала разнообразную и обильную линию Clade\_III\_ge, доминирующую во фракции менее 0.2 мкм в пелагиали оз. Байкал. Clade\_III\_ge представлена филотипами ‘*Ca. Fonsibacter ubiqvis*’, включая третью по количеству последовательностей ОТЕ в микробиомах озера.

Клада SAR11, первоначально известная как морская, является одной из самых распространенных в водоемах, особенно хорошо бактерии клады приспособлены к олиготрофным условиям

(Giovannoni, 2017; Chiriac et al., 2023). Как известно, семейство ‘*Ca. Pelagibacteraceae*’ включает четыре кластера: SAR11-I и SAR11-II встречаются почти исключительно в морских водах, SAR11-IIIa обнаружены в солоноватых водах, а кластер SAR11-IIIb (также называемый LD12 или ‘*Ca. Fonsibacter*’) найден исключительно в пресных водоемах (Henson et al., 2018; Tsementzi et al., 2019). SAR11\_clade состоит из фотогетеротрофных бактерий, способных окислять широкий спектр одноуглеродных соединений и использовать свет как источник энергии с помощью протеородопсина. В стратифицированной олиготрофной водной толще оз. Байкал их роль, очевидно, велика и совсем не изучена. Морские бактерии SAR11\_clade, преимущественно *Pelagibacter*

spp., потребляют низкомолекулярное растворенное органическое вещество. В Байкале филоциты близкородственные *Pelagibacter* spp. нами не обнаружены. Ранее было восстановлено два генома SAR11 из пелагических проб оз. Байкал, которые входили в состав морской клады I (Cabello-Yeves et al., 2020), они не показали сходства с нашими последовательностями.

В прибрежных участках и в пелагиали озера часто встречались ультрамелкие формы *Brevundimonas* spp. (OTE20) (Caulobacterales), в меньшем количестве они найдены и в составе крупно-размерной фракции. Род *Brevundimonas* объединяет облигатно аэробных умеренно психрофильных бактерий, которые отличаются высокой устойчивостью к факторам внешней среды. Представители рода могут вызывать инфекции у человека и животных, они проходят через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. *Brevundimonas* spp. часто выделяют из очищенной воды, в т.ч. питьевой, они устойчивы к действию антисептиков и дезинфектантов. Обнаружение фильтрующихся бактерий рода *Brevundimonas* во фракции размером менее 0.2 мкм указывает на необходимость тщательной пробоподготовки природной воды при ее использовании в качестве питьевой.

Из условно патогенных в составе фемтопланктона обнаружены виды рода *Wolbachia* (Rickettsiales) в Малом Море и в Среднем Байкале. Род *Wolbachia* – облигатные внутриклеточные симбионты членистоногих и нематод-филярий, которые также могут инфицировать человека.

Среди Sphingomonadales в обеих фракциях в большом количестве идентифицированы генотипы родов *Sphingomonas* и *Sphingorhabdus*. Представители *Sphingomonas* многочисленны вблизи пос. Турка, *Sphingorhabdus* – в Баргузинском заливе.

Gamma-proteobacteria включали 12 порядков, ультрамелкие формы бактерий найдены среди порядков Alteromonadales, Burkholderiales, Enterobacterales, Pseudomonadales.

Род *Rheinheimera* (Alteromonadales) – 4-й по количеству НП среди УМБ гаммапротеобактерий. Род *Rheinheimera* объединяет аэробные хемогетеротрофные бактерии, утилизирующие широкий спектр углеводов. Вероятно, в нашем случае они являются фильтрующимися формами бактерий, а не истинными УМБ, т.к. размер клеток рода *Rheinheimera* превышает границы УМБ.

Burkholderiales (ранее известные как Betaproteobacteria) – самый многочисленный порядок по количеству НП УМБ. Семейство Burkholderiaceae содержало значительное количество мелких форм бактерий, например, в прибрежных районах часто встречались *Ralstonia* spp., в пелагиали оз. Байкал в двух фракциях выявлен *Polynucleobacter* spp. Представители рода *Polynucleobacter* являются наиболее часто обнаруживаемыми мелкими протеобактериями в пресных водах разной степени трофности и pH среды. Многочисленные штаммы свободноживущих аэробных гетеротрофных ультрамикробактерий этого

рода (преимущественно из субкладов PncC и PncD) выделены из различных пресных водоемов (Hahn, 2003; Hahn et al., 2005; Wu and Hahn, 2006a; Vannini et al., 2007; Chiriac et al., 2023).

Среди семейства Chromobacteriaceae в фемтопланктоне следует выделить денитрифицирующие органогетеротрофные бактерии рода *Vogesella*. Семейство Comamonadaceae отличалось разнообразием родов и видов в оз. Байкал и включало бактерии родов *Limnohabitans*, *Rhodoferrax*, *Acidovorax*, *Delftia*, *Malikia*, *Paucibacter*.

Семейство Methylophilaceae с ультрамикробактериями рода '*Ca. Methylophilum*' выявлено в двух фракциях планктона в пелагиали оз. Байкал, филоциты этого рода входили в 100 «топовых» ОТЕ. Как известно, бактерии семейства Methylophilaceae относятся к наиболее важным метилотрофам, играющим ключевую роль в круговороте углерода в водной среде обитания (Chistoserdova, 2015; Salcher et al., 2019). Methylophilaceae специализируются на использовании восстановленных одноуглеродных (C1) соединений, таких как метанол, метиламин и формальдегид в качестве единственных источников энергии и углерода (Salcher et al., 2019). Два штаммы рода '*Ca. Methylophilum*' выделены из пелагиали Цюрихского озера: '*Ca. Methylophilum planktonicus*' (LD28) и '*Ca. Methylophilum turicensis*' (PRD01a001B) с размерами генома 1.36 Мб и 1.76 Мб соответственно (Salcher et al., 2015). Пресноводные '*Ca. Methylophilum planktonicus*' повсеместно и в изобилии встречаются в озерах с максимумами численности до  $11.3 \times 10^4$  кл/мл (4% от общего количества прокариот) во время массового развития диатомовых и/или цианобактерий (Salcher et al., 2015; Salcher et al., 2019).

Среди семейства Oxalobacteraceae отмечены в пелагиали ультрамелкие представители родов *Duganella* и *Rugamonas* и двух некультивируемых родов. Бактерии порядка Enterobacterales с родом *Serratia* идентифицированы исключительно в составе фемтопланктона прибрежной зоны.

Pseudomonadales – второй по количеству НП ультрамикробактерий порядок гаммапротеобактерий, среди которого род *Pseudomonas* отличался наибольшим видовым богатством и обилием. Представители рода *Pseudomonas* – факультативно аэробные, хемоорганогетеротрофные бактерии – демонстрируют высокое метаболическое разнообразие и способность колонизировать широкий спектр ниш. В оз. Байкал, по нашим предварительным данным, наряду с крупноразмерными *Pseudomonas* обитают истинные УМБ рода *Pseudomonas* с упорядоченным, малым размером генома, как показал анализ реконструированных геномов из метагеномных проб с использованием метода «дробовика».

**Verrucomicrobiota.** В фемтопланктоне пелагиали найдены разнообразные и многочисленные последовательности гена 16S рPHK (208 ОТЕ) сходные на 98.8% с некультивируемыми Methylophilaceae согласно базе данных Silva v.138.1. Представители семейства '*Ca. Methylophilum*' описаны как термоацидо-



фильные метанооксиляющие бактерии с оптимальным ростом при 55-60°C и в диапазоне pH от 0.8 до 6. В базе данных GTDB (<https://gtdb.ecogenomic.org/>) ‘Ca. Methylacidiphilaceae’ представлены 26 геномами и тремя родами: *Methylacidiphilum*, *Methylacidimicrobium*, ‘Ca. Methylacidithermus’, размер геномов варьирует от 1.88 до 2.77 Мб. Геномы ‘Ca. Methylacidiphilaceae’ содержат три оперона pmoCAB, кодирующих монооксигеназу метана (pMMO) (Kruse et al., 2019; Awala et al., 2023). BLAST-анализ показал высокое сходство байкальских изолятов с некультивируемыми последовательностями из пресных озер Северной Америки (Martinez-Garcia et al., 2012), из альпийского оз. Бурже, где они формировали кладу LD19, отличающуюся высокой долей свободноживущих ОТЕ (Parveen et al., 2013), из оз. Байкал (более 98%). Экологические условия в оз. Байкал являются неподходящими для известных культивируемых бактерий и как показывает функциональный анализ восстановленных геномов этого семейства. Очевидно, что требуется дальнейшее детальное изучение мельчайших форм веррукомикробий в озере.

**Chloroflexi.** Chloroflexi линии SL56\_marine\_group\_fa (47 ОТЕ) часто присутствовали в пелагиали озера. Известно, что группа SL56 является доминирующей в эпилимнионе озер и пресных водоемов, например, в водохранилище Rimov (Чехия) максимальная доля SL56 составляла 1.1% от всего бактериопланктона по данным анализа 16S рДНК и CARD-FISH (Mehrshad et al., 2018; Chiriach et al., 2023). Геномы некультивируемой линии SL56 размером около 1.0 Мб были реконструированы из географически удаленных водоемов (Европа, Северная и Южная Америка), согласно ANI (average nucleotide identity) они принадлежали девяти различным видам (Mehrshad et al., 2018). Из глубоководных проб оз. Байкал также был восстановлен геном линии SL56 – *Limnocyclus* sp009692905 (Cabello-Yeves et al., 2020). Хлорофлексии линии SL56 используют световую энергию благодаря наличию родопсинов, некоторые виды могут фиксировать CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина-Бенсона-Бассема и содержат группу NiFe-гидрогеназ, которые обеспечивают электронами RuBisCO (West-Roberts et al., 2021; Chiriach et al., 2023). Бактерии линии Chloroflexi SL56 было предложено классифицировать как кандидатный род ‘Ca. Limnocyclus’ в составе порядка ‘Ca. Limnocyclusales’ и класса ‘Ca. Limnocyclusia’ (Mehrshad et al., 2018).

**Patescibacteria.** Суперфилум CPR/Patescibacteria представлен за некоторым исключением некультивируемыми бактериями с относительно небольшими размерами клеток (~0,7 мкм) (Albertsen et al., 2013) и геномов (менее ~1 Мб), что часто ассоциируется с симбиотическим и паразитическим образом жизни (Lemos et al., 2019). В пелагиали оз. Байкал мы обнаружили присутствие представителей класса Saccharimonadia (18 ОТЕ), включая сходных на 97.8% с кандидатным видом ‘Ca. Mucosynbacter amalyticus’ (ОТЕ86). ‘Ca. Mucosynbacter amalyticus’ описан как паразитирующий вид с размером генома 1.0 Мб, он изолирован

из сточных вод совместно со штаммами-хозяевами *Gordonia amarae* и *Gordonia pseudoamarae*, которые способствуют стабилизации пены в очистных сооружениях, затрудняя очистку сточных вод (Batinovic et al., 2021).

Бактерии рода ‘Ca. Moranbacteria\_ge’ класса Parcubacteria присутствовали только в пелагиали оз. Байкал. На основе анализа восстановленных геномов известно, что Moranbacteria ферментируют органические вещества до ацетата и деградируют хитин, играя ключевую промежуточную роль в круговороте углерода и метана в субарктических озерах (Vigneron et al., 2020).

В Баргузинском заливе и Малом Море выявлены представители класса Gracilibacteria: ‘Ca. Peregrinibacteria\_ge’ и неидентифицированные генотипы Absconditabacteriales. ‘Ca. Peregrinibacteria\_ge’ имеют упорядоченные небольшие геномы, кодирующие набор крупных внеклеточных белков, некоторые из которых очень богаты цистеином и могут выполнять функцию прикрепления, возможно, к другим клеткам. В целом, особенности клеточной оболочки в сочетании с отсутствием способности к биосинтезу многих необходимых кофакторов, жирных кислот и большинства аминокислот указывают на симбиотический образ жизни (Anantharaman et al., 2016).

Ранее восстановленные геномы и последовательности гена 16S рРНК Patescibacteria были описаны в оз. Байкал в глубоких слоях воды (Cabello-Yeves et al., 2020; Haro-Moreno et al., 2023).

Другие филумы. Последовательности гена 16S рРНК, принадлежащие филумам Deinococcota, Firmicutes, Campilobacterota, Nitrospirota, во фракции размером менее 0.2 мкм обнаружены в небольшом количестве. В прибрежной зоне около г. Северобайкальска выявлены последовательности *Deinococcus* sp. (Deinococcota) гомологичные (100%) *Deinococcus aquaticus*. Firmicutes представлены филотипами близкородственными (97-99%) бактериям, ассоциированными с микробиомами человека и животных: с *Gemella sanguinis*, *Peptoniphilus lacydonensis*, *Blautia wexlerae* и *Ruminococcus* spp. Последовательности сходные (98%) с *Arcobacter* sp. (Campilobacterota) – психрофильной денитрифицирующей бактерией палочковидной формы – определены в пелагиали и в Малом Море. Филум Nitrospirota содержал филотипы *Nitrospira* spp. – повсеместно распространенных нитрифицирующих бактерий, осуществляющих окисление нитритов на втором этапе нитрификации. Вероятнее всего, байкальские представители вышеназванных таксонов являются фильтрующимися формами, их близкие родственники характеризуются большими размерами клеток, чем УМБ.

В исследуемый период отмечено массовое развитие пикопланктонных цианобактерий. Это явление характерно для оз. Байкал и наблюдается ежегодно в июле-сентябре, максимальная численность мельчайших цианобактерий родов *Cyanobium*/*Synechococcus* размером 0.2-2.0 мкм может достигать 3 млн кл/мл (Belykh et al., 2006). В микробных сообществах преобладали генотипы кластера

*Cyanobium/Synechococcus*, например, ОТЕ 2, 4, 12, 15, 16, 21 и т.д. Возможно, летне-осенний период крайне благоприятен для развития ультрамелких форм гетеротрофных бактерий, в том числе благодаря повышенной концентрации поддерживающих их рост органических веществ, выделяемых фотоавтотрофными цианобактериями.

#### 4. Выводы

Впервые в оз. Байкал проведена оценка численности фемтобактериопланктона. Результаты показали высокую численность бактерий во фракции планктона размером менее 0.2 мкм, что соответствует концепции о преобладании мелких форм бактерий в олиготрофных водных экосистемах. Сравнительный анализ численности ультрамелких форм бактерий в оз. Байкал и в других водоемах показал необходимость усовершенствования методов учета фемтопланктона.

В оз. Байкал методами ДНК-метабаркодинга и биоинформатического анализа впервые установлены генетический и таксономический состав и структура сообществ бактерий, прошедших через фильтры размером менее 0.2 мкм. Показано высокое разнообразие и многочисленность ультрамелких бактерий. Микробиомы крупноразмерного бактериопланктона и фемтобактериопланктона (ультрамикробактерий) значительно отличались друг от друга по составу и структуре на всех таксономических уровнях. Существенные различия обнаружены между составом и структурой микробных сообществ литорали и пелагиали. В прибрежных районах оз. Байкал в бактериопланктоне доминировали представители филума Proteobacteria, субдоминантами были Bacteroidota и Cyanobacteria. В пелагиали преобладали Actinobacteriota, в состав доминирующих филумов также входили Cyanobacteria, Proteobacteria и Bacteroidota.

Минорные филумы бактериопланктона включали Acidobacteriota, Armatimonadota, Campilobacterota, Bdellovibrionota, Dependientiae, Desulfobacterota, Fibrobacterota, Gemmatimonadota, Margulisbacteria, Мухососсота, Planctomycetota, среди них фемтопланктонные представители не найдены ни в пелагиали, ни в литорали озера. Бактерии филума Deinococcota, класса Parcubacteria и археи Nitrososphaerota выявлены только во фракции размером менее 0.2 мкм.

В оз. Байкал наибольшим количеством УМБ отличались филумы Actinobacteriota и Proteobacteria. У бактерий класса Saccharimonadia (Patescibacteria) более половины последовательностей 16S рДНК обнаружено во фракции фемтопланктона; среди филумов Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidota, Nitrospirota, класса Gracilibacteria (Patescibacteria), Verrucomicrobiota – менее половины последовательностей принадлежало ультрамелким морфотипам.

В фемтопланктоне определены многочисленные последовательности пяти порядков актинобактерий (IMCC26256, Microtrichales,

Frankiales, Micrococcales, Propionibacteriales), девяти порядков протеобактерий (Caulobacterales, Rhodobacterales, Rickettsiales, Sphingomonadales, SAR11\_clade, Alteromonadales, Burkholderiales, Enterobacteriales, Pseudomonadales), пяти порядков бактериоидов (Bacteroidales, Chitinophagales, Cytophagales, Flavobacteriales, Sphingobacteriales), Chloroflexi (SL56\_marine\_group), Verrucomicrobiota (Methylacidiphilaceae), класса Saccharimonadia (Patescibacteria). Представители архей Nitrososphaerota (*Nitrosopumilus*), бактерий Deinococcota (*Deinococcus*), Firmicutes (*Gemella*, *Peptoniphilus*, *Blautia* и *Ruminococcus*), Nitrospirota (*Nitrospira*), классов Gracilibacteria (Absconditabacteriales и 'Ca. Peregrinibacteria) и Parcubacteria ('Ca. Moranbacteria') присутствовали в небольшом количестве.

В фемтопланктоне оз. Байкал обнаружены фильтрующиеся бактерии, принадлежащие различным таксонам, их гомологи и ближайшие родственники найдены во фракции крупноразмерного бактериопланктона. Среди фильтрующихся бактерий выявлены условно патогенные бактерии, которые могут представлять потенциальную опасность для здоровья человека и животных.

Первые полученные результаты количественной и качественной оценки фемтопланктона оз. Байкал указывают на высокую значимость мельчайшей фракции бактериопланктона для экосистемы озера и требуют дальнейшего изучения.

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № 0279-2021-0015. Авторы выражают благодарность экипажам НИС «Титов» и «Верещагин» флота ЛИН СО РАН за помощь в отборе проб.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Albertsen M., Hugenholtz P., Skarshewski A. et al. 2013. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiplemetagenomes. *Nature Biotechnology* 31(6): 533-538. DOI: [10.1038/nbt.2579](https://doi.org/10.1038/nbt.2579)
- Anantharaman K., Brown C.T., Burstein D. et al. 2016. Analysis of five complete genome sequences for members of the class Peribacteria in the recently recognized Peregrinibacteria bacterial phylum. *PeerJ* 4: e1607 DOI: [10.7717/peerj.1607](https://doi.org/10.7717/peerj.1607)
- Anderson J.I., Heffernan W.P. 1965. Isolation and characterization of filterable marine bacteria. *Journal Bacteriology* 90(6): 1713-1718. DOI: [10.1128/jb.90.6.1713-1718](https://doi.org/10.1128/jb.90.6.1713-1718)
- Awala S.I., Gwak J.H., Kim Y. et al. 2023. *Methylacidiphilum caldifontis* gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic methane-oxidizing bacterium from an acidic geothermal environment, and descriptions of the family *Methylacidiphilaceae* fam. nov. and order *Methylacidiphilales* ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 73: 6085. DOI: [10.1099/ijsem.0.006085](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006085)

- Batinovic S., Rose J.J.A., Ratcliffe J. et al. 2021. Cocultivation of an ultrasmall environmental parasitic bacterium with lytic ability against bacteria associated with wastewater foams. *Nature Microbiology* 6(6): 703-711. DOI: [10.1038/s41564-021-00892-1](https://doi.org/10.1038/s41564-021-00892-1)
- Belykh O.I., Sorokovikova E., Saphonova T.A. et al. 2006. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: composition, abundance and structure. *Hydrobiologia* 568 (1): 9-17. DOI: [10.1007/s10750-006-0340-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0340-8)
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Tomberg I.V. et al. 2023. Water quality, toxicity and diversity of planktonic and benthic cyanobacteria in pristine ancient Lake Khubsugul (Hövsjön), Mongolia. *Toxins* 15(3): 213. DOI: [10.3390/toxins15030213](https://doi.org/10.3390/toxins15030213)
- Buck U., Grossart H.P., Amann R. et al. 2009. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. *Environmental Microbiology* 11(7): 1854-1865. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.01910.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01910.x)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Rosselli R. et al. 2018. Genomes of novel microbial lineages assembled from the sub-ice waters of Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e02132-17. DOI: [10.1128/AEM.02132-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02132-17)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya, T.I., Zakharenko A.S. et al. 2020. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat. *Limnology and Oceanography* 65: 1471-1488. DOI: [10.1002/lno.11401](https://doi.org/10.1002/lno.11401)
- Cavicchioli R., Ostrowski M. 2003. Ultramicrobacteria. In: eLS. Chichester, pp. 1-8. DOI: [10.1038/npg.els.0000309](https://doi.org/10.1038/npg.els.0000309)
- Chiriac M.C., Haber M., Salcher M.M. 2023. Adaptive genetic traits in pelagic freshwater microbes. *Environmental Microbiology* 25(3): 606-641. DOI: [10.1111/1462-2920.16313](https://doi.org/10.1111/1462-2920.16313)
- Chistoserdova L. 2015. Methylophages in natural habitats: current insights through metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology* 99(14): 5763-5779. DOI: [10.1007/s00253-015-6713-z](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6713-z)
- Colombet J., Fuster M., Billard H. 2020. Femtoplankton: What's New? *Viruses* 12(8): 881. DOI: [10.3390/v12080881](https://doi.org/10.3390/v12080881)
- Duda V.I., Suzina N.E., Polivtseva V.N. et al. 2012. Ultramicrobacteria: Formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology. *Microbiology* 81(4): 379-390. DOI: [10.1134/S0026261712040054](https://doi.org/10.1134/S0026261712040054)
- Fedotova A.V., Belova S.E., Kulichevskaya I.S. et al. 2012. Molecular identification of bacteria and archaeobacteria in acid lakes in Northern regions of Russia. *Mikrobiologiya* 81(3): 306-313. (in Russian)
- Fedotova A.V., Serkebaeva Iu.M., Sorokin V.V. et al. 2013. Filterable microbial forms in the Rybinsk water reservoir. *Mikrobiologiya* 82(6): 715-722. DOI: [10.7868/S0026365613060050](https://doi.org/10.7868/S0026365613060050) (in Russian)
- Fischer U.R., Velimirov B. 2000. Comparative study of the abundance of various bacterial morphotypes in an eutrophic freshwater environment determined by AODC and TEM. *Journal of Microbiological Methods* 39(3): 213-224. DOI: [10.1016/S0167-7012\(99\)00121-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00121-9)
- Garcia S.L., McMahon K.D., Martinez-Garcia M. et al. 2013. Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *ISME Journal* 7(1): 137-147. DOI: [10.1038/ismej.2012.86](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.86)
- Gasol J.M., Zweifel U.L., Peters F. et al. 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10): 4475-4483. DOI: [10.1128/AEM.65.10.4475-4483.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4475-4483.1999)
- Gasol J.M., Del Giorgio P.A. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina* 64: 197-224. DOI: [10.3989/scimar.2000.64n2197](https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2197)
- Giovannoni S.J. 2017. SAR11 Bacteria: The Most Abundant Plankton in the Oceans. *Annual Review Marine Science* 9: 231-255. DOI: [10.1146/annurev-marine-010814-015934](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015934)
- Guo Y., Gu S., Wu K. et al. 2023. Temperature-mediated microbial carbon utilization in China's lakes. *Global Change Biology* 29(17): 5044-5061. DOI: [10.1111/gcb.16840](https://doi.org/10.1111/gcb.16840)
- Hahn M.W. 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5248-5254. DOI: [10.1128/AEM.69.9.5248-5254.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5248-5254.2003)
- Hahn M.W., Lünsdorf H., Wu Q. et al. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3): 1442-1451. DOI: [10.1128/AEM.69.3.1442-1451.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1442-1451.2003)
- Hahn M.W., Pöckl M., Wu Q.L. 2005. Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4539-4547. DOI: [10.1128/AEM.71.8.4539-4547.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4539-4547.2005)
- Hahn M.W. 2009. Description of seven candidate species affiliated with the phylum Actinobacteria, representing planktonic freshwater bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(1): 112-117. DOI: [10.1099/ijs.0.001743-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.001743-0)
- Haro-Moreno J.M., Cabello-Yeves P.J., Garcillán-Barcia M.P. et al. 2023. A novel and diverse group of Candidatus Patescibacteria from bathypelagic Lake Baikal revealed through long-read metagenomics. *Environmental Microbiome* 18(1): 12. DOI: [10.1186/s40793-023-00473-1](https://doi.org/10.1186/s40793-023-00473-1)
- Henson M.W., Lanclos V.C., Faircloth B.C. et al. 2018. Cultivation and genomics of the first freshwater SAR11 (LD12) isolate. *The ISME Journal* 12: 1846-1860. DOI: [10.1038/s41396-018-0092-2](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0092-2)
- Hirsch P. 1986. Microbial life at extremely low nutrient levels. *Advances in Space Research* 6(12): 287-298. DOI: [10.1016/0273-1177\(86\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0273-1177(86)90097-9)
- Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 33(5): 1225-1228. DOI: [10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977](https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977)
- Jezbera J., Sharma A.K., Brandt U. et al. 2009. 'Candidatus Planktophila limnetica', an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(11): 2864-2869. DOI: [10.1099/ijs.0.010199-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.010199-0)
- Kepner R.L., Pratt J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews* 58(4): 603-615. DOI: [10.1128/mr.58.4.603-615.1994](https://doi.org/10.1128/mr.58.4.603-615.1994)
- Kruse T., Ratnadevi C.M., Erikstad H.A. et al. 2019. Complete genome sequence analysis of the thermoacidophilic verrucomicrobial methanotroph "Candidatus Methylacidiphilum kamchatkense" strain Kam1 and comparison with its closest relatives. *BMC Genomics* 20: 642. DOI: [10.1186/s12864-019-5995-4](https://doi.org/10.1186/s12864-019-5995-4)
- Lauro F.M., McDougald D., Thomas T. et al. 2009. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 106(37): 15527-15533. DOI: [10.1073/pnas.0903507106](https://doi.org/10.1073/pnas.0903507106)
- Lemos L.N., Medeiros J.D., Dini-Andreote F. et al. 2019. Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultrasmall Saccharimonadia (phylum CPR/Patescibacteria) suggest a symbiotic lifestyle. *Molecular Ecology* 28(18): 4259-4271. DOI: [10.1111/mec.15208](https://doi.org/10.1111/mec.15208)
- Macdonell M.T., Hood M.A. 1982. Isolation and characterization of ultramicrobacteria from a gulf coast estuary. *Applied and Environmental Microbiology* 43(3): 566-571. DOI: [10.1128/aem.43.3.566-571.1982](https://doi.org/10.1128/aem.43.3.566-571.1982)



- Martinez-Garcia M., Swan B.K., Poulton N.J. et al. 2012. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *The ISME Journal* 6(1): 113-23. DOI: [10.1038/ismej.2011.84](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.84)
- Mehrshad M., Salcher M.M., Okazaki Y. et al. 2018. Hidden in plain sight-highly abundant and diverse planktonic freshwater Chloroflexi. *Microbiome* 6(1): 176. DOI: [10.1186/s40168-018-0563-8](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0563-8)
- Nakai R. 2020. Size Matters: ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *Microbes and Environments* 35(2): ME20025. DOI: [10.1264/jsm2.ME20025](https://doi.org/10.1264/jsm2.ME20025)
- Neuenschwander S.M., Ghai R., Pernthaler J. et al. 2018. Microdiversification in genome-streamlined ubiquitous freshwater Actinobacteria. *The ISME Journal* 12(1): 185-198. DOI: [10.1038/ismej.2017.156](https://doi.org/10.1038/ismej.2017.156)
- Newton R.J., Jones S.E., Helmus M.R. et al. 2007. Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria acI lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22): 7169-7176. DOI: [10.1128/AEM.00794-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00794-07)
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(1): 14-49. DOI: [10.1128/MMBR.00028-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10)
- Oppenheimer C.H. 1952. The membrane filter in marine microbiology. *Journal of Bacteriology* 64(6): 783-786. DOI: [10.1128/jb.64.6.783-786.1952](https://doi.org/10.1128/jb.64.6.783-786.1952)
- Parveen B., Mary I., Vellet A. et al. 2013. Temporal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated *Verrucomicrobia* communities in relation to environmental variables in a mesotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 83(1): 189-201. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2012.01469.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01469.x)
- Pérez M.T., Sommaruga R. 2006. Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnology and Oceanography* 51: 2527-2537. DOI: [10.4319/lo.2006.51.6.2527](https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.6.2527)
- Pérez M.T., Rofner C., Sommaruga R. 2015. Dissolved organic monomer partitioning among bacterial groups in two oligotrophic lakes. *Environmental Microbiology Reports* 7(2): 265-272. DOI: [10.1111/1758-2229.12240](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12240)
- Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948. DOI: [10.4319/lo.1980.25.5.0943](https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943)
- Salcher M.M., Posch T., Pernthaler J. 2013. In situ substrate preferences of abundant bacterioplankton populations in a prealpine freshwater lake. *The ISME Journal* 7(5): 896-907. DOI: [10.1038/ismej.2012.162](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.162)
- Salcher M.M., Neuenschwander S.M., Posch T. 2015. The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign. *The ISME Journal* 9(11): 2442-2453. DOI: [10.1038/ismej.2015.55](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.55)
- Salcher M.M., Schaeffle D., Kaspar M. et al. 2019. Evolution in action: habitat transition from sediment to the pelagial leads to genome streamlining in Methylophilaceae. *The ISME Journal* 13(11): 2764-2777. DOI: [10.1038/s41396-019-0471-3](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0471-3)
- Schut F., de Vries E.J., Gottschal J.C. et al. 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 59(7): 2150-2160. DOI: [10.1128/aem.59.7.2150-2160.1993](https://doi.org/10.1128/aem.59.7.2150-2160.1993)
- Schut F., Gottschal J.C., Prins R.A. 1997a. Isolation and characterisation of the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *FEMS Microbiology Reviews* 20 (3-4): 363-369. DOI: [10.1111/j.1574-6976.1997.tb00321.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00321.x)
- Schut F., Prins R., Gottschal J. 1997b. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: Facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology* 12(2): 177-202. DOI: [10.3354/ame012177](https://doi.org/10.3354/ame012177)
- Suzina N.E., Duda V.I., Esikova T.Z. et al. 2011. Novel ultramicrobacteria, strains NF4 and NF5, of the genus *Chryseobacterium*: facultative epibionts of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 80: 535-548. DOI: [10.1134/S0026261711040187](https://doi.org/10.1134/S0026261711040187)
- Tabor P.S., Ohwada K., Colwell R.R. 1981. Filterable marine bacteria found in the deep sea: Distribution, taxonomy, and response to starvation. *Microbial Ecology* 7(1): 67-83. doi: org/ DOI: [10.1007/BF02010479](https://doi.org/10.1007/BF02010479)
- Torrella F., Morita R.Y. 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 41(2): 518-527. DOI: [10.1128/aem.41.2.518-527.1981](https://doi.org/10.1128/aem.41.2.518-527.1981)
- Tsmentzi D., Rodriguez R.L., Ruiz-Perez C.A. et al. 2019. Ecogenomic characterization of widespread, closely-related SAR11 clades of the freshwater genus “*Candidatus Fonsibacter*” and proposal of ‘*Ca. Fonsibacter lacus*’ sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42: 495-505. DOI: [10.1016/j.syapm.2019.03.007](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.03.007)
- Vancanneyt M., Schut F., Snauwaert C. et al. 2001. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 73-79. DOI: [10.1099/00207713-51-1-73](https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-73)
- Vannini C., Pöckl M., Petroni G. et al. 2007. Endosymbiosis in *statu nascendi*: close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living *Polynucleobacter* strains (Betaproteobacteria). *Environmental Microbiology* 9(2): 347-359. DOI: [10.1099/00207713-51-1-73](https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-73)
- Velimirov B. 2001. Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium. *Microbes and Environments* 16: 67-77. DOI: [10.1264/jsm2.2001.67](https://doi.org/10.1264/jsm2.2001.67)
- Vigneron A., Cruaud P., Langlois V. et al. 2020. Ultra-small and abundant: candidate phyla radiation bacteria are potential catalysts of carbon transformation in a thermokarst lake ecosystem. *Limnology and Oceanography Letters* 5: 212-220. DOI: [10.1002/lo2.10132](https://doi.org/10.1002/lo2.10132)
- Wang Y., Hammes F., Boon N. et al. 2007. Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1 µm pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities. *Environmental Science and Technology* 41(20): 7080-7086. DOI: [10.1021/es0707198](https://doi.org/10.1021/es0707198)
- West-Roberts J.A., Matheus-Carnevali P.B., Schoelmerich M.C. et al. 2021. The Chloroflexi supergroup is metabolically diverse and representatives have novel genes for non-photosynthesis based CO<sub>2</sub> fixation. bioRxiv Available from: DOI: [10.1101/2021.08.23.457424](https://doi.org/10.1101/2021.08.23.457424)
- Wu Q.L., Hahn M.W. 2006. Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiology Ecology* 57(1): 67-79. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00105.x)
- Zimmermann R., Meyer-Reil L.A. 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforschungen* 30(1): 24-27.

# Genetic, physiological and biochemical features of the methanogenic strain *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 isolated from oil-saturated bottom sediments of Lake Baikal



Bukin S.V.<sup>1\*</sup>, Rechkina V.I.<sup>2</sup>, Ivanov V.G.<sup>1</sup>, Pogodaeva T.V.<sup>1</sup>, Pavlova O.N.<sup>1</sup>, Shcherbakova V.A.<sup>2</sup>, Zemskaya T.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, prospect Nauki, 5, Pushchino, 142290, Russia

**ABSTRACT.** A culture of irregular cocci with a diameter of 0.7-1.5  $\mu\text{m}$ , capable of producing methane when growing on a mixture of  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  gases, methanol, mono-, di- and trimethylamines, was isolated from the bottom sediments of the Bolshaya Zelenovskaya oil-methane seep. On the basis of physiological-biochemical, phenotypic and genetic characteristics, it was found that the microorganism obtained in pure culture is a new strain of *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1, which has differences from the type strain in a number of parameters, including the ability to produce methane from acetate

**Keywords:** methanogenesis, Lake Baikal, *Methanosarcina*, strain, bottom sediments

**For citation:** Bukin S.V., Rechkina V.I., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Pavlova O.N., Shcherbakova V.A., Zemskaya T.I. Genetic, physiological and biochemical features of the methanogenic strain *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 isolated from oil-saturated bottom sediments of Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 821-828. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-821

## 1. Introduction

Lake Baikal is located in a tectonically active zone, which determines the presence of methane and oil seeps, as well as gas hydrate deposits in its sedimentary strata. The microbial communities of oil saturated bottom sediments of Baikal are characterized by the highest relative abundance of methanogenic archaea in comparison with sediments of deep-water background areas and mud volcanoes (Zemskaya et al., 2024 in press). This provides an opportunity to isolate from them microorganisms that constitute a minor part of the methanogenic component of the communities tending to higher concentrations of organic matter. One of such microorganisms are mixotrophic archaea of the genus *Methanosarcina*, new strains of which were previously isolated from Baikal bottom sediments sampled in the area of the Gorevoy Utyos oil-methane seep (Zhilina et al., 2017). Members of the genus *Methanosarcina* are widely distributed in a variety of ecotopes including anaerobic digesters, bottom sediments of freshwater and marine ecosystems, active layers of permafrost soils, and underground oil reser-

voirs (Liu and Whitman, 2008; De Vrieze et al., 2012; Oshurkova et al., 2020). Due to their ability to utilize different types of substrates as carbon and energy sources, they are often tolerant to specific inhibitors of certain methanogenesis pathways (fluoroacetate and methyl fluoride), and have a high tolerance to stress factors typical of ecotopes with high organic matter content, including ammonium toxicity, high concentrations of volatile fatty acids, elevated salinity and pH stress (De Vrieze et al., 2012). All this makes them a promising object for biotechnological application, and together with the significantly increased need to fill the All-Russian Collection of Microorganisms with biotechnologically important strains, determines the relevance of their search and production in pure culture.

In this paper we present an initial description of the genetic and physiological-biochemical characteristics of a new methanogenic strain LB-BZ-1, isolated from the bottom sediments of the oil-methane seep Bolshaya Zelenovskaya (Middle Baikal) and assigned to the genus *Methanosarcina*.

\*Corresponding author.

E-mail address: [sergeibukin@lin.irk.ru](mailto:sergeibukin@lin.irk.ru) (S.V. Bukin)

**Received:** August 05, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



## 2. Materials and methods

Strain LB-BZ-1 was isolated from the surface layer of bottom sediments (10 cm) of the deep-water (420 m) oil-methane seep Bolshaya Zelenovskaya (52.64668 N, 107.330563 E) sampled in July 2021 from the R/V “G.Y. Vereshchagin”.

The isolation of the strain into pure culture and the study of its physiological and biochemical properties were carried out on medium of the following composition: (g/L): NaCl: 0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.33,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 0.33,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ : 0.33,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.33,  $\text{NaHCO}_3$ : 0.15,  $\text{Na}_2\text{S}$ : 0.25, L-Cysteine-HCl: 0.25, vitamin solution (Wolin et al., 1963): 10 ml, micronutrient solution (Kevbrin and Zavarzin, 1992): 1 ml, resazurin (0.1%): 0.5 ml. The strain was isolated by sequential culturing on medium supplemented with different antibiotic drugs (vancomycin hydrochloride (125 mg/L), kanamycin sulfate (200 mg/L), ampicillin (500 mg/L)) and methanol (5 g/L) as carbon and energy source. The purity of the culture was confirmed by light microscopy, denaturing gradient gel electrophoresis (D-Code System, Bio-Rad), and no growth on Schedler's medium (g/L): trypticasein-soy broth: 10, dextrose: 5, Tris(hydroxymethyl)aminomethane: 3, L-cystine: 0.4, peptone mixture: 5, yeast extract: 5, hemin: 0.01 and glucose-peptone agar (g/L): glucose: 4, yeast extract: 2, peptone: 2.

During the determination of physiological and biochemical parameters of the strain, growth was evaluated by measuring  $\text{CH}_4$  concentrations in the gas phase by gas chromatography. When evaluating the utilization of different carbon sources, cultivation was performed at 29°C for 21 days (90 days at 4°C). All tests were performed in three replications.

To obtain data on the genome structure of strain LB-BZ-1, total DNA was isolated from the culture by a modified enzymatic lysis method followed by phenol-chloroform extraction. Library preparation and sequencing on the MGISEQ DNBSEQ-G400RS platform

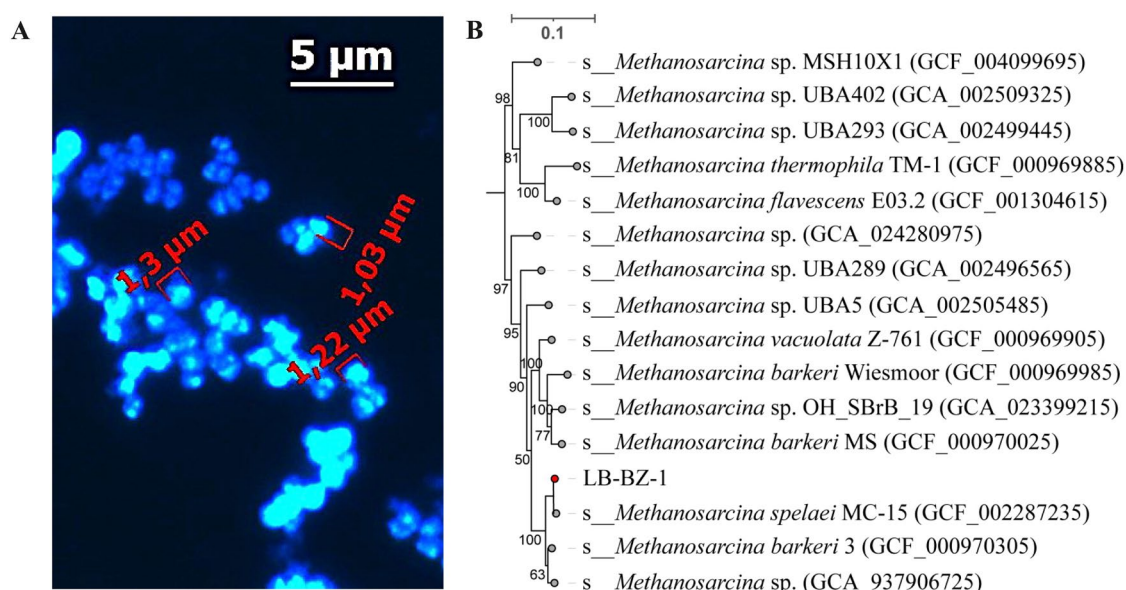
in  $2 \times 150$  bp format were performed at the Institute of Genomic Technologies LLC (Moscow, Russia). Contig assembly and subsequent annotation of genomic data using SPAdes v.3.15.5 genomic assembler (Prjibelski et al., 2020) and SqueezeMeta v.1.6.3 software package (Tamames and Puente-Sanchez, 2019) were performed according to the algorithm described in (Chernitsyna et al., 2024). The taxonomic classification of the strain was determined using the GTDB v.09-RS220 complete genome database based on sequence comparisons of 53 marker genes. The genome assembly obtained in this study was deposited in the NCBI database under project number PRJNA875570.

## 3. Results and discussion

The LB-BZ-1 strain was represented by immobile coccoid cells with a diameter of 0.7-1.5  $\mu\text{m}$ , often combined into sarcine-like packages and their conglomerates (Fig. A). The cells were Gram-negative stained.

When growing on a medium with methanol (5 g/l), the isolate showed no signs of psychrophilicity - the optimal growth temperature was 29 °C (estimated range 4, 20, 22, 25, 27, 29, 32, 37° C), however, it was able to grow over a wide temperature range, including 4°C, which corresponds to the native temperature of the bottom sediments from which it was isolated (3.8 °C). According to preliminary data, the optimum salinity was in the range of 0-0.01M NaCl (estimated range 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M NaCl), optimum pH 7.5-8.0 (estimated range of initial pH of the medium 5.0-9.0), which is also close to the parameters of bottom sediments of the oil-methane seep.

The strain was able to utilize  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20 v/v, 110 kPa), methanol (5 g/L), monomethylamine (1 g/L), dimethylamine (1 g/L) and trimethylamine (1 g/L) as carbon and energy sources. Formate (1 g/L), acetate (0.1, 0.5, 1 g/L) and dimethyl sulfide (0.186 g/L) not used.



**Fig.** Cell morphology of strain LB-BZ-1 in the light epifluorescence microscopy image (A) and its position on the phylogenetic tree of representatives of the genus *Methanosarcina* (B).



**Table.** Physiological, biochemical and genetic characteristics of strains

Characterization	<i>M. spelaei</i> MC-15 <sup>T</sup> (Ganzert et al., 2014)	LB-BZ-1
Source of isolation	Floating biofilm, cave lake.	Surface layer of bottom sediments, Lake Baikal
Cell dimension (µm)	2.0-4.0	0.7-1.5
Gram stain	-	-
Temperature range for growth (°C)	0-54	4-37 (requires clarification)
Temperature optimum (°C)	33	29
pH range for growth	4.1->9.9	5.0-8.5 (requires clarification)
Optimum pH	6.6	7.5-8.0
Tolerance of NaCl (M)	0.02->0.6	0-0.3 (requires clarification)
Optimum NaCl (M)	0.02	0-0.01
Substrates used		
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	+	+
Methanol	+	+
Acetate	+	-
Formate	-	-
Dimethyl sulfide	-	-
Monomethylamine	+	+
Dimethylamine	+	+
Trimethylamine	+	+
Characteristics of genome assemblies		
Size (bp)	5088600	4553458
N50	25064	179504
Completeness according to CheckM2 (%)	99.90	99.98
Contamination according to CheckM2 (%)	1.62	1.51
GC content (%)	38.75	39.04
Coding density (%)	71.27	71.90
Number of genes according to PGAP	4374	3819
Number of protein-coding genes	4310	3757
Number of rRNA genes (5S;16S;23S)	1;1;1	1;1;1
Number of tRNA genes	59	56

The results of sequencing data processing for the strain yielded a genome assembly with a total length of 4553458 bp, an estimated completeness of 99.97% and a contamination of 1.5% according to CheckM2 (Chklovski et al., 2023). Taxonomic analysis showed that the obtained isolate has the highest similarity to the strain *Methanosarcina spelaei* MC-15<sup>T</sup> (Ganzert et al., 2014) and forms a single clade with it on the phylogenomic tree (Fig. B). In terms of average nucleotide identity (ANI), the similarity between strains was within the accepted limits of intraspecific variability (95%) and amounted to 97.13%. The average amino acid identity (AAI) and DNA-DNA *in silico* hybridization were 97.42% and 71.70%, respectively, which also

indicated that the strains belonged to the same species.

Despite the fact that both strains were isolated from ecotopes located at the boundary between oxidized and reduced environmental conditions, comparison of their physiological, biochemical, and genetic characteristics revealed a number of differences (Table). Thus, the Baikal isolate is characterized by smaller cell sizes, lower temperature optimum for growth, and a shorter genome with fewer protein coding genes. However, the main difference is that LB-BZ-1 lacks the ability to grow on medium with acetate as the only source of carbon and energy. It should be noted that this feature is not a consequence of global genetic changes - all key genes of the acetoclastic pathway of methanogenesis were

found in the genome of LB-BZ-1 strain. In this regard, the suppression of the ability to produce methane from acetate probably occurs at the level of transcription regulation and is a consequence of living in conditions of low concentrations of acetate ion (below the detection threshold of 0.01 mg/l) and high competition for this substrate from other microorganisms, including acetoclastic methanogens of the genus *Methanotrix*, which have a large relative abundance in the community of bottom sediments of oil methane seep (Zemskaya et al., 2024 in press).

#### 4. Conclusions

A mixotrophic methanogenic strain LB-BZ-1 has been isolated from the oil-saturated bottom sediments of Lake Baikal, capable of growing in a wide range of temperatures, salinity and pH. Taxonomic analysis confirmed its belonging to the species *M. spelaei*. The assessment of physiological, biochemical and genetic characteristics showed the presence of moderate evolutionary adaptations of LB-BZ-1 to the conditions of existence in the sediments of a cold-water oligotrophic reservoir in comparison with the typical strain of MC-15<sup>T</sup> isolated from a mesophilic, sulfide ecosystem. The lack of the ability to produce methane via the acetoclastic pathway and the level of DNA-DNA hybridization suggest that the Baikal strain is a representative of the new subspecies *Methanosarcina spelaei subsp. baikalica*.

#### Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation project No. 22-14-00084.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V. et al. 2024. Genomic and morphological characterization of a new *Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). *Antonie van Leeuwenhoek* 117: 23. DOI: [10.1007/s10482-023-01918-w](https://doi.org/10.1007/s10482-023-01918-w)

Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20(8):1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)

De Vrieze J., Hennebel T., Boon N. et al. 2012. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* 112: 1–9. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.02.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079)

Ganzert L., Schirmack J., Alawi M. et al. 2014. *Methanosarcina spelaei* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a floating biofilm of a subsurface sulphurous lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3478–3484. DOI: [10.1099/ijs.0.064956-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.064956-0)

Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. 1992. Effect of sulfur compounds on the growth of the halophilic homoacetogenic bacterium *Acetohalobium arabaticum*. *Microbiologiya* 61(5): 812–817. (in Russian)

Liu Y., Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *Archaea*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125(1): 171–189. DOI: [10.1196/annals.1419.019](https://doi.org/10.1196/annals.1419.019)

Oshurkova V., Troshina O., Trubitsyn V. et al. 2020. Characterization of *Methanosarcina mazei* JL01 isolated from Holocene arctic permafrost and study of the archaeon cooperation with bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2<sup>T</sup>. *Proceedings* 66(1): 4. DOI: [10.3390/proceedings2020066004](https://doi.org/10.3390/proceedings2020066004)

Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70(1): e102. DOI: [10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)

Tamames J., Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Frontiers in Microbiology* 9: 3349. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349)

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *Journal of Biological Chemistry* 238(8): 2882–2886. DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)67912-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67912-8)

Zhilina T.N., Gruzdev D.S., Kolganova T.V. et al. 2017. Methanogens and acetogens in anaerobic silts over gas hydrates and in oil spill zones of Lake Baikal. In: Reshetilova T.A. (Ed.), *Proceedings 1st Russian microbiological congress*. Moscow: ID “Voda: chimiya i ekologiya”, pp. 44–45. (in Russian)

# Генетические и физиолого-биохимические особенности метаногенного штамма *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 выделенного из нефтенасыщенных донных отложений оз. Байкал



Букин С.В.<sup>1\*</sup>, Речкина В.И.<sup>2</sup>, Иванов В.Г.<sup>1</sup>, Погодаева Т.В.<sup>1</sup>, Павлова О.Н.<sup>1</sup>, Щербакова В.А.<sup>2</sup>, Земская Т.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН, проспект Науки, 5, Пуццоно, 142290, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Из донных отложений нефте-метанового сипа Большая Зеленовская выделена культура сарцино-подобных кокков диаметром 0.7-1.5 мкм, способных образовывать метан как автотрофно, при росте на смеси газов  $H_2/CO_2$ , так и при использовании метанола, моно-, ди- и триметиламинов. На основе физиолого-биохимических, фенотипических и генетических характеристик, установлено, что полученный в чистой культуре микроорганизм представляет собой новый штамм *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1, имеющий отличия от типового штамма по ряду параметров, включая способность образовывать метан из ацетата.

**Ключевые слова:** метаногенез, озеро Байкал, *Methanosarcina*, штамм, донные отложения

Для цитирования: Букин С.В., Речкина В.И., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Павлова О.Н., Щербакова В.А., Земская Т.И. Генетические и физиолого-биохимические особенности метаногенного штамма *Methanosarcina spelaei* LB-BZ-1 выделенного из нефтенасыщенных донных отложений оз. Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 821-828. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-821](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-821)

## 1. Введение

Озеро Байкал расположено в тектонически активной зоне, что обуславливает наличие метановых и нефтяных сипов, а также залежей газовых гидратов в его осадочной толще. Микробные сообщества нефтенасыщенных донных отложений Байкала характеризуются наибольшей относительной численностью метаногенных архей в сравнении с осадками глубоководных фоновых районов и грязевых вулканов (Zemskaya et al., 2024 в печати). Это предоставляет возможность выделения из них микроорганизмов, составляющих минорную часть метаногенной компоненты сообществ, тяготеющую к повышенным концентрациям органического вещества. Одними из таких микроорганизмов являются миксотрофные археи рода *Methanosarcina*, новые штаммы которых ранее уже выделялись из байкальских донных отложений, отобранных в районе нефте-метанового сипа Горевой Утёс (Жилина и др., 2017). Представители рода *Methanosarcina* широко

распространены в различных экотопах включая метантенки, донные отложения пресноводных и морских экосистем, активные слои вечномёрзлых почв, а также подземные нефтяные резервуары (Liu and Whitman, 2008; De Vrieze et al., 2012; Oshurkova et al., 2020). Благодаря способности использовать в качестве источников углерода и энергии различные типы субстратов они зачастую толерантны к специфическим ингибиторам отдельных путей метаногенеза (фторацетат и метилфторид), а также обладают большей устойчивостью к стрессовым факторам, характерным для экотопов с высоким содержанием органического вещества, включая аммонийную токсичность, высокие концентрации летучих жирных кислот, повышенную солёность и pH-стресс (De Vrieze et al., 2012). Все это делает их перспективным объектом для биотехнологического применения, а в совокупности со значительно возросшей потребностью по наполнению Всероссийской коллекции микроорганизмов биотехнологически-значимыми

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [sergeibukin@lin.irk.ru](mailto:sergeibukin@lin.irk.ru) (С.В. Букин)

Поступила: 05 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





штаммами, обуславливает актуальность их поиска и получения в чистой культуре.

В данной работе мы приводим первичное описание генетических и физиолого-биохимических характеристик нового метаногенного штамма LB-BZ-1, выделенного из донных отложений нефте-метанового сипа Большая Зеленовская (Средний Байкал), и, отнесённого к роду *Methanosarcina*.

## 2. Материалы и методы

Штамм LB-BZ-1 был выделен из поверхностного слоя донных отложений (10 см) глубоководного (420 м) нефте-метанового сипа Большая Зеленовская (52.64668 N, 107.330563 E), отобранных в июле 2021 г. с борта НИС “Г.Ю. Верещагин”.

Выделение штамма в чистую культуру и изучение его физиолого-биохимических свойств проводили на среде следующего состава: (г/л): NaCl: 0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0.33,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 0.33,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0.33,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.33,  $\text{NaHCO}_3$ : 0.15,  $\text{Na}_2\text{S}$ : 0.25, L-Цистеин-HCl: 0.25, раствор витаминов (Wolin et al., 1963): 10 мл, раствор микроэлементов (Кевбрин и Заварзин, 1992): 1 мл, резазурин (0.1%): 0.5 мл. Штамм был изолирован методом последовательного культивирования на среде с добавлением различных антибиотических препаратов (ванкомицина гидрохлорид (125 мг/л), канамицина сульфат (200 мг/л), ампициллин (500 мг/л) и метанолом (5 г/л) в качестве источника углерода и энергии. Чистота культуры была подтверждена методами световой микроскопии, денатурирующего градиентного гель-электрофореза (D-Code System, Bio-Rad), а также отсутствием роста на среде Шедлера (г/л): триптиказеино-соевый бульон: 10, декстроза: 5, трис (гидроксиметил аминометан): 3, L-цистин: 0.4, пептоновая смесь: 5, дрожжевой экстракт: 5, гемин: 0.01 и глюкозопептонном агаре (г/л): глюкоза: 4, дрожжевой экстракт: 2, пептон: 2.

В ходе определения физиолого-биохимических параметров штамма рост оценивали путём измерения концентраций  $\text{CH}_4$  в газовой фазе мето-

дом газовой хроматографии. При оценке использования различных источников углерода культивирование проводили при 29°C в течении 21 суток (90 суток при 4°C). Все тесты проводились в трёх повторностях.

Для получения данных о структуре генома штамма LB-BZ-1 суммарную ДНК из культуры выделяли модифицированным методом ферментативного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией. Подготовку библиотеки и секвенирование на платформе MGISEQ DNBSEQ-G400RS в формате 2×150 пн проводили на базе ООО Институт геномных технологий (Москва, Россия). Сборку контигов и последующую аннотацию геномных данных с использованием геномного сборщика SPAdes v.3.15.5 (Prjibelski et al., 2020) и программного пакета SqueezeMeta v.1.6.3 (Tamames and Puente-Sanchez, 2019) осуществляли по алгоритму, описанному в работе (Chernitsyna et al., 2024). Таксономическую классификацию штамма определяли с использованием базы данных полных геномов GTDB v.09-RS220 на основе сравнения последовательностей 53-х маркерных генов. Геномная сборка, полученная в данной работе депонирована в базе данных NCBI под номером проекта PRJNA875570.

## 3. Результаты и обсуждение

Штамм LB-BZ-1 был представлен неподвижными, кокковидными клетками диаметром 0.7-1.5 мкм, часто объединёнными в сарциноподобные пакеты и их конгломераты (Рис. А). Клетки окрашивались по Граму отрицательно.

При культивировании на среде с метанолом (5 г/л) изолят не проявил признаков психрофильности - оптимальная температура роста составила 29°C (оценённый диапазон 4, 20, 22, 25, 27, 29, 32, 37°C), однако он был способен развиваться в широком диапазоне температур, включая 4°C что соответствует нативной температуре донных отложений, из которых он был выделен (3.8°C). По предваритель-

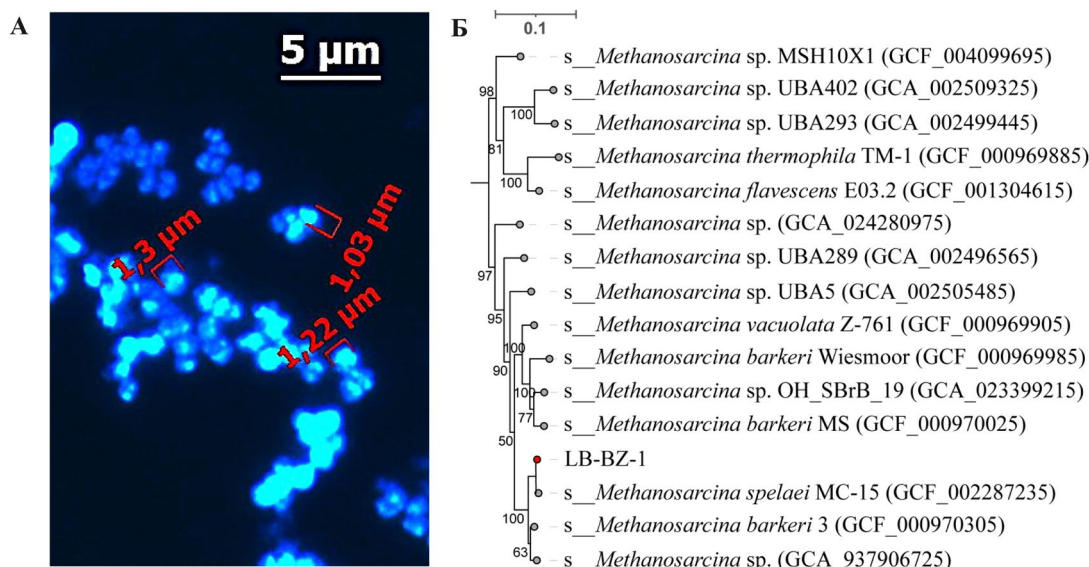


Рис. Морфология клеток штамма LB-BZ-1 на снимке световой эпифлуоресцентной микроскопии (А) и его положение на филогеномном древе представителей рода *Methanosarcina* (Б).

Таблица. Физиолого-биохимический и генетические характеристики штаммов

Характеристика	<i>M. spelaei</i> MC-15 <sup>T</sup> (Ganzert et al., 2014)	Штамм LB-BZ-1
Источник выделения	Плавающая биоплёнка, пещерное озеро	Поверхностный слой донных отложений, озеро Байкал
Размер клеток (мкм)	2.0-4.0	0.7-1.5
Окраска по Граму	-	-
Температурный диапазон роста (°C)	0-54	4-37 (требуется уточнения)
Температурный оптимум (°C)	33	29
Диапазон pH	4.1->9.9	5.0-8.5 (требуется уточнения)
Оптимум pH	6.6	7.5-8.0
Диапазон NaCl (M)	0.02->0.6	0-0.3 (требуется уточнения)
Оптимум NaCl (M)	0.02	0-0.01
Используемые субстраты		
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	+	+
Метанол	+	+
Ацетат	+	-
Формиат	-	-
Диметилсульфид	-	-
Монометиламин	+	+
Диметиламин	+	+
Триметиламин	+	+
Характеристики геномных сборок		
Размер (п.н.)	5088600	4553458
N50	25064	179504
Полнота согласно CheckM2 (%)	99.90	99.98
Контаминация согласно CheckM2 (%)	1.62	1.51
GC (%)	38.75	39.04
Плотность кодирования (%)	71.27	71.90
Количество генов согласно PGAP	4374	3819
Количество белок-кодирующих генов	4310	3757
Количество генов рРНК (5S;16S;23S)	1;1;1	1;1;1
Количество генов тРНК	59	56

ным данным, оптимум солёности находился в пределах 0-0.01M NaCl (оценённый диапазон 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M NaCl), оптимум pH 7.5-8.0 (оценённый диапазон начального pH среды 5.0-9.0), что также близко к параметрам донных отложений нефте-метанового сипа.

В качестве источников углерода и энергии штамм был способен использовать H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20 v/v, 110 кПа), метанол (5 г/л), монометиламин (1 г/л), диметиламин (1 г/л), триметиламин (1 г/л). Формиат (1 г/л), ацетат (0.1, 0.5, 1 г/л) и диметилсульфид (0.186 г/л) не использовал.

По результатам обработки данных секвенирования для штамма получена геномная сборка общей длиной 4553458 пар нуклеотидов, оценочной полнотой 99.97% и контаминационным показателем 1.5% согласно CheckM2 (Chklovski et al., 2023). Таксономический анализ показал, что полученный изолят имеет наибольшее сходство со

штаммом *Methanosarcina spelaei* MC-15<sup>T</sup> (Ganzert et al., 2014) и образует с ним единую кладу на филогеномном древе (Рис. Б). По показателю средней идентичности нуклеотидов (ANI) сходство между штаммами не выходило за принятые рамки внутривидовой вариабельности (95%) и составило 97.13%. Показатели средней аминокислотной идентичности (AAI) и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* составили 97.42% и 71.70% соответственно, что также указывает на принадлежность штаммов к одному виду.

Несмотря на то, что оба штамма выделены из экотопов, располагающихся на границе между окисленными и восстановленными условиями среды, сравнение их физиолого-биохимических и генетических характеристик выявило ряд имеющихся различий (Таблица). Так для байкальского изолята характерны меньшие размеры клеток, более низкий температурный оптимум роста, а также геном мень-

шей длинны с меньшим количеством белок-кодирующих генов. Однако основным отличием является отсутствие у LB-BZ-1 способности к росту на среде с ацетатом, в качестве единственного источника углерода и энергии. Следует отметить, что данная особенность не является следствием глобальных генетических изменений - у байкальского штамма обнаружены все ключевые гены ацетокластического пути метаногенеза. В связи с этим угнетение способности образовывать метан из ацетата, вероятно происходит на уровне регуляции транскрипции и является следствием обитания в условиях низких концентраций ацетат-иона (ниже порога детекции - 0.01 мг/л) и высокой конкуренции за данный субстрат со стороны других микроорганизмов, включая ацетокластических метаногенов рода *Methanotrix*, имеющих большую относительную численность в сообществе донных отложений нефте-метанового сипа (Zemskaya et al., 2024 в печати).

#### 4. Выводы

Из нефтенасыщенных донных отложений озера Байкал выделен миксотрофный метаногенный штамм LB-BZ-1, способный расти в широком диапазоне температур, солёности и pH. Таксономический анализ подтвердил его принадлежность к виду *Methanosarcina spelaei*, а оценка физиолого-биохимических и генетических характеристик показала наличие умеренных эволюционных адаптаций к условиям существования в осадках холодноводного олиготрофного водоёма в сравнении с типовым штаммом MC-15<sup>T</sup>, выделенным из мезофильной, сульфидной экосистемы. Анализ полученных результатов и уровень ДНК-ДНК гибридизации позволяют предположить, что новый метаноген является представителем нового подвида *Methanosarcina spelaei subsp. baikalica*.

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 22-14-00084.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В. и др. 2017. Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал. В: Решитилова Т.А. (Ред.), I Российский микробиологический конгресс. Москва: ИД Вода: химия и экология, с. 44–45.
- Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. 1992. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацететной бактерии *Acetohalobium arabaticum*. Микробиология 61(5): 812–817.
- Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V. et al. 2024. Genomic and morphological characterization of a new *Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). Antonie van Leeuwenhoek 117: 23. DOI: [10.1007/s10482-023-01918-w](https://doi.org/10.1007/s10482-023-01918-w)
- Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. Nature Methods 20(8):1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)
- De Vrieze J., Hennebel T., Boon N. et al. 2012. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. Bioresource Technology 112: 1–9. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.02.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079)
- Ganzert L., Schirmack J., Alawi M. et al. 2014. *Methanosarcina spelaei* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a floating biofilm of a subsurface sulphurous lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:3478–3484. DOI: [10.1099/ijs.0.064956-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.064956-0)
- Liu Y., Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *Archaea*. Annals of the New York Academy of Sciences 1125(1): 171–189. DOI: [10.1196/annals.1419.019](https://doi.org/10.1196/annals.1419.019)
- Oshurkova V., Troshina O., Trubitsyn V. et al. 2020. Characterization of *Methanosarcina mazei* JL01 isolated from Holocene arctic permafrost and study of the archaeon cooperation with bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2<sup>T</sup>. Proceedings 66(1): 4. DOI: [10.3390/proceedings2020066004](https://doi.org/10.3390/proceedings2020066004)
- Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. Current Protocols in Bioinformatics 70(1): e102. DOI: [10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)
- Tamames J., Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. Frontiers in Microbiology 9: 3349. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349)
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. Journal of Biological Chemistry 238(8): 2882–2886. DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)67912-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67912-8)



# Viruses in Baikal mollusks *Benedictia baicalensis*



Butina T.V.<sup>1\*</sup>, Mozhaeva M.A.<sup>2</sup>, Gorev V.A.<sup>1</sup>, Bukin Yu.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Faculty of Biology and Soil Science, Sukhe-Bator Str., 5, Irkutsk, 664011, Russia

**ABSTRACT.** Study of viral diversity in aquatic ecosystems continues to be relevant, including the threat of the emergence of new infectious diseases of animals and humans. The aim of this work was to study the diversity of viral communities associated with the Baikal endemic mollusks *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae) using metagenomic analysis. Our study revealed a high diversity of viruses in mollusk samples, which indicates the important role of gastropods in the bioaccumulation and circulation of bacteria and viruses in the ecosystem of Lake Baikal.

**Keywords:** viruses, mollusks, metagenomic analysis, Lake Baikal

**For citation:** Butina T.V., Mozhaeva M.A., Gorev V.A., Bukin Yu.S. Viruses in Baikal mollusks *Benedictia baicalensis* // *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. - № 4. - P. 829-833. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-829

## 1. Introduction

Mollusks are one of the richest groups of invertebrates in terms of the number of species and diversity of forms. They are distributed throughout the Earth, living in various marine and freshwater bodies, as well as on land (Bouchet, 2015). Mollusks are believed to have highly effective innate immunity and resistance to infectious diseases (Green et al., 2015).

Viruses are the most abundant and diverse inhabitants of aquatic ecosystems, where they play an important ecological role and affect the vital function of hydrobionts. Recently, interest in studying viruses in mollusks as well as other invertebrates, has been steadily growing (Shi et al., 2016; Zhang et al., 2022). Mollusks are known to be able to bioaccumulate a variety of viruses from a wide range of organisms in their bodies (Le Guyader et al., 2012). In general, the viruses and viromes of mollusks, especially freshwater ones, remain poorly understood.

About 180 species of mollusks live in the waters of Lake Baikal, most of which are endemic. Gastropods (Gastropoda) make up the largest part in terms of the number of species and dominate in biomass among the inhabitants of the benthos. The Baikal gastropods participate in the self-purification of the lake and play a significant role in the biological processes of the lake.

The aim of this study was to investigate the diversity of viral communities associated with the

mollusks *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae), one of the largest, most widespread and abundant endemics of Lake Baikal, using metagenomic analysis (DNA sequencing). Previously, the first data on the diversity of viruses (mainly RNA viruses) in *B. baicalensis* samples were published based on metatranscriptomic analysis (Butina et al., 2023).

## 2. Materials and methods

Samples of the mollusks *Benedictia baicalensis* were collected at two stations of South Baikal, in the area of the Listvyanka settlement (in June and October 2022) and near the settlement Bolshie Koty (Varnachka pad, June 2022), as well as at the station of North Baikal, in the area of the Ushkany Islands (Butina et al., 2023). Total DNA isolation and purification from samples of *B. baicalensis* were carried out using CTAB buffer (Panova et al., 2016). The concentration and quality of nucleic acids were assessed using electrophoresis and a Qubit 4.0 fluorometer.

DNA libraries were obtained at the Institute of Genome Analysis LLC (Moscow, Russia) and samples were sequenced in paired-end reading mode using a DNBSEQ-400 sequencer (MGI Tech, China).

To analyze the data sets, read quality control and filtering of the primary fastq data were carried out using the FastQC and Trimmomatic programs. Using

\*Corresponding author.

E-mail address: [tvbutina@mail.ru](mailto:tvbutina@mail.ru) (T.V. Butina)

**Received:** July 18, 2024; **Accepted:** August 08, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



the Kaiju v.1.9.0 program and the NCBI nr database, the obtained reads were analyzed and sequences belonging to viruses were identified.

### 3. Results and discussion

This work resulted in bioinformatic analysis of metagenomic datasets obtained from *B. baicalensis* mollusk samples. In direct analysis of the reads (using the Kaiju program), 98.2–99.1% of the reads were mollusk genome sequences, with the rest belonging to bacteria, microeukaryotes, archaea, and viruses (0.7–1.7%, 0.1–0.3%, 0.0003–0.0007% and 0.007–0.049%, respectively).

A large number of reads identified as viral were similar to unclassified viruses (17.4–21.6%). The most abundant DNA viruses (virotypes) in metagenomic data sets were representatives of the realms *Duplodnaviria* (1.3–13.9%), *Varidnaviria* (1.0–7.5%) and the family *Polydnaviridae* (modern name: *Polydnaviriformidae*) (0.6–2.5%). The dominant DNA bacteriophages (*Duplodnaviria*) in the list of virotypes were “unclassified *Siphoviridae* sp.” (taxon ID: 2170413) and “uncultured *Caudovirales* phage” (taxon ID: 2100421), each averaged more than 2% of reads per sample. The analysis also revealed an abundance of viruses close to insect viruses *Cotesia vestalis bracovirus* (*Polydnaviridae*; on average, more than 1.5% of reads) and *Bloomfield virus* (unclassified virus; more than 17%) (Chen et al., 2011; Webster et al., 2015). A large number of viral reads were assigned to RNA viruses (realm *Riboviria*; 56.7–75.3% of reads). Among all RNA virotypes, a virus close to *Drosophila C virus* of the *Dicistroviridae* family predominated (on average, more than 25% of reads per sample) (Huszar and Imler, 2008). In general, the diversity of viruses in *B. baicalensis* samples, according to the Chao1 and ACE indices, varied from 67 to 124 and from 61 to 114 species, respectively. The list of identified virotypes included a wide variety of viruses from a wide range of hosts.

As noted previously (Butina et al., 2023), the involvement of viruses in horizontal gene transfer leads to the presence of fragments in the host genomes that are similar to viral sequences, and when analyzing short reads, these fragments can be identified as viruses. Therefore, for a more accurate analysis, assembly of primary reads and subsequent analysis of the identified viral scaffolds/contigs are required.

### 4. Conclusions

Metagenomic analysis of *B. baicalensis* samples allowed us to supplement previously obtained data (Butina et al., 2023) on the composition of viral communities associated with Baikal gastropods. Mollusks *B. baicalensis* are known to be omnivorous, living on different substrates (stones, pebbles, and sand) in a wide range of depths (from 1.5 to 100 m) (Roepstorf et al.,

2003; Sitnikova and Roepstorf, 2004). Therefore, our data indicate the important role of gastropods in the bioaccumulation and circulation of viruses in the ecosystem of Lake Baikal.

### Acknowledgements

This research was carried out within the State Assignment of the Ministry of Education and Science No. 0279-2021-0005 with the support of the Russian Science Foundation, the project number 22-24-01120.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Bouchet P. 2015. The magnitude of marine biodiversity. In: Duarte C.M. (Ed.), The exploration of marine biodiversity scientific and technological. Fundación BBVA, pp. 31-62.
- Butina T.V., Zemskaya T.I., Bondaryuk A.N. et al. 2023. Viral diversity in samples of freshwater gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda: Benedictiidae) revealed by total RNA-sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 17022. DOI: [10.17537/2023.18.418](https://doi.org/10.17537/2023.18.418)
- Chen Y.F., Gao F., Ye X.Q. et al. 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis bracovirus* reveals the complexity of a polydnavirus genome. *Virology* 414(1): 42-50. DOI: [10.1016/J.VIROL.2011.03.009](https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.03.009)
- Green T.J., Raftos D., Speck P. et al. 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* 96(9): 2471-2482. DOI: [10.1099/jgv.0.000244](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244)
- Huszar T., Imler J.L. 2008. *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Advances in virus research* 72: 227-265. DOI: [10.1016/S0065-3527\(08\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00406-5)
- Le Guyader F.S., Atmar R.L., Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology* 2(1): 103-110. DOI: [10.1016/j.coviro.2011.10.029](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029)
- Panova M., Aronsson H., Cameron R.A. et al. 2016. DNA extraction protocols for whole-genome sequencing in marine organisms. In: Bourlat S. (Ed.), *Marine Genomics. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, pp. 13-44. DOI: [10.1007/978-1-4939-3774-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3774-5_2)
- Roepstorf P., Sitnikova T.Ya., Timoshkin O.A. 2003. Observation on stomach contents, food uptake and feeding strategies of endemic Baikalian Gastropods. *Berliner Palaobiologische Abhandlungen* 4: 151-156.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H. et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540(7634): 539-543. DOI: [10.1038/nature20167](https://doi.org/10.1038/nature20167)
- Sitnikova T.Y., Roepstorf P. 2004. Mollusks that live exclusively in Lake Baikal. *First Hand* 2(1): 84-99.
- Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S. et al. 2015. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 13(7): 1-33. DOI: [10.1371/journal.pbio.1002210](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210)
- Zhang Y.Y., Chen Y., Wei X. et al. 2022. Viromes in marine ecosystems reveal remarkable invertebrate RNA virus diversity. *Science China Life Sciences* 65(2): 426-437. DOI: [10.1007/s11427-020-1936-2](https://doi.org/10.1007/s11427-020-1936-2)

# Вирусы в байкальских моллюсках *Benedictia baicalensis*

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYБутина Т.В.<sup>1\*</sup>, Можаяева М.А.<sup>2</sup>, Горев В.А.<sup>1</sup>, Букин Ю.С.<sup>1</sup><sup>1</sup>Лимнологический институт СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3<sup>2</sup>Иркутский Государственный Университет, Биолого-почвенный факультет, 664011, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5

**АННОТАЦИЯ.** Исследования разнообразия вирусов в водных экосистемах не теряют своей актуальности, в том числе в связи с угрозой возникновения новых инфекционных заболеваний животных и человека. Целью данной работы стало исследование разнообразия вирусных сообществ, ассоциированных с байкальскими эндемичными моллюсками *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae), с помощью метагеномного анализа. В результате исследования выявлено высокое разнообразие вирусов в образцах моллюсков, что свидетельствует о важной роли брюхоногих моллюсков в биоаккумуляции и циркуляции вирусов в экосистеме оз. Байкал.

**Ключевые слова:** вирусы, моллюски, метагеномный анализ, оз. Байкал

Для цитирования: Бутина Т.В., Можаяева М.А., Горев В.А., Букин Ю.С. Вирусы в байкальских моллюсках *Benedictia baicalensis* // *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. - № 4. - С. 829-833. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-829

## 1. Введение

Моллюски – одна из наиболее богатых по числу видов и разнообразию форм группа беспозвоночных; они распространены по всему земному шару, обитают в различных морских и пресноводных водоемах, а также на суше (Bouchet, 2015). Считается, что моллюски обладают высокоэффективным врожденным иммунитетом и устойчивостью к инфекционным заболеваниям (Green et al., 2015).

Вирусы являются наиболее многочисленными и разнообразными обитателями водных экосистем, где они выполняют важную экологическую роль и влияют на жизнедеятельность гидробионтов. В последнее время интерес к изучению вирусов в моллюсках, как и других беспозвоночных, неуклонно растет (Shi et al., 2016; Zhang et al., 2022). Известно, что моллюски способны биоаккумулировать в своем организме разнообразные вирусы широкого круга организмов (Le Guyader et al., 2012). В целом вирусы и виромы моллюсков (особенно пресноводных) остаются малоизученными.

В водах озера Байкал обитает около 180 видов моллюсков, большинство из которых эндемичны. Брюхоногие моллюски (Gastropoda) составляют наибольшую часть по числу видов и доминируют по биомассе среди обитателей бентоса. Байкальские

брюхоногие участвуют в самоочищении озера и играют значительную роль в биологических процессах озера.

Целью настоящей работы стало исследование разнообразия вирусных сообществ, ассоциированных с моллюсками *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae) – одних из самых крупных, распространенных и многочисленных эндемиков оз. Байкал – с помощью метагеномного анализа (ДНК-секвенирования). Ранее были опубликованы первые сведения о разнообразии вирусов (главным образом РНК-вирусов) в образцах *B. baicalensis*, полученные на основе метатранскриптомного анализа (Butina et al., 2023).

## 2. Материалы и методы

Пробы моллюсков *Benedictia baicalensis* были отобраны на двух станциях Южного Байкала – в районе пос. Листвянка (в июне и октябре 2022 г.) и недалеко от пос. Большие Коты (падь Варначка, июнь 2022 г.), а также на станции Северного Байкала – в районе Ушканьих островов (Butina et al., 2023). Выделение и очистку суммарной ДНК из образцов моллюсков *B. baicalensis* проводили с помощью СТАВ буфера (Panova et al., 2016). Концентрацию и качество нуклеиновых кислот оценивали с помощью электрофореза и флуориметра Qubit 4.0

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [tvbutina@mail.ru](mailto:tvbutina@mail.ru) (Т.В. Бутина)

Поступила: 18 июля 2024; Принята: 08 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





В ООО «Институт Геномного Анализа» (г. Москва) были получены ДНК-библиотеки и проведено секвенирование образцов в режиме парноконцевого чтения с использованием прибора DNBSEQ-400 (MGI Tech, China).

Для анализа наборов данных проводился контроль качества прочтений и фильтрация первичных fastq данных с помощью программ FastQC и Trimmomatic. С помощью программы Kaiju v.1.9.0 и базы данных NCBI nr был проведен анализ полученных прочтений и выявлены последовательности, принадлежащие вирусам.

### 3. Результаты и обсуждение

В результате работы проведен биоинформатический анализ метагеномных наборов данных, полученных из образцов моллюсков *B. baicalensis*. При прямом анализе прочтений (с помощью программы Kaiju) 98,2–99,1% ридов представляли собой последовательности генома моллюсков, остальные принадлежали бактериям, микроэукариотам, археям и вирусам (0.7-1.7%, 0.1-0.3%, 0.0003-0.0007% и 0.007-0.049%, соответственно).

Большое количество прочтений, идентифицированных как вирусные, было сходно с неклассифицированными вирусами (17,4-21,6%). Наиболее многочисленными ДНК-вирусами (виротипами) в метагеномных наборах данных оказались представители реалмов *Duplodnaviria* (1,3-13,9%), *Varidnaviria* (1,0-7,5%) и семейства *Polydnaviridae* (современное название: *Polydnaviriformidae*) (0,6-2,5%). Доминирующими ДНК-бактериофагами (*Duplodnaviria*) в списке виротипов были: “unclassified *Siphoviridae* sp.” (taxon ID: 2170413) и “uncultured *Caudovirales* phage” (taxon ID: 2100421), каждый в среднем составлял более 2% прочтений на образец. При анализе также выявлено обилие вирусов, близких вирусам насекомых: *Cotesia vestalis bracovirus* (*Polydnaviridae*; в среднем более 1,5% прочтений) и *Bloomfield virus* (неклассифицированный вирус; более 17%) (Chen et al., 2011; Webster et al., 2015). Большое количество вирусных прочтений было отнесено к РНК-вирусам (реалм *Riboviria*; 56,7-75,3% прочтений). Среди всех РНК-виротипов преобладал вирус, близкий *Drosophila C virus* семейства *Dicistroviridae* (в среднем более 25% прочтений на образец) (Huszar and Imler, 2008). В целом, видовое разнообразие вирусов в пробах *B. baicalensis*, согласно индексам Chao1 и ACE, варьировало от 67 до 124 и от 61 до 114 видов, соответственно. Список выявленных виротипов включал большое разнообразие вирусов широкого спектра хозяев.

Как отмечалось ранее (Butina et al., 2023), участие вирусов в горизонтальном переносе генов приводит к наличию в геномах хозяина фрагментов, сходных с вирусными последовательностями и при анализе коротких прочтений эти фрагменты могут быть идентифицированы как вирусные. Поэтому для более точного анализа требуется сборка коротких прочтений и последующий анализ выявленных вирусных скаффолдов/контигов.

### 4. Выводы

Метагеномный анализ образцов моллюсков *B. baicalensis* позволил нам дополнить полученные ранее данные (Butina et al., 2023) о составе вирусных сообществ, ассоциированных с байкальскими гастроподами. Как известно, *B. baicalensis* всеядны, обитают на разных субстратах (камнях, гальке и песке) в широком диапазоне глубин (от 1,5 до 100 м) (Roepstorf et al., 2003; Sitnikova and Roepstorf, 2004). Поэтому наши результаты свидетельствуют о важной роли брюхоногих моллюсков в биоаккумуляции и циркуляции вирусов в экосистеме оз. Байкал.

### Благодарности

Исследование выполнено в рамках госзадания №0279-2021-0005 Минобрнауки России при поддержке Российского научного фонда, проект №22-24-01120.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Bouchet P. 2015. The magnitude of marine biodiversity. In: Duarte C.M. (Ed.), The exploration of marine biodiversity scientific and technological. Fundación BBVA, pp. 31-62.
- Butina T.V., Zemskaya T.I., Bondaryuk A.N. et al. 2023. Viral diversity in samples of freshwater gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda: Benedictiidae) revealed by total RNA-sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 17022. DOI: [10.17537/2023.18.418](https://doi.org/10.17537/2023.18.418)
- Chen Y.F., Gao F., Ye X.Q. et al. 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnavirus genome. *Virology* 414(1): 42-50. DOI: [10.1016/J.VIROL.2011.03.009](https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.03.009)
- Green T.J., Raftos D., Speck P. et al. 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* 96(9): 2471-2482. DOI: [10.1099/jgv.0.000244](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244)
- Huszar T., Imler J.L. 2008. *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Advances in virus research* 72: 227-265. DOI: [10.1016/S0065-3527\(08\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00406-5)
- Le Guyader F.S., Atmar R.L., Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology* 2(1): 103-110. DOI: [10.1016/j.coviro.2011.10.029](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029)
- Panova M., Aronsson H., Cameron R.A. et al. 2016. DNA extraction protocols for whole-genome sequencing in marine organisms. In: Bourlat S. (Ed.), *Marine Genomics. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, pp. 13-44. DOI: [10.1007/978-1-4939-3774-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3774-5_2)
- Roepstorf P., Sitnikova T.Ya., Timoshkin O.A. 2003. Observation on stomach contents, food uptake and feeding strategies of endemic Baikalian Gastropods. *Berliner Palaobiologische Abhandlungen* 4: 151-156.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H. et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540(7634): 539-543. DOI: [10.1038/nature20167](https://doi.org/10.1038/nature20167)
- Sitnikova T.Y., Roepstorf P. 2004. Mollusks that live exclusively in Lake Baikal. *First Hand* 2(1): 84-99.

Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S. et al. 2015. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 13(7): 1-33. DOI: [10.1371/journal.pbio.1002210](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210)

Zhang Y.Y., Chen Y., Wei X. et al. 2022. Viromes in marine ecosystems reveal remarkable invertebrate RNA virus diversity. *Science China Life Sciences* 65(2): 426-437. DOI: [10.1007/s11427-020-1936-2](https://doi.org/10.1007/s11427-020-1936-2)

# Water quality and ecological state estimate of large lakes of Yakutsk City (Lake Saysary, Lake Sergelyakh) in the end of ice period in 2021

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYChebykin E.P.<sup>1\*</sup>, Mal'nik V.V.<sup>1</sup>, Tomberg I.V.<sup>1</sup>, Kopyrina L.I.<sup>2</sup>, Suturin A.N.<sup>1</sup>, Zakharova Yu.R.<sup>1</sup><sup>1</sup>Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya st., 3, Irkutsk, 664033, Russia<sup>2</sup>Institute of Biological Problems in Permafrost Zone of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lenin ave., 41, Yakutsk, 677980, Russia

**ABSTRACT.** Water quality of water bodies situated near populated localities is an important ecological problem. To estimate water quality in Lake Saysary and Lake Sergelyakh within Yakutsk City, hydrochemical, geochemical and microbiological methods were used. By research moment, the water in these lakes did not meet quality norms established for water of water bodies for fishery use as well as for drinking and cultural-domestic water use. The data obtained make pay attention to the necessity of the control for limitation of water use from these lakes for human needs and of activities for improvement of their quality.

**Keywords:** waters quality estimate, hydrochemical indicators, trace elements, microbiological indicators, urban Lakes, Yakutsk City

**For citation:** Chebykin E.P., Mal'nik V.V., Tomberg I.V., Kopyrina L.I., Suturin A.N., Zakharova Yu.R. Water quality and ecological state estimate of large lakes of Yakutsk City (Lake Saysary, Lake Sergelyakh) in the end of ice period in 2021 // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 834-863. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-834](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-834)

## 1. Introduction

Yakutsk City is the capital of Sakha Republic (Yakutia) and one of the largest cities in Russia within permafrost zone, the abundance of which increases permanently (Gorokhov, 2023) like its territory reaching 160 km<sup>2</sup> (Ksenofontova et al., 2013). For January 1, 2023 the abundance of the city population was 378.5 thousand people (Gorokhov, 2023; Population..., 2023). The city is situated on I and II flood-plain terraces in the central part of Tuymaada valley in middle current of the Lena R. left shore. The valley width in Yakutsk City area reaches 18–20 km, among which ca. 8 km belong to modern bed of the Lena River with numerous island, by-arms and bayou lakes (Nikolaev and Arkhipov, 2021; Popova and Fedulova, 2022). There are on the city territory numerous lakes, five of them are largest (Beloje, Khatyng-Yuryakh, Ytyk-Kyuel', Sergelyakh, Saysary) (Legostaeva and Rufova, 2022). These lakes are related to water erosional type, their shapes are round and oblong (Ksenofontova et al., 2013). The urban lakes are very important for amenity

needs – they are used for recreation and watering in market-gardening (Rufova et al., 2012; Ksenofontova et al., 2013). Nowadays the lakes are under high anthropogenic press, as there are on the city territory large industrial, agricultural, housing and municipal and fuel and energy enterprises (Rufova et al., 2012). Before active building of the city in 1960ies (Makarov and Chizhuk, 2009; Popova and Fedulova, 2022), the lakes had a good by-channel system, were supplied from the Lena River and from small rivers (Shestakovka, Markhinka). Due to the increase of Yakutsk City territory and building in it, the flowage of major part of lakes was disturbed. Due to this fact, the lakes, which were cleaned regularly in natural way, started to get dirty, blossom, overgrow with rush and become shallow, and these processes resulted in decline of their ecological state (Ksenofontova et al., 2013). Since 2011, Yakutsk City authorities undertake activities for reconstitution of the flowage of the urban lacustrine system (Legostaeva and Rufova, 2022; Nikolaev and Arkhipov, 2021) which, in some cases, resulted in improvement

\*Corresponding author.

E-mail address: [cheb@lin.irk.ru](mailto:cheb@lin.irk.ru) (E.P. Chebykin)

**Received:** May 30, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





of ecological situation, for example, in Lake Saysary (Cherdonova and Popova, 2022). However, despite this, the drainage systems litter rapidly (Nikolaev and Arkhipov, 2021). The analysis of data bases by chemical composition of large lakes residential territories shows that since 1985 their mineralization decreases, main contribution of it belongs to more mineralized mineral waters (Legostaeva and Rufova, 2022). The same data suggest that seasonal and in some cases interannual variations of main hydrochemical characteristics are partly determined by riverine influence. Along with this, anthropogenic pressing is found out by numerous chemical (Makarov and Chizhuk, 2009; Rufova et al., 2012; 2013; Ksenofontova et al., 2013; Rufova and Ksenofontova, 2015; Rufova & Tatarinova, 2015, Kaidalova and Olesova, 2019; Gabyshev and Gabysheva, 2020; Nikolaev and Arkhipov, 2021; Popova and Fedulova, 2022; Legostaeva and Rufova, 2022; Rufova, 2023) and biological (Vasilyeva, 1968; Kopyrina, 2013; Tatarinova and Salova, 2013; Rufova and Tatarinova, 2015; Grigorieva and Solovieva, 2020; Gabyshev and Gabysheva, 2020; Cherdonova and Popova, 2022) components.

Earlier monitoring studies of water were performed at Lake Saysary (2009-2021) and Lake Sergelyakh (2009-2014) during open water period (Makarov and Chizhuk, 2009; Rufova et al., 2012; 2013; Ksenofontova et al., 2013; Rufova and Ksenofontova, 2015; Rufova and Tatarinova, 2015; Kaydalova and Olesova, 2019; Nikolaev and Arkhipov, 2021). Table 1 presents data on limits of variations of hydrochemical and geochemical indicators compiled with their averaged values for the period from 1985 till 2021 (Legostaeva and Rufova, 2022), with fishery norms (Order..., 2016) and with norms for drinking and cultural-domestic water use (SanPiN 1.2.3685-21).

Data for water microbiological characteristics of Lakes Saysary and Sergelyakh water published in scientific papers were not found by the authors. Internet provides information from Russian Consumer Protection Agency about swimming prohibition in Lake Sergelyakh due to exceed of norms of sanitary-epidemiological indicators (Swimming..., 2021).

Earlier the analysis of water quality in Yakutsk City lakes was performed during open water period. However, during major part of any year, eight months, these lakes are covered with ice. Permanent ice cover occurs since late September – early October, ice melting started in middle May, ice cover disappears completely in late May or early June (Nikolaev and Arkhipov, 2021).

In order to determine waters quality and ecological state of Lakes Saysary and Sergelyakh during ice period, a comprehensive analysis of samples collected in late April – early May of 2021 was performed. The paper presents for the first time the results of microbiological studies (total bacterial abundance – TBA, total microbial count at 22°C (TMC22) and 37°C (TMC37), *Escherichia coli* and bacteria of the genus *Enterococcus*) in water from these lakes, of expanded water geochemical analysis (66 chemical elements) and of additional hydrochemical indicators (concentration of total and organic phosphorus, permanganate oxidability).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Description of the studied area

#### Lake Saysary

One of best studied lakes is Lake Saysary situated in the southern part of the city (Fig. 1), is included in the list of unique Yakutian lakes and is sacred in the history and legends of Yakut people and homeland of Sakha people (Nikolaev and Arkhipov, 2021). In winter, the lakes is actively used by city residents for skiing, in spring – for skating and mass feasts (Nikolaev and Arkhipov, 2021). The lake depression is situated on the II above flood-plane terrace and is related to erosional-anthropogenic genetic type (Kaydalova and Olesova, 2019; Cherdonova and Popova, 2022; Popova and Fedulova, 2022). The supply incomes mainly from precipitations (Kaydalova and Olesova, 2019; Popova and Fedulova, 2022). The lake sizes are as follows: the length is 1.4 km, the average width is 0.35 km, the maximal width is 0.47 km, the water table area is 0.49 km<sup>2</sup>; the average depth is 2.65 m, the maximal one is 6 m; the lakes volume is estimate as much as 1.23 million m<sup>3</sup> (Legostaeva and Rufova, 2022). Snow cover height on Lake Saysary is 0.38 m, average ice thickness is 1.3 m (Nikolaev and Arkhipov, 2021). During recent years, anthropogenic impact onto the water body increased much, the water table area considerably decreased due to shores dumping for building, sewer plumbing and building and household wastes discharge (Rufova et al., 2013).

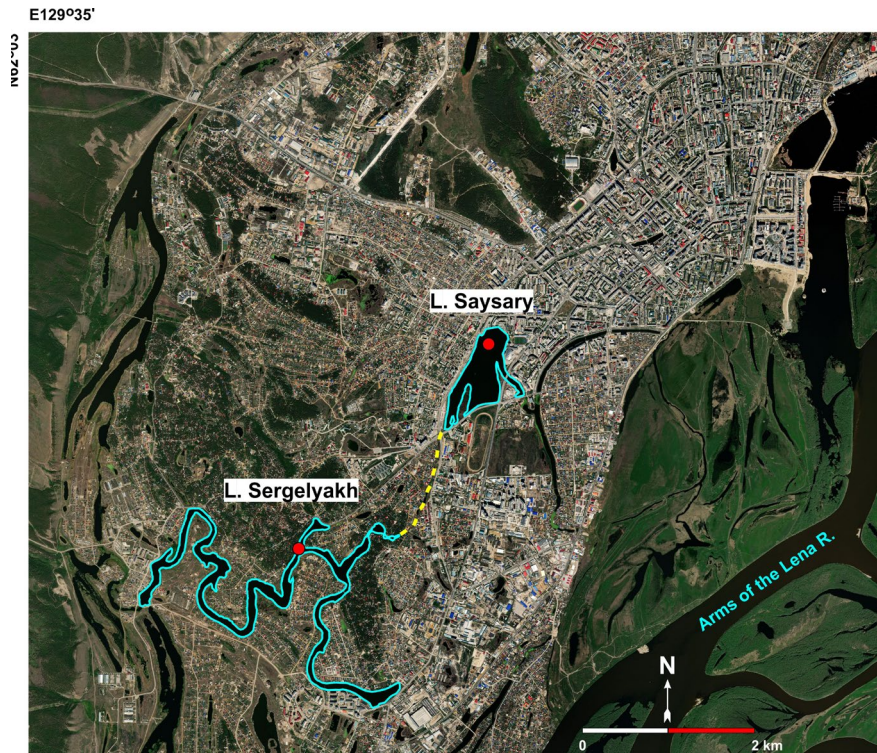
#### Lake Sergelyakh

Lake Sergelyakh is situated southward from Lake Saysary (Fig.) and is connected with it with pipes and a channel (Cherdonova and Popova, 2022). Lake Sergelyakh has a narrow serpentine shape. Total lake length by different estimates is from 6 (Legostaeva and Rufova, 2022) to 8 km (Ksenofontova et al., 2013), its average width is 0.08 km, maximal one is 0.15 km, water table area is 0.47 km<sup>2</sup>, water volume is 0.42 million m<sup>3</sup>, average depth of the lake is 0.88 m, and maximal one is 2 m (Legostaeva and Rufova, 2022). According to satellite images (software SASPlanet with open access), the length of main part of united water body is 8 km 300 m, there are also branches with total length of 1.5 km.

### 2.2. Sampling

Water was sampled in the end of ice-cover period in 2021 – on April 21 from Lake Saysary (N 62° 01'10.0", E 129°41'38.6") and on May 4 from Lake Sergelyakh (N 61° 59'53.7", E 129°39'07.3") (Fig.). The snow thickness of Lake Saysary was 32 cm, the ice thickness was 105 cm, the water depth was 4 m, on Lake Sergelyakh – 0.5 cm, 105 cm and 1.5 m, respectively. Water was sampled with a Niskin bottle (volume of 2 dm<sup>3</sup>) from the depth of 1 m (from lower ice surface).

For hydrochemical analysis, water samples were spattered into 1.5 L PET bottles. To determine biogenic components and organic matter, the bottles were frozen, to determine other hydrochemical indicators, the bottles were kept in a fridge. Determination of pH was done several hours later after the sampling.



**Fig.** Lacustrine-riverine network in Yakutsk City. Sampling stations are shown with red circles. Yellow dashed line shows the channel connecting Lake Sergelyakh with Lake Sargsary. The satellite image is from open sources (resource SASPlanet).

For multielemental ICP-MS analysis, water was sampled from a Niskin bottle with single use medical syringes with volume of 10 mL. Samples were immediately filtered through single use polystyrol sterile syringe nozzle Minisart 16555-K (pores size was 0.45  $\mu\text{m}$ , cellulose acetate, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) into preliminary weighed polypropylene Eppendorf test tubes (2 ml, Axygen Scientific, Cat.-No. MCT-200-C, USA, Mexico) containing 40  $\mu\text{L}$  of preserving agent. We used as a preserving agent 70 %  $\text{HNO}_3$  purified twice with a subboiling system for acids distillation (Savillex DST-1000 sub-boiling distillation system, Japan). Indium (1008 ppb) was added into nitric acid as an internal standard. The preserving agent was added into Eppendorf test tubes by weighing method. Test tubes with water samples were weighed under laboratory conditions, and accurate content of nitric acid (typically 2 %) and of indium (typically 30 ppb) was calculated. All necessary weighing was done using an analytical balance Mettler Toledo AG104 (weighing error is  $\pm 0,0003$  g).

For microbiological analysis, water was sampled from a Niskin bottle into new plastic bottles with volume of 0.5 L in two replications. Time period from sampling till microbiological analysis did not exceed 6 hours according to (GOST 31942-2012).

### 2.3. Hydrochemical analysis

Chemical composition was determined by methods adopted in freshwater hydrochemistry (Baram et al., 1999; Fomin, 2000; Wetzel and Likens, 2000; Guidelines..., 2009). To measure pH value, we used a pH meter with a combined electrode and a thermocompensator “Expert-001” (Russia). Total nitrogen, phosphorus and organic matter content was determined in

non-filtered samples, and biogenic elements and major ions content – in samples filtered through membrane filters with pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ . Biogenic elements concentrations were measured using a spectrophotometer «UNICO-2100» (USA): nitrites – with Griess reagent, nitrates – with sodium salicylate, ammonium nitrogen – by indophenol method, phosphates – by Denigès-Atkins method with tin chloride as a reducing agent. To determine siliceous acid, we used a spectrophotometry method based on measuring of staining intensity of yellow silicomolibdic heteropoly acid. Total phosphorus and nitrogen content was measured after high temperature persulfate oxidation on a spectrophotometer, organic matter content was estimated by permanganate (PMO) and bichromatic oxidability (referred as chemical oxygen demand – COD). Concentration of ions  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{SO}_4^{2-}$  was determined by method of high-performance liquid chromatography with indirect UV-detection (“Milichrom A-O2”, Russia), of ions  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  – by absorption method, and  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  – by flame emission one («AAS-30», Germany).

### 2.4. Multielemental ICP-MS analysis

Prepared water samples were measured at a quadruple ICP-MS mass-spectrometer Agilent 7500 ce in Common Use Center “Ultramicroanalysis” in LIN of RAS SB according to approaches developed earlier (Chebykin et al., 2012; 2020). The loading of the water samples to the spectrometer measuring system was performed using an acid-resistant interface. The latter consisted of a borosilicate MicroMist nebulizer (solutions supply regime is self-pulverizing ca. 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), a perfluoroalkoxy (PFA) Scott spray chamber and gas quartz torch with a ruby injector and a ShieldTorch system. Measurements were performed in “hot plasma” mode

**Table 1.** Hydrochemical, geochemical and microbiological characteristics of Lake Saysary and Lake Sergelyakh according to references compiled to norms and our data. In bold – values exceeding fishery norms (MPC<sub>f</sub>), in bold and underlined – norms for drinking and cultural-domestic water use (MPC<sub>dr\_c/dom</sub>)

Characteristics	MPC <sub>f</sub>	MPC <sub>dr_c/dom</sub>	Lake Saysary, min-max (2009-2021)	Lake Saysary, averaged (1985-2021)	Lake Saysary, LIN of RAS SB (April 21, 2021)	Lake Sergelyakh, min-max (2009-2014)	Lake Sergelyakh, averaged (1985-2021)	Lake Sergelyakh, LIN of RAS SB (May 4, 2021)
Reference	(Order..., 2016)	(SanPin 1.2.3685-21)	reference list in the notes*	(Legostaeva & Rufova, 2022)	this paper	reference list in the notes*	(Legostaeva & Rufova, 2022)	this paper
pH	background	6-9	7.9-8.6 (2009-2012)	8.34	7.23	7.64-8.58	8.34	6.78
Ca <sup>2+</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	180	nn	17-40 (2009-2014, 2021)	27.4	82.4	22-42	25.44	28.4
Mg <sup>2+</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	40	50	10- <b>55</b> (2009-2014, 2021)	30.	<b>50</b>	8-30	21.21	14.1
Na <sup>+</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	120	200	40- <b>125</b> (2009-2014), <b>335</b> (Na+K, 2021)	77.6	117	22-45	47.42	24.8
K <sup>+</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	10 / 50 <sup>(1)</sup>	nn	5-8 (2009-2014)	6.51	16.5	~2-5	5.84	5.52
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	165-313 (2009-2014), 540 (2021)	262	577	140-279	203.33	169.8
Cl <sup>-</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	300	350	20-> <b>300</b>	83.8	174	<10-90	32.36	26
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	100	500	nd	21.1	13.5	nd	14.07	10.0
Hard, meq/dm <sup>3</sup>	nn	7 / 10 <sup>(2)</sup>	< <b>4-20</b>	4.04	<b>8.3</b>	1.5- <b>8</b>	3.27	2.6
Min, mg/dm <sup>3</sup>	nn	1000 / 1500 <sup>(2)</sup>	180- <b>1246</b>	479	<b>1030</b>	250-420	308.95	279
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	0.5	1.5	<b>0.2-3.4</b>	<b>0.63</b>	<b>2.27</b>	~ <b>0-1.6</b>	0.35	<b>0.66</b>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	0.08	3	<b>0.02-3.2</b>	<b>0.13</b>	0.003	<0.05	0.03	0.046
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	40	45	0-2.2	1.16	0.41	< dl	0.13	1.22
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , mg/dm <sup>3</sup>	0.15 / 0.45 / 0.6 <sup>(3)</sup>	3.5	<b>0.07-0.76</b>	0.44	<b>1.04</b>	<dl- <b>2.4</b>	0.33	0.162
P <sub>total</sub> , mg/dm <sup>3</sup>	nd	nd	nd	nd	0.53	nd	nd	0.228
P <sub>org</sub> , mg/dm <sup>3</sup>	nd	nd	nd	nd	0.19	nd	nd	0.175
COD, mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	nn	15 / 30 / 60 <sup>(4)</sup>	< <b>15-150</b>	nd	<b>122</b>	nd	nd	<b>132.7</b>
BOD <sub>5</sub> , mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	2.1	2 / 4 <sup>(5)</sup>	< <b>2.1-7.1</b>	nd	nd	nd	nd	nd
PMO, mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	nn	5 / 7 / 7.5 <sup>(6)</sup>	nd	nd	<b>38.8</b>	nd	nd	<b>42.4</b>
O <sub>2</sub> diss, mg/dm <sup>3</sup>	> 4 / > 6 <sup>(7)</sup>	> 4	< 4-10	nd	nd	> 6	nd	nd
SM, mg/dm <sup>3</sup>	to background + 0.25-0.75 / + 5% at > 30 at > 30 in low-wa-ter season <sup>(8)</sup>	to background + 0.75 / + 5% at > 30 in low-wa-ter season / 5-60 (tech) <sup>(9)</sup>	< 2-8	6.06	nd	2-13	6.41	nd
F <sup>-</sup> , µg/dm <sup>3</sup>	to background + 50 / 750 (max) <sup>(10)</sup>	to background + 50 / 750 (max) <sup>(10)</sup>	< dl	310	nd	< dl	250	dl
Fe, µg/dm <sup>3</sup>	100	300	< <b>100-1200</b>	<b>390</b>	<b>200</b>	< <b>100-850</b>	<b>270</b>	<b>250</b>
Mn, µg/dm <sup>3</sup>	10	100	0.8-> <b>500</b>	<b>20</b>	<b>1050</b>	6- <b>29</b>	<b>20</b>	<b>350</b>



Characteristics	MPC_f	MPC_dr_c/dom	Lake Saysary, min-max (2009-2021)	Lake Saysary, averaged (1985-2021)	Lake Saysary, LIN of RAS SB (April 21, 2021)	Lake Sergelyakh, min-max (2009-2014)	Lake Sergelyakh, averaged (1985-2021)	Lake Sergelyakh, LIN of RAS SB (May 4, 2021)
Zn, µg/dm <sup>3</sup>	10	1000	<10-390	120	0.83	<dl-490	20	5.1
Cu, µg/dm <sup>3</sup>	1	1000	<1-11.7	1	<0.4	1.5-2.3	1	1.77
Pb, µg/dm <sup>3</sup>	6	10	1.4-22.2	4	0.025	4.9-6.8	10	0.115
Sr, µg/dm <sup>3</sup>	400	7000	nd	260	720	nd	150	170
Ba, µg/dm <sup>3</sup>	740	700	nd	2	89	nd	20	32
Co, µg/dm <sup>3</sup>	10	100	<dl	8	0.3	<dl	5	0.23
Cr, µg/dm <sup>3</sup>	20	50	<dl	4	0.77	<dl	3	0.49
Mo, µg/dm <sup>3</sup>	1	70	nd	4	0.1	nd	2	0.91
Li, µg/dm <sup>3</sup>	80	30	<dl	<dl	10.6	<dl	20	2.9
Ni, µg/dm <sup>3</sup>	10	20	<dl	<dl	3.9	<dl	<dl	1.69
As, µg/dm <sup>3</sup>	50	10	<dl	<dl	1.9	<dl	<dl	0.84
Cd, µg/dm <sup>3</sup>	5	1	<dl	nd	0.0016	<dl	nd	0.01
Hg, µg/dm <sup>3</sup>	0.01	0.5	<dl	<dl	<0.02	<dl	<dl	<0.02
Be, µg/dm <sup>3</sup>	0.3	0.2	nd	nd	0.011	nd	nd	0.005
B, µg/dm <sup>3</sup>	500	500	nd	nd	122	nd	nd	14.3
Al, µg/dm <sup>3</sup>	40	200	nd	nd	5.1	nd	nd	18.7
Si, µg/dm <sup>3</sup>	nn	10000	nd	nd	1760	nd	Nd	1590
Sc, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	<0.125 <sup>(14)</sup>	nd	nd	<0.073 <sup>(14)</sup>
Ti, µg/dm <sup>3</sup>	60	100	nd	nd	1.14	nd	nd	0.76
V, µg/dm <sup>3</sup>	1	100	nd	nd	1.66	nd	nd	0.85
Ga, µg/dm <sup>3</sup>	nd	nd	nd	nd	0.009	nd	nd	0.017
Ge, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.015	nd	nd	0.0019
Se, µg/dm <sup>3</sup>	2	10	nd	nd	0.33	nd	nd	0.05
Br, µg/dm <sup>3</sup>	1350	200	nd	nd	310	nd	nd	77
Rb, µg/dm <sup>3</sup>	100	70	nd	nd	4.2	nd	nd	2.9
Y, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.103	nd	nd	0.072
Zr, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.3	nd	nd	0.16
Nb, µg/dm <sup>3</sup>	nn	10	nd	nd	0.039	nd	nd	0.014
Ag, µg/dm <sup>3</sup>	nn	50	nd	nd	0.0006	nd	nd	<0.0004
Sn, µg/dm <sup>3</sup>	112	nn	nd	nd	0.012	nd	nd	0.014
Sb, µg/dm <sup>3</sup>	nn	5	nd	nd	0.18	nd	nd	0.2
Te, µg/dm <sup>3</sup>	3	10	nd	nd	<0.008	nd	nd	<0.008

Characteristics	MPC_f	MPC_dr_c/dom	Lake Saysary, min-max (2009-2021)	Lake Saysary, averaged (1985-2021)	Lake Saysary, LIN of RAS SB (April 21, 2021)	Lake Sergelyakh, min-max (2009-2014)	Lake Sergelyakh, averaged (1985-2021)	Lake Sergelyakh, LIN of RAS SB (May 4, 2021)
I, µg/dm <sup>3</sup>	400	125	nd	nd	35	nd	nd	10.3
Cs, µg/dm <sup>3</sup>	1000	nn	nd	nd	0.0021	nd	nd	0.0024
La, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.074	nd	nd	0.075
Ce, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.125	nd	nd	0.134
Pr, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.014	nd	nd	0.017
Nd, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.07	nd	nd	0.059
Sm, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.023	nd	nd	0.021
Eu, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.008 <sup>(15)</sup>	nd	nd	0.0025 <sup>(15)</sup>
Gd, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.013	nd	nd	0.014
Tb, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0022	nd	nd	0.002
Dy, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.012	nd	nd	0.009
Ho, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0034	nd	nd	0.0028
Er, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.01	nd	nd	0.008
Tm, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0014	nd	nd	0.0011
Yb, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.008	nd	nd	0.006
Lu, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0019	nd	nd	0.001
Hf, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.006	nd	nd	0.003
Ta, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0013	nd	nd	0.0009
W, µg/dm <sup>3</sup>	0.8	50	nd	nd	0.007	nd	nd	0.029
Re, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0009	nd	nd	0.0007
Tl, µg/dm <sup>3</sup>	nn	0.1	nd	nd	<0.001	nd	nd	<0.001
Bi, µg/dm <sup>3</sup>	nn	100	nd	nd	0.0031	nd	nd	0.0029
Th, µg/dm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	0.0067	nd	nd	0.02
U, µg/dm <sup>3</sup>	nn	15	nd	nd	1.1	nd	nd	1.2
TBA, cells/cm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	14.6 × 10 <sup>6</sup>	nd	nd	6.4 × 10 <sup>6</sup>
TMC22, CFU/cm <sup>3</sup>	nn	nn	nd	nd	323	nd	nd	14080
TMC37, CFU/cm <sup>3</sup>	nn	50 / 100 <sup>(11)</sup>	nd	nd	33	nd	nd	447
Enterococcus, CFU/100 cm <sup>3</sup>	nn	0 / 100 / 10 / nn <sup>(12)</sup>	nd	nd	36	nd	nd	346
<i>E. coli</i> , CFU/100 cm <sup>3</sup>	nn	0 / 100 / 100 / 10 <sup>(13)</sup>	nd	nd	4	nd	nd	240

**Notes:** nn – no norms; nd – no data; <dl – below detection limits of measurements methods; Hard – hardness; Min – mineralization (major ions sum); SM – suspended matter.

(1) Potassium concentration not more than 10 mg/dm<sup>3</sup> for waterbodies with mineralization up to 100 mg/dm<sup>3</sup>.

(2) Drinking water of centralized supply: Min – not more than 1000 mg/dm<sup>3</sup>, H – not more than 7 meq/dm<sup>3</sup>; drinking water of non-centralized supply: Min – not more than 1500 mg/dm<sup>3</sup>, H – not more than 10 meq/dm<sup>3</sup>.

- (3) Phosphates  $< 0.15 \text{ mg/dm}^3$  – oligotrophic,  $0.15\text{-}0.45 \text{ mg/dm}^3$  – mesotrophic,  $> 0.6 \text{ mg/dm}^3$  – eutrophic waterbodies.
- (4) COD must not exceed  $15.0 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in the waters of surface water sources used for centralized water supply of people, for domestic use, in sites of water intake for swimming pools, balneary. COD must not exceed  $30.0 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in water of surface water sources used for recreation, as well as within inhabited sites, in open systems of technical water supply and for streets and green spaces watering. COD must not exceed  $60.0 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in systems of technical water reuse in manual and automatic car wash.
- (5) BOD5 must not exceed  $2 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in water of surface water sources used for centralized water supply to people, for domestic use, in sites of water intake for swimming pools, balneary. BOD5 must not exceed  $4 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in water of surface water sources used for recreation, as well as within inhabited sites. BOD5 must not exceed  $5 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in open systems of technical water supply and for streets and green spaces watering. BOD5 must not exceed  $10 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in systems of technical water reuse in manual and automatic car wash.
- (6) PMO must be not more than  $5 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  in drinking water of centralized water supply, not more than  $7 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  in drinking water of non-centralized water supply, not more than  $7.5 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  in fun water parks water.
- (7) Dissolved oxygen content in water must be not less than  $4 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$  in winter, not less than  $6 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  in summer.
- (8) Suspended matter content at discharge of return (waste) waters by a concrete water user while performing any activities at any water body and in the near-shore zone in a control site must not increase compared to natural conditions by more than  $0.25 \text{ mg/dm}^3$  (for highest and first categories of a water body of fishery importance) or by more than  $0.75 \text{ mg/dm}^3$  (for a second category of a water body of fishery importance). In water bodies of fishery importance with more than  $30 \text{ mg/dm}^3$  suspended matter content during low-water season, their content in water is admissible within 5%. Return (waste) waters containing suspended matter with precipitation rate of  $> 0.4 \text{ mm/sec}$  are forbidden for discharging into the water flows, at precipitation rate of  $> 0.2 \text{ mm/sec}$  – into water bodies.
- (9) Suspended matter content at discharge of waste waters, while performing any activities at any water body and in the near-shore zone in a control site must not increase compared to natural conditions by more than  $0.25 \text{ mg/dm}^3$  for recreation water use, and within populated sites – by more than  $0.75 \text{ mg/dm}^3$ . In water bodies with more than  $30 \text{ mg/dm}^3$  suspended matter content during low-water season, their content in water is admissible within 5%. Suspended matter with precipitation rate of  $> 0.4 \text{ mm/sec}$  for flowing water bodies and  $> 0.2 \text{ mm/sec}$  for waterbodies are forbidden for discharge. For technical water in open systems of technical water supply and for streets and green spaces watering, suspended matter content must not exceed  $5.0 \text{ mg/dm}^3$ , and for technical water in systems of technical reused water supply in manual and automatic car wash –  $20.0 \text{ mg/dm}^3$  ( $60.0 \text{ mg/dm}^3$  – for wheel car washers).
- (10) Fluorides content must be not more than  $50 \text{ mg/dm}^3$  as additional to background one but not exceeding their summary content  $750 \text{ mg/dm}^3$ .
- (11) TMC37 must be not more than  $50 \text{ CFU/cm}^3$  for systems of centralized drinking and hot water supply, not more than  $100 \text{ CFU/cm}^3$  for systems of non-centralized drinking water supply.
- (12) Enterococci must be absent in water in systems of centralized drinking and hot water supply and non-centralized drinking water supply as well as in waters of swimming pools and fun water parks; in surface waters for drinking and domestic water supply as well as for water supply to food establishments – not more than  $100 \text{ CFU} / 100 \text{ cm}^3$ ; in recreation zones as well as within populated sites (for swimming and aquatic sports) – not more than  $10 \text{ CFU} / 100 \text{ cm}^3$ ; in natural waters for technical water supply – no norms.
- (13) *E. coli* must be absent in water of systems of centralized drinking and hot water supplies and non-centralized drinking water supply as well as in water of swimming pools and fun water parks; in surface waters for drinking and domestic water supply as well as for water supply of food establishments – not more than  $100 \text{ CFU} / 100 \text{ cm}^3$ ; in recreation zones as well as within populated sites (for swimming and aquatic sports) – not more than  $100 \text{ CFU} / 100 \text{ cm}^3$ ; in natural waters of technical water supply (car wash, streets and green spaces watering) – not more than  $10 \text{ CFU} / 100 \text{ cm}^3$ .
- (14) Concentration of Sc may be elevated due to complexity of account of interferences with SiO (determining by ICP-MS method).
- (15) Concentration of Eu may be elevated due to complexity of account of interferences with BaO (determining by ICP-MS method).
- \* (Makarov and Chizhuk, 2009) – PO43-;  
 (Rufova et al., 2012) – pH, hardness, total mineralization,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , F, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Cr, Ni, Cd, Hg;  
 (Rufova et al., 2013) –  $\text{NH}_4^+$ , Fe, Mn, Zn, Pb;  
 (Ksenofontova et al., 2013) – pH, hardness,  $\text{O}_2$ -diss, suspended matter;  $\text{NH}_4^+$ , Fe, Mn, Zn, Cu;  
 (Rufova and Ksenofontova, 2015) – pH,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , Cl, hardness, total mineralization,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Cr, Ni, As, Cd, Hg;  
 (Rufova and Tatarinova, 2015) –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , F, Fe, Pb, Co, Cr, Ni, As, Cd, Hg;  
 (Kaydalova and Olesova, 2019) –  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , Cl, hardness, total mineralization,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , COD, BOD5,  $\text{O}_2$ -diss, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Ni, Hg;  
 (Nikolaev and Arkhipov, 2021) –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , Cl, hardness, total mineralization,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , BOD5,  $\text{O}_2$ -diss, Fe;  
 (Legostaeva and Rufova, 2022) – mineralization, suspended matter, averaged hydrochemical and geochemical characteristics.



(plasma generator capacity was 1580 W) without a collision cell.

The solutions were measured in a scanning mode with an additional desensitization of signals by 30 times for the isotopes  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{28}\text{Si}$ ,  $^{39}\text{K}$  and  $^{115}\text{In}$  (3 channels per mass, 0.05 sec per channel, total scanning time of a mass spectrum was – 62 sec, washing between samples was – 60 sec).

To calibrate the mass-spectrometer, we used multi-elemental standard solutions ICP-MS-68A-A and ICP-MS-68A-B (HIGH-PURITY STANDARDS, Charleston, USA), a sample of Baikalian bottled water (for Na, Mg, Si, S, Cl, K, Ca, (Suturin et al., 2003)), as well as cations (Na, Mg, K, Ca, Fe, Hg) and anions (Si, P, S, Cl, Br, I) solutions made by mixing of single-element ICP-MS standard solutions from Inorganic Ventures (USA).

Correction for interfering molecular ions ( $\text{MeO}^+$ ,  $\text{MeOH}^+$ ,  $\text{MeAr}^+$ ,  $\text{MeCl}^+$ ) was done using the approach described in (Aries et al., 2000).

Typical measuring errors (variation coefficient of RSD) depending on chemical elements concentrations are in the following ranges:  $< 0.001 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  – RSD  $> 25\%$ ;  $0.001\text{-}0.1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  – RSD 25-10 %;  $0.1\text{-}1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  – RSD 10-5 %;  $> 1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  – RSD 5 %.

## 2.5. Microbiological analysis

*Total bacterial abundance* (TBA) was counted by method of direct accounting of preparations stained with a fluorochromic dye DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) (Porter and Feig, 1980), using epifluorescent microscopy (Axiovert 200 Zeiss, Germany) with an ultraviolet lamp HBO 50W/AC ASRAM with excitation spectrum of 365 nm (Bashenkhaeva et al., 2015). While calculating cells, minimum 30 eyepiece fields per sample were examined, calculations were performed using a recommended formula (Murray et al., 1994).

*Organotrophic bacteria* were determined under different culturing conditions. Fish-peptone agar diluted 10 times (FPA/10) was used to determine the abundance of autochthonous microflora natural for this water body, the inoculations were incubated at 22 °C during 72 h (TMC 22) (Gorbenko, 1961). On meat-peptone agar (MPA), after incubation at  $37 \pm 1$  °C during 24 h, we determined the abundance of allochthonous microflora supplied into the body due to anthropogenic pollution (TMC37). Self-purification coefficient (SPC) was determined by ratio of values of TMC indicator determined at temperatures of 22°C and 37 °C.

*Sanitary-microbiological indicators* were determined according to (SanPiN 1.2.3685-21). Detection and counting of the studied bacterial groups were performed by method of membrane filtration on nitrocellulose filters with pores diameter of 0.45  $\mu\text{m}$  according to (MUK 4.2.1884-04) and (GOST 24849-2014). The abundance of thermotolerant *E. coli* was determined by method of membrane filtration using High-chrome agar (produced by «Himedia» No M1571) (GOST 24849-2014).

The presence of faecal enterococci was revealed by method of membrane filtration using nutrient selec-

tive agar Slanetz and Bartley Medium (produced by «Himedia» No M 612) and Bile Esculine Azide Agar (produced by «Himedia» No M493) (GOST 24849-2014). The results were analyzed according to (MUK 4.2.1884-04, GOST 24849-2014).

## 3. Results and discussion

### 3.1. pH, composition of major ions

During the studies period, both lakes water had a weakly alkaline reaction, and, according to classification by Alekin (Alekin, 1953), was related to hydrocarbonate class (Table 1). Among cations,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  dominated in the water of both lakes, In Lake Saysary, the concentration of  $\text{Na}^+$  (117  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) was a little higher than one of  $\text{Ca}^{2+}$  (82.4  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ), and in Lake Sergelyakh, vice versa, the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (28.4  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) was a little higher than one of  $\text{Na}^+$  (24.8  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ). In Lake Saysary, major ions concentrations, except  $\text{SO}_4^{2-}$ , exceeded their averaged values obtained during 1985-2021 (Legostaeva and Rufova, 2022) (further we are going to use the term “characteristic values”) 1.5-3 times, and total mineralization (1030  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) – ca. 2 times. Concentration of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{HCO}_3^-$  in Lake Saysary exceeded maximal values observed during open water period in 2009-2021 (the range of concentrations variations for the accessible observations period will be called further “monitoring values”). This may suggest both more intensive feeding with underground and riverine waters in winter compared to atmospheric moisture and anthropogenic factors impact (Rufova et al., 2012), drainage from which can income into the lake with ground waters (Makarov and Chizhuk, 2009).

Mineralization of Lake Saysary (1030  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) exceeded a little maximum permissible concentrations (MPC) for drinking water of centralized water supply (1000  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) but was less than MPC for drinking water of non-centralized water supply (1500  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) (SanPiN 1.2.3685-21). Among major ions, concentration of  $\text{Mg}^{2+}$  (50  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) in Lake Saysary reached MPC for drinking and cultural-domestic water use (MPC<sub>dr\_c/dom</sub>) and exceeded norms for fishery purposes (1.25 MPC<sub>f</sub>). Water hardness in Lake Saysary (8.3  $\text{meq}/\text{dm}^3$ ) exceeded MPC for drinking water from centralized water supply 1.2 time (7  $\text{meq}/\text{dm}^3$ ) but was less than MPC for drinking water from non-centralized water supply (10  $\text{meq}/\text{dm}^3$ ).

Lake Sergelyakh is fresher, water mineralization (major ions sum) in it was 279  $\text{mg}/\text{dm}^3$ , this is 3.7 times less than in Lake Saysary (Table 1). Major ions concentration in Lake Sergelyakh was 1.5-2 times lower than characteristic values, this may suggest other character of lake hydrological regime compared to Lake Saysary. Concentration of  $\text{K}^+$  in Lake Sergelyakh exceeded a little maximal monitoring values observed during open water period in 2009-2014.

### 3.2. Biogenic components

Maximal concentration of ammonium ( $\text{NH}_4^+$  = 2.27  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) exceeding both norms (4.5 MPC<sub>f</sub>

(Order..., 2016) and 1.5 MPC<sub>dr\_c/dom</sub> (SanPiN 1.2.3685-21)) was found in Lake Saysary (Table 1). In Lake Sergelyakh, concentration of ammonium ( $\text{NH}_4^+ = 0.66 \text{ mg/dm}^3$ ) exceeded fishery norms 1.3 times.

According to classification of pollution degree of water bodies by ammonium nitrogen content (in  $\text{mg/dm}^3$ ): very clean ( $< 0.05$ ), clean (0.05-0.1), moderately polluted (0.2-0.3), polluted (0.4-1.0), dirty (1.1-3.0) and very dirty ( $> 3.0$ ), (Kharaev et al., 2004), Lake Saysary is related to the category “dirty”, and Lake Sergelyakh – to category “polluted”. The obtained ammonium concentrations in Lake Saysary are close to maximal monitoring values ( $3.4 \text{ mg/dm}^3$ ) and are 3.6 times higher than characteristic values ( $0.63 \text{ mg/dm}^3$ ). In Lake Sergelyakh, ammonium concentration is 2.4 times lower than maximal monitoring values ( $1.6 \text{ mg/dm}^3$ ), however, it is almost twice higher than characteristic values ( $0.35 \text{ mg/dm}^3$ ) (Table 1).

Concentration of ammonium oxidation products ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) in Lake Saysary is less than in Lake Sergelyakh (Table 1). This suggests that Lake Saysary is more effected by intensive fresh faecal pollution.

Concentration of nitrites and nitrates in both lakes was less than established norms. Concentration of nitrites in Lake Saysary is very small ( $0.003 \text{ mg/dm}^3$ ), seven times lower than minimal monitoring values ( $0.02 \text{ mg/dm}^3$ ) and 43 times lower than characteristic values ( $0.13 \text{ mg/dm}^3$ ).

Concentration of nitrites in Lake Sergelyakh ( $0.046 \text{ mg/dm}^3$ ) is comparable with monitoring values ( $< 0.05 \text{ mg/dm}^3$ ) and 1.5 time higher than characteristic values ( $0.03 \text{ mg/dm}^3$ ).

Concentration of nitrates in Lake Saysary ( $0.41 \text{ mg/dm}^3$ ) was 5.4 times lower than maximal monitoring values ( $2.2 \text{ mg/dm}^3$ ) and 2.8 times lower than characteristic values ( $1.16 \text{ mg/dm}^3$ ).

Concentration of nitrates in Lake Sergelyakh ( $1.22 \text{ mg/dm}^3$ ) was almost by one order of magnitude higher than characteristic values ( $0.13 \text{ mg/dm}^3$ ). At monitoring studies during open water period in 2009-2014, nitrates in Lake Sergelyakh were not found, the authors (Rufova and Ksenofontova, 2015; Rufova and Tatarinova, 2015) do not present detection limits.

In the whole, summary concentration of nitrogen under its different forms ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) in Lake Saysary was 2.3 times higher than in Lake Sergelyakh. It is seen in Figure 1 that Lake Saysary is in the area of dense urban buildings, and Lake Sergelyakh – in horticultural business areas. Summary concentration of nitrogen under its different forms in Lake Saysary exceeded characteristic values 2.3 times, and in Lake Sergelyakh 2.6 times; this is probably due to peculiarities of ice-cover period.

By concentration of phosphates ( $1.04 \text{ mg/dm}^3$ ) at studies period, Lake Saysary is related to the category of hypertrophic water bodies (Table 1). Phosphates concentration exceeded at that time characteristic values ( $0.44 \text{ mg/dm}^3$ ) 2.4 times and maximal monitoring values ( $0.76 \text{ mg/dm}^3$ ) 1.4 time. In Lake Sergelyakh, phosphates concentration ( $0.162 \text{ mg/dm}^3$ ) was 6.4 times less than in Lake Saysary, two times lower than characteristic values ( $0.33 \text{ mg/dm}^3$ ) and by one order

of magnitude lower than maximal monitoring values ( $2.4 \text{ mg/dm}^3$ ). By concentration of phosphate at studies moment, Lake Sergelyakh is related to the category of mesotrophic water bodies ( $0.15\text{-}0.45 \text{ mg/dm}^3$ ).

Concentration of total phosphorus ( $\text{P}_{\text{tot}}$ ) in Lake Saysary was  $0.53 \text{ mg/dm}^3$ , and one of organic phosphorus ( $\text{P}_{\text{org}}$ ) –  $0.19 \text{ mg/dm}^3$ . Fraction of  $\text{P}_{\text{org}}$  in Lake Saysary water was 36%. Concentration of  $\text{P}_{\text{tot}}$  in Lake Sergelyakh was  $0.23 \text{ mg/dm}^3$ , this is 2.3 times lower than in Lake Saysary. Concentration of  $\text{P}_{\text{org}}$  in Lake Sergelyakh was almost the same as in Lake Saysary and was  $\sim 0.18 \text{ mg/dm}^3$ . Thus, fraction of  $\text{P}_{\text{org}}$  in Lake Sergelyakh water was 77%, this is twice higher than in Lake Saysary. This suggests a more effective phosphorus utilization by biota in Lake Sergelyakh.

Differences of lakes by biogenic charge is probably due to uneven distribution of anthropogenic factors.

Concentration of Si in Lake Saysary ( $1760 \mu\text{g/dm}^3$ ) and in Lake Sergelyakh ( $1590 \mu\text{g/dm}^3$ ) was comparable. During the studies period, by this indicator water in both lakes is suitable for drinking and cultural-domestic water use, as it is ca. six times lower than MPC<sub>dr\_c/dom</sub> ( $10\,000 \mu\text{g/dm}^3$ ). Fishery norm for Si is not established. We failed to find characteristic and monitoring values of Si in the studied lakes.

### 3.3. Organic matter

Organic matter content was estimated by parameters of COD (total amount of dissolved organic matter) and PMO (content of easily oxidized organic matter). COD in Lake Saysary was  $122 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ , this is comparable with COD in Lake Sergelyakh ( $133 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ). PMO parameters in these lakes are also close – 38.8 and  $42.4 \text{ O}_2/\text{dm}^3$ , respectively.

COD parameters in both lakes exceeded MPC for technical water use ( $60 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ )  $\sim 2$  times. COD parameters in both lakes exceeded MPC in water bodies for recreation as well as MPC for water bodies within populated areas, MPC for water in open systems of technical water supply, MPC for water for streets and green sites watering ( $30 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ) –  $\sim 4$  times. COD parameters in both lakes exceeded MPC in surface waters used for centralized water supply of people, MPC for water for domestic water use, in sites of water intake for swimming pools and balneary ( $15 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ) – 8-9 times (Table 1). It means that the water from Lake Saysary and Lake Sergelyakh cannot be used for all these aims during the studied period.

PMO parameters have norms for drinking water of centralized (not more than  $5 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ) and non-centralized (not more than  $7 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ) water supply, as well as for water in fun water parks (not more than  $7.5 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ). The studied lakes exceeded established norms by these indicators minimum 5 times. It means that during the studied period, the water from these lakes may not either be used for drinking and fun water parks.

Comparing the results obtained with monitoring observations, we can see that COD in Lake Saysary is close to maximal values ( $150 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ ) found out during open water periods in 2009-2021. Characteristic

COD values for Lake Saysary are not presented in (Legostaeva and Rufova, 2022). Any data concerning COD and PMO for Lake Sergelyakh were not found in scientific papers as well (Table 1).

By PMO/COD ratio we can estimate qualitative composition of organic matter in natural waters (Skopintsev, 1950; Skopintsev and Goncharova, 1987). The value of PMO/COD = 40% is accepted as a conventional boundary of organic matter of allochthonous and autochthonous origin. In Lake Saysary this value is 31%, and in Lake Sergelyakh – 32%. It means that in both lakes major part of organic matter is autochthonous.

### 3.4. Trace elements

Trace elements are chemical elements whose concentrations in natural waters less than 1 mg/dm<sup>3</sup> (Gaillardet et al., 2003).

Concentration of Fe, which is related as well to biogenic elements, in Lake Saysary (200 µg/dm<sup>3</sup>) and Lake Sergelyakh (250 µg/dm<sup>3</sup>) exceeded fishery norms 2 and 2.5 times, respectively (Table 1). In Lake Sergelyakh, concentration of Fe was close to characteristic values (270 µg/dm<sup>3</sup>) and 3.4 times lower than maximal monitoring values (850 µg/dm<sup>3</sup>), and in Lake Saysary concentration of Fe was almost 2 times lower than characteristic values (390 µg/dm<sup>3</sup>) and 2.7 times lower than maximal monitoring values (530 µg/dm<sup>3</sup>). By this indicator, water from both lakes is suitable for drinking and cultural-domestic water use (MPC<sub>dr\_c/dom</sub> = 300 µg/dm<sup>3</sup>).

Concentration of Mn in Lake Saysary (1050 µg/dm<sup>3</sup>) was three times higher than in Lake Sergelyakh (350 µg/dm<sup>3</sup>). Both indicators considerably exceeded fishery norms (MPC<sub>f</sub> = 10 µg/dm<sup>3</sup>) – 105 and 35 times, respectively as well as water norms for drinking and cultural-domestic water use (MPC<sub>dr\_c/dom</sub> = 100 µg/dm<sup>3</sup>) – 10.5 and 3.5 times, respectively. Concentration of Mn in both lakes considerably exceeded as well characteristic values (20 µg/dm<sup>3</sup>) – ~50 and 17.5 times, respectively. It is noticed in (Kaydalova and Olesova, 2019) that high and extremely high pollution levels in Lake Saysary with manganese related to fishery norms were found out during winter-summer low water season in 2012 and 2013. It means that at that time concentration of Mn could be > 500 µg/dm<sup>3</sup>, however, the authors do not indicate, in what extent more. Concentration of Mn in Lake Sergelyakh exceeded by one order of magnitude maximal monitoring values (29 µg/dm<sup>3</sup>).

High levels of Mn content in lakes water during ice-cover period are mainly due to the peculiarities of its chemical behavior. The concentration of Mn in natural waters is influenced by content of dissolved oxygen and by value of reduction-oxidation potential. Under moderate oxidation conditions, soluble Mn<sup>2+</sup> transfers into insoluble Mn<sup>4+</sup>, which migrates mainly in colloid forms (~90%, Pokrovsky et al., 2006), it can be utilized into bottom sediments and/or sorbed by suspended matter (Chebykin et al., 2012). During freezing up, at oxygen deficiency, reversal processes of Mn mobilization from bottom sediments occur – during a seasonal cycle

it concentration in water can vary tens and hundreds times (Chebykin et al., 2012). Mn can as well income into water bodies fed by underground waters, which, as a rule, contain considerably more Mn compared to surface waters (Suturin et al., 2016). Mobilization of Mn into water can as well be due to swampy landscape (acid environment) and decrease of flow rate. On the background of such considerable natural processes, it is very difficult to reveal anthropogenic contribution. During ice-cover period, water from both lakes by this indicator is not suitable for drinking without preliminary purification.

Concentration of Zn in Lake Saysary (0.83 µg/dm<sup>3</sup>) and Lake Sergelyakh (5.1 µg/dm<sup>3</sup>) was lower than MPC<sub>f</sub> (10 µg/dm<sup>3</sup>) and considerably lower than MPC<sub>dr\_c/dom</sub> (1000 µg/dm<sup>3</sup>) as well as than characteristic values, which are 120 and 20 µg/dm<sup>3</sup> for Lake Saysary and Lake Sergelyakh, respectively (Table 1). Maximal monitoring values of Zn are 390 and 490 µg/dm<sup>3</sup> for Lake Saysary and Lake Sergelyakh, respectively. Such high values are not characteristic for natural water bodies and raise doubts concerning the quality of analytical data.

Concentration of Cu in Lake Saysary was < 0.4 µg/dm<sup>3</sup>, this is lower than MPC<sub>f</sub> (1 µg/dm<sup>3</sup>) and considerably lower than MPC<sub>dr\_c/dom</sub> (1000 µg/dm<sup>3</sup>). In Lake Sergelyakh concentration of Cu (1.77 µg/dm<sup>3</sup>) exceeded fishery norms ~ 1.8 time. Characteristic concentration of Cu in both lakes is 1 µg/dm<sup>3</sup> with variations of monitoring values < 1-11.7 µg/dm<sup>3</sup> in Lake Saysary and 1.5-2.3 µg/dm<sup>3</sup> in Lake Sergelyakh (Table 1). During the studied period, water of both lakes is suitable by this indicator for drinking and cultural-domestic water use.

Concentration of Pb in Lake Saysary (0.025 µg/dm<sup>3</sup>) and in Lake Sergelyakh (0.025 µg/dm<sup>3</sup>) was considerably lower than MPC<sub>f</sub> (6 µg/dm<sup>3</sup>), MPC<sub>dr\_c/dom</sub> (10 µg/dm<sup>3</sup>) and characteristic values (4 and 10 µg/dm<sup>3</sup> for Lake Saysary and Lake Sergelyakh, respectively). Variations of monitoring value for Pb are 1.4-22.2 and 4.9-6.8 µg/dm<sup>3</sup> for Lake Saysary and Lake Sergelyakh, respectively. Such a big difference of our data with published ones is most probably due to an analytical factor. In this work, a highly sensitive method of multi-elemental ICP-MS analysis was used, it has elements detection limits by several orders of magnitude lower than traditionally used methods (atomic absorption, etc.). Most probably, the authors who performed monitoring studies used methods (unfortunately, they do not tell which ones), the detection limits of which leave to be desired. This difference is seen practically for all elements with a characteristic concentrations at the level of ones or tens of µg/dm<sup>3</sup> and lower (Zn, Co, Cr, Mo, Li) (Table 1).

Among other trace elements exceeding established norms we detected Sr (1.8 MPC<sub>f</sub>), V (1.7 MPC<sub>f</sub>) and Br (1.6 MPC<sub>dr\_c/dom</sub>) in Lake Saysary. Concentration of Sr (720 µg/dm<sup>3</sup>) in Lake Saysary exceeded characteristic values (260 µg/dm<sup>3</sup>) 2.8 times. In Lake Sergelyakh, concentration of Sr (170 µg/dm<sup>3</sup>) was 2.4 times lower than MPC<sub>f</sub> (400 µg/dm<sup>3</sup>) and a little higher than characteristic values (150 µg/dm<sup>3</sup>). We

failed to find in papers characteristic and other values concerning V, Br and major part of other trace elements we measured.

### 3.5. Geochemical composition

On one hand, geochemical composition of bodies is very specific, on the other hand, it is variable, it forms under the influence of numerous natural-climatic, physical, physico-chemical, biological and anthropogenic factors, which influence water interaction with rocks, soils, biota and atmosphere (Perelman, 1982). The data obtained (Table 1) suggest that in about half cases, the concentration of chemical elements in Lake Saysary was higher than in Lake Sergelyakh (times): Co (1.3), Y (1.4), Ta (1.4), Rb (1.5), Ti (1.5), Cr (1.6), Sc (1.7), Zr (1.9), V (2), Hf (2), Be (2.2), As (2.3), Ni (2.3), P (2.3), Ba (2.8), Nb (2.8), Ca (2.9), K (3), Mn (3), I (3.4), Mg (3.6), Li (3.7), Br (4), Sr (4.2), Na (4.7), Se (6.6), Cl (6.7), Ge (7.9) and B (8.5). On the contrary, in ten cases it was lower (times): Fe (1.3), Ga (1.9), Th (3), Al (3.7), W (4.1), Cu (4.4), Pb (4.6), Zn (6.1), Cd (6.3) и Mo (9.1). We detected no differences between lakes by other elements (Hg, Si, Ag, Sn, Sb, Te, Cs, REE, Ta, Re, Tl, Bi and U) within errors of determination of their concentrations.

### 3.6. Comprehensive estimate of waters quality by hydrochemical and geochemical indicators

The data obtained do not allow to use formal comprehensive indicators such as normalized combinatory index of waters pollution (NCIWP) and index of waters pollution (IWP).

To estimate the first index, it is required to perform determination of 15 mandatory indicators ( $O_2$ -diss, BOD5, COD, phenols, petrochemicals,  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ , Cl<sup>-</sup>,  $SO_4^{2-}$ , Fe, Mn, Cu, Zn, Ni) (RD 52.24.643-2002), among which we did not determine  $O_2$ -diss, BOD5, phenols and petrochemicals. While calculating NCIWP, along with multiplicity of MPC exceed, indicators of comprehensiveness and repeatability of pollution for a studied period are used. In this work only a single testing was done, therefore, a repeatability indicator cannot be determined. Depending of NCIWP value, water hazard class is determined from I (conventionally clean) to V (extremely dirty).

To estimate the second indicator, we need to determine six most important indicators for this water body, among which  $O_2$ -diss and BOD5 are mandatory (Temporary..., 1986). Depending on IWP value, a water hazard class is determined from I (very clean) to VII (exceedingly dirty). In this work, two latter indicators were not determined. To compare pollution degrees between Lake Saysary and Lake Sergelyakh, IWP was calculated with available pollutions set, where instead BOD5 an approximate parameter – permanganate oxidability (PMO) – can be used. The pollutants set was not limited with six most important indicators, all n indicators of  $C_i$ , which reached or exceeded established

norms (MPC<sub>f</sub> and MPC<sub>dr\_c/dom</sub>) at least in one of the lakes were used:

$$IWP(c) = \left( \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{MPC_i} \right) / n \quad (1),$$

where IWP(c) is a conventional index of pollution in the studied lakes.

According to the data obtained, there are seven such indicators by fishery norms ( $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $PO_4^{3-}$ , Fe, Mn, Cu, and V) and nine indicators by norms for drinking and cultural-domestic water use ( $Mg^{2+}$ , water hardness, water mineralization,  $NH_4^+$ ,  $PO_4^{3-}$ , COD, PMO, Mn and Br) (Table 2).

The Table 2 presents degrees of exceeding of MPC by chosen indicators and calculated pollution levels (PL) (RD 52.24.643-2002) and conventional indices of waters pollution IWP(c).

In Lake Saysary IWP(c)<sub>f</sub> was 16.7, this is 2.8 times higher than in Lake Sergelyakh (IWP(c)<sub>f</sub> = 6). It means that by fishery norms Lake Saysary was almost three times worse than Lake Sergelyakh. Overwhelming contribution into IWP(c)<sub>f</sub> in both cases was made by Mn, which exceeded established norms 105 times in Lake Saysary and 35 in Lake Sergelyakh, these are extremely high and high pollution levels, respectively. Average water pollution levels for fishery needs were found by ammonium (4.5 MPC<sub>f</sub>) in Lake Saysary and by Fe (2.5 MPC<sub>f</sub>) in Lake Sergelyakh. Pollution level by other components was low or absent (Table 2).

IWP(c)<sub>dr\_c/dom</sub> in Lake Saysary was 3.42, this is 1.5 time higher than in Lake Sergelyakh (IWP(c)<sub>dr\_c/dom</sub> = 2.25). It means that by norms for drinking and cultural-domestic water use Lake Saysary was also worse than Lake Sergelyakh. In both cases main contribution into this index was done by COD, PMO and Mn, which exceeded established norms ~8/~9, ~5/~6 and 10.5/3.5 times for Lake Saysary/Lake Sergelyakh, respectively. By organic matter content the water in both lakes met a conventionally high pollution level, which, due to absence of statements in governing documents is calculated by analogy with multiplicity of MPC exceed by the indicator BOD5 (RD 52.24.643-2002) (see notes to Table 2). By concentration of Mn water in Lake Saysary met a high pollution level and Lake Sergelyakh water – medium pollution level. The pollution level by other component was low or absent (Table 2). Thus, use of lakes water for drinking and cultural-domestic needs was the most dangerous by content of organic matter along with Mn.

### 3.7. Microbiological characteristics

TBA in Lake Saysary was  $14.6 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>, and in Lake Sergelyakh  $6.4 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>. According to the GOST 17.1.3.07-82, TBA is an indicator of a water body sanitary state and is taken into account while estimating its trophic status. The water is divided into six hazard classes: TBA <  $0.5 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> – I (very clean), TBA =  $0.5-1.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> – II (clean), TBA =  $1.1-3.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> – III (moderately polluted), TBA =  $3.1-5.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> – IV (polluted), TBA =  $5.1-10.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> – V (dirty), TBA >  $10.0 \times 10^6$



**Table 2.** Pollution levels (PL) and conventional indices of waters pollution IWP(c) in Lake Saysary and Lake Sergelyakh by indicators reaching and exceeding MPC\_f and MPC\_dr\_c/dom at least in one of the lakes.

Hazard class*	Indicator	Lake Saysary				Lake Sergelyakh			
		Ci / MPC_f	PL_f	Ci / MPC_dr_c/dom	PL_dr_c/dom	Ci / MPC_f	PL_f	Ci / MPC_dr_c/dom	PL_dr_c/dom
3	Mg <sup>2+</sup>	1.25	L	1.00	L	0.35	nd	0.28	L
nn	H	nn	–	1.19	L	Nn	–	0.37	L
nn	Min	nn	–	1.03	L	Nn	–	0.28	L
4	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<b>4.54</b>	<b>M</b>	1.51	L	1.32	L	0.44	L
3	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1.74 (1)	L	0.30	L	0.27 (1)	nd	0.05	L
nn	COD	nn	–	<b>8.13 (2)</b>	<b>H (4)</b>	nn	–	<b>8.85 (2)</b>	<b>H (4)</b>
nn	PMO	nn	–	<b>5.54 (3)</b>	<b>H (4)</b>	nn	–	<b>6.06 (3)</b>	<b>H (4)</b>
3-4*	Fe	2.00	L	<	L	<b>2.50</b>	<b>M</b>	<	L
3	Mn	<b>105</b>	<b>EH</b>	<b>10.5</b>	<b>H</b>	<b>35</b>	<b>H</b>	<b>3.5</b>	<b>M</b>
3-4*	Cu	0.40	nd	<	nd	1.77	L	<	nd
3	V	1.66	L	<	nd	0.85	nd	<	nd
2	Br	<	nd	1.55	L	<	nd	0.39	nd
	IWP(c)	IWP(c)_f		IWP(c)_dr_c/dom		IWP(c)_f		IWP(c)_dr_c/dom	
		16.7		3.42		6.01		2.25	

**Notes:** nn – no norms; < – an indicator is not taken into account as it is lower than norms for both lakes.

(1) we used for calculation a norm for eutrophic lakes PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = 0.6 mg/dm<sup>3</sup>.

(2) we used for calculation a norm of COD = 15 mg O<sub>2</sub> / dm<sup>3</sup> for water from surface water sources used for centralized supply to population, for drinking and domestic use, from sites of water intake for swimming pools and balneary.

(3) we used for calculation a norm of PMO = 7 mg O<sub>2</sub> / dm<sup>3</sup> for drinking water from non-centralized water supply.

PL – water pollution level by overshooting degree of MPC (RD 52.24.643-2002): L – low (1-2) MPC, M – medium [2-10] MPC; H – high [3-5] MPC for matter of 1-2 hazard classes, [10-50] MPC for matter of 3-4 hazard classes, EH – extremely high ≥ 5 MPC for matter of 1-2 hazard classes, ≥ 50 MPC for matter of 3-4 hazard classes, dash «–» impossible to calculate PL due to norm absence; nd – pollution level is not determined as it is low than MPC.

(4) – criteria of determination of high and extremely high water pollution levels by indicators of COD and PMO are determined by analogy with overshooting degree of MPC of BOD<sub>5</sub>: 5-20 MPC – high, > 20 MPC – extremely high.

\* – hazard class of chemicals according to (SanPiN 1.2.3685-21) in drinking water from systems of centralized, including hot and non-centralized water supply, in water of underground and surface water bodies for drinking and cultural-domestic water use, in water of swimming pools and fun water parks. For comprehensive estimate of the degree of surface waters pollution by hydrochemical indicators, the hazard class for Fe and Cu is decreased up to 4 (RD 52.24.643-2002).

cells/cm<sup>3</sup> – VI (very dirty) (GOST 17.1.3.07-82). Thus, water pollution degree by TBA in Lake Sergelyakh and Lake Saysary meets V and VI hazard classes.

Little abundance of allochthonous microflora supplied into a water body and estimated by indicator of TMC37 occurred in Lake Sergelyakh – 447 CFU / cm<sup>3</sup>. In Lake Saysary TMC37 was by one order of magnitude lower (33 CFU / cm<sup>3</sup>). The abundance of autochthonous microflora in Lake Sergelyakh (TMC22 = 14 080 CFU / cm<sup>3</sup>) also was considerably higher than in Lake Saysary (TMC22 = 323 CFU / cm<sup>3</sup>). By ratio TMC22 / TMC37 (self-purification coefficient, SPC) one can estimate the activity and state of self-purification in natural water bodies (MUK 4.2.1884-04). By this parameter, water in both lakes meets an accomplished self-purification process (SPC ≥ 4). Despite higher abundance of organotrophic microorganisms in Lake Sergelyakh, self-purification processes in it occurred more intensively (SPC = 31.5) compared to Lake Saysary (SPC = 9.8).

Nevertheless, presence of sanitary indicative bacteria suggested a non-favorable sanitary-microbiological situation, especially in Lake Sergelyakh.

Enterococci were found in Lake Saysary as many as 36 CFU / 100 cm<sup>3</sup>, this is lower than norms of surface waters used for drinking and domestic water supply as well as for water supply to food enterprises (100 CFU / 100 cm<sup>3</sup>), however, it is 3.6 higher than norms for surface waters in recreation zones as well as for waters within populated sites (for swimming and aquatic sports) – 10 CFU / 100 cm<sup>3</sup> (SanPiN 1.2.3685-21). In Lake Sergelyakh enterococci content was almost by one order of magnitude higher than in Lake Saysary as many as 346 CFU / 100 cm<sup>3</sup>, this is considerably higher than all norms for surface waters adopted in Russian Federation.

In Lake Saysary a small amount of coliform bacillus *E. coli* (4 CFU / 100 cm<sup>3</sup>) was found, it did not exceed norms in surface waters for all water usages (100 CFU / 100 cm<sup>3</sup>) and in natural water for technical water supply (10 CFU / 100 cm<sup>3</sup>). In Lake Sergelyakh content of *E. coli* was 60 times higher than in Lake Saysary, 240 CFU / 100 cm<sup>3</sup>, this is 2.4 times higher than adopted norms for surface waters and 24 times higher than norms for natural waters, which can be

used for technical water supply.

Thus, except TBA, by all measured microbiological characteristics, Lake Sergelyakh was by 1-2 orders of magnitude worse than Lake Saysary; this is probably due to absence of sewage tanks in numerous gardening plots, which are closely adjacent to the lake shores (Fig.). During the studied period, water from Lake Sergelkhakh could not be used for drinking and domestic supply as well as for food enterprises, technical and recreation usage. By studied microbiological characteristics, Lake Saysary water could be used for above listed needs except recreational ones.

#### 4. Conclusion

The water from large lakes of Yakutsk City (Lake Saysary and Lake Sergelyakh) in the end of ice-cover period of 2021 did not meet quality norms established for water bodies for fishery, drinking and cultural-domestic water use by numerous hydrochemical, geochemical and microbiological characteristics.

Comprehensive estimate of waters quality by hydrochemical and geochemical indicators obtained using a conventional index of waters pollution *IWP(c)* shows that Lake Saysary water was three times worse than Lake Sergelyakh water by fishery norms and 1.5 times worse by norms for drinking and cultural-domestic water use.

Maximal pollution level in both lakes is found out by Mn (10.5-105 MPC) and organic matter (up to 9 MPC), major part of which, however, is of autochthonous origin. Most probably, high concentrations of Mn are due to seasonal reasons.

By biogenic components (nitrogen, phosphorus) Lake Saysary met the category of dirty and eutrophic water bodies and Lake Sergelyakh – the category of polluted and mesotrophic ones.

Total bacterial pollution in Lake Saysary was also higher (VI hazard class, category of very dirty waters), than in Lake Sergelyakh (V hazard class, category of dirty waters), however, the content of sanitary indicators (*E. coli* and the genus *Enterococcus*) and organotrophic (TMC22, TMC37) bacteria in Lake Sergelyakh was by one and more orders of magnitude higher than in Lake Saysary and exceeded all Russian norms established for surface waters.

The results obtained suggest the necessity to undertake measures for improvement of water quality in Lake Saysary and Lake Sergelyakh as they are situated within Yakutsk City and are of very great amenity and recreational importance. Lake Saysary is included into a list of unique Yakutian lakes and has a sacred meaning.

#### Acknowledgements

This study was performed using the facilities of the Instrumentation Center for Electron Microscopy and ICP-MS analysis at the Integrated Center of Ultramicroanalysis (Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences). The authors thank I.I. Kopyrin for help in sampling. This study

was supported by the projects No. 121032300186-9 (Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) and No. 121012190038-0 (Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Science).

#### Conflict of interests

Hereby the authors state that this research work and manuscript production complied with ethical standards, and none of the authors have any potential conflict of interests.

#### References

- Alekin O.A. 1953. Fundamentals of hydrochemistry. Leningrad: Hydrometeoizdat [Hydrometeorological Publishing House], 295 pp. (in Russian)
- Aries S., Valladon M., Polve M. et al. 2000. A Routine Method for Oxide and Hydroxide Interference Corrections in ICP-MS Chemical Analysis of Environmental and Geological Samples. *Geostandards Newsletter* 24(1): 19–31. DOI: [10.1111/j.1751-908X.2000.tb00583.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2000.tb00583.x)
- Baram G.I., Vereshchagin A.L., Golobokova L.P. 1999. Application of high-performance microcolumn liquid chromatography with UV detection for the determination of anions in environmental objects. *Analiticheskaya khimiya [Journal of Analytical Chemistry]* 54(9): 962–965 (in Russian)
- Bashenkhaeva M.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P et al. 2015. Sub-ice microalgal and bacterial communities in freshwater Lake Baikal, Russia. *Microbial Ecology* 70: 751–765 DOI: [10.1007/s00248-015-0619-2](https://doi.org/10.1007/s00248-015-0619-2)
- Chebykin E.P., Sorokovikova L.M., Tomberg I.V, et al. 2012. Current State of the Selenga River Waters in the Russian Territory Concerning Major Components and Trace Elements. *Chemistry for Sustainable Development* 20(5): 561–580
- Chebykin E.P., Dambinov Yu.A., Suturin A.N. 2020. Multielemental analysis of above slime waters in the accumulation cells of Baikalsk Pulp and Paper Plant for the choice of territory remediation strategy. *Voda i ekologiya: problema i resheniya [Water and ecology]* 84(4): 67–80. DOI: [10.23968/2305-3488.2020.25.4.67-80](https://doi.org/10.23968/2305-3488.2020.25.4.67-80) (in Russian)
- Cherdonova O.V., Popova N.V. 2022. The ecological state of Lake Saisary and the importance of plankton for the ecosystem of the lake. In: *Strategy and prospects for the development of agrotechnologies and the forest complex of Yakutia until 2050. Collection of scientific articles based on the materials of the All-Russian scientific and practical conference with international participation dedicated to the 100<sup>th</sup> anniversary of the formation of the Yakut ASSR and the 85<sup>th</sup> anniversary of the First President of the RS(Ya) M. E. Nikolaev (Nikolaev readings)*. M.: Znanie-M [Knowledge-M], pp. 615-619. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?edn=hgipve> (in Russian)
- Fomin G.S. 2000. Water. Chemical, bacterial and radiation safety control according to international standards. M.: Protektor [Protector], 840 p.
- Gabyshev V.A., Gabysheva O.I. 2020. On study of influence of heavy metals onto the development of phytoplankton in the lakes of Yakutsk City and the surrounding area. *Prirodnye resursy Arktiki i Subarktiki [Arctic and Subarctic Natural Resources]* 25(4): 81–91. DOI: [10.31242/2618-9712-2020-25-4-6](https://doi.org/10.31242/2618-9712-2020-25-4-6) (in Russian)
- Gaillardet J., Viers J., Dupre B. 2003. Trace Elements in River Waters. In: Holland H.M. and Turekian K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*, vol. 5. Oxford: Elsevier-Pergamon, pp. 225–272. DOI: [10.1016/B978-0-08-095975-7.00507-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00507-6)
- Orbenko Yu.A. 1961. On the most favorable amount of

dry nutrient agar in media for the cultivation of marine microorganisms. *Mikrobiologiya* [Microbiology] 30(1): 168–172 (in Russian)

Gorokhov M. 2023. The population of Yakutsk City has increased by 60 thousand people in five years. *Komsomolskaya Pravda* [Komsomol's Truth] I. Yakutia, April 08, 2023. URL: <https://www.yakutia.kp.ru/online/news/5217118/?ysclid=lu7yjk3zd550642327> (in Russian)

GOST 17.1.3.07-82. 1982. Nature conservation. The hydrosphere. Rules for water quality control of reservoirs and watercourses. The interstate standard. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/29997/?ysclid=lw7i759h1o63072849> (in Russian)

GOST 31942-2012. 2012. Water. Sampling for microbiological analysis. The interstate standard. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/53467/?ysclid=lw92j-8ce1m446660343> (in Russian)

GOST 24849-2014. 2014. Methods of sanitary and biological analysis for field conditions. The interstate standard. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/58822/?ysclid=l-who13pwb444456396> (in Russian)

Grigorieva M.V., Solovieva M.I. 2020. The quality of the lakes of Yakutsk City according to the state of benthic communities. *Problemy regional'noy ekologii* [Regional Environmental Issues] 5: 12–16. DOI: [10.24412/1728-323X-2020-5-12-16](https://doi.org/10.24412/1728-323X-2020-5-12-16)

Guidelines for the chemical analysis of land surface waters. Part I. 2009. Rostov-on-Don: Nauka-Obrazovanie-Kul'tura [Science-Education-Culture], 1044 p.

Kaydalova M.V., Olesova A.I. 2019. Lake “Saysary” Yakutsk. In: Materials of the XI International Student Scientific Conference “Student Scientific Forum 2019”. Moscow, Moscow State University Science Park. URL: <https://files.scienceforum.ru/pdf/2019/5c6bb00cee22f.pdf>

Kharaev G.I., Yampilov S.S., Tanganov B.B. et al. 2004. Environmental monitoring. Ulan-Ude: East Siberia State University of Thechnology and Management, 77 p. (in Russian)

Kopyrina L.I. 2013. Epiphytic algae are indicators of saprobity of some lakes in the vicinity of Yakutsk City. *Nauka i Obrazovanie* [Science and education] 4: 77–81 (in Russian).

Ksenofontova M.I., Legostaeva Ya.B., Yablovskaya P.E. et al. 2013. Characteristics of the chemical composition of waters and bottom sediments of large reservoirs in Yakutsk City. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk* [Actual problems of the humanities and natural sciences] 4: 493–500 (in Russian)

Legostaeva Ya.B., Rufova A.A. 2022. Analysis of the hydrochemical regime of the largest lakes in the Yakutsk City. *Prirodnye resursy Arktiki i Subarkтики* [Arctic and Subarctic Natural Resources] 27(4): 572–591. DOI: [10.31242/2618-9712-2022-27-4-572-591](https://doi.org/10.31242/2618-9712-2022-27-4-572-591) (in Russian)

Makarov V.N., Chizhuk A.L. 2009. The supply of phosphates to the lakes of Yakutsk. *Nauka i Obrazovanie* [Science and education] 4: 67–69 (in Russian)

MUK 4.2.1884-04. 2004. Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water from surface water bodies. Methodological guidelines. URL: <https://internet-law.ru/stroyka/text/45900/> (in Russian)

Murray R.G.E., Doetsch R.N., Robinow C.F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. (Eds.) *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 21–41.

Nikolaev A.A., Arkhipov I.V. 2021. Ecological condition of the lakes in Yakutsk City for tourism and recreational use. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* [Advances in current natural sciences] 11: 106–113 (in Russian)

Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation of December 13, 2016 No. 552 (as amended on October 12, 2018). 2016. On Approval of Water Quality

Standards for water bodies of fishery importance, including standards for maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of water bodies of fishery importance URL: <https://docs.cntd.ru/document/420389120> (in Russian)

Perelman A.I. 1982. *Geochemistry of natural waters*. Moscow: Nauka [Science], 154 p. (in Russian)

Pokrovsky O.S., Schott J., Dupre B. 2006. Trace element fractionation and transport in boreal rivers and soil porewaters of permafrost-dominated basaltic terrain in Central Siberia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 3239–3260. DOI: [10.1016/j.gca.2006.04.008](https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.04.008)

Popova N.V., Fedulova S.I. 2022. The study of the water of Lake Saysary according to hydrochemical parameters. In: Chugunov agronomic readings. Collection of scientific articles based on the materials of the XIV All-Russian Scientific and practical conference of agrotechnological orientation dedicated to the 100<sup>th</sup> anniversary of the formation of the Yakut Autonomous Soviet Socialist Republic and the Year of Cultural Heritage of Peoples in Russia, pp. 140–144. (in Russian)

Population estimate as of January 1, 2023 by municipal area. The territorial body of the Federal State Statistics Survey for the Republic of Sakha (Yakutia). SakhaStat (April 4, 2023). 2023. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A%D1%83%D1%82%D1%81%D0%BA#cite\\_note-87](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A%D1%83%D1%82%D1%81%D0%BA#cite_note-87) (in Russian)

Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943–948. DOI: [10.4319/lo.1980.25.5.0943](https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943)

RD 52.24.643-2002. 2002. A method for the comprehensive assessment of the degree of contamination of surface waters by hydrochemical indicators. The guidance document. Rostov on Don: Roshydromet, 55 p. URL: <https://ohranatruda.ru/upload/iblock/10d/4293831806.pdf> (in Russian)

Rufova A.A., Ksenofontova M.I., Yablovskaya P.E. 2012. Monitoring of the state of the lakes of Yakutsk City by hydrochemical indicators. *Nauka i Obrazovanie* [Science and education] 4: 52–55 (in Russian)

Rufova A.A., Ksenofontova M.I., Trofimova L.N. 2013. The content of some trace elements in the water of Lake Saysary. *Nauka i Obrazovanie* [Science and education] 3: 139–141 (in Russian)

Rufova A.A., Tatarinova A.V. 2015. Anthropogenic influence on the hydrochemical and hydrobiological state of surface waters of northern cities (using the example of Yakutsk City). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education] 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=20468> (in Russian)

Rufova A.A., Ksenofontova M.I. 2015. Hydrochemical composition as one of the indicators of modern conditions of lake formation (using the example of Yakutsk City). *Nauka i Obrazovanie* [Science and education] 2: 144–150 (in Russian)

Rufova A.A. 2023. Integral indicators of hydrochemical state of lacustrine waters in Yakutsk City. In: Actual problems of ecology and nature management. Collection of the XXIV International scientific and practical conference. 2 volumes. Moscow, p. 323–328

SanPiN 1.2.3685-21. 2021. Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of January 28, 2021 No. 2. URL: <https://docs.cntd.ru/document/573500115?marker=6560IQ> (in Russian)

Skopintsev B.A. 1950. Organic matter in natural waters (aqueous humus). In: *Trudy Okeanograficheskogo instituta* [Proceedings of the Oceanographic Institute]. Leningrad: Hydrometeoizdat 17(29), 290 p (in Russian)

Skopintsev B.A., Goncharova I.A. 1987. Using the values of the ratios of various indicators of the organic matter of natural waters for its qualitative assessment. In: *Sovremennye problemy regional'noy gidrokhimii* [Modern problems of regional hydrochemistry]. L.: Hydrometeoizdat, pp. 95 – 117. (in Russian)

Suturin A.N., Paradina L.F., Epov V.N. et al. 2003. Preparation and assessment of a candidate reference sample of Lake Baikal deep water. *Spectrochimica Acta Part B* 58: 277 – 88. DOI: [10.1016/S0584-8547\(02\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00157-X)

Suturin A.N., Chebykin E.P., Malnik V.V. et al. 2016. The role of anthropogenic factors in the development of ecological stress in Lake Baikal littoral (the Listvyanka settlement lakescape) *Geography and Natural Resources* 6: 43 – 54 DOI: [10.21782/GIPRO206-1619-2016-6\(43-54\)](https://doi.org/10.21782/GIPRO206-1619-2016-6(43-54)) (in Russian)

Swimming was banned in Lakes Khatyng-Yuryakh and Sergelyakh in Yakutsk. 2021. *Izvestia* [News], July 16, 2021. URL: <https://iz.ru/1194109/2021-07-16/kupanie-zapretili-v-ozerakh-khatyng-iuriakh-i-sergeliakh-v-iakutske> (in

Russian)

Tatarinova A.V., Salova T.A. 2013. Hydrobiological characteristics of urban and suburban lakes of Yakutsk City. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied and Fundamental Research] 8-1: 81 – 82. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=3854> (in Russian)

Temporary guidelines for the comprehensive assessment of the quality of surface and marine waters. 1986. The USSR State Committee for Hydrometeorology and Environmental Control. URL: <https://standartgost.ru/g/pkey-14293742635> (in Russian)

Vasilyeva I.I. 1968. Composition and seasonal dynamics of lakes's phytoplankton in the vicinity of Yakutsk City. Cand. Sc. Synopsis of Thesis, Irkutsk, Russia (in Russian)

Wetzel R.G., Likens G.E. 2000. *Limnological analyses*. New York: Springer-Verlag, 391 p.



# Оценка качества вод и экологического состояния крупных озер г. Якутска (оз. Сайсары, оз. Сергелях) в конце подледного периода 2021 г

Оригинальная статья  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Чебыкин Е.П.<sup>1\*</sup>, Мальник В.В.<sup>1</sup>, Томберг И.В.<sup>1</sup>, Копырина Л.И.<sup>2</sup>, Сутурин А.Н.<sup>1</sup>, Захарова Ю.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

<sup>2</sup> Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, проспект Ленина, 41, Якутск, 677980, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Важной экологической проблемой является качество вод водоемов, расположенных вблизи населенных пунктов. В работе использованы гидрохимические, геохимические и микробиологические методы для оценки качества вод озер Сайсары и Сергелях, расположенных в черте города Якутска. На момент исследования вода этих озер не соответствовала нормативам качества, установленным для водных объектов рыбохозяйственного, хозяйственно питьевого и культурно-бытового назначения. Полученные данные обращают внимание на необходимость контроля по ограничению использования вод этих озер для нужд человека и проведения мероприятий по улучшению их качества.

**Ключевые слова:** оценка качества вод, гидрохимические показатели, микроэлементы, микробиологические показатели, городские озера, Якутск

**Для цитирования:** Чебыкин Е.П., Мальник В.В., Томберг И.В., Копырина Л.И., Сутурин А.Н., Захарова Ю.Р. Оценка качества вод и экологического состояния крупных озер г. Якутска (оз. Сайсары, оз. Сергелях) в конце подледного периода 2021 г // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 834-863. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-834

## 1. Введение

Якутск – столица республики Саха (Якутия) и один из крупнейших городов России в пределах криолитозоны, численность которого постоянно растёт (Горохов, 2023), также как и его территория, которая достигает 160 км<sup>2</sup> (Ксенофонтова и др., 2013). На 1 января 2023 г. численность населения города составляла 378,5 тыс. человек (Горохов, 2023; Оценка..., 2023). Город расположен на I и II пойменных террасах центральной части долины Туймаада в среднем течении левобережья р. Лены. Ширина долины в районе г. Якутска достигает 18–20 км, из которых около 8 км приходится на современное русло р. Лены с многочисленными островами, протоками и старичными озерами (Николаев и Архипов, 2021, Попова и Федулова, 2022). На территории города находятся большое количество озер, пять из которых наиболее крупные (Белое, Хатынг-Юрях, Ытык-Кюель, Сергелях, Сайсары). Данные озера относятся к водно-эрози-

онном типе, имеют округлые и удлинённые формы (Ксенофонтова и др., 2013; Легостаева и Руфова, 2022). Городские озера имеют большое культурно-бытовое значение – используются для рекреационных целей и полива огороднических хозяйств (Руфова и др., 2012; Ксенофонтова и др., 2013). В современный период озера испытывают высокую антропогенно-техногенную нагрузку, поскольку на территории города сосредоточены крупные предприятия промышленного, сельскохозяйственного, жилищно-коммунального и топливно-энергетического назначения (Руфова и др. 2012). До начала активного строительства города в 1960-е годы (Макаров и Чижук, 2009; Попова и Федулова, 2022) озера имели хорошую проточную систему, подпитываясь от р. Лены и от малых рек (Шестаковка, Мархинка). В связи с ростом территории города Якутска и ее застройкой проточность большинства озер нарушилась. В связи с этим озера, ранее регулярно очищавшиеся естественным путем, начали загрязняться, цвести, зарастать камышом и мелеть,

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [cheb@lin.irk.ru](mailto:cheb@lin.irk.ru) (Е.П. Чебыкин)

**Поступила:** 30 мая 2024; **Принята:** 14 июня 2024;

**Опубликована online:** 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



что привело к ухудшению их экологического состояния (Ксенофонтова и др., 2013). С 2011 г. администрацией г. Якутска предпринимаются меры по восстановлению проточности городской озерной системы (Легостаева и Руфова, 2022; Николаев и Архипов, 2021), которые в некоторых случаях привели к улучшению экологической обстановки, например, оз. Сайсары (Чердонова и Попова, 2022). Однако дренажные системы все равно быстро засоряются (Николаев и Архипов, 2021). Из анализа баз данных по химическому составу крупных озер на селитебных территориях следует, что с 1985 г. происходит уменьшение их минерализации, основной вклад в которую вносят более минерализованные речные воды (Легостаева и Руфова, 2022). Из этих же данных следует, что сезонные, а в некоторых случаях и межгодовые, вариации основных гидрохимических характеристик частично определяются речным влиянием. Наряду с этим, антропогенный прессинг фиксируется по многим химическим (Макаров и Чижук, 2009; Руфова и др., 2012; 2013; Ксенофонтова и др., 2013; Руфова и Ксенофонтова, 2015; Руфова и Татарина, 2015, Кайдалова и Олесова, 2019; Габышев и Габышева, 2020; Николаев и Архипов, 2021; Попова и Федулова, 2022; Легостаева и Руфова, 2022; Руфова, 2023) и биологическим (Васильева, 1968; Копырина, 2013; Татарина и Салова, 2013; Руфова и Татарина, 2015; Григорьева и Соловьева, 2020; Габышев и Габышева, 2020; Чердонова и Попова, 2022) компонентам.

Ранее проводили мониторинговые исследования воды оз. Сайсары (2009-2021 гг.) и оз. Сергелях (2009-2014 гг.) в период открытой воды (Макаров и Чижук, 2009; Руфова и др., 2012; 2013; Ксенофонтова и др., 2013; Руфова и Ксенофонтова, 2015; Руфова и Татарина, 2015; Кайдалова и Олесова, 2019; Николаев и Архипов, 2021). В таблице 1 приведены данные о пределах вариаций гидрохимических и геохимических показателей в сопоставлении с их усредненными значениями за период с 1985 по 2021 гг. (Легостаева и Руфова, 2022), рыбохозяйственными нормативами (Приказ..., 2016) и нормативами для вод хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения (СанПиН 1.2.3685-21).

Данных по микробиологическим характеристикам воды оз. Сайсары и оз. Сергелях, опубликованных в научной литературе, нами не обнаружено. В сети интернет есть сообщения Роспотребнадзора о запрете купания в оз. Сергелях из-за превышения норм санитарно-эпидемиологических показателей (Купание..., 2021).

Ранее анализ качества вод озер г. Якутска проводили в период открытой воды. Однако большую часть года, восемь месяцев, эти озера покрыты льдом. Постоянный ледовый покров устанавливается с конца сентября – начала октября, таяние льда начинается в середине мая, полностью ледяной покров сходит в конце мая или в начале июня (Николаев и Архипов, 2021).

С целью определения качества вод и экологического состояния озер Сайсары и Сергелях в ледо-

вый период проведен комплексный анализ водных проб, отобранных в конце апреля – начале мая 2021 г. В работе впервые представлены результаты микробиологических исследований (общая численность микроорганизмов – ОЧМ, общее микробное число при 22°C (ОМЧ22) и 37°C (ОМЧ37), *Escherichia coli* и бактерии рода *Enterococcus*) воды этих озер, расширенного геохимического анализа воды (66 химических элементов) и дополнительных гидрохимических показателей (концентрация общего и органического фосфора, перманганатная окисляемость).

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Описание района исследований

#### Оз. Сайсары

Одним из наиболее изученных является оз. Сайсары, которое расположено в южной части города (Рис.), входит в список уникальных озёр Якутии и является сакральным в истории и легендах якутского народа как прародина народа саха (Николаев и Архипов, 2021). В зимнее время озеро активно используется горожанами для лыжных прогулок, весной – для катания на коньках, проведения массовых праздников (Николаев и Архипов, 2021). Котловина озера находится на II надпойменной террасе и относится к эрозионно-антропогенному генетическому типу (Кайдалова и Олесова, 2019; Чердонова и Попова, 2022; Попова и Федулова, 2022). Питание осуществляется в основном атмосферными осадками (Кайдалова и Олесова, 2019; Попова и Федулова, 2022). Озеро имеет размеры: длина – 1,4 км, средняя ширина – 0,35 км, максимальная ширина – 0,47 км, площадь зеркала воды – 0,49 км<sup>2</sup>, средняя глубина – 2,65 м, максимальная – 6 м; объём озера оценивается в 1,23 млн м<sup>3</sup> (Легостаева и Руфова, 2022). Высота снежного покрова оз. Сайсары составляет 0,38 м, средняя толщина льда – 1,3 м (Николаев и Архипов, 2021). В последние годы сильно возросло влияние антропогенных факторов на водоем, отмечается большое уменьшение площади зеркала воды за счет отсыпки берегов под строительство, прокладки канализационного коллектора и сброса строительных и бытовых отходов (Руфова и др., 2013).

#### Оз. Сергелях

Оз. Сергелях расположено южнее оз. Сайсары (Рис.) и связано с ним через трубы и канал (Чердонова и Попова, 2022). Оз. Сергелях имеет узкую извилистую форму. Общая длина озера по разным оценкам составляет от 6 (Легостаева и Руфова, 2022) до 8 км (Ксенофонтова и др., 2013), средняя ширина 0,08 км, максимальная – 0,15 км, площадь зеркала воды 0,47 км<sup>2</sup>, объём воды 0,42 млн м<sup>3</sup>, средняя глубина озера 0,88 м, а максимальная – 2 м (Легостаева и Руфова, 2022). По космоснимкам (программа SASPlanet с открытым доступом) длина главной части единого водного тела составляет 8 км 300 м, имеются также боковые ответвления общей протяжённостью 1,5 км.

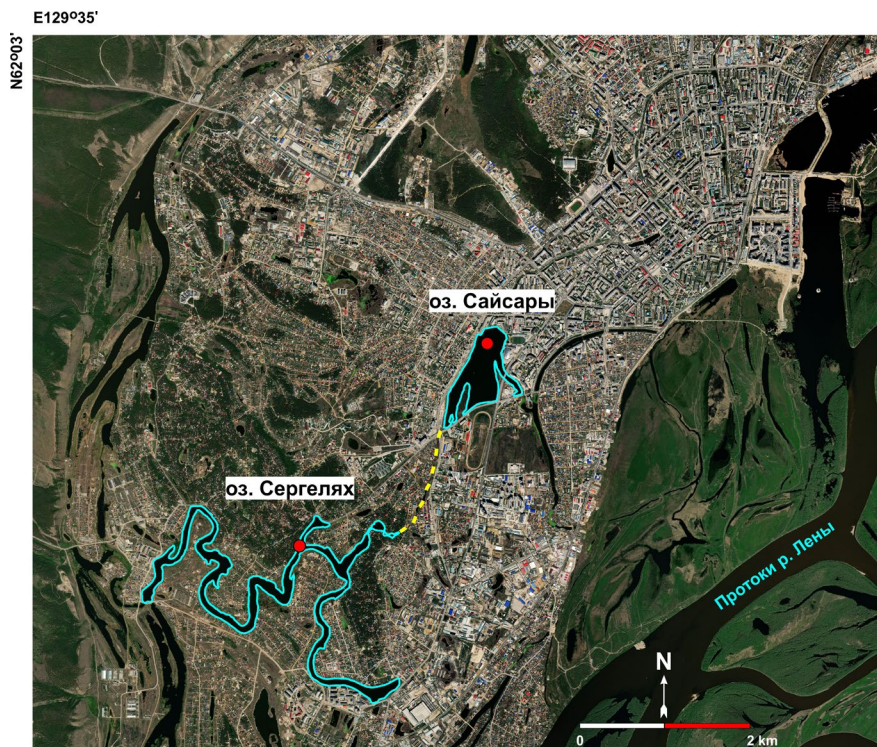


Рис. Озёрно-речная сеть г. Якутска. Станции отбора проб показаны красными кружками. Жёлтой пунктирной линией показан канал, связывающий оз. Сергелях с оз. Сайсары. Космоснимок взят из открытых источников (ресурс SASPlanet).

## 2.2. Отбор проб

Пробы воды отобрали в конце подледного периода 2021 г. – 21 апреля из оз. Сайсары (N 62° 01'10.0», E 129°41'38.6») и 04 мая из оз. Сергелях (N 61° 59'53.7», E 129°39'07.3») (Рис.). Толщина снега на оз. Сайсары составляла 32 см, толщина льда – 105 см, глубина воды – 4 м, на оз. Сергелях – 0,5 см, 105 см и 1,5 м соответственно. Пробы воды отобрали батометром Нискина (объёмом 2 дм<sup>3</sup>) с глубины 1 м (от нижней поверхности льда).

Для гидрохимического анализа образцы воды разливали в 1,5 л ПЭТ бутылки. Для определения биогенных компонентов и органического вещества бутылки замораживали, для определения остальных гидрохимических показателей бутылки хранили в холодильнике. Определение pH проводили через несколько часов после отбора проб.

Для многоэлементного ИСП-МС анализа пробы воды отобрали из батометра одноразовыми медицинскими шприцами объёмом 10 мл. Образцы сразу же фильтровали через одноразовые полистирольные стерильные шприц-насадки Minisart 16555-K (размер пор 0,45 мкм, ацетат целлюлозы, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Германия) в предварительно взвешенные полипропиленовые пробирки Эппендорфа (2 мл, Axugen Scientific, Cat.-No. MCT-200-C, США, Мексика), содержащие 40 мкл консерванта. В качестве консерванта использовали 70 % HNO<sub>3</sub>, дважды очищенную с помощью суббуйлинговой системы перегонки кислот (Savillex DST-1000 sub-boiling distillation system, Япония). В азотную кислоту, в качестве внутреннего стандарта был добавлен индий (1008 ppb). Консервант добавляли в пробирки Эппендорфа весовым методом. Пробирки

с образцами воды взвешивали в лабораторных условиях и рассчитывали точное содержание азотной кислоты (типично 2 %) и индия (типично 30 ppb). Все необходимые взвешивания проводились на аналитических весах Mettler Toledo AG104 (погрешность взвешивания ± 0,0003 г).

Для микробиологического анализа пробы воды отобрали из батометра в новые пластиковые бутылки объёмом 0,5 л в двух повторностях. Время с момента отбора проб до проведения микробиологического анализа не превышало 6 часов в соответствии с (ГОСТ 31942-2012).

## 2.3. Гидрохимический анализ

Определение химического состава выполняли по методикам, общепринятым в гидрохимии пресных вод (Барам и др., 1999; Фомин, 2000; Wetzel and Likens, 2000; Руководство..., 2009). Для измерения величины pH использовали pH-метр с комбинированным электродом и термокомпенсатором «Эксперт-001» (Россия). Содержание общего азота, фосфора и органического вещества определяли в нефилтрованных пробах, а биогенных элементов и основных ионов в пробах, профильтрованных через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрации биогенных элементов измеряли на спектрофотометре «UNICO-2100» (США): нитриты – с реактивом Грисса, нитраты – с салициловокислым натрием, аммонийный азот – индофенольным методом, фосфаты – методом Дениже-Аткинса с хлористым оловом в качестве восстановителя. Для определения кремнекислоты использован спектрофотометрический метод, основанный на измере-

**Таблица 1.** Гидрохимические, геохимические и микробиологические характеристики оз. Сайсары и оз. Сергелях по литературным источникам в сопоставлении с нормативами и нашими данными. Жирным шрифтом выделены значения, превышающие рыбохозяйственные нормативы (ПДК<sub>р/х</sub>), жирным шрифтом с подчеркиванием – нормативы для вод хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения (ПДК<sub>х/п\_к/б</sub>)

Характеристика	ПДК <sub>р/х</sub>	ПДК <sub>х/п_к/б</sub>	оз. Сайсары, мин-макс (2009-2021 гг.)	оз. Сайсары, усредненная (1985-2021 гг.)	оз. Сайсары, ЛИН СО РАН (21.04.2021)	оз. Сергелях, мин-макс (2009-2014 гг.)	оз. Сергелях, усредненная (1985-2021 гг.)	оз. Сергелях, ЛИН СО РАН (04.05.2021)
Литературный источник	(Приказ..., 2016)	(СанПиН 1.2.3685-21)	Список работ в примечании*	(Легостаева и Руфова, 2022)	эта работа	Список работ в примечании*	(Легостаева и Руфова, 2022)	эта работа
рН	фоновые	6-9	7,9-8,6 (2009-2012 гг.)	8,34	7,23	7,64-8,58	8,34	6,78
Ca <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	180	ну	17-40 (2009-2014, 2021 гг.)	27,4	82,4	22-42	25,44	28,4
Mg <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	40	50	10- <b>55</b> (2009-2014, 2021 гг.)	30,3	50	8-30	21,21	14,1
Na <sup>+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	120	200	40- <b>125</b> (2009-2014 гг.), <b>335</b> (Na+K, 2021 г.)	77,6	117	22-45	47,42	24,8
K <sup>+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	10 / 50 <sup>(1)</sup>	ну	5-8 (2009-2014 гг.)	6,51	16,5	~2-5	5,84	5,52
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	165-313 (2009-2014 гг.), 540 (2021 г.)	262	577	140-279	203,33	170
Cl <sup>-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	300	350	20- > <b>300</b>	83,8	174	<10-90	32,36	26
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	100	500	нд	21,1	13,5	нд	14,07	10,0
Ж, мг-экв/дм <sup>3</sup>	ну	7 / 10 <sup>(2)</sup>	< 4- <b>20</b>	4,04	8,3	1,5- <b>8</b>	3,27	2,6
Мпн, мг/дм <sup>3</sup>	ну	1000 / 1500 <sup>(2)</sup>	180- <b>1246</b>	479	1030	250-420	308,95	279
NH4 <sup>+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	0,5	1,5	0,2- <b>3,4</b>	0,63	2,27	~0- <b>1,6</b>	0,35	0,66
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	0,08	3	0,02- <b>3,2</b>	0,13	0,003	< 0,05	0,03	0,046
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	40	45	0-2,2	1,16	0,41	< по	0,13	1,22
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	0,15 / 0,45 / 0,6 <sup>(3)</sup>	3,5	0,07- <b>0,76</b>	0,44	1,04	< по- <b>2,4</b>	0,33	0,162
P <sub>общ</sub> , мг/дм <sup>3</sup>	нд	нд	нд	нд	0,53	нд	нд	0,228
P <sub>орг</sub> , мг/дм <sup>3</sup>	нд	нд	нд	нд	0,19	нд	нд	0,175
XПК, мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	ну	15 / 30 / 60 <sup>(4)</sup>	<15- <b>150</b>	нд	122	нд	нд	132,7
БПК <sub>5</sub> , мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	2,1	2 / 4 <sup>(5)</sup>	<2,1- <b>7,1</b>	нд	нд	нд	нд	нд
ПМО, мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	ну	5 / 7 / 7,5 <sup>(6)</sup>	нд	нд	нд	нд	нд	нд
O <sub>2</sub> -раств, мг/дм <sup>3</sup>	> 4 / > 6 <sup>(7)</sup>	> 4	< 4-10	нд	нд	> 6	нд	нд
ВВ, мг/дм <sup>3</sup>	к фону + 0,25-0,75 / + 5% при > 30 в > 30 в межень <sup>(8)</sup>	к фону + 0,75 / + 5% при > 30 в межень / 5-60 (тех) <sup>(9)</sup>	<2-8	6,06	нд	2-13	6,41	нд
F <sup>-</sup> , мкг/дм <sup>3</sup>	к фону + 50 / 750 (макс) <sup>(10)</sup>	к фону + 50 / 750 (макс) <sup>(10)</sup>	< по	310	нд	< по	250	нд
Fe, мкг/дм <sup>3</sup>	100	300	<100- <b>1200</b>	390	200	<100- <b>850</b>	270	250
Mn, мкг/дм <sup>3</sup>	10	100	0,8- > <b>500</b>	20	1050	6-29	20	350
Zn, мкг/дм <sup>3</sup>	10	1000	<10- <b>390</b>	120	0,83	< по- <b>490</b>	20	5,1



Характеристика	ПДК_р/х	ПДК_х/п_к/б	оз. Сайсары, мин-макс (2009-2021 гг.)	оз. Сайсары, усредненная (1985-2021 гг.)	оз. Сайсары, ЛИН СО РАН (21.04.2021)	оз. Сергелях, мин-макс (2009-2014 гг.)	оз. Сергелях, усредненная (1985-2021 гг.)	оз. Сергелях, ЛИН СО РАН (04.05.2021)
Cu, мкг/дм <sup>3</sup>	1	1000	<1-11,7	1	<0,4	1,5-2,3	1	1,77
Pb, мкг/дм <sup>3</sup>	6	10	1,4-22,2	4	0,025	4,9-6,8	10	0,115
St, мкг/дм <sup>3</sup>	400	7000	нд	260	720	нд	150	170
Va, мкг/дм <sup>3</sup>	740	700	нд	2	89	нд	20	32
Co, мкг/дм <sup>3</sup>	10	100	<по	8	0,3	<по	5	0,23
Cr, мкг/дм <sup>3</sup>	20	50	<по	4	0,77	<по	3	0,49
Mo, мкг/дм <sup>3</sup>	1	70	нд	4	0,1	нд	2	0,91
Li, мкг/дм <sup>3</sup>	80	30	<по	<по	10,6	<по	20	2,9
Ni, мкг/дм <sup>3</sup>	10	20	<по	<по	3,9	<по	<по	1,69
As, мкг/дм <sup>3</sup>	50	10	<по	<по	1,9	<по	<по	0,84
Cd, мкг/дм <sup>3</sup>	5	1	<по	нд	0,0016	<по	нд	0,01
Hg, мкг/дм <sup>3</sup>	0,01	0,5	<по	<по	<0,02	<по	<по	<0,02
Be, мкг/дм <sup>3</sup>	0,3	0,2	нд	нд	0,011	нд	нд	0,005
B, мкг/дм <sup>3</sup>	500	500	нд	нд	122	нд	нд	14,3
Al, мкг/дм <sup>3</sup>	40	200	нд	нд	5,1	нд	нд	18,7
Si, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	10000	нд	нд	1760	нд	нд	1590
Sc, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	<0,125 <sup>(14)</sup>	нд	нд	<0,073 <sup>(14)</sup>
Ti, мкг/дм <sup>3</sup>	60	100	нд	нд	1,14	нд	нд	0,76
V, мкг/дм <sup>3</sup>	1	100	нд	нд	1,66	нд	нд	0,85
Ga, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,009	нд	нд	0,017
Ge, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,015	нд	нд	0,0019
Se, мкг/дм <sup>3</sup>	2	10	нд	нд	0,33	нд	нд	0,05
Br, мкг/дм <sup>3</sup>	1350	200	нд	нд	310	нд	нд	77
Rb, мкг/дм <sup>3</sup>	100	70	нд	нд	4,2	нд	нд	2,9
Y, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,103	нд	нд	0,072
Zr, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,3	нд	нд	0,16
Nb, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	10	нд	нд	0,039	нд	нд	0,014
Ag, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	50	нд	нд	0,0006	нд	нд	<0,0004
Sn, мкг/дм <sup>3</sup>	112	ну	нд	нд	0,012	нд	нд	0,014
Sb, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	5	нд	нд	0,18	нд	нд	0,2
Te, мкг/дм <sup>3</sup>	3	10	нд	нд	<0,008	нд	нд	<0,008
I, мкг/дм <sup>3</sup>	400	125	нд	нд	35	нд	нд	10,3

Характеристика	ПДК <sub>р/х</sub>	ПДК <sub>х/п_к/б</sub>	оз. Сайсары, мин-макс (2009-2021 гг.)	оз. Сайсары, усредненная (1985-2021 гг.)	оз. Сайсары, ЛИН СО РАН (21.04.2021)	оз. Сергелях, мин-макс (2009-2014 гг.)	оз. Сергелях, усредненная (1985-2021 гг.)	оз. Сергелях, ЛИН СО РАН (04.05.2021)
Cs, мкг/дм <sup>3</sup>	1000	ну	нд	нд	0,0021	нд	нд	0,0024
La, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,074	нд	нд	0,075
Se, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,125	нд	нд	0,134
Rt, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,014	нд	нд	0,017
Nd, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,07	нд	нд	0,059
Sm, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,023	нд	нд	0,021
Eu, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,008 <sup>(15)</sup>	нд	нд	0,0025 <sup>(15)</sup>
Gd, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,013	нд	нд	0,014
Tb, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0022	нд	нд	0,002
Dy, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,012	нд	нд	0,009
Ho, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0034	нд	нд	0,0028
Er, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,01	нд	нд	0,008
Tm, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0014	нд	нд	0,0011
Yb, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,008	нд	нд	0,006
Lu, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0019	нд	нд	0,001
Hf, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,006	нд	нд	0,003
Ta, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0013	нд	нд	0,0009
W, мкг/дм <sup>3</sup>	0,8	50	нд	нд	0,007	нд	нд	0,029
Re, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0009	нд	нд	0,0007
Tl, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	0,1	нд	нд	<0,001	нд	нд	<0,001
Bi, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	100	нд	нд	0,0031	нд	нд	0,0029
Tb, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	0,0067	нд	нд	0,02
U, мкг/дм <sup>3</sup>	ну	15	нд	нд	1,1	нд	нд	1,2
ОЧМ, кл/см <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	14,6 × 10 <sup>6</sup>	нд	нд	6,4 × 10 <sup>6</sup>
ОМЧ22, КОЕ/см <sup>3</sup>	ну	ну	нд	нд	323	нд	нд	14080
ОМЧ37, КОЕ/см <sup>3</sup>	ну	50 / 100 <sup>(11)</sup>	нд	нд	33	нд	нд	447
Энтерококки, КОЕ/100 см <sup>3</sup>	ну	0 / 100 / 10 / ну <sup>(12)</sup>	нд	нд	36	нд	нд	346
<i>E. coli</i> , КОЕ/100 см <sup>3</sup>	ну	0 / 100 / 100 / 10 <sup>(13)</sup>	нд	нд	4	нд	нд	240

**Примечания:** ну – нормативы не установлены; нд – нет данных; < по – ниже пределов обнаружения методов измерения; Ж – жесткость; Мин – минерализация (сумма главных ионов); ВВ – взвешенные вещества.

(1) Концентрация калия не более 10 мг/дм<sup>3</sup> для водоемов с минерализацией до 100 мг/дм<sup>3</sup>.

(2) Вода питьевая централизованного водоснабжения: Мин – не более 1000 мг/дм<sup>3</sup>; Ж – не более 7 мг-экв/дм<sup>3</sup>; вода питьевая нецентрализованного водоснабжения: Мин – не более 1500 мг/дм<sup>3</sup>; Ж – не более 10 мг-экв/дм<sup>3</sup>.

- (3) Фосфаты  $< 0,15 \text{ мг/дм}^3$  – олиготрофные,  $0,15\text{-}0,45 \text{ мг/дм}^3$  – мезотрофные,  $> 0,6 \text{ мг/дм}^3$  – эвтрофные водоемы.
- (4) ХПК не должно превышать  $15,0 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в воде поверхностных водоемчиков, используемых для централизованного водоснабжения населения, для хозяйственно-бытового водопользования, в местах водозабора для плавательных бассейнов, водолечебниц, ХПК не должно превышать  $30,0 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в воде поверхностных водоемчиков, используемых для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест, в открытых системах технического водоснабжения и для полива улиц и зеленых насаждений. ХПК не должно превышать  $60,0 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в системах технического оборотного водоснабжения ручных и автоматических моек автомобильного транспорта.
- (5) БПК<sub>5</sub> не должно превышать  $2 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в воде поверхностных водоемчиков, используемых для централизованного водоснабжения населения, для хозяйственно-бытового водопользования, в местах водозабора для плавательных бассейнов, водолечебниц, БПК<sub>5</sub> не должно превышать  $4 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в воде поверхностных водоемчиков, используемых для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест. БПК<sub>5</sub> не должно превышать  $5 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в открытых системах технического водоснабжения и для полива улиц и зеленых насаждений. БПК<sub>5</sub> не должно превышать  $10 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  в системах технического оборотного водоснабжения ручных и автоматических моек автомобильного транспорта.
- (6) ПМО должно быть не более  $5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$  в воде питьевой централизованного водоснабжения, не более  $7 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$  в воде питьевой нецентрализованного водоснабжения, не более  $7,5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$  в воде аквапарков.
- (7) Содержание растворенного кислорода в воде должно быть не менее  $4 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  – зимой, не менее  $6 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  – летом.
- (8) Содержание взвешенных веществ при сбросе возвратных (сточных) вод конкретным водопользователем, при производстве работ на водном объекте и в прибрежной зоне в контрольном створе (пункте) не должно увеличиваться по сравнению с естественными условиями более чем на  $0,25 \text{ мг/дм}^3$  (для высшей и первой категорий водного объекта рыбохозяйственного значения) или более чем на  $0,75 \text{ мг/дм}^3$  (для второй категории водного объекта рыбохозяйственного значения). В водных объектах рыбохозяйственного значения при содержании в межень более  $30 \text{ мг/дм}^3$  природных взвешенных веществ допускается увеличение содержания их в воде в пределах 5%. Возвратные (сточные) воды, содержащие взвешенные вещества со скоростью осаждения более  $0,4 \text{ мм/с}$ , запрещается сбрасывать в водотоки, при скорости осаждения более  $0,2 \text{ мм/с}$  – в водоемы.
- (9) Содержание взвешенных веществ при сбросе сточных вод, производств работ на водном объекте и в прибрежной зоне в контрольном створе (пункте) не должно увеличиваться по сравнению с естественными условиями более чем на  $0,25 \text{ мг/дм}^3$  для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест – более чем на  $0,75 \text{ мг/дм}^3$ . Для водных объектов, содержащих в межень более  $30 \text{ мг/дм}^3$  природных взвешенных веществ, допускается увеличение их содержания в воде в пределах 5%. Взвеси со скоростью выпадения более  $0,4 \text{ мм/с}$  для проточных водоемов и более  $0,2 \text{ мм/с}$  для водохранилищ к спуску запрещаются. Для технической воды в открытых системах технического водоснабжения и для полива улиц и зеленых насаждений содержание взвешенных веществ не должно превышать  $5,0 \text{ мг/дм}^3$ , а для технической воды в системах технического оборотного водоснабжения ручных и автоматических моек автомобильного транспорта –  $20,0 \text{ мг/дм}^3$  ( $60,0 \text{ мг/дм}^3$  – для колесных моек автотранспорта).
- (10) Содержание фторидов должно быть не более  $50 \text{ мг/дм}^3$  в дополнение к фоновому, но не выше их суммарного содержания  $750 \text{ мг/дм}^3$ .
- (11) ОМЧ37 должно быть не более  $50 \text{ КОЕ/см}^3$  для систем централизованного питьевого и горячего водоснабжения, не более  $100 \text{ КОЕ/см}^3$  для систем нецентрализованного питьевого водоснабжения.
- (12) Энтрококки должны отсутствовать в воде систем централизованного питьевого и горячего водоснабжения и нецентрализованного питьевого водоснабжения, а также в воде бассейнов и аквапарков; в поверхностных водах для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий – не более  $100 \text{ КОЕ} / 100 \text{ см}^3$ ; в зонах рекреации, а также в черте населенных мест (для купания и занятия водным спортом) – не более  $10 \text{ КОЕ} / 100 \text{ см}^3$ ; в природных водах для технического водоснабжения – норматив не установлен.
- (13) *E. coli* должны отсутствовать в воде систем централизованного питьевого и горячего водоснабжения и нецентрализованного питьевого водоснабжения, а также в воде бассейнов и аквапарков; в поверхностных водах для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий – не более  $100 \text{ КОЕ} / 100 \text{ см}^3$ ; в зонах рекреации, а также в черте населенных мест (для купания и занятия водным спортом) – не более  $100 \text{ КОЕ} / 100 \text{ см}^3$ ; в природных водах для технического водоснабжения (автомойки, полив улиц и зеленых насаждений) – не более  $10 \text{ КОЕ} / 100 \text{ см}^3$ .
- (14) Концентрация Sc может быть повышена из-за сложностей учета интерференций с SiO (определение методом ИСП-МС).
- (15) Концентрация Eu может быть повышена из-за сложностей учета интерференций с BaO (определение методом ИСП-МС).
- \* (Макаров и Чижук, 2009) –  $\text{PO}_4^{3-}$ ;  
 (Руфова и др., 2012) – рН, жесткость, общая минерализация,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , F, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Cr, Ni, Cd;  
 (Руфова и др., 2013) –  $\text{NH}_4^+$ , Fe, Mn, Zn, Pb;  
 (Ксенофонтова и др., 2013) – рН, жесткость,  $\text{O}_2$ -раств, взвешенные вещества;  $\text{NH}_4^+$ , Fe, Mn, Zn, Cu;  
 (Руфова и Ксенофонтова, 2015) – рН,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, жесткость, общая минерализация,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Cr, Ni, As, Cd, Hg;  
 (Руфова и Татарина, 2015) –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , K<sup>+</sup>,  $\text{NO}_3^-$ , F, Fe, Pb, Co, Cr, Ni, As, Cd, Hg;  
 (Руфова и Олесова, 2019) –  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , Cl<sup>-</sup>, жесткость, общая минерализация,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , ХПК, БПК<sub>5</sub>,  $\text{O}_2$ -раств, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Ni, Hg;  
 (Кайдалова и Архипов, 2021) –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, жесткость, общая минерализация,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ; БПК<sub>5</sub>,  $\text{O}_2$ -раств, Fe;  
 (Легостаева и Руфова, 2022) – минерализация, взвешенные вещества, усредненные гидрхимические и геохимические характеристики.

нии интенсивности окраски желтой кремнемолибденовой гетерополикислоты. Содержание общего фосфора и азота измеряли после высокотемпературного персульфатного окисления на спектрофотометре, содержание органических веществ оценивали по перманганатной (ПМО) и бихроматной окисляемости (ХПК). Концентрацию ионов  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{SO}_4^{2-}$  определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с непрямой УФ-детекцией («Милюхром А-О2», Россия), ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  – абсорбционным, а  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  – пламенно-эмиссионным методом («AAS-30», Германия).

## 2.4. Многоэлементный ИСП-МС анализ

Подготовленные пробы воды измеряли на квадрупольном ИСП-МС масс-спектрометре Agilent 7500 се в ЦКП «Ультрамикрoанализ» ЛИН СО РАН в соответствии с разработанными ранее подходами (Чебыкин и др., 2012; 2020). Система ввода проб: боросиликатный распылитель MicroMist (режим подачи растворов – самораспыление ~ 200 мкл/мин), PFA распылительная камера Скотта, кварцевая горелка с рубиновым инжектором и с системой ShieldTorch. Измерения проводили в режиме «горячей плазмы» (мощность генератора плазмы 1580 Вт) без столкновительной ячейки.

Растворы измерялись в сканирующем режиме с дополнительным заглублением сигналов в 30 раз для изотопов  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{28}\text{Si}$ ,  $^{39}\text{K}$  и  $^{115}\text{In}$  (3 канала на массу, 0,05 с на канал, общее время сканирования масс-спектра – 62 с, промывка между пробами – 60 с).

Для калибровки масс-спектрометра использовали многоэлементные стандартные растворы ICP-MS-68A-A и ICP-MS-68A-B (HIGH-PURITY STANDARDS, Charleston, USA), образец байкальской бутылированной воды (для Na, Mg, Si, S, Cl, K, Ca, (Suturin et al., 2003)), а также растворы катионов (Na, Mg, K, Ca, Fe, Hg) и анионов (Si, P, S, Cl, Br, I), приготовленные смешением одноэлементных ИСП-МС стандартных растворов компании Inorganic Ventures (США)

Корректировку на интерферирующие молекулярные ионы ( $\text{MeO}^+$ ,  $\text{MeOH}^+$ ,  $\text{MeAr}^+$ ,  $\text{MeCl}^+$ ) проводили с использованием подхода, описанного в работе (Aries et al., 2000).

Типичные ошибки измерения (коэффициент вариации RSD), в зависимости от концентрации химических элементов находятся в следующих диапазонах:  $< 0,001 \text{ мкг/дм}^3$  – RSD  $> 25 \%$ ;  $0,001-0,1 \text{ мкг/дм}^3$  – RSD 25-10 %;  $0,1-1 \text{ мкг/дм}^3$  – RSD 10-5 %;  $> 1 \text{ мкг/дм}^3$  – RSD 5 %.

## 2.5. Микробиологический анализ

Общую численность микроорганизмов (ОЧМ) учитывали методом прямого счета препаратов, окрашенных красителем ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол) (Porter and Feig, 1980), с использованием эпифлуоресцентного микроскопа (Axiovert 200 Zeiss, Германия) с ультрафиолетовой лампой HBO

50W/AC ASRAM при спектре возбуждения 365 нм (Bashenkhaeva et al., 2015). При подсчете клеток просматривали не менее 30 полей зрения на объектив, расчеты проводили по рекомендованной формуле (Murray et al., 1994).

*Органотрофные бактерии* определяли при разных условиях культивирования. Рыбо-пептонный агар, разбавленный в 10 раз (РПА/10) использовали для определения численности автохтонной микрофлоры, естественной для данного водоема, посеы инкубировали при 22 °С в течение 72 ч (ОМЧ 22) (Горбенко, 1961). На мясо-пептонном агаре (МПА) после инкубации при  $37 \pm 1$  °С в течение 24 ч. определяли численность аллохтонной микрофлоры, привнесенной в водоем в результате антропогенного загрязнения (ОМЧ37). Коэффициент самоочищения (КСО) определяли по соотношению значений показателя ОМЧ, определённых при температурах 22°С и 37 °С.

*Санитарно-микробиологические показатели* определяли в соответствии (СанПиН 1.2.3685-21). Обнаружение и подсчет исследуемых групп бактерий проводили, используя метод мембранной фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0.45 мкм в соответствии с (МУК 4.2.1884-04) и (ГОСТ 24849-2014). Численность термотолерантных *E. coli* определялась методом мембранной фильтрации с использованием селективного Хай-хром агара (производство «Himedia» № M1571) (ГОСТ 24849-2014).

Присутствие фекальных энтерококков выявляли методом мембранной фильтрации с использованием питательного селективного агара Slanetz and Bartley Medium (производство «Himedia» № M 612) и Bile Esculine Azide Agar (производство «Himedia» № M493) (ГОСТ 24849-2014). Анализ результатов проводили согласно (МУК 4.2.1884-04, ГОСТ 24849-2014).

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. pH, состав главных ионов

В период исследования вода обоих озер имела слабощелочную реакцию, и, по классификации Алекина (Алекин, 1953), соответствовала гидрокарбонатному классу (Таблица 1). Среди катионов в воде обоих озер преобладали  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$ . В оз. Сайсары концентрация  $\text{Na}^+$  ( $117 \text{ мг/дм}^3$ ) немного больше чем  $\text{Ca}^{2+}$  ( $82,4 \text{ мг/дм}^3$ ), а в оз. Сергелях, наоборот, концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  ( $28,4 \text{ мг/дм}^3$ ) немного больше чем  $\text{Na}^+$  ( $24,8 \text{ мг/дм}^3$ ). В оз. Сайсары концентрация главных ионов, за исключением  $\text{SO}_4^{2-}$  превышала усредненные характеристики, полученные за период 1985-2021 гг. (Легостаева и Руфова, 2022) (далее будем использовать термин «характерные значения») в 1,5-3 раза, а общая минерализация ( $1030 \text{ мг/дм}^3$ ) – в ~ 2 раза. Концентрация  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{HCO}_3^-$  в оз. Сайсары превышала максимальные значения, наблюдавшиеся в период открытой воды в 2009-2021 гг. (диапазон вариаций характеристик для доступного периода наблюдений далее будем называть «мониторинговые значения»). Это может



указывать как на более интенсивную подпитку подземными и речными водами в зимний период по сравнению с атмосферной влагой, так и на вклад антропогенных факторов (Руфова и др. 2012), стоки которых могут попадать в озеро с грунтовыми водами (Макаров и Чижук, 2009).

Минерализация оз. Сайсары (1030 мг/дм<sup>3</sup>) немного превышала предельно допустимые концентрации (ПДК) для питьевой воды централизованного водоснабжения (1000 мг/дм<sup>3</sup>), но была меньше ПДК для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения (1500 мг/дм<sup>3</sup>) (СанПиН 1.2.3685-21). Среди главных ионов концентрация Mg<sup>2+</sup> (50 мг/дм<sup>3</sup>) в оз. Сайсары достигала ПДК вод хозяйственно питьевого и культурно-бытового назначения (ПДК<sub>х/п.к/б</sub>) и превышала рыбохозяйственные нормативы (1,25 ПДК<sub>р/х</sub>). Жесткость воды в оз. Сайсары (8,3 мг-экв/дм<sup>3</sup>) в 1,2 раза превышала ПДК для питьевой воды централизованного водоснабжения (7 мг-экв/дм<sup>3</sup>), но была меньше ПДК для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения (10 мг-экв/дм<sup>3</sup>).

Оз. Сергелях более пресное, минерализация воды (сумма главных ионов) в нем составляла 279 мг/дм<sup>3</sup>, что в 3,7 раза ниже, чем в оз. Сайсары (Таблица 1). Концентрация главных ионов в оз. Сергелях была в 1,5-2 раза ниже характерных значений, что может указывать на другой характер гидрологического режима озера по сравнению с оз. Сайсары. Концентрация K<sup>+</sup> в оз. Сергелях немного превышала максимальные мониторинговые значения, наблюдаемые в период открытой воды в 2009-2014 гг.

### 3.2. Биогенные компоненты

Наибольшая концентрация аммония (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 2,27 мг/дм<sup>3</sup>), превышающая оба норматива (4,5 ПДК<sub>р/х</sub> (Приказ..., 2016) и 1,5 ПДК<sub>х/п.к/б</sub> (СанПиН 1.2.3685-21)) была обнаружена в оз. Сайсары (Таблица 1). В оз. Сергелях концентрация аммония (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0,66 мг/дм<sup>3</sup>) превышала рыбохозяйственные нормативы в 1,3 раза.

Согласно классификации степени загрязненности водоемов по содержанию аммонийного азота (в мг/дм<sup>3</sup>): очень чистые (< 0,05), чистые (0,05-0,1), умеренно загрязненные (0,2-0,3), загрязненные (0,4-1,0), грязные (1,1-3,0) и очень грязные (> 3,0), (Хараев и др., 2004), оз. Сайсары попадает в категорию «грязные», а оз. Сергелях – в категорию «загрязненные». Полученные концентрации аммония в оз. Сайсары близки к максимальным мониторинговым значениям (3,4 мг/дм<sup>3</sup>) и в 3,6 раз выше характерных значений (0,63 мг/дм<sup>3</sup>). В оз. Сергелях концентрация аммония в 2,4 раза ниже максимальных мониторинговых значений (1,6 мг/дм<sup>3</sup>), однако почти в два раза выше характерных значений (0,35 мг/дм<sup>3</sup>) (Таблица 1).

Концентрация продуктов окисления аммония (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) в оз. Сайсары меньше, чем в оз. Сергелях (Таблица 1). Это указывает на то, что оз. Сайсары

подвергается более интенсивному свежему фекальному загрязнению.

Концентрация нитритов и нитратов в обоих озерах была ниже установленных нормативов. Концентрация нитритов в оз. Сайсары исчезающе мала (0,003 мг/дм<sup>3</sup>), в семь раз ниже минимальных мониторинговых значений (0,02 мг/дм<sup>3</sup>) и в 43 раза ниже характерных значений (0,13 мг/дм<sup>3</sup>).

Концентрация нитритов в оз. Сергелях (0,046 мг/дм<sup>3</sup>) сопоставима с мониторинговыми значениями (< 0,05 мг/дм<sup>3</sup>) и в 1,5 раза выше характерных значений (0,03 мг/дм<sup>3</sup>).

Концентрация нитратов в оз. Сайсары (0,41 мг/дм<sup>3</sup>) была в 5,4 раза ниже максимальных мониторинговых значений (2,2 мг/дм<sup>3</sup>) и в 2,8 раза ниже характерных значений (1,16 мг/дм<sup>3</sup>).

Концентрация нитратов в оз. Сергелях (1,22 мг/дм<sup>3</sup>) была почти на порядок выше характерных значений (0,13 мг/дм<sup>3</sup>). При мониторинговых исследованиях в период открытой воды в 2009-2014 гг. нитраты в оз. Сергелях не обнаруживались, пределы обнаружения авторы (Руфова и Ксенофонтова, 2015; Руфова и Татаринова, 2015) не указывают.

В целом суммарная концентрация азота в виде различных его форм (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) в оз. Сайсары была в 2,3 раза выше, чем в оз. Сергелях. Из рисунка видно, что оз. Сайсары находится в районе густой городской застройки, а оз. Сергелях в районе садоводческих хозяйств. Суммарная концентрация азота в виде различных его форм в оз. Сайсары превышала характерные значения в 2,3 раза, а в оз. Сергелях в 2,6 раз что, вероятно, связано с особенностями подледного периода.

По концентрации фосфатов (1,04 мг/дм<sup>3</sup>) в период исследования оз. Сайсары попадает в категорию гипертрофных водоемов (Таблица 1). Концентрация фосфатов в это время превышала характерные значения (0,44 мг/дм<sup>3</sup>) в 2,4 раза и максимальные мониторинговые значения (0,76 мг/дм<sup>3</sup>) в 1,4 раза. В оз. Сергелях концентрация фосфатов (0,162 мг/дм<sup>3</sup>) была в 6,4 раз меньше, чем в оз. Сайсары, в два раза ниже характерных значений (0,33 мг/дм<sup>3</sup>) и на порядок ниже максимальных мониторинговых значений (2,4 мг/дм<sup>3</sup>). По концентрации фосфатов на момент исследования оз. Сергелях попадает в категорию мезотрофных водоемов (0,15-0,45 мг/дм<sup>3</sup>).

Концентрация общего фосфора (P<sub>общ</sub>) в оз. Сайсары составляла 0,53 мг/дм<sup>3</sup>, а органического фосфора (P<sub>орг</sub>) – 0,19 мг/дм<sup>3</sup>. Доля P<sub>орг</sub> в воде оз. Сайсары составляла 36%. Концентрация P<sub>общ</sub> в оз. Сергелях составляла 0,23 мг/дм<sup>3</sup>, что в 2,3 раза ниже, чем в оз. Сайсары. Концентрация P<sub>орг</sub> в оз. Сергелях была почти такая же, как в оз. Сайсары и составляла ~ 0,18 мг/дм<sup>3</sup>. Таким образом, доля P<sub>орг</sub> в воде оз. Сергелях составляла 77%, что в два раза выше, чем в оз. Сайсары. Это указывает на более эффективную утилизацию фосфора биотой оз. Сергелях.

Различие озер по биогенным нагрузкам, вероятно, обусловлено неравномерным распределением антропогенных факторов.

Концентрация Si в оз. Сайсары (1760 мкг/дм<sup>3</sup>) и оз. Сергелях (1590 мкг/дм<sup>3</sup>) была сопоставима. В исследуемый период вода обоих озер по данному показателю пригодна для хозяйственно питьевого и культурно-бытового использования, поскольку примерно в шесть раз ниже ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> (10000 мкг/дм<sup>3</sup>). Рыбохозяйственный норматив по Si не установлен. Характерных и мониторинговых значений по Si в исследуемых озерах найти не удалось.

### 3.3. Органическое вещество

Содержание органических веществ оценивалось по показателям ХПК (общее количество растворенных органических веществ) и ПМО (содержание легкоокисляемых органических веществ). ХПК в оз. Сайсары составляло 122 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>, что сопоставимо с ХПК в оз. Сергелях (133 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>). Показатели ПМО в этих озерах также близки – 38,8 и 42,4 O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> соответственно.

Показатели ХПК в обоих озерах превышали ПДК технической воды (60 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) в ~ 2 раза. Показатели ХПК в обоих озерах превышали ПДК водоисточников, используемых для рекреационного водопользования, а также ПДК водоемов в черте населенных мест, ПДК воды в открытых системах технического водоснабжения, ПДК воды для полива улиц и зеленых насаждений (30 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) – в ~ 4 раза. Показатели ХПК в обоих озерах превышали ПДК поверхностных водоисточников, используемых для централизованного водоснабжения населения, ПДК воды для хозяйственно-бытового водопользования, в местах водозабора для плавательных бассейнов, водолечебниц (15 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) – в 8-9 раз (Таблица 1). То есть для всех этих целей воду из оз. Сайсары и оз. Сергелях в исследуемый период использовать нельзя.

Показатели ПМО нормируются для питьевой воды централизованного (не более 5 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) и нецентрализованного (не более 7 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) водоснабжения, а также для воды аквапарков (не более 7,5 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>). Исследуемые озера по этим показателям превышали установленные нормативы минимум в 5 раз. То есть вода этих озер в исследуемый период также непригодна для питья и организации аквапарков.

Сравнивая полученные результаты с мониторинговыми наблюдениями, видно, что ХПК в оз. Сайсары приближается к максимальным значениям (150 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>), зафиксированным в период открытой воды в 2009-2021 гг. Характерные значения ХПК для оз. Сайсары в работе (Легостаева и Руфова, 2022) не указаны. Данных в научной литературе по ХПК и ПМО для оз. Сергелях также обнаружить не удалось.

По соотношению ПМО/ХПК можно оценить качественный состав органического вещества природных вод (Скопинцев, 1950; Скопинцев и Гончарова, 1987). Условной границей органического вещества аллохтонного и автохтонного происхождения принято значение ПМО/ХПК = 40%. В оз. Сайсары этот показатель составляет 31%, а в оз.

Сергелях – 32%. То есть, в обоих озерах основная часть органического вещества – автохтонная.

### 3.4. Микроэлементы

К микроэлементам (в иностранной литературе trace elements – следовые элементы) относят химические элементы, содержание которых в природных водах < 1 мг/дм<sup>3</sup> (Gaillardet et al., 2003).

Концентрация Fe, которое также относят и к биогенным элементам, в оз. Сайсары (200 мкг/дм<sup>3</sup>) и оз. Сергелях (250 мкг/дм<sup>3</sup>) превышала рыбохозяйственные нормативы в 2 и 2,5 раза соответственно (Таблица 1). В оз. Сергелях концентрация Fe была близка к характерным значениям (270 мкг/дм<sup>3</sup>) и в 3,4 раза ниже максимальных мониторинговых значений (850 мкг/дм<sup>3</sup>), а в оз. Сайсары концентрация Fe была почти в 2 раза ниже характерных значений (390 мкг/дм<sup>3</sup>) и в 2,7 раз ниже максимальных мониторинговых значений (530 мкг/дм<sup>3</sup>). По данному показателю вода обоих озер пригодна для хозяйственно питьевого и культурно-бытового использования (ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> = 300 мкг/дм<sup>3</sup>).

Концентрация Mn в оз. Сайсары (1050 мкг/дм<sup>3</sup>) была в три раза выше, чем в оз. Сергелях (350 мкг/дм<sup>3</sup>). Оба показателя существенно превышали рыбохозяйственные нормативы (ПДК<sub>р/х</sub> = 10 мкг/дм<sup>3</sup>) – в 105 и 35 раз соответственно, а также нормативы воды для хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования (ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> = 100 мкг/дм<sup>3</sup>) – в 10,5 и 3,5 раз соответственно. Концентрация Mn в обоих озерах также существенно превышала характерные значения (20 мкг/дм<sup>3</sup>) – в ~50 и 17,5 раз, соответственно. В работе (Кайдалова и Олесова, 2019) отмечается, что высокий и экстремально высокий уровни загрязнения оз. Сайсары марганцем относительно рыбохозяйственных нормативов фиксировались в зимнюю-летнюю межень в 2012 и 2013 гг. То есть, в это время концентрация Mn могла быть больше 500 мкг/дм<sup>3</sup>, однако насколько больше авторы не указывают. Концентрация Mn в оз. Сергелях на порядок превышала максимальные мониторинговые значения (29 мкг/дм<sup>3</sup>).

Высокие уровни содержания Mn в воде озер в подледный период в большей степени обусловлены особенностями его геохимического поведения. На концентрацию Mn в природных водах оказывает влияние содержание растворенного кислорода и величина окислительно-восстановительного потенциала. В умеренных окислительных условиях растворимый Mn<sup>2+</sup> переходит в нерастворимый Mn<sup>4+</sup>, который мигрирует, главным образом, в виде коллоидных форм (~90%, Pokrovsky et al., 2006), он может утилизироваться в донные отложения и/или сорбироваться взвешенным веществом (Чебыкин и др., 2012). В период ледостава, при недостатке кислорода, происходят обратные процессы мобилизации Mn из донных отложений – в сезонном цикле его концентрация в воде может меняться в десятки и сотни раз (Чебыкин и др., 2012). Mn может также поступать в водоемы при подпитке подземными

водами, которые, как правило, содержат значительно больше Mn, по сравнению с поверхностными водами (Сутурин и др., 2016). Процессам мобилизации Mn в воду также способствует болотистый ландшафт (кислая среда) и понижение скорости течения. На фоне таких существенных природных процессов вычлнить антропогенный вклад является сложной задачей. В подледный период по данному показателю вода обоих озер не пригодна для питья без предварительной очистки.

Концентрация Zn в оз. Сайсары (0,83 мкг/дм<sup>3</sup>) и оз. Сергелях (5,1 мкг/дм<sup>3</sup>) была ниже ПДК<sub>р/х</sub> (10 мкг/дм<sup>3</sup>) и существенно ниже ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> (1000 мкг/дм<sup>3</sup>), а также характерных значений, которые составляют 120 и 20 мкг/дм<sup>3</sup> для оз. Сайсары и оз. Сергелях соответственно (Таблица 1). Максимальные мониторинговые значения Zn составляют 390 и 490 мкг/дм<sup>3</sup> для оз. Сайсары и оз. Сергелях соответственно. Столь высокие значения не характерны для природных водоемов, что вызывает большие сомнения в качестве аналитических данных.

Концентрация Cu в оз. Сайсары была <0,4 мкг/дм<sup>3</sup>, что ниже ПДК<sub>р/х</sub> (1 мкг/дм<sup>3</sup>) и существенно ниже ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> (1000 мкг/дм<sup>3</sup>). В оз. Сергелях концентрация Cu (1,77 мкг/дм<sup>3</sup>) превышала рыбохозяйственные нормативы в ~ 1,8 раз. Характерная концентрация Cu в обоих озерах составляет 1 мкг/дм<sup>3</sup> с вариациями мониторинговых значений <1-11,7 мкг/дм<sup>3</sup> в оз. Сайсары и 1,5-2,3 мкг/дм<sup>3</sup> в оз. Сергелях (Таблица 1). В исследуемый период вода обоих озер по данному показателю пригодна для хозяйственно-питьевого и культурно-бытового использования.

Концентрация Pb в оз. Сайсары (0,025 мкг/дм<sup>3</sup>) и оз. Сергелях (0,025 мкг/дм<sup>3</sup>) была существенно ниже ПДК<sub>р/х</sub> (6 мкг/дм<sup>3</sup>), ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> (10 мкг/дм<sup>3</sup>) и характерных значений (4 и 10 мкг/дм<sup>3</sup> для оз. Сайсары и оз. Сергелях, соответственно). Вариации мониторинговых значения Pb составляют 1,4-22,2 и 4,9-6,8 мкг/дм<sup>3</sup> для оз. Сайсары и оз. Сергелях соответственно. Столь большая разница наших данных с опубликованными, скорее всего, обусловлена аналитическим фактором. В данной работе использован высокочувствительный метод многоэлементного ИСП-МС анализа, который имеет пределы обнаружения элементов на порядки ниже, по сравнению с традиционно используемыми методами (атомная абсорбция и т.п.). Скорее всего, авторы, проводившие мониторинговые исследования, использовали методы (к сожалению, не указывают), пределы обнаружения которых оставляли желать лучшего. Это различие просматривается практически для всех элементов с характерной концентрацией на уровне единиц-десятков мкг/дм<sup>3</sup> и ниже (Zn, Co, Cr, Mo, Li, Таблица 1).

Среди других микроэлементов, превышавших установленные нормативы, обнаружены Sr (1,8 ПДК<sub>р/х</sub>), V (1,7 ПДК<sub>р/х</sub>) и Br (1,6 ПДК<sub>х/п\_к/б</sub>) в оз. Сайсары. Концентрация Sr (720 мкг/дм<sup>3</sup>) в оз. Сайсары превышала характерные значения (260 мкг/дм<sup>3</sup>) в 2,8 раза. В оз. Сергелях концентрация

Sr (170 мкг/дм<sup>3</sup>) была в 2,4 раза ниже ПДК<sub>р/х</sub> (400 мкг/дм<sup>3</sup>) и немного выше характерных значений (150 мкг/дм<sup>3</sup>). По V, Br и большинству других микроэлементов, измеренных нами, характерных и других значений в литературе найти не удалось.

### 3.5. Геохимический состав

Геохимический состав воды водных объектов, с одной стороны, весьма специфичен, с другой – изменчив, он формируется под влиянием множества природно-климатических, физических, физико-химических, биологических и антропогенных факторов, которые влияют на процессы взаимодействия воды с горными породами, почвам, биотой и атмосферой (Перельман, 1982). Из полученных данных (Таблица 1) следует, что примерно в половине случаев концентрация химических элементов в оз. Сайсары была выше, чем в оз. Сергелях (в размах): Co (1,3), Y (1,4), Ta (1,4), Rb (1,5), Ti (1,5), Cr (1,6), Sc (1,7), Zr (1,9), V (2), Hf (2), Be (2,2), As (2,3), Ni (2,3), P (2,3), Ba (2,8), Nb (2,8), Ca (2,9), K (3), Mn (3), I (3,4), Mg (3,6), Li (3,7), Br (4), Sr (4,2), Na (4,7), Se (6,6), Cl (6,7), Ge (7,9) и B (8,5). В десяти случаях, наоборот, была меньше (в размах): Fe (1,3), Ga (1,9), Th (3), Al (3,7), W (4,1), Cu (4,4), Pb (4,6), Zn (6,1), Cd (6,3) и Mo (9,1). По остальным элементам (Hg, Si, Ag, Sn, Sb, Te, Cs, REE, Ta, Re, Tl, Bi и U) различий, в рамках ошибок определения их концентраций, между озерами не обнаруживалось.

### 3.6. Комплексная оценка качества вод по гидрохимическим и геохимическим показателям

Полученные данные не позволяют использовать формальные комплексные показатели – удельный комбинаторный индекс загрязненности вод (УКИВЗ) и индекс загрязненности вод (ИЗВ).

Для оценки первого индекса требуется определение 15 обязательных показателей (O<sub>2</sub>-раств, БПК<sub>5</sub>, ХПК, фенолы, нефтепродукты, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni) (ПД 52.24.643-2002), среди которых O<sub>2</sub>-раств, БПК<sub>5</sub>, фенолы, нефтепродукты мы не определяли. При расчете УКИВЗ, наряду с кратностью превышения ПДК, используются показатели комплексности и повторяемости загрязнения за исследуемый период. В данной работе проведено единичное опробование, что не позволяет определить показатель повторяемости. В зависимости от величины УКИВЗ определяется класс качества вод от I (условно чистая) до V (экстремально грязная).

Для оценки второго показателя требуется определение шести наиболее важных показателей для данного водоема, среди которых обязательными являются O<sub>2</sub>-раств и БПК<sub>5</sub> (Временные..., 1986). В зависимости от величины ИЗВ определяется класс качества вод от I (очень чистая) до VII (чрезвычайно грязная). В данной работе два последних показателя не определялись. Для сравнения степени загрязненности оз. Сайсары и оз. Сергелях рассчитывался ИЗВ с имеющимся набором загрязнителей,

где вместо БПК5 использован близкий критерий – перманганатная окисляемость (ПМО). При этом набор загрязнителей не ограничивался шестью наиболее важными показателями, а были использованы все  $n$  показателей  $C_i$ , которые достигли или превысили установленные нормативы (ПДК<sub>p/x</sub> и ПДК<sub>x/п\_к/б</sub>) хотя бы в одном из озер:

$$\text{ИЗВ}(y) = \left( \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{\text{ПДК}_i} \right) / n \quad (1),$$

где ИЗВ( $y$ ) – условный индекс загрязненности исследуемых озер.

Согласно полученным данным, имеется семь таких показателей по рыбохозяйственным нормативам ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Fe, Mn, Cu, и V) и девять показателей по нормативам для водных объектов хозяйственно питьевого и культурно-бытового назначения ( $\text{Mg}^{2+}$ , жесткость воды, минерализация воды,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , ХПК, ПМО, Mn и Br) (Таблица 2).

В Таблице 2 приведены степени превышения ПДК по выбранным показателям и рассчитанные уровни загрязненности (УЗ) (РД 52.24.643-2002) и условные индексы загрязнения вод ИЗВ( $y$ ).

В оз. Сайсары ИЗВ( $y$ )<sub>p/x</sub> составлял 16,7, что в 2,8 раз выше, чем в оз. Сергелях (ИЗВ( $y$ )<sub>p/x</sub> = 6). То есть по рыбохозяйственным нормативам оз. Сайсары было почти в три раза хуже, чем оз. Сергелях. Подавляющий вклад в ИЗВ( $y$ )<sub>p/x</sub> в обоих случаях вносил Mn, который превышал установленный норматив в 105 раз в оз. Сайсары и в 35 в оз. Сергелях, что соответствует экстремально высокому и высокому уровням загрязненности, соответственно. Средние уровни загрязненности вод для рыбохозяйственных целей обнаруживались по аммонии (4,5 ПДК<sub>p/x</sub>) в оз. Сайсары и по Fe (2,5 ПДК<sub>p/x</sub>) в оз. Сергелях. Уровень загрязненности по остальным компонентам был низким или отсутствовал (Таблица 2).

ИЗВ( $y$ )<sub>x/п\_к/б</sub> в оз. Сайсары составлял 3,42, что в 1,5 раз выше, чем в оз. Сергелях (ИЗВ( $y$ )<sub>x/п\_к/б</sub> = 2,25). То есть по хозяйственно питьевым и культурно-бытовым нормативам оз. Сайсары было также хуже, чем оз. Сергелях. Основной вклад в обоих случаях в этот индекс вносили ХПК, ПМО и Mn, которые превышали установленные нормативы в ~8/~9, ~5/~6 и 10,5/3,5 раз для оз. Сайсары/оз. Сергелях, соответственно. Вода обоих озер по содержанию органических веществ соответствовала условно высокому уровню загрязненности, который, в отсутствии указаний в нормативных документах рассчитан аналогично кратности превышений ПДК по показателю БПК5 (РД 52.24.643-2002) (см. примечания к Таблице 2). По концентрации Mn вода оз. Сайсары соответствовала высокому уровню загрязненности, а вода оз. Сергелях – среднему уровню загрязненности. Уровень загрязненности по остальным компонентам был низким или отсутствовал (Таблица 2). Таким образом, для хозяйственно питьевых и культурно-бытовых целей использование воды озер являлось наиболее опасным по содержанию органических веществ, наряду с Mn.

### 3.7. Микробиологические характеристики

ОЧМ в оз. Сайсары была  $14,6 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup>, а в оз. Сергелях  $6,4 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup>. Согласно ГОСТ 17.1.3.07-82 ОЧМ является показателем санитарного состояния водоема и учитывается при оценке его трофического статуса. Вода подразделяется на шесть классов качества: ОЧМ менее  $0,5 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup> – I (очень чистая), ОЧМ =  $0,5-1,0 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup> – II (чистая), ОЧМ =  $1,1-3,0 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup> – III (умеренно загрязненная), ОЧМ =  $3,1-5,0 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup> – IV (загрязненная), ОЧМ =  $5,1-10,0 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup> – V (грязная), ОЧМ более  $10,0 \times 10^6$  кл./см<sup>3</sup> – VI (очень грязная (ГОСТ 17.1.3.07-82)). Таким образом, степень загрязненности воды по показателю ОЧМ в озерах Сергелях и Сайсары соответствует V и VI классам качества.

Наибольшая численность аллохтонной микрофлоры, привнесенной в водоем, и оцениваемой по показателю ОМЧ37, была в оз. Сергелях – 447 КОЕ / см<sup>3</sup>. В оз. Сайсары ОМЧ37 была на порядок ниже (33 КОЕ / см<sup>3</sup>). Численность автохтонной микрофлоры в оз. Сергелях (ОМЧ22 = 14 080 КОЕ / см<sup>3</sup>) также была значительно выше, чем в оз. Сайсары (ОМЧ22 = 323 КОЕ / см<sup>3</sup>). По соотношению ОМЧ22 / ОМЧ37 (коэффициент самоочищения, КСО) можно оценить активность и состояние процессов самоочищения природных водоемов (МУК 4.2.1884-04). По данному параметру вода обоих озер соответствует завершённому процессу самоочищения (КСО  $\geq 4$ ). Несмотря на большую численность органотрофных микроорганизмов в оз. Сергелях, процессы самоочищения в нем протекали более интенсивно (КСО = 31,5) по сравнению с оз. Сайсары (КСО = 9,8).

Тем не менее, наличие санитарно показательных бактерий свидетельствовало о неблагоприятной санитарно-микробиологической обстановке, особенно в оз. Сергелях.

В оз. Сайсары были обнаружены энтерококки в количестве 36 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>, что ниже нормативов поверхностных вод, используемых для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий (100 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>), однако в 3,6 раз выше нормативов для поверхностных вод в зонах рекреации, а также вод в черте населенных мест (для купания и занятия водным спортом) – 10 КОЕ / 100 см<sup>3</sup> (СанПиН 1.2.3685-21). В оз. Сергелях содержание энтерококков было почти на порядок больше, чем в оз. Сайсары, и составляло 346 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>, что значительно выше всех принятых в Российской Федерации нормативов для поверхностных вод.

В воде оз. Сайсары было обнаружено небольшое количество кишечной палочки *E. coli* (4 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>), которое не превышало нормативы поверхностных вод для всех видов водопользования (100 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>) и природной воды для технического водоснабжения (10 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>). В оз. Сергелях содержание *E. coli* было в 60 раз больше, чем в оз. Сайсары, и составляло 240 КОЕ / 100 см<sup>3</sup>, что в 2,4 раза выше общепринятых нормативов для поверх-



**Таблица 2.** Уровни загрязненности (УЗ) и условные индексы загрязнения вод ИЗВ(у) оз. Сайсары и оз. Сергелях по показателям, достигающим и превышающим ПДК<sub>р/х</sub> и ПДК<sub>х/п\_к/б</sub> хотя бы в одном из озер

Класс опасности *	Показатель	оз. Сайсары				оз. Сергелях			
		Ci / ПДК <sub>р/х</sub>	УЗ <sub>р/х</sub>	Ci / ПДК <sub>х/п_к/б</sub>	УЗ <sub>х/п_к/б</sub>	Ci / ПДК <sub>р/х</sub>	УЗ <sub>р/х</sub>	Ci / ПДК <sub>х/п_к/б</sub>	УЗ <sub>х/п_к/б</sub>
3	Mg <sup>2+</sup>	1,25	Н	1,00	Н	0,35	но	0,28	Н
ну	Ж	ну	–	1,19	Н	ну	–	0,37	Н
ну	Мин	ну	–	1,03	Н	ну	–	0,28	Н
4	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4,54	С	1,51	Н	1,32	Н	0,44	Н
3	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1,74 (1)	Н	0,30	Н	0,27 (1)	но	0,05	Н
ну	ХПК	ну	–	<b>8,13</b> <sup>(2)</sup>	<b>В</b> <sup>(4)</sup>	ну	–	<b>8,85</b> <sup>(2)</sup>	<b>В</b> <sup>(4)</sup>
ну	ПМО	ну	–	<b>5,54</b> <sup>(3)</sup>	<b>В</b> <sup>(4)</sup>	ну	–	<b>6,06</b> <sup>(3)</sup>	<b>В</b> <sup>(4)</sup>
3-4*	Fe	2,00	Н	<	Н	<b>2,50</b>	С	<	Н
3	Mn	<b>105</b>	ЭВ	<b>10,5</b>	<b>В</b>	35	В	<b>3,5</b>	С
3-4*	Cu	0,40	но	<	но	1,77	Н	<	но
3	V	1,66	Н	<	но	0,85	но	<	но
2	Br	<	но	1,55	Н	<	но	0,39	но
	ИЗВ(у)	ИЗВ(у) <sub>р/х</sub>		ИЗВ(у) <sub>х/п_к/б</sub>		ИЗВ(у) <sub>р/х</sub>		ИЗВ(у) <sub>х/п_к/б</sub>	
		16,7		3,42		6,01		2,25	

**Примечания:** ну – нормативы не установлены; < – показатель не взят в расчет, поскольку ниже нормативов для обоих озер.

(1) для расчета использован норматив для эвтрофных озер PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = 0,6 мг/дм<sup>3</sup>.

(2) для расчета использован норматив ХПК = 15 мг O<sub>2</sub> / дм<sup>3</sup> для воды поверхностных водоисточников, используемых для централизованного водоснабжения населения, для хозяйственно-бытового водопользования, мест водозабора для плавательных бассейнов, водолечебниц.

(3) для расчета использован норматив ПМО = 7 мг O<sub>2</sub> / дм<sup>3</sup> для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения.

УЗ – уровень загрязненности воды по кратности превышения ПДК (РД 52.24.643-2002): Н – низкий (1-2) ПДК, С – средний [2-10] ПДК; В – высокий [3-5] ПДК для веществ 1-2 классов опасности, [10-50] ПДК для веществ 3-4 классов опасности, ЭВ – экстремально высокий ≥ 5 ПДК для веществ 1-2 классов опасности, ≥ 50 ПДК для веществ 3-4 классов опасности, прочерк «-» невозможно рассчитать УЗ по причине отсутствия норматива; но – уровень загрязненности не определен т.к. ниже ПДК.

(4) – критерии определения высокого и экстремально высокого уровней загрязненности воды по показателям ХПК и ПМО определен по аналогии с кратностью превышения ПДК БПК<sub>5</sub>: 5-20 ПДК – высокий, > 20 ПДК – экстремально высокий.

\* - класс опасности химических веществ согласно (СанПиН 1.2.3685-21) в воде питьевой систем централизованного, в том числе горячего, и нецентрализованного водоснабжения, воде подземных и поверхностных водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования, воде плавательных бассейнов, аквапарков. Для комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям класс опасности для Fe и Cu понижен до 4 (РД 52.24.643-2002).

ностных вод и в 24 раза выше норматива для природных вод, которые можно использовать для технического водоснабжения.

Таким образом, за исключением ОЧМ, по всем измеренным микробиологическим характеристикам оз. Сергелях было на 1-2 порядка хуже, чем оз. Сайсары, что, вероятно, связано с отсутствием септиков в многочисленных садово-огороднических хозяйствах, которые вплотную примыкают к берегам озера (Рис.). В исследуемый период воду оз. Сергелях нельзя было использовать для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий, технических и рекреационных целей. Вода оз. Сайсары по исследованным микробиологическим характеристикам могла быть использована для указанных целей за исключением рекреационных.

#### 4. Заключение

Вода крупных озер г. Якутска (оз. Сайсары и оз. Сергелях) в конце подледного периода 2021 г. по многим гидрохимическим, геохимическим и микробиологическим характеристикам не соответствовала нормативам качества, установленным для водных объектов рыбохозяйственного, хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения.

Комплексная оценка качества вод по гидрохимическим и геохимическим показателям, полученная с помощью условного индекса загрязненности вод ИЗВ(у), показывает, что вода оз. Сайсары была в три раза хуже, чем вода оз. Сергелях по рыбохозяйственным нормативам и в 1,5 раза хуже по нормативам для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения.

Наибольший уровень загрязнения обоих озер фиксируется по Mn (10,5-105 ПДК) и органическому веществу (до 9 ПДК), большая часть которого, однако, имеет автохтонное происхождение. Высокие концентрации Mn, скорее всего, обусловлены сезонными причинами.

По биогенным компонентам (азот, фосфор) оз. Сайсары попадала в категорию грязных и эвтрофных водоёмов, а оз. Сергелях в категорию загрязнённых и мезотрофных.

Общее бактериальное загрязнение оз. Сайсары также было выше (VI класс качества, категория очень грязных вод), чем оз. Сергелях (V класс качества, категория грязных вод), однако содержание санитарно-показательных (*E. coli* и рода *Enterococcus*) и органотрофных (ОМЧ22, ОМЧ37) бактерий в оз. Сергелях было на порядок и более выше, чем в оз. Сайсары, и превышало все российские нормативы, установленные для поверхностных вод.

Полученные результаты указывают на необходимость принятия мер по улучшению качества вод оз. Сайсары и оз. Сергелях, поскольку они находятся в черте г. Якутска и имеют большое культурно-бытовое и рекреационное значение. Озеро Сайсары входит в список уникальных озёр Якутии и имеет сакральную ценность.

## Благодарности

Это исследование было проведено с использованием оборудования Центра электронной микроскопии и ИСП-МС анализа Центра коллективного пользования «Ультрамикроанализ» при Лимнологическом институте Сибирского отделения Российской академии наук. Авторы благодарны за помощь в отборе проб Копырину И.И. Работа выполнена в рамках государственных заданий № 121032300186-9 (Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук) и № 121012190038-0 (Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук).

## Конфликт интересов

Авторы настоящим заявляют, что данная исследовательская работа и выпуск рукописи соответствуют этическим стандартам и ни у кого из авторов нет потенциального конфликта интересов.

## Список литературы

Алекин О.А. 1953. Основы гидрохимии. Л.: Гидрометеоздат, 295 с.

Барам Г.И., Верещагин А.Л., Голобокова Л.П. 1999. Применение микроколонной высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием для определения анионов в объектах окружающей среды. Аналитическая химия 54(9): 962 – 965.

Васильева И.И. 1968. Состав и сезонная динамика фитопланктона озера окрестностей г. Якутска. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Новосибирск, Россия.

Временные методические указания по комплексной оценке качества поверхностных и морских вод. 1986. ГК СССР по гидрометеорологии и контролю природной среды. URL: <https://standartgost.ru/g/pkey-14293742635>

Габышев В.А., Габышева О.И. 2020. К изучению влияния тяжелых металлов на развитие фитопланктона озер г. Якутска и окрестностей. Природные ресурсы Арктики и Субарктики 25(4): 81 – 91. DOI: [10.31242/2618-9712-2020-25-4-6](https://doi.org/10.31242/2618-9712-2020-25-4-6)

Горбенко Ю.А. 1961. О наиболее благоприятном количестве сухого питательного агара в средах для культивирования морских микроорганизмов. Микробиология 30(1): 168 – 172.

Горохов М. 2023. Население Якутска за пять лет увеличилось на 60 тысяч человек. Комсомольская правда. Якутия, 08 апреля 2023 г. URL: <https://www.yakutia.kp.ru/online/news/5217118/?ysclid=lu7yjk3zd550642327>

ГОСТ 17.1.3.07-82. 1982. Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков. Межгосударственный стандарт. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/29997/?ysclid=lw7i759h1o63072849>

ГОСТ 31942-2012. 2012. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа. Межгосударственный стандарт. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/53467/?ysclid=lw92j8ce1m446660343>

ГОСТ 24849-2014. 2014. Методы санитарно-биологического анализа для полевых условий. Межгосударственный стандарт. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/58822/?ysclid=lwho13pwb444456396>

Григорьева М.В., Соловьева М.И. 2020. Качество озер г. Якутска по состоянию бентосных сообществ. Проблемы региональной экологии 5: 12 – 16. DOI: [10.24412/1728-323X-2020-5-12-16](https://doi.org/10.24412/1728-323X-2020-5-12-16)

Кайдалова М.В., Олесова А.И. 2019. Озеро «Сайсары» г. Якутск. В: Материалы XI Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум 2019». Москва. Научный парк МГУ. URL: <https://files.scienceforum.ru/pdf/2019/5c6bb00cee22f.pdf>

Копырина Л.И. 2013. Эпифитные водоросли – индикаторы сапробности некоторых озер окрестностей г. Якутска. Наука и образование 4: 77 – 81.

Ксенофонтова М.И., Легостаева Я.Б., Ябловская П.Е. и др. 2013. Характеристика химического состава вод и донных отложений крупных водоемов г. Якутска. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук 4: 493 – 500.

Купание запретили в озерах Хатынг-Юрях и Сергелях в Якутске. 2021. Известия, 16 июля 2021 г. URL: <https://iz.ru/1194109/2021-07-16/kupanie-zapretili-v-ozerakh-khatyng-iuriakh-i-sergeliakh-v-iakutske>

Легостаева Я.Б., Руфова А.А. 2022. Анализ гидрохимического режима наиболее крупных озер города Якутска. Природные ресурсы Арктики и Субарктики 27(4): 572 – 591. DOI: [10.31242/2618-9712-2022-27-4-572-591](https://doi.org/10.31242/2618-9712-2022-27-4-572-591)

Макаров В.Н., Чижук А.Л. 2009. Поступление фосфатов в озера Якутска. Наука и образование 4: 67 – 69.

МУК 4.2.1884-04. 2004. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ вод поверхностных водных объектов. Методические указания. URL: <https://internet-law.ru/stroyka/text/45900/>

Николаев А.А., Архипов И.В. 2021. Экологическое состояние озер города Якутска для туристско-рекреационного использования. Успехи современного естествознания 11: 106 – 113.

Оценка численности населения на 1 января 2023 года по муниципальным районам Территориальный орган ам. Федеральной службы государственной статистики по Республике Саха (Якутия). СахаСтат (4 апреля 2023). 2023. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AF%D0%BA%D1%83%D1%82%D1%81%D0%BA#cite\\_note-87](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AF%D0%BA%D1%83%D1%82%D1%81%D0%BA#cite_note-87)

Перельман А.И. 1982. Геохимия природных вод. М.: Наука, 154 с.

Попова Н.В., Федулова С.И. 2022. Исследование воды озера Сайсары по гидрохимическим показателям. В: Чугуновские агроочтения. Сборник научных статей по материалам XIV Всероссийской научно-практической конференции агротехнологической направленности, посвященной 100-летию образования Якутской Автономной Советской Социалистической Республики и Году культурного наследия народов в России, 140 – 144.

Приказ Минсельхоза России от 13.12.2016 N 552 (ред. от 12.10.2018). 2016. Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения URL: <https://docs.cntd.ru/document/420389120>

РД 52.24.643-2002. 2002. Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям. Руководящий документ. Ростов на Дону: Росгидромет, 55 с. URL: <https://ohranatruda.ru/upload/iblock/10d/4293831806.pdf>

Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Часть I. 2009. Ростов-на-Дону: Наука-Образование-Культура, 1044 с.

Руfoва А.А., Ксенофонтова М.И., Ябловская П.Е. 2012. Мониторинг состояния озер г. Якутска по гидрохимическим показателям. Наука и образование 4: 52 – 55.

Руfoва А.А., Ксенофонтова М.И., Трофимова Л.Н. 2013. Содержание некоторых микроэлементов в воде оз. Сайсары. Наука и образование 3: 139 – 141.

Руfoва А.А., Татаринова А.В. 2015. Антропогенное влияние на гидрохимическое и гидробиологическое состояние поверхностных вод северных городов (на примере г. Якутска). Современные проблемы науки и образования 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=20468>

Руfoва А.А., Ксенофонтова М.И. 2015. Гидрохимический состав как один из индикаторов современных условий формирования озер (на примере г. Якутска). Наука и образование 2: 144 – 150.

Руfoва А.А. 2023. Интегральные показатели гидрохимического состояния озерных вод г. Якутск. В: Актуальные проблемы экологии и природопользования. Сборник научных трудов XXIV Международной научно-практической конференции. В 2-х томах. Москва, стр. 323 – 328.

СанПиН 1.2.3685-21. 2021. Гигиенические нормы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 2. URL: <https://docs.cntd.ru/document/573500115?marker=656010>

Скопинцев Б.А. 1950. Органическое вещество в природных водах (водный гумус). В: Труды Океанографического института. Л.: Гидрометеиздат 17(29), 290 с.

Скопинцев Б.А., Гончарова И.А. 1987. Использование значений отношений различных показателей органического вещества природных вод для его качественной оценки. В: Современные проблемы региональной гидрохимии. Л.: Гидрометеиздат, стр. 95 – 117.

Сутурин А.Н., Чебыкин Е.П., Мальник В.В. и др. 2016. Роль антропогенных факторов в развитии экологического стресса в литорали оз. Байкал (акватория пос. Листвянка). География и природные ресурсы 6: 43 – 54. DOI: [10.21782/GIPR0206-1619-2016-6\(43-54\)](https://doi.org/10.21782/GIPR0206-1619-2016-6(43-54))

Татаринова А.В., Салова Т.А. 2013. Гидробиологическая характеристика городских и пригородных озер г. Якутска. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований 8-1: 81 – 82. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=3854>

Фомин Г.С. 2000. Вода. Контроль химический, бактериальный и радиационной безопасности по международным стандартам. М.: Протектор, 840 с.

Хараев Г.И., Ямпиллов С.С., Танганов Б.Б. и др. 2004. Экологический мониторинг. Улан-Удэ: ВСГТУ, 77 с.

Чебыкин Е.П., Сороковикова Л.М., Томберг И.В. и др. 2012. Современное состояние вод р. Селенги на территории России по главным компонентам и следовым элементам. Химия в интересах устойчивого развития 20(5): 613 – 631.

Чебыкин Е.П., Дамбинов Ю.А., Сутурин А.Н. 2020. Многоэлементный анализ надшламовых вод карт-копителей Байкальского целлюлозно-бумажного комбината для выбора стратегии ремедиации территории. Вода и экология: проблемы и решения 84(4): 67 – 80. DOI: [10.23968/2305-3488.2020.25.4.67-80](https://doi.org/10.23968/2305-3488.2020.25.4.67-80)

Чердонова О.В., Попова Н.В. 2022. Экологическое состояние озера Сайсары и значение планктона для экосистемы озера. В: Стратегия и перспективы развития агротехнологий и лесного комплекса Якутии до 2050 года. Сборник научных статей по материалам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию образования Якутской АССР и 85-летию Первого президента РС(Я) М. Е. Николаева (Николаевские чтения). М.: Знание-М, с. 615 – 619. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?edn=hgipve>

Aries S., Valladon M., Polve M. et al. 2000. A routine method for oxide and hydroxide interference corrections in ICP-MS chemical analysis of environmental and geological samples. Geostandards newsletter 24(1): 19 – 31. DOI: [10.1111/j.1751-908X.2000.tb00583.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2000.tb00583.x)

Bashenkhaeva M.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P. et al. 2015. Sub-ice microalgal and bacterial communities in freshwater Lake Baikal, Russia. Microbial Ecology 70: 751–765 DOI: [10.1007/s00248-015-0619-2](https://doi.org/10.1007/s00248-015-0619-2)

Gaillardet J., Viers J., Dupre B. 2003. Trace elements in river waters. In: Holland H.M. and Turekian K.K. (Eds.), Treatise on Geochemistry, V. 5. Oxford: Elsevier Pergamon, pp. 225 – 272. DOI: [10.1016/B978-0-08-095975-7.00507-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00507-6)

Murray R.G.E., Doetsch R.N., Robinow C.F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. (Eds.) Methods for general and molecular bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 21 – 41.

Pokrovsky O.S., Schott J., Dupre B. 2006. Trace element fractionation and transport in boreal rivers and soil porewaters of permafrost-dominated basaltic terrain in Central Siberia. Geochimica et Cosmochimica Acta 70: 3239 – 3260. DOI: [10.1016/j.gca.2006.04.008](https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.04.008)

Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnology and Oceanography 25: 943–948. DOI: [10.4319/lo.1980.25.5.0943](https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943)

Suturin A.N., Paradina L.F., Epov V.N. et al. 2003. Preparation and assessment of a candidate reference sample of Lake Baikal deep water. Spectrochimica Acta Part B 58: 277 – 88. DOI: [10.1016/S0584-8547\(02\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00157-X)

Wetzel R.G., Likens G.E. 2000. Limnological analyses. New York: Springer-Verlag, 391 p.

# Colourless sulphur bacteria in the ecosystem of Lake Baikal

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Chernitsyna S.M.\*, Bukin S.V., Elovskaya I.S., Sitnikova T.Ya., Zemskaya T.I.

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** The morphology and phylogenetic analysis of three genera of colourless sulphur bacteria found in different regions of Lake Baikal were studied. Based on 16S rRNA gene analysis, Baikalian *Thioploca* sp. belongs to the cluster of freshwater representatives of this genus from different lakes and is identical to the species *T. ingrlica*. A new species of *Ca. Thiiothrix namsaraevi* was discovered in the Zmeiny hot spring using whole genome analysis. Single filaments with sulphur inclusions from the Hakusy hot spring were identified as *Beggiatoa* sp. with 99% homology to uncultivated representatives of the genus.

**Keywords:** *Thioploca* sp., *Thiothrix* sp., *Beggiatoa* sp., lake Baikal

**For citation:** Chernitsyna S.M., Bukin S.V., Elovskaya I.S., Sitnikova T.Ya., Zemskaya T.I. Colourless sulphur bacteria in the ecosystem of Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 864-869. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-864

## 1. Introduction

Colourless sulphur bacteria (CSB) are of great scientific interest because they form a significant biomass due to their size and can be seen with the naked eye. Typically, oxygen shortage, high levels of various sulphur compounds, organic matter and nitrates are registered in areas inhabited by CSB. CSB develop en masse in coastal areas of seas and oceans, hydrothermal vents and springs, water treatment reactors (Robertson and Kuenen, 2006).

In 1991, in the northern basin of Lake Baikal bacterial mats formed by CSB of *Thioploca* sp. were described for the first time (Crane et al., 1991). High rates of sulfate reduction and methanogenesis were recorded in sediments of this site, and chemosynthesis-based communities developed here. Based on 16S rRNA gene fragment analysis, Baikalian bacterium was the most similar to the *Thioploca ingrlica* (Zemskaya et al., 2009). Later, the presence of *Thioploca* sp. filaments was found in sediments of other sites, including near-surface gas hydrates and oil seepage, where high concentrations of some ions, methane, and organic matter were recorded. The highest abundance of *Thioploca* sp. was recorded in the estuaries of the Selenga and Barguzin rivers (Zemskaya et al., 2009).

The development of CSB of the genus *Thiothrix* was noted in the areas of thermal sulfide springs, in the

zone of mixing of thermal and lake water (Kompantseva and Gorlenko, 1988; Barkhutova, 2000). Later, in the Goloustnoye methane seep, bacteria like *Thiothrix* sp. were found on the shell valves of the endemic ostracod *Candona* sp. as a part of epibiotic communities. 16S rRNA gene metabarcoding confirmed affiliation to the genus *Thiothrix* (Khalzov et al., 2021).

In 2009 CSB of the genus *Beggiatoa* were found in the Hakusy hot springs during the observation of alive shellfish samples of gastropods.

The aim of the work was to study morphology and phylogenetic determination of CSB found in different years in sediments of Lake Baikal and microbial fouling in thermal springs located near the water's edge of the lake Baikal.

## 2. Materials and methods

The CSB were sampled during scientific expeditions between 2009 and 2021. The samples taken for the study are *Thiothrix* sp. from the Zmeiny hot spring, *Thioploca* sp. – from delta of Selenga River, *Beggiatoa* sp. - from Khakusy hot spring. Phase-contrast and light microscopy were performed on an Axiovert 200 epifluorescence microscope (Zeiss, Germany). DNA isolation, PCR, cloning, sequencing, and sequence processing were performed as described previously (Chernitsyna et al., 2021; Chernitsyna et al., 2024). 16S rRNA gene

\*Corresponding author.

E-mail address: [sveta@lin.irk.ru](mailto:sveta@lin.irk.ru) (S.M. Chernitsyna)

Received: August 08, 2024; Accepted: August 21, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





sequences were deposited in GenBank under the numbers PP946765, PQ143231 and PQ143237.

### 3. Results and discussion

The morphology of Baikalian CSB is according to the descriptions given in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity et al., 2005). Bacteria of the genus *Thioploca* had a common sheath in which 3 to 22 filaments were observed. They were able to move in and out of the sheath independently of each other (Fig. 1a). Sulphur globules, vacuoles containing nitrate and other inclusions were noted inside the cells. The complete sequence of the 16S rRNA gene of *Thioploca* sp. from the Selenga had 99.8% homology with *T. ingrlica*. According to this gene, Baikalian *Thioploca* sp. belongs to the freshwater clade (Fig. 2).

Multicellular filaments of *Thiothrix* sp. are non-motile, covered with a sheath, and form rosettes. Sulphur inclusions were observed in phase contrast (Fig. 1b). The 16S rRNA gene sequence (1485 bp) of Baikalian *Thiothrix* sp. showed 99-99.7 % homology with several species of *Thiothrix*. Whole genome analysis of *Thiothrix* sp. from the thermal spring Zmeiny situated on the coast of northern Baikal showed the presence of a new species *Ca. Thiothrix namsaraevi* (Chernitsyna et al., 2024).

Single filaments of *Beggiatoa* sp. with a diameter of about 3 µm had rounded ends and a large number of inclusions (Fig. 1c). Microscopy of alive *Beggiatoa* sp. showed active movement of filaments, with speeds up to 300 µm/min. Sequencing of the 16S rRNA gene (893 bp) showed 99% homology with *Beggiatoa* sp. LPN (EU015402) from the sediment of a stream receiving primary treated sewage water (Denmark). Other nearest homologues (98.8%) were found in the Frasassi karst cave system (Italy). The homology with cultured *B. leptomitiformis* and *B. alba* was only 92 and 91.6%, respectively.

### 4. Conclusions

In Lake Baikal, three genera of CSB: *Thioploca*, *Thiothrix* and *Beggiatoa* - were found in different ecozones, in the zones of redox potential gradient, sul-

phate ion concentrations. They differ morphologically (presence/absence of a sheath, cell shape and ability to move) and have different metabolic potential. The difficulty of culturing, the wide variability of morphological features and high homology of 16S rRNA gene within the genus make it impossible to identify them to species without genome analysis. It is the analysis of the complete genome that allowed to discover a new species of *Ca. Thiothrix namsaraevi*. The complete genomes of Baikalian *Thioploca* sp. and *Beggiatoa* sp. are yet to be assembled.

### 5. Acknowledgments

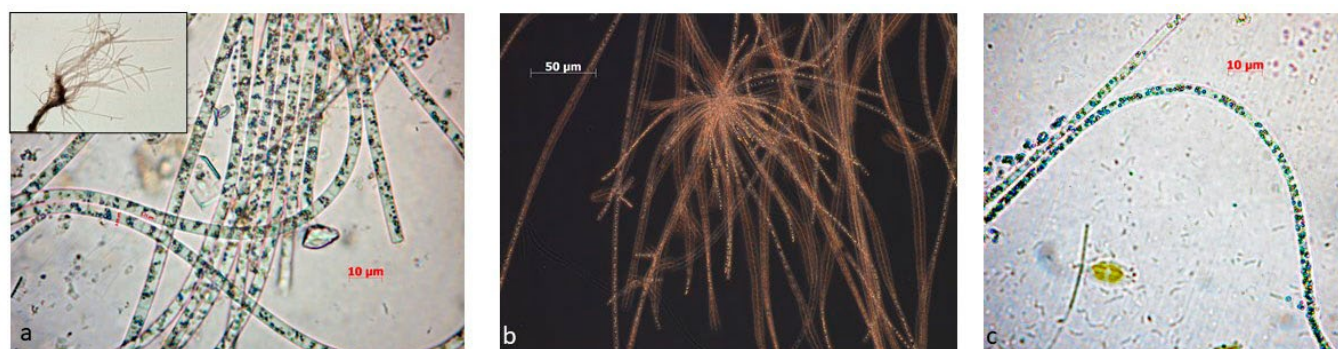
The study was carried out within the State assignment 0279-2021-0006 (121032300223-1) and with the support of the Russian Science Foundation (22-14-00084). Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (FSBSI ARRIAM, St. Petersburg). All calculations were performed with HPC-cluster «Akademik V.M. Matrosov» (Irkutsk).

### Conflict of interests

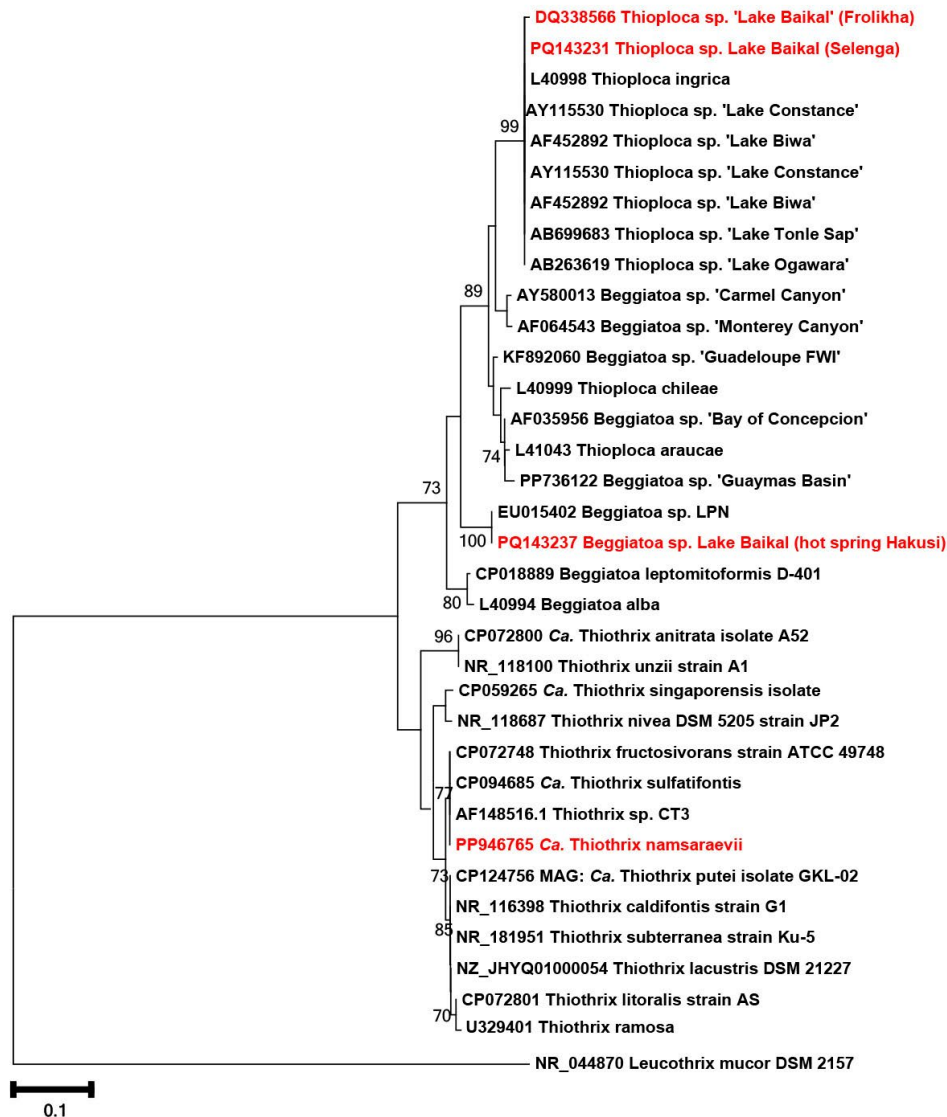
The authors declare no conflicts of interest.

### References

- Barkhutova D.D. 2000. Effect of environmental parameters on bacterial diversity and functional activity of bacteria-destroyer in sulfide-rich springs of the Baikal region. PhD Thesis, Ulan-Ude, Russia. (in Russian)
- Chernitsyna S.M., Khalzov I.A., Sitnikova T.Ya. et al. 2021. Microbial communities associated with benthic invertebrates of Lake Baikal. *Current Microbiology* 78: 3020-3031. DOI: [10.1007/s00284-021-02563-0](https://doi.org/10.1007/s00284-021-02563-0)
- Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V. et al. 2024. Genomic and morphological characterization of a new *Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). *Antonie van Leeuwenhoek* 117: 1-16. DOI: [10.1007/s10482-023-01918-w](https://doi.org/10.1007/s10482-023-01918-w)
- Crane K., Hecker B., Golubev V. 1991. Hydrothermal vents in Lake Baikal. 350: 281.
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. Family I. Thiotrichaceae fam. nov. 2005. In: Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R. et al. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. V. 2, part B. New York: Springer, pp. 131-179.



**Fig. 1.** Morphology of CSB at 1600-magnification: **a** - *Thioploca* sp. from the cold seep Posolskaya Bank (a view of filaments in a common sheath at 160-magnification is in the inset); **b** - *Ca. Thiothrix namsaraevi* from thermal spring Zmeiny (phase contrast); **c** - *Beggiatoa* sp. from thermal spring Hakusy.



**Fig.2.** Phylogenetic tree of Baikalian CSB reconstructed by the neighbour-joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (values above 70% are shown).

Khalzov I.A., Bukin S.V., Zakharenko A.S. et al. 2021. Microbial communities associated with the ostracods *Candona* sp. inhabiting the area of the methane seep Goloustnoye (Lake Baikal) *Symbiosis* 85: 163-174. DOI: [10.1007/s13199-021-00802-3](https://doi.org/10.1007/s13199-021-00802-3)

Kompantseva E.I., Gorlenko V.M. 1988. Phototrophic communities in some thermal springs of Lake Baikal. *Microbiology* 57: 841-856. (in Russian)

Robertson L.A., Kuenen J.G. 2006. The colorless sulfur bacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. (Eds.), *The Prokaryotes*. New York: Springer, pp. 985-1011. DOI: [10.1007/0-387-30742-7\\_31](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_31)

Zemskaya T.I., Chernitsyna S.M., Dul'tseva N.M. et al. 2009. Colorless sulfur bacteria *Thioploca* from different sites in Lake Baikal. *Microbiology* 78: 117-124. (in Russian) DOI: [10.1134/s0026261709010159](https://doi.org/10.1134/s0026261709010159)

# Бесцветные серные бактерии в экосистеме озера Байкал



Черницына С.М.\*, Букин С.В., Еловская И.С., Ситникова Т.Я., Земская Т.И.

Лимнологический Институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Исследована морфология и проведен филогенетический анализ трех родов бесцветных серных бактерий, обнаруженных в различных районах озера Байкал. На основании анализа гена 16S рПНК байкальская *Thioploca* sp. входит в кластер пресноводных представителей этого рода из различных озер и идентична виду *T. ingrlica*. В районе горячего источника Змеиный с помощью анализа полного генома обнаружен новый вид *Ca. Thiiothrix namsaraevi*. Одиночные нити с включениями серы из района горячего источника Хакусы отнесены к роду *Beggiatoa* с 99% гомологии к некультивируемым представителям рода.

**Ключевые слова:** *Thioploca* sp., *Thiiothrix* sp., *Beggiatoa* sp., оз. Байкал

Для цитирования: Черницына С.М., Букин С.В., Еловская И.С., Ситникова Т.Я., Земская Т.И. Бесцветные серные бактерии в экосистеме озера Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 864-869. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-864

## 1. Введение

Бесцветные серные бактерии (БСБ) вызывают большой научный интерес, поскольку образуют значительную биомассу благодаря своим размерам и могут быть видны невооруженным глазом. Как правило, в районах, где обитают серные бактерии, регистрируется недостаток кислорода, высокое содержание восстановленных соединений серы, органического вещества и нитратов. БСБ развиваются в массе в прибрежных районах морей и океанов, гидротермальных вентях и источниках, реакторах очистки вод (Robertson and Kuenen, 2006).

В 1991 году в северной котловине озера Байкал впервые были описаны бактериальные маты, основу которых составляли БСБ рода *Thioploca* (Crane et al., 1991). В донных осадках этого района фиксировались высокие скорости сульфатредукции и метаногенеза, и развивались основанные на хемосинтезе сообщества. На основе анализа фрагмента гена 16S рПНК байкальская бактерия наиболее сходна виду *Thioploca ingrlica* (Земская и др., 2009). Позднее присутствие нитей *Thioploca* sp. отмечалось в осадочных толщах других районов, включая районы приповерхностного залегания газогидратов и нефтепроявлений, где регистрировались высокие концентрации некоторых ионов, метана и органических веществ. Наибольшая численность *Thioploca* sp.

отмечена в устьях рек Селенга и Баргузин (Земская и др., 2009).

Развитие БСБ рода *Thiiothrix* отмечалось в районах сульфидных гидротерм, в зоне смешения термальной и озерной вода (Компанцева и Горленко, 1988; Бархутова, 2000). Позднее в районе метанового сипа Голоустное, подобные *Thiiothrix* sp бактерии были обнаружены на створках раковин эндемичных остракод *Candona* sp. в составе эписимбиотических сообществ. Метабаркодирование по гену 16S рПНК подтвердило их принадлежность роду *Thiiothrix* (Khalzov et al., 2021).

БСБ рода *Beggiatoa* были обнаружены в районе источника Хакусы в 2009 г. при исследовании живых проб моллюсков.

Целью работы являлось изучение морфологии и определение таксономического статуса БСБ, обнаруженных в различные годы в донных осадках озера Байкал и микробных обрастаниях в районе термальных источников озера, расположенных вблизи уреза воды.

## 2. Материалы и методы

Пробы бесцветных серных бактерий отобраны в ходе научных экспедиций в период с 2009 г. по 2021 г. Для исследования взяты образы *Thiiothrix* sp. из горячего источника Змеиный, *Thioploca* sp. –

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [sveta@lin.irk.ru](mailto:sveta@lin.irk.ru) (С.М. Черницына)

Поступила: 08 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





дельта реки Селенга, *Beggiatoa* sp. – горячий источник Хакусы. Фазово-контрастную и световую микроскопию выполняли на эпифлуоресцентном микроскопе Axiovert 200 (Zeiss, Германия). Выделение ДНК, ПЦР, клонирование, секвенирование и обработку последовательностей проводили как описано ранее (Chernitsyna et al., 2021; Chernitsyna et al., 2024). Последовательности генов 16S рРНК депонированы в GenBank под номерами № PP946765, PQ143231, RQ143237.

### 3. Результаты и обсуждение

Морфология байкальских БСБ соответствовала описаниям, приведенным в определителе бактерий Берджи (Garrity et al., 2005). Бактерии рода *Thioploca* имели общий чехол, в котором фиксировалось от 3 до 22 филламентов. Они могли передвигаться внутри чехла и выходить из него независимо друг от друга (Рис. 1а). Внутри клеток отмечались глобулы серы, вакуоли содержащие нитраты и другие включения. Полная последовательность гена 16S рРНК для *Thioploca* sp. из дельты р. Селенга имела 99.8% гомологии с видом *T. ingrlica*. По этому гену, байкальские представители *Thioploca* попадали в пресноводную кладу (Рис. 2).

Многочеточные нити *Thiothrix* sp. неподвижны, покрыты чехлом, образуют розетки. В фазовом контрасте наблюдались включения серы (Рис. 1б). Последовательность гена 16S рРНК (1485 п.н.) байкальского *Thiothrix* показала 99-99.7 % гомологию с несколькими видами *Thiothrix*. Анализ полного генома *Thiothrix* sp. из термального источника Змеиный на побережье северного Байкала показал присутствие здесь нового вида *Ca. Thiothrix namsaraevi* (Chernitsyna et al., 2024).

Одиночные нити *Beggiatoa* sp. диаметром около 3 мкм имели закругленные концы и большое количество включений (Рис. 1в). При микроскопировании живых образцов *Beggiatoa* sp. отмечалось активное движение нитей, скорость которых достигала 300 мкм/мин. Анализ последовательности гена 16S рРНК (893 п.н.) показал 99% гомологии с

*Beggiatoa* sp. LPN (EU015402) из осадков ручья с очищенными сточными водами (Дания). Другие ближайшие гомологи (98.8%) обнаружены в системе карстовых пещер Фразасси (Италия). С культивируемыми *B. leptomitiformis* и *B. alba* процент гомологии составляет всего 92 и 91.6% соответственно.

### 4. Выводы

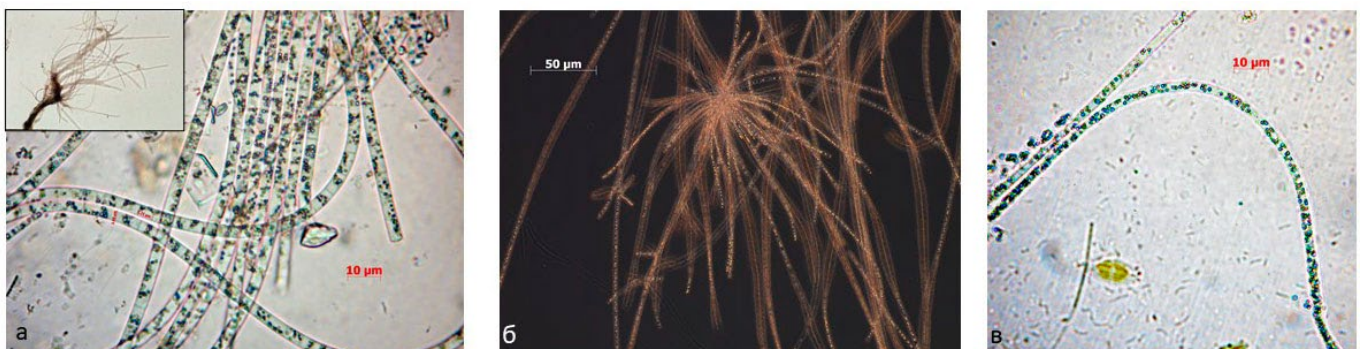
В озере Байкал обнаружены БСБ трех родов *Thioploca*, *Thiothrix* и *Beggiatoa*, обитающие в различных экотопах, в зонах градиента окислительно-восстановительного потенциала, концентраций сульфат иона. Они различаются морфологически (наличие/отсутствие чехла, форма клеток и способность к движению) и имеют различные метаболические возможности. Сложность получения и поддержания чистых культур, широкая вариабельность морфологических признаков внутри рода, неинформативность классического гена 16S рРНК не позволяют идентифицировать их до вида без анализа генома. Именно анализ полного генома позволил обнаружить новый вид *Ca. Thiothrix namsaraevi*. Полные геномы байкальских *Thioploca* sp. и *Beggiatoa* sp. еще только предстоит получить.

### Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания ЛИН СО РАН № 0279-2021-0006 (121032300223-1) и гранта РФФ 22-14-00084. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург). Биоинформатические расчеты проводились на вычислительном кластере «Академик В.М. Матросов» (Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН).

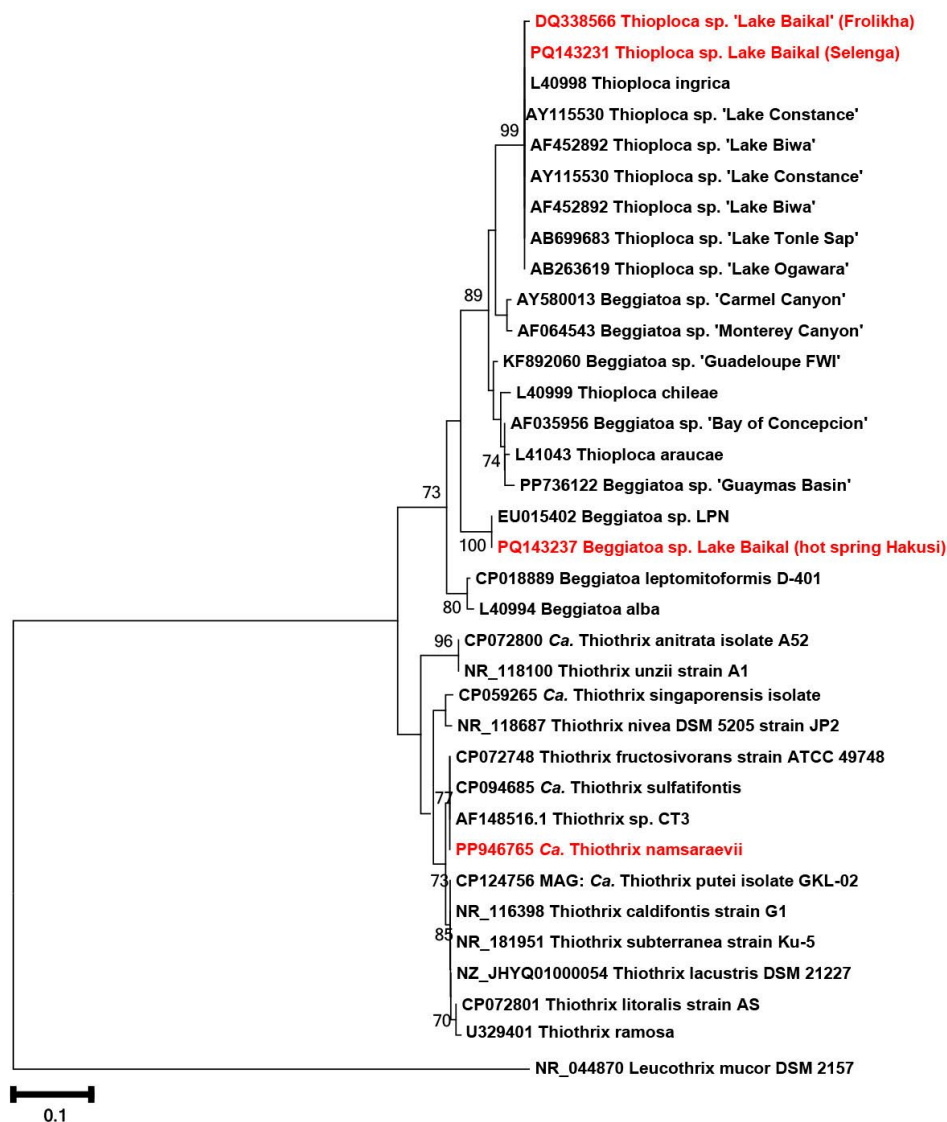
### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



**Рис.1.** Морфология бесцветных серных бактерий при 1600-кратном увеличении: а - *Thioploca* sp. из района холодного сипа Посольская банка (во врезке вид нитей в общем чехле при 160-кратном увеличении); б - *Ca. Thiothrix namsaraevi* в фазовом контрасте, термальный источник Змеиный; в - *Beggiatoa* sp., термальный источник Хакусы.





**Рис.2.** Филогенетическое древо байкальских БСБ, построенное по методу объединения ближайших соседей. Числа показывают достоверность ветвления по результатам 1000 повторностей “bootstrap”-анализа (приведены значения выше 70 %).

## Список литературы

Бархутова Д.Д. 2000. Влияние экологических условий на распространение и активность бактерий-деструкторов в сероводородных источниках Прибайкалья: Автореф. дис. канд. биол. наук, Улан-Удэ, Россия.

Земская Т.И., Черницына С.М., Дульцева Н.М. и др. 2009. Бесцветные серные бактерии рода *Thioploca* из различных районов озера Байкал. *Микробиология* 78: 134-143.

Компанцева Е.И., Горленко В.М. 1988. Фототрофные сообщества в некоторых термальных источниках озера Байкал. *Микробиология* 57: 841-846.

Chernitsyna S.M., Khalzov I.A., Sitnikova T.Ya. et al. 2021. Microbial communities associated with benthic invertebrates of Lake Baikal. *Current Microbiology* 78: 3020-3031. DOI: [10.1007/s00284-021-02563-0](https://doi.org/10.1007/s00284-021-02563-0)

Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Bukin S.V. et al. 2024. Genomic and morphological characterization of a new

*Thiothrix* species from a sulfide hot spring of the Zmeinaya bay (Northern Baikal, Russia). *Antonie van Leeuwenhoek* 117: 1-16. DOI: [10.1007/s10482-023-01918-w](https://doi.org/10.1007/s10482-023-01918-w)

Crane K., Hecker B., Golubev V. 1991. Hydrothermal vents in Lake Baikal. 350: 281.

Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. Family I. Thiotrichaceae fam. nov. 2005. In: Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R. et al. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. V. 2, part B. New York: Springer, pp. 131-179.

Khalzov I.A., Bukin S.V., Zakharenko A.S. et al. 2021. Microbial communities associated with the ostracods *Candona* sp. inhabiting the area of the methane seep Goloustnoye (Lake Baikal). *Symbiosis* 85: 163-174. DOI: [10.1007/s13199-021-00802-3](https://doi.org/10.1007/s13199-021-00802-3)

Robertson L.A., Kuenen J.G. 2006. The colorless sulfur bacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. (Eds.), *The Prokaryotes*. New York: Springer, pp. 985-1011. DOI: [10.1007/0-387-30742-7\\_31](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_31)

# Features of microbial communities in fresh lakes of Buryatia



Dagurova O.P.<sup>1</sup>, Zaitseva S.V.<sup>1</sup>, Tsydenova B.V.<sup>2</sup>, Kozyreva L.P.<sup>1</sup>, Buryukhaev S.P.<sup>1</sup>, Dambaev V.B.<sup>1</sup>, Barkhutova D.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Sakhyanovoi st., 6, Ulan-Ude, 670047, Russia

<sup>2</sup>N.L. Dobretsov Geological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Sakhyanovoi st., 6a, Ulan-Ude, 670047, Russia

**ABSTRACT.** The taxonomic composition of microbial communities of eight large fresh lakes of Buryatia was studied. These lakes are Baikal, Kotokel, Gusinoye, Shchuchye and lakes of the Eravno-Kharginskaya group (Isinga, Gunda, Sosnovoe, Bolshoe Eravnoe). They have water management, fishery and recreational significance. At the phylum level, the microbial communities of the studied lakes were similar but the phyla abundance was varied. They consisted of typical freshwater taxa *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*. At the genus level, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* were numerous in all lakes. Other dominant taxa were *Flavobacterium*, *hgcI* clade in the fresh lakes of the Baikal region and *Exiguobacterium*, *Klebsiella* in the Eravno-Kharginskaya lakes. The feature of Eravno-Kharginskaya lakes was the abundance of the genera *Exiguobacterium* and *Klebsiella*, as well as the detection of sanitary-significant bacteria. These facts may indicate pollution as a result of pressing various factors, including anthropogenic ones.

**Keywords:** microbial community, taxonomic composition, fresh lakes, Buryatia

**For citation:** Dagurova O.P., Zaitseva S.V., Tsydenova B.V., Kozyreva L.P., Buryukhaev S.P., Dambaev V.B., Barkhutova D.D. Features of microbial communities in fresh lakes of Buryatia // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 870-876. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-870

## 1. Introduction

The studies of fresh water bodies used for various water supply purposes, as well as an irreplaceable source of drinking water, are important. Microbial communities are great component of the fresh lakes ecosystems. They participate in the processes of self-purification, play an important role in biogeochemical cycles, and can serve as an indicator of changes in the ecosystem as a result of the influence of natural and anthropogenic factors. Qualitative and quantitative assessment of microbial communities in fresh lakes is important for determining the trophic status of water bodies and the characteristics of its functioning, and maintaining water quality.

On the territory of Buryatia Republic, in addition to the unique Lake Baikal, which is a huge reservoir of clean water, there are fresh lakes that have water-economic and recreational importance and are subject to anthropogenic pressure (Borisenko et al., 1994; Lake

Kotokelskoye..., 2013). In the east of the republic, there is a large Eravno-Kharginskaya lake system. The lakes of this system are one of the most fish-producing lakes in Buryatia. The largest (after Baikal) lake Gusinoye is a cooling reservoir for the Gusinozerskaya State District Power Plant. Lake Kotokel experienced an environmental disaster. The coastal zone of Lake Baikal and Lake Shchuchye is under recreational pressure. The goal of the work was to determine the characteristics of the taxonomic composition of the water microbial community of large fresh lakes in Buryatia.

## 2. Materials and methods

The objects of study were eight large fresh lakes of Buryatia - Baikal (coastal recreational zone), Kotokel (Pribaikalsky district), Gusinoye, Shchuchye (Selenginsky district) and lakes of the Eravno-Kharginsky group - Isinga, Gunda, Sosnovoe, Bolshoye Eravnoye (Eravninsky district).

\*Corresponding author.

E-mail address: [dagur-ol@mail.ru](mailto:dagur-ol@mail.ru) (O.P. Dagurova)

**Received:** June 04, 2024; **Accepted:** June 20, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Samples for research were taken in August 2019 at 3-4 different points of the each lakes from the sub-surface horizon into sterile containers. The taxonomic composition of the studied lakes was determined by high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene region in three technical replicates used Illumina MiSeq (Illumina, USA). DNA was isolated by DNA NucleoSpin Soil reagent kit (MACHEREY-NAGEL, Germany). Sequencing was carried out at the Center for Collective Use “Genome Technologies, Proteomics and Cell Biology” of the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology. Data obtained from sequencing samples were processed using Trimmomatic and QIIME software packages (Caporaso et al., 2010). Taxonomic identification of OTUs was performed using the RDP database.

### 3. Results and discussion

Lake microbial communities were similar at the phylum level. The phyla *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* and *Cyanobacteriota* were dominants in microbial community of all studied lakes (Table 1). The phyla *Firmicutes*, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobiota* were subdominants. These phyla wide distributed of freshwater lake communities (Newton et al., 2011). In the freshwater lakes of the Baikal region Kotokel, Gusinoe, Shchuchye and in the beach area of Lake Baikal, a greater distribution of the phyla *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Verrucomicrobiota* was observed. In the Eravno-Kharginskies lakes, the proportion of the phylum *Planctomycetota* and especially the phylum *Firmicutes* increased (up to 34%).

Table 2 presents the most abundant bacterial genera in the microbial communities of the studied lakes (more than 1%). Similarities and differences were found in the distribution of bacterial genera. The most abundant in all lakes were genera *Acinetobacter* (up to 25%) and *Pseudomonas* (up to 20%). They are able to dominate in natural ecosystems under favorable conditions, suppressing the growth of other genera (Cray et al., 2013). The dominance of these genera in communities in Lake Kotokel and the Eravno-Kharginskies lakes

(Isinga, Bolshoe Eravnoe, Gunda, Sosnovoe) may indicate a possible change in the community structure due to natural and anthropogenic impacts on the ecosystem. Other dominant taxa at the genus level in the microbial communities of Lake Baikal and Lakes of the Baikal region, on the one hand, and in the Eravno-Khargina lakes, on the other hand, differed greatly. In Lake Baikal and the lakes of the Baikal region, *Flavobacterium* (up to 17%) and *hgcl* clade (up to 18%), widespread in freshwater bodies, were represented. *Sediminibacterium* (up to 7%) and cyanobacteria *Azolla filiculoides* (up to 5%) were also a permanent component of the communities.

In the Eravno-Kharginskies lakes, as well as in the lakes of the Baikal region, representatives of the genera *Acinetobacter* and *Pseudomonas* also dominated. A significant proportion in the community were *Exiguobacterium* (up to 12%), *Microbacterium* (up to 6%), *Massilia* (up to 8%). An increase in the share of the genus *Exiguobacterium* in the microbial community of recreational contaminated waters of fresh lakes was observed (Lee et al., 2016). Bacteria of the genera *Brevundimonas*, *Cyanobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium* Constant component of the community were, which are typical inhabitants of freshwater ecosystems. Representatives of the genus *Microbacterium* and *Massilia* were previously found in the microbial community of Lake Baikal water (Bashenkhaeva et al., 2017). In Lake Isinga (average 3%) and Lake Gunda (average 13%) the genus *Klebsiella* (family *Enterobacteriaceae*) was found. In these lakes, where a high share of *Klebsiella* was found, the coliform bacteria were detected (Dagurova et al., 2021). *Staphylococcus* (1.13%) and *Streptococcus* (1.67%) were found in Lake Isinga. This may be due to cattle grazing. Previously, the presence of *Staphylococcus* was detected on freshwater beaches (Thapaliya et al., 2017). Increased *Exiguobacterium* and detected *Klebsiella* indicated the pollution of anthropogenic origin. Previously, the values of bacterial eutrophic index (BEI) based on the composition of microbial communities, detected risk of eutrophication of the lakes of Buryatia (Zaitseva et al., 2021).

**Table 1.** The main bacterial phyla in water microbial communities of fresh lake of Buryatia

Bacterial phyla	Baikal and the fresh lakes of the Baikal region	Eravno-Kharginskies lakes	Average
Dominants			
<i>Pseudomonadota</i>	26-66	48-75	49.4 ± 2.88
<i>Actinobacteriota</i>	7-28	4-35.6	16.1 ± 13.73
<i>Bacteroidota</i>	12-54	0.3-8.7	15.5 ± 4.56
<i>Cyanobacteriota</i>	0.6-30	0.9-6.5	7.4 ± 3.82
Subdominants			
<i>Firmicutes</i>	0.01-2	1.2-34.6	4.1 ± 2.31
<i>Planctomycetes</i>	0.2-4	0-10.5	2.8 ± 2.82
<i>Verrucomicrobiota</i>	2-12	0.05-1.9	2.6 ± 4.72
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0-0.4	0-9.3	1.0 ± 2.01
Others	0.4-1.6	0-2.7	0.6 ± 0.74

**Table 2.** The main bacterial genera in water microbial communities of fresh lake of Buryatia

Bacterial genera	Baikal	Kotokel	Gusinoe	Shchuchye	B. Eravnoe	Gunda	Isinga	Sosnovoe
<i>Acinetobacter</i>	4.07	<b>14.31</b>	-	2.44	<b>24.99</b>	<b>22.13</b>	14.5	<b>25.17</b>
<i>Pseudomonas</i>	<b>20.10</b>	7.22	-	3.72	5.40	2.78	<b>16.7</b>	8.49
<i>Cyanobium_PCC-6307</i>	2.73	-	-	4.51	3.57	1.43	0.56	1.27
<i>Flavobacterium</i>	7.80	13.13	<b>17.48</b>	16.22	-	-	-	1.97
<i>hgcI clade</i>	9.90	10.06	15.85	<b>18.23</b>	-	-	-	-
<i>Sediminibacterium</i>	1.03	6.69	2.25	7.40	-	-	-	-
<i>Azolla filiculoides</i>	5.23	4.42	3.70	3.95	-	-	-	-
<i>Rhodoferrax</i>	4.26	0.94	4.63	1.47	-	-	-	-
<i>Luteolibacter</i>	4.80	1.75	-	-	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium</i>	-	-	-	-	12.10	2.74	11.5	4.27
<i>Klebsiella</i>	-	-	-	-	-	13.10	2.90	-
<i>Massilia</i>	-	-	-	-	8.60	2.60	-	8.00
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	5.10	3.23	6.37	-
<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	-	2.87	2.31	2.62	5.87
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	-	-	1.77	4.13	-

Note: dash – less than 1%, bold – maximum for lake

#### 4. Conclusions

The microbial communities of the studied lakes at the phylum level were similar and consisted of taxa typical of freshwater ecosystems: *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*, differing in their abundances in the community. At the genus level, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* were numerous in all lakes. Other dominant taxa were *Flavobacterium*, *hgcI* clade in the fresh lakes of the Baikal region and *Exiguobacterium*, *Klebsiella* in the Eravno-Kharginskaya lakes. The feature of Eravno-Kharginskies lakes was the abundance of the genera *Exiguobacterium* and *Klebsiella*, as well as the detection of sanitary-significant bacteria. These facts may indicate pollution as a result of pressing various factors, including anthropogenic ones.

#### Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the topic of State Assignment No. 121030100229-1.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

Bashenkhaeva M.V., Zakharova Y.R., Galachyants Y.P. et al. 2017. Bacterial communities during the period of massive under-ice dinoflagellate development in Lake Baikal. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 86: 524-532. DOI: [10.7868/S0026365617040036](https://doi.org/10.7868/S0026365617040036) (in Russian)

Borisenko I.M., Pronin N.M., Shaibonov B.B. 1994. Gusinoe Lake ecology. Ulan-Ude: Buryat Scientific Centre SB RAS. (in Russian)

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7: 335–336. DOI: [10.1038/nmeth.f.303](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303)

Cray J.A., Bell A.N., Bhaganna P. et al. 2013. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microbial Biotechnology* 5: 453-92. DOI: [10.1111/1751-7915.12027](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12027)

Dagurova O.P., Tsydenova B.V., Buruykhaev S.P. et al. 2021. Microbiological indicators of fresh lakes of Eravno-Kharginskaya lake system. *Bulletin of Buryat state university. Biology, geography* 1: 99-103. DOI: [10.18101/2587-7148-2021-1-99-103](https://doi.org/10.18101/2587-7148-2021-1-99-103) (in Russian)

Lake Kotokelskoye: natural conditions, biota, ecology. 2013. In: Pronin N.M., Ubugunov L.L. (Eds.) Ulan-Ude: Publishing house BSC SB RAS. (in Russian)

Lee C.S., Kim M., Lee C. et al. 2016. The microbiota of recreational freshwaters and the implications for environmental and public health. *Frontiers in Microbiology* 7: 1826. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01826](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01826)

Newton R.J., Jones S.E., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 14–49. DOI: [10.1128/MMBR.00028-1](https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-1)

Thapaliya D., Hellwig E.J., Kadariya J. et al. 2017. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on public recreational beaches in Northeast Ohio. *Geohealth* 1: 320-332. DOI: [10.1002/2017GH000106](https://doi.org/10.1002/2017GH000106)

Zaitseva S.V., Dagurova O.P., Kozyreva L.P. 2021. Microbiological indicators for assessing the ecological status of freshwater lakes in Buryatia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 885: 012067. DOI: [10.1088/1755-1315/885/1/012067](https://doi.org/10.1088/1755-1315/885/1/012067)



# Особенности микробных сообществ пресных озер Бурятии

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Дагурова О.П.<sup>1</sup>, Зайцева С.В.<sup>1</sup>, Цыденова Б.В.<sup>2</sup>, Козырева Л.П.<sup>1</sup>,  
Бурюхаев С.П.<sup>1</sup>, Дамбаев В.Б.<sup>1</sup>, Бархутова Д.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской Академии Наук, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047, Россия

<sup>2</sup> Геологический институт им. Н.Л. Добрецова Сибирского отделения Российской Академии Наук, ул. Сахьяновой, 6а, Улан-Удэ, 670047, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Был изучен таксономический состав микробных сообществ восьми крупных пресных озер Бурятии, имеющих водохозяйственное, рыбохозяйственное и рекреационное значение: Байкал, Котокель, Гусиное, Щучье и озер Еравно-Харгинской группы - Исинга, Гунда, Сосновое, Большое Еравное. Микробные сообщества изученных озер на уровне филумов были схожи и состояли из таксонов, типичных для пресноводных экосистем: *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*, различаясь по содержанию филумов в сообществе. На уровне родов во всех озерах наиболее часто встречались представители двух таксонов – *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Среди других доминирующих таксонов на уровне рода в пресных озерах Прибайкалья доминировали *Flavobacterium* и клада *hgcI*, в Еравно-Харгинских озерах – *Exiguobacterium* и *Klebsiella*. В Еравно-Харгинских озерах наблюдалось увеличение доли родов *Exiguobacterium* и *Klebsiella*, обнаружение санитарно-значимых бактерий, что может свидетельствовать о загрязнении озер в результате различных факторов, в том числе антропогенных.

**Ключевые слова:** микробное сообщество, таксономический состав, пресные озера, Республика Бурятия

Для цитирования: Дагурова О.П., Зайцева С.В., Цыденова Б.В., Козырева Л.П., Бурюхаев С.П., Дамбаев В.Б., Бархутова Д.Д. Особенности микробных сообществ пресных озер Бурятии // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 870-876. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-870

## 1. Введение

Изучение пресных водоемов, используемых для различных целей водоснабжения, а также как незаменимый источник питьевой воды, имеет огромное значение. Микробные сообщества являются важным компонентом экосистемы пресных озер, они участвуют в процессах самоочищения водоема, играют важную роль в биогеохимических циклах, могут служить индикатором изменений экосистемы в результате воздействия природных и антропогенных факторов. Качественная и количественная оценка микробных сообществ пресных озер важна для определения трофического статуса водоемов и особенностей его функционирования, сохранения качества воды.

На территории Республики Бурятии, помимо уникального озера Байкал, являющимся огромным резервуаром чистой воды, расположены

пресные озера, имеющие водохозяйственное и рекреационное значение и испытывающие антропогенную нагрузку (Борисенко и др., 1994; Озеро Котокельское..., 2013). На востоке республики находится крупная Еравно-Харгинская озерная система. Еравнинские озера одни из самых рыбопродуктивных в Бурятии. Крупнейшее (после Байкала) озеро Гусиное является водоемом-охладителем Гусиноозерской ГРЭС. Озеро Котокель пережило экологическую катастрофу. Прибрежная зона озера Байкал и озера Щучье испытывают рекреационную нагрузку. Целью работы было определение особенностей таксономического состава микробного сообщества воды крупных пресных озер Бурятии.

## 2. Материалы и методы

Объектами исследования выбраны восемь крупных пресных озер Бурятии – Байкал (прибреж-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [dagur-ol@mail.ru](mailto:dagur-ol@mail.ru) (О.П. Дагурова)

Поступила: 04 июня 2024; Принята: 20 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



но-рекреационная зона), Котокель (Прибайкальский район), Гусиное, Щучье (Селенгинский район) и озера Еравно-Харгинской группы - Исинга, Гунда, Сосновое, Большое Еравное (Еравнинский район).

Пробы для исследований отбирали в августе 2019 г. в 3-4 различных точках с подповерхностного горизонта в стерильную посуду. Таксономический состав исследуемых озер определяли методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК в трех технических повторностях. Для выделения ДНК из образцов воды был использован набор реактивов NucleoSpin Soil (MACHERY-NAGEL, Германия). Секвенирование проводили в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США). Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывались с использованием пакетов ПО «Trimmomatic» и «QIIME» (Caporaso et al., 2010). Таксономическая идентификация ОТЕ проводилась с помощью базы данных RDP.

### 3. Результаты и обсуждение

Микробные сообщества озер на уровне филумов были схожи. В микробном сообществе всех изученных озер доминировали представители *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* и *Cyanobacteriota* (Таблица 1). Филумы *Firmicutes*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia* являлись субдоминантами. Широкое распространение этих филумов характерно для сообществ пресноводных озер (Newton et al., 2011). В пресных озерах Прибайкалья Котокель, Гусиное, Щучье и в прибрежной пляжной зоне озера Байкал наблюдалось большее распространение филумов *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Verrucomicrobiota*. В Еравно-Харгинских озерах возростала доля филумов *Planctomycetota* и особенно филума *Firmicutes* (до 34%). В отдельных точках отбора озер Гунда, Сосновое, Большое Еравное выявлен филум *Deinococcus-Thermus* в количестве 0,25-9,3%.

В таблице 2 представлены наиболее распространенные рода бактерий в микробных сообществах изученных озер (более 1%). В распределении родов бактерий были обнаружены сходства и различия. Наиболее часто встречались во всех озерах представители двух родов – *Acinetobacter* (до 25%) и *Pseudomonas* (до 20%). При благоприятных условиях они способны доминировать в природных экосистемах, подавляя развитие других родов (Cray et al., 2013). Доминирование этих родов в сообществах в озере Котокель и Еравно-Харгинских озерах (Исинга, Большое Еравное, Гунда, Сосновое) может свидетельствовать о возможном изменении структуры сообщества при природных и антропогенных воздействиях на экосистему. Другие доминирующие таксоны на уровне рода в микробных сообществах озера Байкал и озерах Прибайкалья, с одной стороны, и в Еравно-Харгинских озерах, с другой стороны, сильно различались. В озере Байкал и в озерах Прибайкалья были широко представлены *Flavobacterium* (до 17%) и клады *hgcl* (до 18%), широко распространенные в пресноводных водоемах. Также постоянным компонентом сообщества были *Sediminibacterium* (до 7%) и цианобактерии *Azolla filiculoides* (до 5%). В Еравно-Харгинских озерах также, как и в озерах Прибайкалья, также доминировали представители родов *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Значимую долю в сообществе составляли *Exiguobacterium* (до 12%), *Microbacterium* (до 6%), *Massilia* (до 8%). Увеличение доли рода *Exiguobacterium* наблюдалось в микробном сообществе рекреационных загрязненных вод пресных озер США (Lee et al., 2016). Также постоянным компонентом сообщества были бактерии родов *Brevundimonas*, *Cyanobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, относящиеся к типичным обитателям пресноводных экосистем. Представители рода *Microbacterium* и *Massilia* были ранее обнаружены в микробном сообществе воды озера Байкал (Башенхаева и др., 2017). В озерах Исинга и Гунда в значительных количествах выявлены последовательности р. *Klebsiella* семейства *Enterobacteriaceae*, составляя в среднем 13% в пробах озера Гунда и 3% в пробах из озера Исинга.

Таблица 1. Содержание основных бактериальных филумов в микробных сообществах воды пресных озер Бурятии

Филумы бактерий	Байкал и озера Прибайкалья	Еравно-Харгинские озера	Среднее значение
Доминанты			
<i>Pseudomonadota</i>	26 -66	48-75	49,4 ± 2,88
<i>Actinobacteriota</i>	7-28	4-35,6	16,1 ± 13,73
<i>Bacteroidota</i>	12-54	0,3-8,7	15,5 ± 4,56
<i>Cyanobacteriota</i>	0,6-30	0,9-6,5	7,4 ± 3,82
Субдоминанты			
<i>Firmicutes</i>	0,01-2	1,2-34,6	4,1 ± 2,31
<i>Planctomycetes</i>	0,2-4	0-10,5	2,8 ± 2,82
<i>Verrucomicrobiota</i>	2-12	0,05-1,9	2,6 ± 4,72
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0-0,4	0-9,3	1,0 ± 2,01
Другие	0,4-1,6	0-2,7	0,6 ± 0,74

Таблица 2. Содержание основных бактериальных родов в микробных сообществах воды пресных озер Бурятии

Род	Байкал	Котокель	Гусиное	Щучье	Б. Еравное	Гунда	Исинга	Сосновое
<i>Acinetobacter</i>	4,07	<b>14,31</b>	-	2,44	<b>24,99</b>	<b>22,13</b>	14,5	<b>25,17</b>
<i>Pseudomonas</i>	<b>20,10</b>	7,22	-	3,72	5,40	2,78	<b>16,7</b>	8,49
<i>Cyanobium_PCC-6307</i>	2,73	-	-	4,51	3,57	1,43	0,56	1,27
<i>Flavobacterium</i>	7,80	13,13	<b>17,48</b>	16,22	-	-	-	1,97
<i>hgcI clade</i>	9,90	10,06	15,85	<b>18,23</b>	-	-	-	-
<i>Sediminibacterium</i>	1,03	6,69	2,25	7,40	-	-	-	-
<i>Azolla filiculoides</i>	5,23	4,42	3,70	3,95	-	-	-	-
<i>Rhodofera</i>	4,26	0,94	4,63	1,47	-	-	-	-
<i>Luteolibacter</i>	4,80	1,75	-	-	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium</i>	-	-	-	-	12,10	2,74	11,5	4,27
<i>Klebsiella</i>	-	-	-	-	-	13,10	2,90	-
<i>Massilia</i>	-	-	-	-	8,60	2,60	-	8,00
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	5,10	3,23	6,37	-
<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	-	2,87	2,31	2,62	5,87
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	-	-	1,77	4,13	-

Примечание: прочерк – содержание менее 1%, жирный шрифт – максимальное значение для озера

*Klebsiella* — род условно-патогенных бактерий, являющихся показателем вероятного фекального загрязнения. В озерах Исинга и Гунда, где обнаружена высокая доля клебсиелл, также обнаружены повышенные значения общего микробного числа и выявлялись колиформные бактерии (Дагурова и др., 2021). В озере Исинга также были обнаружены *Staphylococcus* (1,13%) и *Streptococcus* (1,67%). Возможно, это связано с выпасом крупного рогатого скота, который интенсивно выпасивается на озерах Исинга и Гунда. Ранее на пресноводных пляжах наличие *Staphylococcus aureus* обнаруживалось почти в половине проб (Tharaliya et al., 2017). Увеличение доли рода *Exiguobacterium* в сообществе и обнаружение энтеробактерий рода *Klebsiella* в озерах Исинга и Гунда свидетельствуют о загрязнении озер в результате антропогенной нагрузки. Ранее по бактериальному эвтрофному индексу, рассчитываемому на основе состава микробных сообществ, установлено, что озера Бурятии подвержены риску эвтрофикации (Zaitseva et al., 2021).

#### 4. Выводы

Микробные сообщества изученных озер на уровне филумов были схожи и состояли из таксонов, типичных для пресноводных экосистем: *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*, различаясь по содержанию филумов в сообществе. На уровне родов во всех озерах наиболее часто встречались представители двух таксонов – *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. По другим доминирующим таксонам на уровне рода две группы озер – пресные озера Прибайкалья и Байкал и Еравно-Харгинские озера – сильно различались. В пресных озерах Прибайкалья доминировали *Flavobacterium* и клада *hgcI*, в Еравно-Харгинских озерах –

*Exiguobacterium* и *Klebsiella*. В Еравно-Харгинских озерах наблюдались особенности состава микробных сообществ, такие, как увеличение доли родов *Exiguobacterium* и *Klebsiella*, обнаружение санитарно-значимых родов бактерий, что может свидетельствовать о загрязнении озер в результате различных факторов, в том числе антропогенных.

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках темы Госзадания № 121030100229-1.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р., Галачянц Ю.П. и др. 2017. Сообщества бактерий в период массового подледного развития динофлагеллят в озере Байкал. Микробиология 86: 510–519. DOI: [10.7868/S0026365617040036](https://doi.org/10.7868/S0026365617040036)
- Борисенко И.М., Пронин Н.М., Шайбонов Б.Б. и др. 1994. Экология озера Гусиное. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН.
- Дагурова О.П., Цыденова Б.В., Бурюхаев С.П. и др. 2021. Микробиологические показатели вод пресных озер Еравно-Харгинской системы. Вестник Бурятского государственного университета. Биология, география 1: 99–103. DOI: [10.18101/2587-7148-2021-1-99-103](https://doi.org/10.18101/2587-7148-2021-1-99-103)
- Озеро Котокельское: природные условия, биота, экология. 2013. В: Пронин Н.М., Убугунов Л.Л. (Ред.). Улан-Удэ: БНЦ СО РАН.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods 7: 335–336. DOI: [10.1038/nmeth.f.303](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303)

Cray J.A., Bell A.N., Bhaganna P. et al. 2013. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microbial Biotechnology* 5: 453-92. DOI: [10.1111/1751-7915.12027](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12027)

Lee C.S., Kim M., Lee C. et al. 2016. The microbiota of recreational freshwaters and the implications for environmental and public health. *Frontiers in Microbiology* 7: 1826. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01826](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01826)

Newton R.J., Jones S.E., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 14-49. DOI: [10.1128/MMBR.00028-1](https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-1)

Thapaliya D., Hellwig E.J., Kadariya J. et al. 2017. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on public recreational beaches in Northeast Ohio. *Geohealth* 1: 320-332. DOI: [10.1002/2017GH000106](https://doi.org/10.1002/2017GH000106)

Zaitseva S.V., Dagurova O.P., Kozyreva L.P. 2021. Microbiological indicators for assessing the ecological status of freshwater lakes in Buryatia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 885: 012067. DOI: [10.1088/1755-1315/885/1/012067](https://doi.org/10.1088/1755-1315/885/1/012067)



# Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of *Bacillus velezensis* S18



Elistratova A.A., Shirshikova T.V., Ivoilova T.M., Sharipova M.R., Khilyas I.V.\*

Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, Russian Federation

**ABSTRACT.** The high anthropogenic load of heavy metals on water resources has a negative impact on all living organisms, causing environmental, medical and economic problems. One of the most ubiquitous microorganisms in aquatic ecosystems is the genus *Bacillus*. The study of the mechanisms by which *Bacillus* bacteria adapt to heavy metal exposure contributes significantly to the understanding of physiological and biotechnological processes. This study focuses on the effect of heavy metals on the production of siderophores by the endolithic strain *Bacillus velezensis* S18. The *B. velezensis* S18 strain was found to demonstrate resistance towards high concentrations of heavy metals, as well as the ability to secrete siderophores. Thus, *B. velezensis* S18 has significant potential for the detoxification and recovery of metals from contaminated surface and groundwater.

**Keywords:** siderophores, *Bacillus*, heavy metals

**For citation:** Elistratova A.A., Shirshikova T.V., Ivoilova T.M., Sharipova M.R., Khilyas I.V. Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of *Bacillus velezensis* S18 // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 877-880. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-877](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-877)

## 1. Introduction

One of the most pressing issues facing our environment is the contamination of aquatic ecosystems by heavy metals and metalloids. This is a direct result of industrial activities, urban services and the use of chemical fertilisers in agriculture (Roskova et al., 2022). High anthropogenic load of heavy metals on water resources has a negative impact on all living organisms, causing environmental, health and economic problems. Biological methods are the safest and most effective way to treat and recover surface, groundwater and wastewater. The key role in the bioremediation process belongs to microorganisms, which have developed various mechanisms of resistance to heavy metals (Gadd, 2010). Microbial siderophores are low molecular weight organic compounds that have high affinity for iron ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) and other metals, which provides a high potential for application in detoxification processes and extraction of metals from polluted waters (Hofmann et al., 2021). Bacteria of the genus *Bacillus* have adapted to the conditions of life in a wide variety of ecological niches, including freshwater and marine aquatic systems. Members of the genus *Bacillus* are known to be resistant to heavy metals and also produce various siderophores (Khan et al., 2016). The aim of this work was to investigate the effect of heavy metals

on the production of siderophores by endolithic strain *Bacillus velezensis* S18.

## 2. Materials and methods

**Isolation and Identification.** The strain S18 was isolated from an ultramafic rock, serpentinite. Genomic DNA from strain S18 was extracted from an overnight LB-grown culture using the phenol-chloroform method. The 16S rRNA gene (1500 bp) was amplified with polymerase chain reaction, then sequenced using instrument ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, USA) following Sanger's method. The bacterial sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

**Heavy Metal Resistance.** *Bacillus velezensis* S18 was exposed to different concentrations of heavy metals ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) to determine their minimum inhibitory concentrations (MICs).

**Siderophore Production Screening.** The Chrome Azurol S (CAS) agar assay was used for screening *B. velezensis* S18 capacity for siderophore production (Payne, 1994). Additionally, a replacement of  $\text{Fe}^{3+}$  with heavy-metal ions ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) in the standard CAS agar method was tested (Sarvepalli et al., 2023).

\*Corresponding author.

E-mail address: [irina.khilyas@gmail.com](mailto:irina.khilyas@gmail.com) (I.V. Khilyas)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



### 3. Results and discussion

The endolithic strain *B. velezensis* S18 was isolated from a serpentinite (Khalilovsky massif, Orenburg region, Russia) (Khilyas et al., 2019). A comparative analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of the strain S18 revealed the highest similarity with the typical strain of *Bacillus velezensis* strain L-15. The resistance of the *B. velezensis* S18 to different concentrations of heavy metals was evaluated on LA medium for determination of minimum inhibitory concentrations (MIC). The *B. velezensis* S18 demonstrated the capacity of surviving in heavy metals concentrations of 2 mM Ni<sup>2+</sup>, 1 mM Co<sup>2+</sup>, 0.5 mM Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, 3 mM Cu<sup>2+</sup>, 4 mM Zn<sup>2+</sup> and 5 mM Fe<sup>3+</sup>. The capacity of *B. velezensis* S18 to secrete siderophores on standard CAS-agar medium was demonstrated. Replacement of Fe<sup>+3</sup> ion with Al<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Ga<sup>+3</sup> ions revealed the formation of increased halo zones formed around the *B. velezensis* S18.

### 4. Conclusion

The endolithic strain *Bacillus velezensis* S18 has the capacity to synthesize metal-binding metabolites and to resist to heavy metals. This determines its potential ecological and biotechnological significance. The binding of heavy metals by *B. velezensis* S18 siderophores offers new avenues for the development of biotechnologies in the field of biometallurgy, as well as the detoxification of metals in surface water and wastewater.

### 5. Funding

This research was supported by the RSF grant (Russian Science Foundation) № 24-24-00473.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156(3): 609-643. DOI: [10.1099/mic.0.037143-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0)
- Hofmann M., Heine T., Malik L. et al. 2021. Screening for microbial metal-chelating Siderophores for the removal of metal ions from solutions. *Microorganisms* 9(1): 111. DOI: [10.3390/microorganisms9010111](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010111)
- Khan A., Doshi H.V., Thakur M.C. 2016. *Bacillus* spp.: a prolific siderophore producer. In: Islam M., Rahman M., Pandey P. et al. (Ed.), *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, pp. 309-323 DOI: [10.1007/978-3-319-44409-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13)
- Khilyas I.V., Sorokina A.V., Elistratova A.A. et al. 2019. Microbial diversity and mineral composition of weathered serpentinite rock of the Khalilovsky massif. *PLoS One* 14(12): e0225929. DOI: [10.1371/journal.pone.0225929](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225929)
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 235: 329-344. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. 2022. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of the Total Environment* 819: 153144. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.153144](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144)
- Sarvepalli M., Velidandi A., Korrapati N. 2023. Optimization of siderophore production in three marine bacterial isolates along with their heavy-metal chelation and seed germination potential determination. *Microorganisms* 11(12): 2873. DOI: [10.3390/microorganisms11122873](https://doi.org/10.3390/microorganisms11122873)

# Влияние тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Елистратова А.А., Ширшикова Т.В., Ивойлова Т.М., Шарипова М.Р., Хиляс И.В.\*

Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, д.18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Высокая антропогенная нагрузка тяжелыми металлами на водные ресурсы оказывает негативное влияние на все живые организмы, вызывая экологические, медицинские и экономические проблемы. Одними из наиболее распространенных микроорганизмов водных систем являются бактерии рода *Bacillus*. Исследование механизмов адаптации бактерий рода *Bacillus* к воздействию тяжелыми металлами вносит существенный вклад в понимание физиологических и биотехнологических процессов. Исследование посвящено влиянию тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18. Штамм *B. velezensis* S18 проявляет устойчивость к высоким концентрациям тяжелых металлов и способен секретировать сидерофоры. Таким образом, *B. velezensis* S18 обладает значительным потенциалом для детоксикации и извлечения металлов из загрязненных поверхностных и грунтовых вод.

**Ключевые слова:** сидерофоры, *Bacillus*, тяжелые металлы

Для цитирования: Елистратова А.А., Ширшикова Т.В., Ивойлова Т.М., Шарипова М.Р., Хиляс И.В. Влияние тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18 // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 877-880. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-877

## 1. Введение

Одной из наиболее острых проблем загрязнения окружающей среды является попадание тяжелых металлов и металлоидов в водные экосистемы в результате деятельности промышленных предприятий, городских служб и применения химических удобрений в сельском хозяйстве (Roskova et al., 2022). Высокая антропогенная нагрузка тяжелыми металлами на водные ресурсы оказывает негативное влияние на все живые организмы, вызывая экологические, медицинские и экономические проблемы. Для очистки и восстановления поверхностных, подземных и сточных вод разрабатываются биологические методы, которые относятся к наиболее безопасным и эффективным. Ключевая роль в процессе биоремедиации принадлежит микроорганизмам, которые выработали различные механизмы устойчивости к тяжелым металлам (Gadd, 2010). Микробные сидерофоры – низкомолекулярные органические соединения, которые обладают высокой аффинностью к ионам железа ( $Fe^{3+}$ ) и другим металлам, что обеспечивает высокий потенциал для применения в процессах детоксикации и извлечения металлов из

загрязненных вод (Hofmann et al., 2021). Бактерии рода *Bacillus* адаптировались к условиям жизнедеятельности в самых разнообразных эконических, включая пресноводные и морские водные системы. Известно, что представители рода *Bacillus* обладают устойчивостью к тяжелым металлам, а также продуцируют различные сидерофоры (Khan et al., 2016).

Цель данной работы - исследование влияния тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18.

## 2. Материалы и методы

**Выделение и идентификация.** Штамм S18 выделен из ультрамафической горной породы – серпентинита. Геномная ДНК штамма S18 выделена фенол-хлороформным методом. Фрагмент гена 16S рРНК (1500 п.н.) амплифицировали с помощью ПЦР, а затем секвенировали на приборе ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, США) по методу Сэнгера. Последовательность гена штамма *Bacillus velezensis* S18 анализировали с помощью программы Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [irina.khilyas@gmail.com](mailto:irina.khilyas@gmail.com) (И.В. Хиляс)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



**Устойчивость к тяжелым металлам.** Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) тяжелых металлов, культуру *B. velezensis* S18 выращивали на агаризованной среде Лурия-Бертани в присутствии различных концентраций  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ .

**Способность к продукции сидерофоров** штаммом *B. velezensis* S18 определяли с использованием агаризованной среды, содержащей хром азурол S (CAS-агар) (Payne, 1994). Дополнительно, проводили скрининг продукции сидерофоров в CAS-агар среде, в которой  $\text{Fe}^{3+}$  замещали ионами тяжелых металлов ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) (Sarvepalli et al., 2023).

### 3. Результаты и обсуждение

Эндолитный штамм *B. velezensis* S18 выделен из минерала группы серпентинита (Халиловский массив, Оренбургская область, Россия) (Khilyas et al., 2019). Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма *B. velezensis* S18 показал наибольшее сходство с типовым штаммом *Bacillus velezensis* strain L-15. Устойчивость штамма *B. velezensis* S18 к различным концентрациям тяжелых металлов проверяли на агаризованной среде Лурия-Бертани для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Обнаружили устойчивость штамма *B. velezensis* S18 к тяжелым металлам в концентрациях 2 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ , 1 мМ  $\text{Co}^{2+}$ , 0.5 мМ  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , 3 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ , 4 мМ  $\text{Zn}^{2+}$  и 5 мМ  $\text{Fe}^{3+}$ . Показали способность штамма *B. velezensis* S18 секретировать сидерофоры на стандартной среде CAS-агар. Замещение иона  $\text{Fe}^{3+}$  на ионы  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Ga}^{3+}$  в среде CAS-агар выявило формирование зон просветления вокруг колонии большего диаметра по сравнению со стандартной средой.

### 4. Выводы

Эндолитный штамм *Bacillus velezensis* S18 обладает способностью продуцировать металлсвязывающие метаболиты, а также устойчив к тяжелым металлам, что определяет его потенциальную

экологическую и биотехнологическую значимость. Связывание тяжелых металлов с помощью сидерофоров *B. velezensis* S18 предоставляет новые горизонты для разработки биотехнологий в области биометаллургии, а также детоксикации металлов в поверхностных и сточных водах.

### 5. Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке (за счет средств) гранта РФФИ № 24-24-00473.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156(3): 609-643. DOI: [10.1099/mic.0.037143-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0)
- Hofmann M., Heine T., Malik L. et al. 2021. Screening for microbial metal-chelating Siderophores for the removal of metal ions from solutions. *Microorganisms* 9(1): 111. DOI: [10.3390/microorganisms9010111](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010111)
- Khan A., Doshi H.V., Thakur M.C. 2016. *Bacillus* spp.: a prolific siderophore producer. In: Islam M., Rahman M., Pandey P. et al. (Ed.), *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, pp. 309-323 DOI: [10.1007/978-3-319-44409-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13)
- Khilyas I.V., Sorokina A.V., Elistratova A.A. et al. 2019. Microbial diversity and mineral composition of weathered serpentine rock of the Khalilovsky massif. *PLoS One* 14(12): e0225929. DOI: [10.1371/journal.pone.0225929](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225929)
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 235: 329-344. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. 2022. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of the Total Environment* 819: 153144. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.153144](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144)
- Sarvepalli M., Velidandi A., Korrapati N. 2023. Optimization of siderophore production in three marine bacterial isolates along with their heavy-metal chelation and seed germination potential determination. *Microorganisms* 11(12): 2873. DOI: [10.3390/microorganisms11122873](https://doi.org/10.3390/microorganisms11122873)



# Bacteriophages from waters of the Volga region



Fedorova M.S.\*, Mutallapova G.I., Aznabayeva Z.A., Ilyina V.N., Zakarova N.D., Yadykova L.L., Trizna E.Y., Kayumov A.R.

Kazan (Volga Region) Federal University, 18 Kremlevskaya str., Kazan, 420008, Russia, Republic of Tatarstan

**ABSTRACT.** One of the promising approaches to the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria looks a therapy with bacteriophage. While bacteriophages are indifferent to bacterial resistance to antibiotics, bacteriophages are generally strain-specific, i.e., various isolates of the same bacterium can be insensitive to the given phage, that requires the creation of the library of bacteriophages. Here we report the isolation from wastewater from the city of Kazan (Republic of Tatarstan) the number of bacteriophages virulent against a number of opportunistic bacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* and *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* Enteritidis and Typhimurium). Phages formed a clear plaques on the bacterial lawn and had a titer up to  $10^9$  PFU/ml. Additionally, the polyvalent properties of bacteriophages were revealed: KES1, KES2 are lytic against *C. sakazakii* and *S. enterica* serovar Enteritidis, KST1 lyses *S. enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium, KEF1 is virulent against *E. faecalis* and *S. enterica* serovar Enteritidis.

**Keywords:** bacteriophages, waste waters, infectious diseases

**For citation:** Fedorova M.S., Mutallapova G.I., Aznabayeva Z.A., Ilyina V.N., Zakarova N.D., Yadykova L.L., Trizna E.Y., Kayumov A.R. Bacteriophages from waters of the Volga region // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 881-887. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-881](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-881)

## 1. Introduction

In recent decades, the improper use of antibiotics has significantly increased the spread of bacteria resistance to various antimicrobials. Being a great threat to the health of humanity, the multidrug resistant bacteria contribute to the development of nosocomial infections with increased mortality (Scholtz et al., 2021; Ma et al., 2020). To the date, 12 species of multidrug-resistant bacteria playing a major role in the occurrence of difficult-to-treat infections are included in the list of World Health Organization (WHO) (Rice, 2008; Hoenes et al., 2021; Kalpana et al., 2023). Among them, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enterica* (serovars) cause infections of the genitourinary system and the gastrointestinal tract in humans (Chang et al., 2021; Bonten et al., 2021; Zhou et al., 2021; Cattoir, 2022; Mkgangara, 2023). The use of bacteriophages can be a promising alternative to antimicrobial therapy for these infections. The main advantage of bacteriophages is their insensitivity to antibiotic resistance (Alharbi and Ziadi, 2021; Pirnay, 2020). Therefore, phages can be

used individually or in combination with conventional antimicrobials (Lewis, 2020; Hatfull et al., 2022). From the other hand, bacteriophages are generally strain-specific, i.e., various isolates of the same bacterium can be insensitive to the given phage. Therefore, a mixture of phages targeting various bacterial isolates should be used for the treatment of the infection, and the library of bacteriophages should be available (Abedon et al., 2021) and therefore the wastewaters and the natural waters are reservoirs for these viral particles. In this study, bacteriophages were isolated from wastewater from the city of Kazan (Republic of Tatarstan), virulent against *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis*, and *S. enterica* (serovars).

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*Enterococcus faecalis* strains ATCC 19433 NCTC 775, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 NCTC 9633, *Enterobacter* (*Cronobacter*)

\*Corresponding author.

E-mail address: [MaSFedorova97@mail.ru](mailto:MaSFedorova97@mail.ru) (M.S. Fedorova)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



sakazakii CCM 3461, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis WHO, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Bacteria were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth (Sambrook et al., 1989). The agarized medium, LB (A), includes an additional 2% agar. Semi-liquid agarized medium contained (g/l): agar - 6; NaCl - 6.

## 2.2. Sample preparation

A water sample (100 ml) was filtered through a paper filter to remove big particles and the resulting filtrate was then filtered twice through a nitrocellulose membrane with a pore diameter of 0.45 µm, with final filtration through a syringe filter with a pore diameter of 0.22 µm.

## 2.3. Preparation of concentrated sterile phagolysates

The resulting sterile filtrate was mixed in a ratio of 1:1 with a 3 × LB broth, and the resulting suspension was mixed in a ratio of 1:1 with an overnight culture of the host bacterium. Bacteria were incubated with shaking for 24 hours at 30 °C. Next, the cells were removed by centrifugation for 40 minutes at 4000 rpm and 4 °C and the chloroform was added (3% v/v). After the incubation for 24 hours at 4 °C, the mixture was centrifuged at 4000 rpm and filtered through a syringe nitrocellulose filter with a pore diameter of 0.22 µm.

## 2.4. Bacteriophages detection

The presence of bacteriophages was evaluated by the lysis zones formation in Otto assay (Otto et al., 1922) and the spot assay. Morphology and separation of phage plaques were performed using serial dilutions of phagolysates by the Gratia approach (Gratia, 1936).

## 3. Results and discussions

Isolation of bacteriophages lysing bacteria *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, and *S. enterica* (serovars).

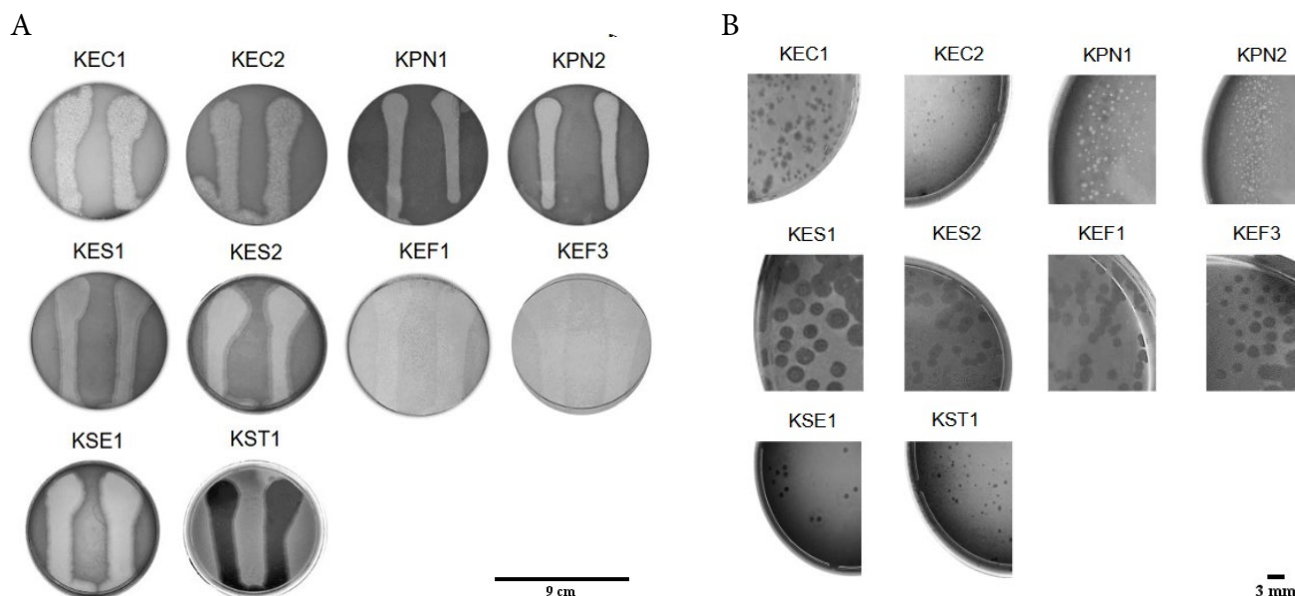
Bacteriophages lysing *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *S. enterica* (serovars) were isolated from wastewaters Kazan city (Republic of Tatarstan) (Fig. 1A). Lysis zones were formed on the lawn of each bacterium, indicating the presence of lytic bacteriophages in the corresponding suspension, virulent against the target host bacterium as indicated.

Next, the morphology of bacteriophage plaques was analyzed. For that, serial dilution of phage lysates were prepared according to the Gratia approach. Several types of plaques have been observed on the agar cup, which probably indicates the different nature of bacteriophages. Each type of plaque has been isolated and phages have been purified until apparent homogeneity of plaques formed on the solid medium (Fig. 1B).

Intriguingly, during the strain-specificity test the polyvalent properties of some phages have been discovered. Thus, isolates KES1, KES2 turned out to be virulent against the bacteria *C. sakazakii* and serovar Enteritidis *S. enterica*. Bacteriophage KST1 lysed bacteria *S. enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. The KEF1 bacteriophage was effective against both *S. enterica* serovar Enteritidis and *E. faecalis* (Fig. 2). Polyvalent bacteriophages are known to be more effective against bacterial infections (Abedon et al., 2021). Therefore, the ES1, ES2 KST1 and KEF1 can be of interest for further investigations.

## 4. Conclusions

In this work, ten bacteriophages lysing opportunistic bacteria *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii* и *E. faecalis*, *S. enterica* (serovars) have been isolated: two bacteriophages against *K. pneumoniae*, two against *E. coli*, two against *C. sakazakii*, one against *S. enterica*



**Fig. 1.** Bacteriophages and their host bacteria: zones of lysis by bacteriophages on bacterial lawns of *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis* and *S. enterica* (serovars) in the Otto assay (A) and plaques in Gratia assay (B). Host strains: KEC1, KEC2 - *E. coli*; KPN1, KPN2 - *K. pneumoniae*, KES1, KES2 - *C. sakazakii*, KEF1, KEF3 - *E. faecalis*, KSE1, KST1 - *S. enterica* (serovars)

ica serovar Enteritidis and one against *S. enterica* serovar Typhimurium. Additionally, the polyvalent properties of bacteriophages were revealed: ES1, ES2 are lytic against *C. sakazakii* and *S. enterica* serovar Enteritidis, KST1 lyses *S. enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium, KEF1 is virulent against *E. faecalis* and *S. enterica* serovar Enteritidis.

## Acknowledgements

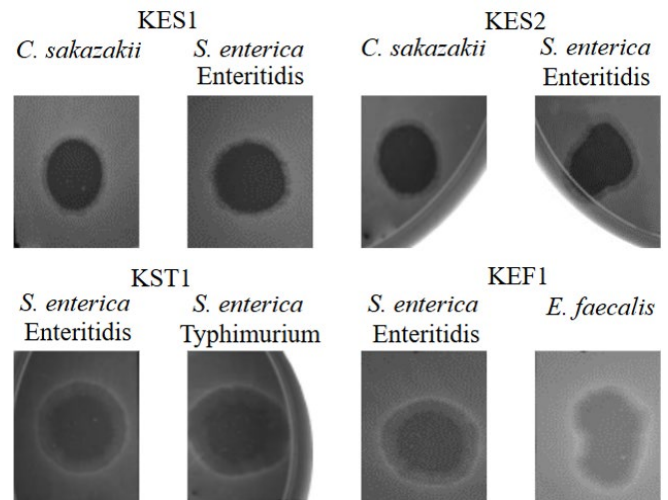
The work was carried out at the expense of a grant allocated to the Kazan Federal University to complete a task in the field of scientific activity. Project № FZSM2022-0017 (E.Y.Trizna).

## Conflict of interest

The author declare no conflicts of interest.

## References

- Abedon S.T., Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J. 2021. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth. *Pharmaceuticals* 14: 1019. DOI: [10.3390/ph14101019](https://doi.org/10.3390/ph14101019)
- Alharbi N.M., Ziadi M.M. 2021. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 4358-4364. DOI: [10.1016/j.sjbs.2021.04.025](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.025)
- Bonten M., Johnson J., Biggelaar A. et al. 2021. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases* 72: 1211-1219. DOI: [10.1093/cid/ciaa210](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210)
- Cattoir V. 2022. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology* 65: 73-80. DOI: [j.mib.2021.10.013](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.013)
- Chang D., Sharma L., Cruz C. et al. 2021. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. *Frontiers in microbiology* 12: 750662. DOI: [10.3389/fmicb.2021.750662](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662)
- Gratia A. 1936. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bacteriophages. *Annales de l'Institut Pasteur*. Masson Publishing, France.
- Hatfull G.F., Dedrick R.M., Schooley R.T. 2022. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annual review of medicine* 73: 197-211. DOI: [10.1146/annurev-med-080219-122208](https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208)
- Hoenes K., Bauer R., Meurle T. et al. 2021. Inactivation effect of violet and blue light on ESKAPE pathogens and closely related non-pathogenic bacterial species—a promising tool against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant microorganisms. *Frontiers in microbiology* 11: 612367. DOI: [10.3389/fmicb.2020.612367](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612367)
- Kalpana S., Lin W., Wang Y. et al. 2023. Antibiotic Resistance Diagnosis in ESKAPE Pathogens—A Review on Proteomic Perspective. *Diagnostics* 13: 1014. DOI: [10.3390/diagnostics13061014](https://doi.org/10.3390/diagnostics13061014)



**Fig.2.** Polyvalent properties of bacteriophages KES1, KES2, KST1, KEF1. Zones of lysis by bacteriophages on bacterial lawns of *C. sakazakii*, *E. faecalis* and *S. enterica* (serovars) in the spot assay

- Lewis K. 2020. The science of antibiotic discovery. *Cell* 181: 29-45. DOI: [10.1016/j.cell.2020.02.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056)
- Ma Y.X., Wang C., Li Y. et al. 2020. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science* 7: 1901872. DOI: [10.1002/advs.201901872](https://doi.org/10.1002/advs.201901872)
- Mkangara M. 2023. Prevention and control of human *Salmonella enterica* infections: An implication in food safety. *International Journal of Food Science* 2023. DOI: [10.1155/2023/8899596](https://doi.org/10.1155/2023/8899596)
- Otto R., Munter H., Winkler W.F. 1922. Contributions to the d'Hérelle phenomenon. *Journal of Hygiene and Infectious Diseases*. 96: 118-160.
- Pirnay J.P. 2020. Phage therapy in the year 2035. *Frontiers in Microbiology* 11: 538375. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01171](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01171)
- Rice L.B. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases* 197: 1079-1081. DOI: [10.1086/533452](https://doi.org/10.1086/533452)
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Scholtz V., Vankova E., Kasparova P. et al. 2021. Non-thermal plasma treatment of ESKAPE pathogens: a review. *Frontiers in Microbiology* 12: 737635. DOI: [10.3389/fmicb.2021.737635](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737635)
- Zhou A., Wang L., Zhang J. et al. 2021. Survival of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* in macrophages contributes to infections. *Microbial Pathogenesis* 158: 105064. DOI: [10.1016/j.micpath.2021.105064](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105064)



# Выделение бактериофагов из сточных вод г. Казани

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Федорова М.С.\*, Муталлапова Г.И., Азнабаева З.А., Ильина В.Н.,  
Закарова Н.Д., Ядыкова Л.Л., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия, Республика Татарстан

**АННОТАЦИЯ.** Одним из многообещающих подходов к лечению инфекций, вызванных бактериями со множественной лекарственной устойчивостью, является терапия бактериофагами. Хотя способность бактериофагов лизировать бактериальные клетки, как правило, не зависит от устойчивости последних к антибиотикам, сами бактериофаги штаммоспецифичны, т.е. различные изоляты одной и той же бактерии могут быть нечувствительны к определенному бактериофагу, что требует создания коллекции бактериофагов. В данном исследовании мы сообщаем о выделении из сточных вод города Казани (Республика Татарстан) бактериофагов, вирулентных в отношении ряда условно-патогенных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* и *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium). Бактериофаги формировали прозрачные бляшки на бактериальных газонах и лизировали культуру с образованием фаголизата с титром  $10^9$  БОЕ/мл и более. Кроме того, были выявлены поливалентные свойства отдельных штаммов: бактериофаги KES1, KES2 проявили литические свойства в отношении *C. sakazakii* и *S. enterica* серовара Enteritidis, бактериофаг KST1 лизировал *S. enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium, бактериофаг KEF1 оказался вирулентным в отношении бактерий *E. faecalis* и *S. enterica* серовар Enteritidis.

**Ключевые слова:** бактериофаги, сточные воды, инфекционные заболевания

Для цитирования: Федорова М.С., Муталлапова Г.И., Азнабаева З.А., Ильина В.Н., Закарова Н.Д., Ядыкова Л.Л., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р. Выделение бактериофагов из сточных вод г. Казани // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 881-887. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-881

## 1. Введение

За последние десятилетия неграмотное применение антибиотиков значительно усилило распространение бактериальной резистентности к различным противомикробным препаратам. Бактерии со множественной лекарственной устойчивостью способствуют развитию внутрибольничных инфекций с высокой смертностью, что является серьезной угрозой для здоровья всего человечества (Scholtz et al., 2021; Ma et al., 2020). На сегодняшний день в список Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) включены 12 видов бактерий со множественной лекарственной устойчивостью, представляющие ключевую роль в возникновении трудно поддающихся лечению инфекций (Rice, 2008; Hoenes et al., 2021; Kalpana et al., 2023). Среди таких бактерий представители *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus faecalis* и *Salmonella*

*enterica* (серовары), способные вызывать инфекции мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта (Chang et al., 2021; Bonten et al., 2021; Zhou et al., 2021; Cattoir, 2022; M कांगара, 2023). Использование бактериофагов может стать многообещающей альтернативой антимикробной терапии данных инфекций. Основным преимуществом бактериофагов является их нечувствительность к бактериальной антибиотикорезистентности (Alharbi and Ziadi, 2021; Pirnay, 2020). Следовательно, бактериофаги можно использовать отдельно в качестве самостоятельного препарата или в комбинации с традиционными противомикробными препаратами (Lewis, 2020; Hatfull et al., 2022). С другой стороны, бактериофаги, как правило, являются штаммоспецифичными, т.е. различные изоляты одной и той же бактерии могут быть нечувствительны к определенному бактериофагу. Следовательно, для лечения инфекций следует использовать смесь бактерио-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [MaSFedorova97@mail.ru](mailto:MaSFedorova97@mail.ru) (М.С. Федорова)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





фагов, нацеленных на различные бактериальные изоляты. Для создания бактериофаговых коктейлей необходимо создавать библиотеку бактериофагов (Abeldon et al., 2021). Известно, что сточные воды и природные водоемы являются хранилищами для обитания большинства бактериофагов. В данном исследовании из сточных вод города Казани (Республика Татарстан) были выделены бактериофаги, вирулентные против бактерий *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis* и *S. enterica* (сероваров).

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Бактериальные штаммы и условия роста

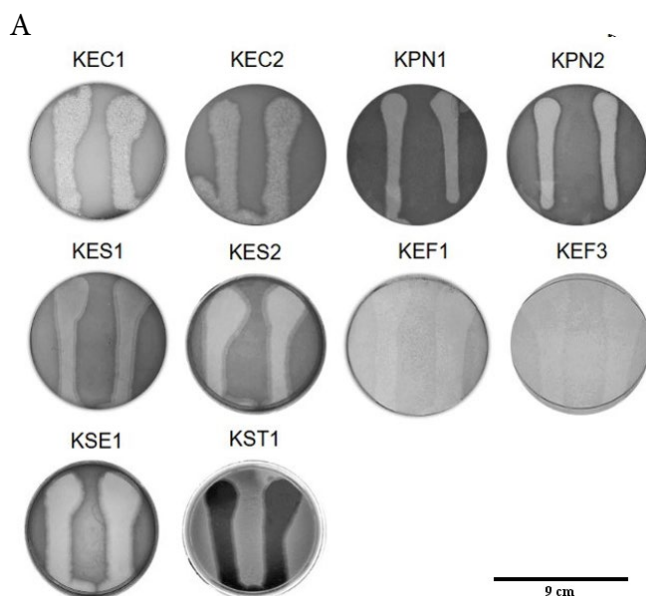
#### 2.2.

*Enterococcus faecalis* strains ATCC 19433 NCTC 775, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 NCTC 9633, *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii* CCM 3461, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* WHO, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028. Бактерии выращивали при температуре 37°C в среде Лурия-Бертани (LB) (Sambrook et al., 1989). Агаризованная среда LB (A) дополнительно содержала 2% агара. Полужидкая агаризованная среда содержала (г/л): агар - 6; NaCl - 6.

### 2.3. Подготовка образцов

Пробы, взятые из места сброса сточных вод, (100 мл) фильтровали через бумажный фильтр для удаления загрязнения (крупных частиц), затем полученный фильтрат дважды фильтровали через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм с окончательной фильтрацией через шприцевой фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

### 2.4. Приготовление концентрированных



## стерильных фаголизатов

Полученный стерильный фильтрат воды смешивали в соотношении 1:1 с 3×LB-бульона, полученную суспензию смешивали в соотношении 1:1 с бактериальной культурой –хозяином и инкубировали с качанием в течение 24 часов при 30°C. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 40 минут при 4000 об/мин и температуре 4°C, и добавляли хлороформ (3% от объема). После инкубации в течение 24 часов при температуре 4°C смесь центрифугировали при 4000 об/мин и фильтровали через нитроцеллюлозный шприцевой фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

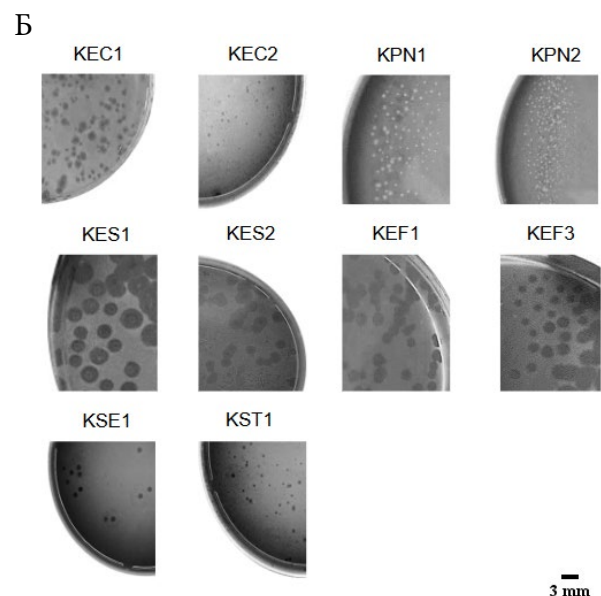
### 2.5. Обнаружение бактериофагов

Наличие бактериофагов оценивали по формированию на бактериальном газоне зон лизиса с помощью метода Отто (Otto et al., 1922) и точечного метода. Морфологию и разделения бактериофаговых бляшек проводили с использованием последовательных разведений фаголизатов методом Грация (Gratia, 1936).

## 3. Результаты и обсуждения

Выделение бактериофагов, лизирующих бактерии *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары)

Бактериофаги, лизирующие *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары), были выделены из сточных вод города Казани (Республика Татарстан) (Рис. 1А). На поверхности бактериальных газонов образовывались зоны лизиса в отношении бактерий-хозяев, указывающие на присутствие литических бактериофагов в соответствующей суспензии. Далее была проанализирована морфология бактериофаговых бляшек.



**Рис.1.** Бактериофаги и бактерии-хозяева: зоны лизиса бактериофагов на бактериальных газонах *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары) с помощью метода Отто (А); негативные колонии бактериофагов, метод Грация (Б). Бактериофаги и штаммы-хозяева: KEC1, KEC2 - *E. coli*; KPN1, KPN2 - *K. pneumoniae*, KES1, KES2 - *C. sakazakii*, KEF1, KEF3 - *E. faecalis*, KSE1, KST1 - *S. enterica* (серовары).

Для этого были приготовлены последовательные разведения фаголизатов согласно методу Грациа. На чашках с бактериальными газонами было обнаружено несколько типов бляшек, что указывало на наличие нескольких штаммов бактериофагов в пробе. Каждый тип бляшек был изолирован и очищен до получения последующей видимой однородности бляшек на бактериальном газоне (Рис. 1Б).

Интересно, что при оценке штаммоспецифичности бактериофагов у некоторых фаговых изолятов были обнаружены поливалентные свойства. Так, изоляты KES1, KES2 оказались вирулентными в отношении бактерий *C. sakazakii* и *S. enterica* серовара Enteritidis. Бактериофаг KST1 лизировал бактерии *S. enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium. Бактериофаг KEF1 был эффективен как против *S. enterica*, серовара Enteritidis, так и против *E. faecalis* (Рис. 2). Известно, что поливалентные бактериофаги более эффективны против бактериальных инфекций (Abedon et al., 2021). Таким образом, ES1, ES2 KST1 и KEF1 могут представлять интерес для дальнейших исследований.

#### 4. Выводы

В данной работе было выделено десять бактериофагов, лизирующих условно-патогенные бактерии *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii* и *E. faecalis*, *S. enterica* (серовары): два бактериофага оказались эффективными против *K. pneumoniae*, два против *E. coli*, два против *C. sakazakii*, один против *S. enterica* серовара Enteritidis и один против *S. enterica* серовара Typhimurium. Кроме того, были выявлены поливалентные свойства бактериофагов: ES1, ES2 оказались эффективными против бактерий *C. sakazakii* и *S. enterica* серовара Enteritidis, KST1 лизировал *S. enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium, KEF1 оказался вирулентным против *E. faecalis* и *S. enterica* серовара Enteritidis.

#### Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017. (Е.Ю.Тризна).

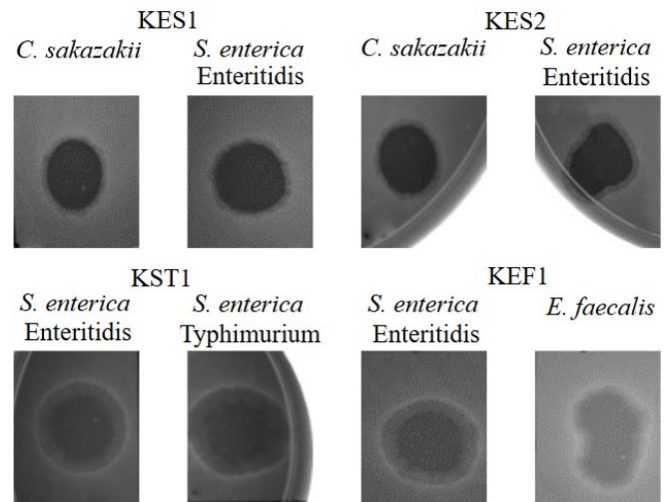
#### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

#### Список литературы

Abedon S.T., Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J. 2021. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth. *Pharmaceuticals* 14: 1019. DOI: [10.3390/ph14101019](https://doi.org/10.3390/ph14101019)

Alharbi N.M., Ziadi M.M. 2021. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 4358-4364.



**Рис.2.** поливалентные свойства бактериофагов KES1, KES2, KST1, KEF1. Зоны лизиса бактериофагов на бактериальных газонах *C. sakazakii*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары), точечный (спот) тест

DOI: [10.1016/j.sjbs.2021.04.025](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.025)

Bonten M., Johnson J., Biggelaar A. et al. 2021. Epidemiology of Escherichia coli bacteremia: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases* 72: 1211-1219. DOI: [10.1093/cid/ciaa210](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210)

Cattoir V. 2022. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology* 65: 73-80. DOI: [j.mib.2021.10.013](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.013)

Chang D., Sharma L., Cruz C. et al. 2021. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of Klebsiella pneumoniae infection. *Frontiers in microbiology* 12: 750662. DOI: [10.3389/fmicb.2021.750662](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662)

Gratia A. 1936. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bacteriophages. *Annales de l'Institut Pasteur*. Masson Publishing, France.

Hatfull G.F., Dedrick R.M., Schooley R.T. 2022. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annual review of medicine* 73: 197-211. DOI: [10.1146/annurev-med-080219-122208](https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208)

Hoenes K., Bauer R., Meurle T. et al. 2021. Inactivation effect of violet and blue light on ESKAPE pathogens and closely related non-pathogenic bacterial species—a promising tool against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant microorganisms. *Frontiers in microbiology* 11: 612367. DOI: [10.3389/fmicb.2020.612367](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612367)

Kalpana S., Lin W., Wang Y. et al. 2023. Antibiotic Resistance Diagnosis in ESKAPE Pathogens—A Review on Proteomic Perspective. *Diagnostics* 13: 1014. DOI: [10.3390/diagnostics13061014](https://doi.org/10.3390/diagnostics13061014)

Lewis K. 2020. The science of antibiotic discovery. *Cell* 181: 29-45. DOI: [10.1016/j.cell.2020.02.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056)

Ma Y.X., Wang C., Li Y. et al. 2020. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science* 7: 1901872. DOI: [10.1002/adv.201901872](https://doi.org/10.1002/adv.201901872)

Mkangara M. 2023. Prevention and control of human Salmonella enterica infections: An implication in food safety. *International Journal of Food Science* 2023. DOI: [10.1155/2023/8899596](https://doi.org/10.1155/2023/8899596)

Otto R., Munter H., Winkler W.F. 1922. Contributions to the d'Hérelle phenomenon. *Journal of Hygiene and Infectious Diseases*. 96: 118-160.

Pirnay J.P. 2020. Phage therapy in the year 2035.

Frontiers in Microbiology 11: 538375. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01171](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01171)

Rice L.B. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases* 197: 1079-1081. DOI: [10.1086/533452](https://doi.org/10.1086/533452)

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

Scholtz V., Vankova E., Kasparova P. et al. 2021. Non-thermal plasma treatment of ESKAPE pathogens: a review. *Frontiers in Microbiology* 12: 737635. DOI: [10.3389/fmicb.2021.737635](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737635)

Zhou A., Wang L., Zhang J. et al. 2021. Survival of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* in macrophages contributes to infections. *Microbial Pathogenesis* 158: 105064. DOI: [10.1016/j.micpath.2021.105064](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105064)

# Test of two membrane filter types for biomass collection in community profiling by metabarcoding

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Galachyants Yu.P.\*, Bolbat A.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P.

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya Str., Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** With the rapid development of microorganism biodiversity estimation and community profiling via DNA metabarcoding, there is a growing need to identify key stages affecting the results of experiment. In order to ensure high-quality reproducible results, all potential sources of bias should be explored. While bioinformatic pipelines can be often corrected and optimized to recalculate results, the initial steps of sample collection procedure, potentially influencing the downstream results of bacterial community profiling, are much harder to correct easily, without repeating the whole experiment. We examined the differences of the amplicon bacterial community profiles generated from aquatic microbial communities captured by polycarbonate (PC) and cellulose acetate (CA) filters. The microbial community profiles were shown to be significantly different by biodiversity. When using a PC-filters, alpha- and beta-diversity of communities were significantly higher. Differential abundance analysis showed enrichment of major cyanobacterial OTUs in CA-treated communities. Based on these results, the use of PC-filters is the most optimal for bacterial community profiling by metabarcoding of the 16S rRNA gene fragments.

**Keywords:** 16S rRNA, bacterial communities, metabarcoding, biodiversity, biomass collection by filtering

**For citation:** Galachyants Yu.P., Bolbat A.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P. Test of two membrane filter types for biomass collection in community profiling by metabarcoding // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 888-899. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-888

## 1. Introduction

Profiling of the microbial community composition is one of the basic goals of many biological studies including biomedicine, biotechnology, environmental research, etc. Composition of the community can tell a great deal about its stability, symbiotic relationships and diversity of the available metabolic pathways. Such data can be used in a variety of ways, e.g for tracking seasonal fluctuation in biodiversity, identifying the factors affecting community composition. Comprehensive biodiversity surveys not only facilitate the discovery of seasonal fluctuations on the community composition, but also help to measure the ecological effects of specific environmental factors which is particularly relevant for estimating the anthropogenic impact to natural communities.

While observing the macroorganism community is pretty straightforward (except for cases of cryptic diversity), the microbial diversity is much more difficult to measure. The traditional approach to this issue included cultivating microorganisms on a variety

of growth media with subsequent characterization of colonies and bacterial microscopic morphology which was very labor-intensive and low-resolution due to limited number of well-defined distinguishable traits at a microscopic scale. The shortcomings of such approach quickly became apparent when the number of bacteria counted directly from samples and cultivated on plates differed by several orders of magnitude (Razumov, 1931). A more advanced technique suggested classifying universally-present household gene fragments cloned from environmental samples based on genetic distances and phylogenetics. This technique, revealed that at least half of the bacterial phyla have no culturable members (Rappé and Giovannoni, 2003). Currently the proportion of known unculturable phyla raised to ¾ and the estimates of the proportion of unculturable taxa of bacterial diversity go as high as 99% (Hugon et al., 2017).

The technique of metabarcoding combines the advantages of using high-throughput sequencing (HTS) technologies and commonly established genetic markers for main domains of life: 16S rRNA gene for bac-

\*Corresponding author.

E-mail address: [yuri.galachyants@lin.irk.ru](mailto:yuri.galachyants@lin.irk.ru) (Yu.P. Galachyants)

**Received:** May 28, 2024; **Accepted:** June 10, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





teria and archaea, 18S rRNA gene for eukaryotes in general and mitochondrial 12S rRNA and *cox1* genes for Metazoa. While metabarcoding is less capable of detecting genetic diversity within the sample on the whole-genome scale compared to the full-scale shotgun metagenomic studies, it has lower per-sample cost and sufficient resolution for a majority of studies aimed to initial characterization of the communities and their comparison between each other.

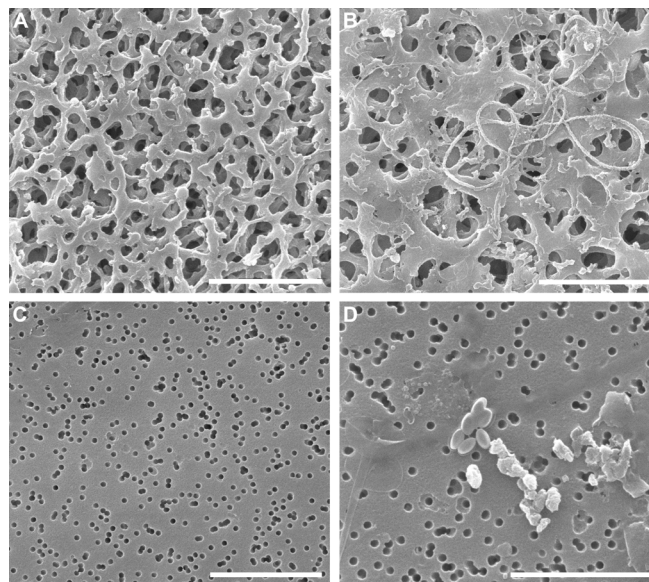
While molecular techniques reached the plateau of their abilities and software side of metabarcoding protocols can be adjusted even after the original study was finished, improper sample collection protocols can hinder the downstream analysis without any way to correct the obtained data. At the very beginning of the metabarcoding protocol of the aquatic communities, the bacterial and/or microeukaryotic cells are often filtered to collect the biomass. There are several types of filters, which are made of different materials: polyethersulfone (PES), polyvinylidene fluoride (PVDF), nylon, cellulose nitrate (CN), mixed cellulose ester (MCE), cellulose acetate (CA), polycarbonate (PC), etc (Moldovan et al., 2020). While the effect of the pore size on the observed biodiversity is intuitive (the smaller the pore – the more diversity is captured) the effect of filter material may be less obvious (Eichmiller et al., 2015; Li et al., 2018). As the number of eDNA (environmental DNA) collection strategies increases, the type of filter membranes used also changes: fiberglass, cellulose paper and other synthetic thermoplastic membranes are often used for eDNA collection (Takahashi et al., 2023). However, there is not enough work on the effect of filters when collecting material for subsequent analysis of the bacterial community by metabarcoding (Moldovan et al., 2020). It has been shown that real pore sizes can vary significantly around the average nominal pore size stated by the manufacturer (Turner et al., 2014). Moreover, the values of these deviations are unpredictable even for derivatives of the same material. As a result, smaller organisms may bypass filter while being larger than the nominal pore size. In addition, the surface characteristics of filters may also play a role: some filter types are intended to serve as a barrier adsorbing all microorganisms on their surface, while others are prone to capturing smaller organisms within their volume (Djurhuus et al., 2017). This, in turn, may affect the ratios of DNA fragments from different organisms because of the difference of the biomass washing-out process from distinct filter types.

In our work, we tested filters made from polycarbonate (PC) and cellulose acetate (CA) to collect the bacterial biomass from freshwater communities in order to identify the effect of the filtering step on the efficiency of total DNA extraction and the downstream results of the bacterial community profiling by 16S rRNA metabarcoding.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection and DNA extraction

Water samples were collected on the 3rd of September 2017 at the central station of the transect



**Fig.1.** Scanning electron microscopy of filters. A) CA filter; B) CA filter after filtration of water sample; C) PC filter; D) PC filter after filtration of water sample. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$  – A, C; 2  $\mu\text{m}$  – B; 4  $\mu\text{m}$  – D.

Listvyanka-Tankhoi (Lake Baikal, Russia) from the photic zone at the depths 0, 5, 10, 15, 20 and 25 m using a Niskin bottle and combined into single integral sample. Twenty liters of the integral sample were filtered through PC filter (Whatman, USA) with 0.2  $\mu\text{m}$  pore size (Fig. 1C) and CA filter (Vladisart, Russia) with 0.2  $\mu\text{m}$  pore size (Fig. 1A) in two repetitions. Each filter with the biomass was transferred into sterile bottle, stretched with the forceps and the biomass was washed out of the filter with 10 ml of TE buffer (1mM EDTA and 10 mM Tris-HCl; pH 7.5) using automatic pipette. The washed-out sample was frozen and stored at -80  $^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Total DNA was extracted from samples with lysozyme (1 mg·mL<sup>-1</sup>), proteinase K (310  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 10% SDS and phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1) (Bukin et al., 2023).

### 2.2. Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), 20 mL from 200 mL of the samples was precipitated by filtration onto a filter with a diameter of 13 mm and pore diameter of 0.2  $\mu\text{m}$  on PC and CA filters. Then, 20 mL of 70% ethanol was passed through the filter. The filter with the studied material and clean filter dried at room temperature was attached to the SEM stub with double tape, coated with gold in an SDC 004 vacuum evaporator (SD 004 Balzers, Liechtenstein) and examined using a QUANTA 200 SEM (FEI Company; Hillsboro, OR, USA).

### 2.3. DNA library preparation and sequencing

Preparation of the amplicon libraries was performed as described in “Illumina 16S Metagenomic Library Preparation Guide #15044223 Rev. B”. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using uni-

versal primers U341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') and U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3') (Baker et al., 2003). Libraries were analyzed using Illumina MiSeq (San Diego, USA) in Evrogen company (Moscow, Russia) with Reagent Kit v2 to obtain 250 bp paired-end reads. Two amplicon libraries were generated for each filter type.

## 2.4. OTU detection and diversity analysis

Read pairs merging and quality filtering was conducted using Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010), with maximum expected error of 1 bp per read and minimum length of 350 bps. Sequence dereplication was conducted in Vsearch v2.16.0 (Rognes et al., 2016) with minimum abundance of 2. Sequence pre-clustering with 97% identity threshold and subsequent *de novo* and reference-based chimera filtering was conducted in Vsearch. Chimera-free sequences were then preclustered in Vsearch with the same 97% identity threshold. Taxonomic classification of the resulting OTUs was conducted in Mothur v.1.48.0 (Schloss et al., 2009) with Silva v.138.1 database using Wang method and the cutoff value of 80. Unidentified OTUs were omitted from the analysis.

Alpha-diversity metrics and Bray-Curtis dissimilarity were calculated using the diversity function of the vegan 2.6.4 package (Oksanen et al., 2022). The Weighted Unifrac distance was calculated in phyloseq 1.40.0 package (McMurdie and Holmes, 2013) using IQ-TREE 2.2.0 (Minh et al., 2020) consensus phylogeny generated with GTR+G+I substitution model and 1000 ultrafast bootstrap replicates (Hoang et al., 2018). Differential abundance analysis was conducted in DESeq2 1.36.0 package (Love et al., 2014) with local fit type.

## 3. Results and discussion

We performed a qualitative assessment of PC and CA filters by the SEM method (Fig. 1). This allowed us to identify the structure and morphology of pores depending on type of the filter material. Bacterial cells are located separately or as conglomerates on the surface of the PC filter (Fig. 1D). When using CA filters, bacterial cells were located both on the filter surface and inside the filter pores (Fig. 1B). We assume this feature of the CA filters contributed to the fact the biomass was not completely washed off the filter surface, and some cell remained inside the filter material. This may alter the community profiles collected with CA filters.

As a result of sequencing, the total number of raw reads for 16S rRNA was 313 500, of which 289 100 (92.22%) were merged and aligned. Out of remaining reads, 16% were discarded due to >1 expected errors. Read pre-clustering was performed with 3% identity threshold which resulted in 590 clusters, out of which 49.3% were *de novo* identified as chimeras and 50.7% as non-chimeras. This seemingly high proportion of chimeric reads is, in fact, common for different pipelines (e.g. Fonseca et al., 2012, Salonen et al., 2021). Subsequent reference-based filtering discarded 5.4% of

the resulting clusters as chimeras. Reclustering of these filtered sequences with the same threshold and omitting unidentifiable OTUs resulted of 277 OTUs for the analysis. The final sequencing depth was in range from 40 000 to 52 000 reads per sample, that is sufficient for downstream analyses of community profiles (Fig. 2).

A very noticeable difference of samples was observed by alpha-diversity metrics. PC filter allowed for capturing 1.425 times more OTUs than CA filter (Fig. 2, Table 1). The samples' Shannon's and Simpson's diversity indices differed 1.512-fold ( $p = 0.02$ ) and 1.169-fold ( $p = 0.03$ ) accordingly between the filter materials. Considering the commonly used 97% identity threshold, such differences may influence the downstream interpretation of seasonal dynamics, trophic networks or metabolic pathways of the communities. Interestingly, membranes of mixed cellulose ether, cellulose acetate and cellulose nitrate were previously reported to be the best filter types for bacterial communities of karst sources (Moldovan et al., 2020). As expected from alpha-diversity metrics, beta-diversity was also different between PC and CA profiles (Table 2), while the profiles of the same filter type were very close each other.

Analysis of differential abundance of OTU profiles (Fig. 3, Table 3) revealed, that both major and minor OTUs can be specifically abundant on the filters made of different materials. Most noticeably, PC-treated profiles had a greater fraction of minor OTUs than CA ones. At the same time, PC-treated profiles had a greater proportion of chloroplast-specific sequences, uncultured Methylacidiphilaceae, unclassified Sporichthyaceae and CL500-29 marine group while having a lower proportion of *Cyanobium gracile* PCC-6307 and unclassified Cyanobiaceae OTUs. Enrichment of different bacterial OTUs may be explained by bacteria being trapped in the CA filter or even passing through its pores. An alternative explanation might be a release of chemical compounds by the CA filter, affecting the PCR. Hypothetically, such compounds may influence the

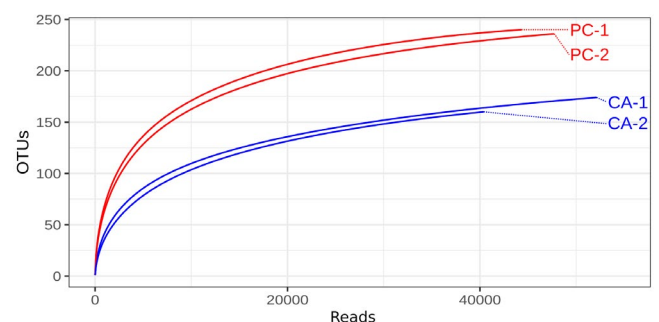


Fig. 2. Rarefaction curves for analyzed bacterial community profiles.

Table 1. Alpha-diversity of bacterial communities

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
Species richness (OTUs)	240	236	174	160
Shannon's index	2.29	2.2	1.56	1.41
Simpson's index	0.77	0.75	0.66	0.64

PCR at the primer annealing stage causing primer binding only to the most conservative motifs thus increasing the specificity of the PCR which can result in preferential amplification of certain taxa (Chua et al., 2015).

Analysis of differential abundance by DESeq2 revealed 15 OTUs that differed significantly between PC- and CA-treated community profiles ( $p < 0.05$ ,  $\text{abs}(\log_2\text{FC}) > 1.5$ ) (Table 3). These OTUs belonged to *Cyanobium gracile* PCC-6307, CL500-29 marine group, *Sphingomonas*, Methyacidiphilaceae, SAR11 Clade III, *Williamsia*, Sporichthyaceae hgcl clade and Nocardioideles. Relative abundance of 12 out of these 15 OTUs was above 0.1%. The composition of the identified bacterial community is consistent with previously obtained data for Lake Baikal during this time period (Mikhailov et al., 2022).

#### 4. Conclusions

In this study we tested two filter types to collect biomass from freshwater samples. We believe that such testing is necessary for better control of potential biases and batch effects when designing the complex metabarcoding experiments and comparing data from different metabarcoding studies. When choosing an appropriate membrane filter type, it is necessary to account for the filter's ability to collect microorganisms. It is evident that PC-treated amplicon profiles have higher alpha- and beta-diversity than those of CA-treated ones. Possible explanations of this effect may be: i) the structure of the CA-filter, as the three-dimensional maze-like CA-membrane pores able to irreversibly capture some part of the biomass inside the filter or even on the membrane surface; ii) the release of chemical compounds that can potentially affect the specificity of the polymerase chain reaction.

The bias introduced by the filter material indicates that results obtained on different filters must not

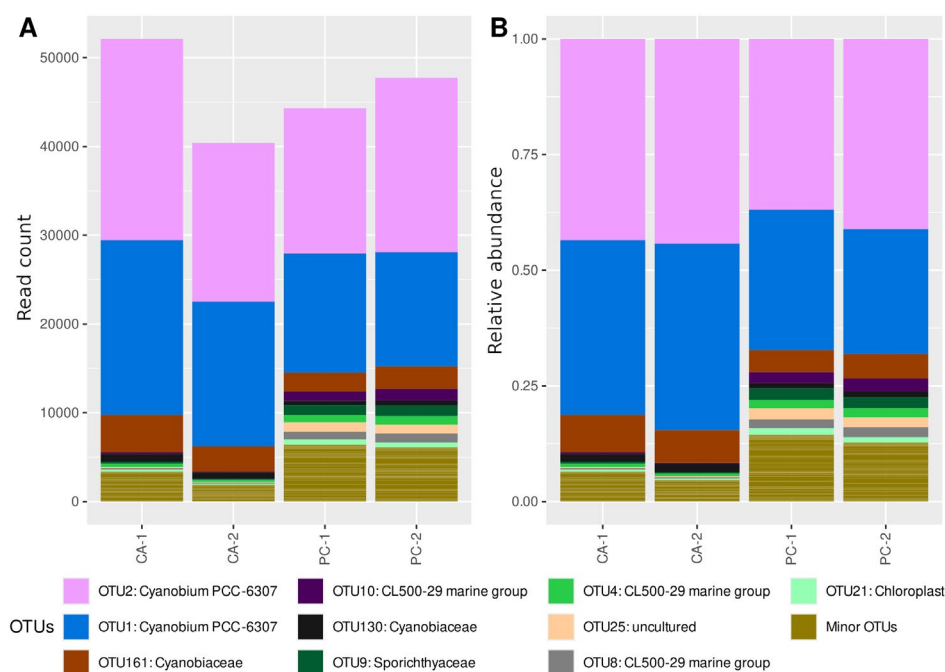
**Table 2.** Beta-diversity of bacterial communities: Bray-Curtis dissimilarity (above diagonal) and weighted unifrac (below diagonal) distances

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
PC-1		0.074	0.237	0.173
PC-2	0.009		0.202	0.173
CA-1	0.058	0.054		0.129
CA-2	0.065	0.061	0.008	

be compared, except with the express purpose to estimate their difference in filtration efficiency. Filter manufacturer, type and preferably, batch should be selected for studies considering the comparison of the community structure and composition. Chemical inertness of the filter material should also be considered to avoid the release of compounds affecting DNA extraction and amplification. According to our results, PC filters turned out to be superior compared to CA filters for profiling the freshwater bacterial communities.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge co-workers of LIN SB RAS: Mikhailov I.S. for their assistance during the field studies and E.V. Likhoshway for valuable advices during the preparation of the manuscript. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation projects: No. 0279-2021-0009 The study was performed using microscopes of the The Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS. We also gratefully acknowledge the Irkutsk Supercomputer Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for providing the access to HPC-cluster



**Fig.3.** Abundance of OTUs in absolute values (A) and proportions (B). The top 10 most abundant OTUs are shown using distinct colors. The rest of the OTUs are merged into the “Minor OTUs” category.

**Table 3.** Differential abundance of OTUs by filter material

ID	Taxon	$P_{adj}$	$\log_2$ -fold change	CA*	PC*
OTU161	Cyanobiaceae unclassified	5.18e-13	-1.79	5262.58	1518
OTU1	Cyanobium PCC-6307	6.85e-11	-1.67	27504.73	8613.97
OTU25	Methylacidiphilaceae uncultured	1.83e-09	1.85	188.74	684
OTU130	Cyanobiaceae unclassified	6.78e-09	-1.79	1229.24	355.35
OTU9	Sporichthyaceae unclassified	4.60e-06	1.81	209.26	739.81
OTU10	CL500-29 marine group	3.33e-05	1.73	233.16	780.59
OTU2	Cyanobium PCC-6307	9.74e-05	-1.38	30819.91	11809.67
OTU8	CL500-29 marine group	9.74e-05	1.59	203.45	610.51
OTU19	Sporichthyaceae unclassified	4.44e-03	2.35	16.58	86.64
OTU20	Sporichthyaceae unclassified	5.83e-03	2.4	14.05	75.02
OTU14	Clade III	1.17e-02	1.86	30.81	110.69
OTU80	Nocardioides	1.71e-02	5.64	0	14.02
OTU13	Methylacidiphilaceae uncultured	2.68e-02	1.54	51.42	149.39
OTU114	Sphingomonadaceae unclassified	2.73e-02	2.6	8.35	47.39
OTU149	Actinobacteria unclassified	4.86e-02	-2.58	25.04	4.25

**Note:** \* Mean count of taxon abundance in the corresponding group (CA or PC)

“Akademik V.M. Matrosov” and Shared Equipment Center for Integrated information and computing network of Irkutsk Research and Educational Complex for the data storage infrastructure.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541-555. DOI: [10.1016/j.mimet.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009)

Bukin Y.S., Mikhailov I.S., Petrova D.P. et al. 2023. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 229 DOI: [10.1007/s11274-023-03678-1](https://doi.org/10.1007/s11274-023-03678-1)

Chua E-W., Miller A.L., Kennedy M.A. 2015. Choice of PCR microtube can impact on the success of long-range PCRs. *Analytical Biochemistry* 477: 115-117. DOI: [10.1016/j.ab.2015.02.023](https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.023)

Djurhuus A., Port J., Closek C.J. et al. 2017. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science* 4: 314. DOI: [10.3389/fmars.2017.00314](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314)

Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)

Eichmiller J.J., Miller L.M., Sorensen P.W. 2015. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources* 16(1): 56-68. DOI: [10.1111/1755-0998.12421](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421)

Fonseca V.G., Nichols B., Lallias D. et al. 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSUmetagenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 40(9):

e66. DOI: [10.1093/nar/gks002](https://doi.org/10.1093/nar/gks002)

Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35(2): 518-522. DOI: [10.1093/molbev/msx281](https://doi.org/10.1093/molbev/msx281)

Hugon P., Lagier J., Colson P. et al. 2017. Repertoire of human gut microbes. *Microbial Pathogenesis* 106: 103-112. DOI: [10.1016/j.micpath.2016.06.020](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020)

Li J., Lawson Handley L.J., Read D.S. et al. 2018. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*. DOI: [10.1111/1755-0998.12899](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899) Epub ahead of print. PMID: 29766663

Love M.I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12): 550. DOI: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)

McMurdie P.J., Holmes S. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8(4): e61217. DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)

Mikhailov I.S., Galachyants Y.P., Bukin Y.S. et al. 2022. Seasonal Succession and Coherence Among Bacteria and Microeukaryotes in Lake Baikal. *Microbial Ecology* 84(2): 404-422. DOI: [10.1007/s00248-021-01860-2](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01860-2)

Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1530-1534. DOI: [10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015)

Moldovan O.T., Baricz A., Szekeres E. et al. 2020. Testing Different Membrane Filters for 16S rRNA Gene-Based Metabarcoding in Karstic Springs. *Water* 12(12): 3400. DOI: [10.3390/w12123400](https://doi.org/10.3390/w12123400)

Oksanen J., Simpson G., Blanchet F. et al. 2022. vegan: Community Ecology Package. URL: [cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf](https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf)

Rappé M.S., Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-94. DOI: [10.1146/annurev.micro.57.030502.090759](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759)

Razumov A.S. 1931. Direct method of aquatic bacteria counting and its comparison to Koch's method. *Mikrobiologija*



1(2): 131-136. (in Russian)

Rognes T., Flouri T., Nichols B. et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584. DOI: [10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)

Salonen I.S., Chronopoulou P., Nomaki H. et al. 2021. 16S rRNA Gene Metabarcoding Indicates Species-Characteristic Microbiomes in Deep-Sea Benthic Foraminifera. *Frontiers in Microbiology* 12: 694406. DOI: [10.3389/fmicb.2021.694406](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694406)

Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and compar-

ing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-41. DOI: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)

Takahashi M., Saccò M., Kestel J.H. et al. 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal bio-monitoring revolution. *Science of the Total Environment* 873: 162322. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.162322](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322)

Turner C.R., Barnes M.A., Xu C.C. et al. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676–684. DOI: [10.1111/2041-210X.12206](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206)

# Тестирование двух типов мембранных фильтров для сбора биомассы при профилировании бактериальных сообществ методом метабаркодирования

Оригинальная статья

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Галачянц Ю.П.\*, Болбат А.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Россия, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

**АННОТАЦИЯ.** В связи с быстрым развитием методов оценки биоразнообразия микроорганизмов и профилирования сообществ с помощью метабаркодирования ДНК растет потребность в выявлении ключевых этапов, влияющих на результаты экспериментов. Чтобы обеспечить высококачественные воспроизводимые результаты, необходимо изучить все потенциальные источники систематической ошибки. Хотя биоинформационные конвейеры часто можно исправить и оптимизировать для пересчета результатов, начальные этапы процедуры сбора образцов, потенциально влияющие на последующие результаты профилирования бактериального сообщества, гораздо сложнее исправить без повторения всего эксперимента. Мы исследовали различия в ампликонных профилях бактериальных сообществ, полученных из водных образцов при сборе биомассы с помощью фильтров из разного материала: поликарбоната (PC) и ацетата целлюлозы (CA). Показано, что профили микробных сообществ существенно различаются по биоразнообразию. При использовании PC-фильтров альфа- и бета-разнообразие сообществ было значительно выше. Дифференциальный анализ численности показал обогащение многочисленных цианобактериальных OTU в профилях сообществ, полученных с помощью CA. На основании этих результатов использование PC-фильтров является наиболее оптимальным для профилирования бактериальных сообществ путем метабаркодирования фрагментов гена 16S рРНК.

**Ключевые слова:** 16S рРНК, бактериальные сообщества, метабаркодирование, биоразнообразие, сбор биомассы фильтрованием

Для цитирования: Галачянц Ю.П., Болбат А.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П. Тестирование двух типов мембранных фильтров для сбора биомассы при профилировании бактериальных сообществ методом метабаркодирования // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 888-899. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-888](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-888)

## 1. Введение

Профилирование состава микробных сообществ является одной из основных целей многих биологических исследований, в таких областях как биомедицина, биотехнология, исследования окружающей среды и т. д. Состав сообщества может многое рассказать о его стабильности, симбиотических отношениях и разнообразии доступных метаболических путей. Такие данные можно использовать для различных целей, например, для отслеживания сезонных колебаний биоразнообразия, выявления факторов, влияющих на состав сообщества. Всесторонние исследования биоразнообразия не только способствуют выявлению сезонных коле-

баний состава сообществ, но и помогают оценить экологическое воздействие конкретных факторов окружающей среды, что особенно актуально для оценки антропогенного воздействия на природные сообщества.

Хотя наблюдать за сообществом макроорганизмов довольно просто (за исключением случаев скрытого или т.н. *криптического* разнообразия), микробное разнообразие оценить гораздо труднее. Традиционный подход к этому вопросу включал культивирование микроорганизмов на различных питательных средах с последующей характеристикой колоний и бактериальной микроскопической морфологии. Однако этот метод был трудоемким

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [yuri.galachyants@lin.irk.ru](mailto:yuri.galachyants@lin.irk.ru) (Ю.П. Галачянц)

Поступила: 28 мая 2024; Принята: 10 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



и имел низкое разрешение из-за ограниченного числа четко определенных различимых признаков в микроскопическом масштабе. Недостатки такого подхода быстро стали очевидны, когда число бактерий, подсчитанное непосредственно из проб и культивируемых на чашках, различалось на несколько порядков (Разумов, 1931). Более продвинутый метод предполагает классификацию и группировку фрагментов повсеместно присутствующих генов домашнего хозяйства, клонированных из образцов окружающей среды, на основе генетических расстояний и филогенетики. Этот метод показал, что по крайней мере для половины определяемых бактериальных фрагментов 16S рРНК не имеется культивируемых представителей ранга того же филума (Rappé and Giovannoni, 2003). В настоящее время доля известных некультивируемых филумов увеличена до  $\frac{3}{4}$ , а оценки доли некультивируемых таксонов бактериального разнообразия достигают 99% (Hugon et al., 2017).

Методика метабаркодирования сочетает в себе преимущества использования технологий высокопроизводительного секвенирования (HTS) и общепринятых генетических маркеров основных доменов жизни: ген 16S рРНК для бактерий и архей, ген 18S рРНК для эукариот в целом и гены митохондриальной 12S рРНК и *cox1* конкретно для Metazoa. Хотя способность метабаркодирования обнаружить генетическое разнообразие в образце в масштабе всего генома ниже по сравнению с полномасштабными метагеномными исследованиями, оно имеет меньшую стоимость на образец и достаточное разрешение для большинства исследований, направленных на первоначальную характеристику сообществ и их сравнение друг с другом.

В то время как молекулярные методы достигли плато своих возможностей, а программная часть протоколов метабаркодирования может быть скорректирована даже после завершения первоначального исследования, неправильные протоколы сбора образцов могут затруднить последующий анализ без какой-либо возможности исправить полученные данные. На первых шагах протокола метабаркодирования при анализе водных сообществ бактериальные и/или микроэукариотические клетки часто фильтруют из проб воды для сбора биомассы. Существует несколько типов материалов, из которых изготавливают фильтры: полиэфирсульфон (PES), поливинилиденфторид (PVDF), нейлон, нитрат целлюлозы (CN), смешанные эфиры целлюлозы (MCE), ацетат целлюлозы (CA), поликарбонат (PC) и т. д. (Moldovan et al., 2020). Хотя влияние размера пор на наблюдаемое биоразнообразие интуитивно понятно (чем меньше поры, тем большее разнообразие можно получить в итоговом профиле сообщества), влияние фильтрующего материала может быть менее очевидным (Li et al., 2018; Eichmiller et al., 2015). По мере увеличения количества стратегий сбора eDNA (environmental DNA) тип используемых фильтрующих мембран также меняется: для сбора eDNA часто используются стекловолокно, целлюлозная бумага и другие синте-

тические термопластичные мембраны (Takahashi et al., 2023). Однако работ по влиянию фильтров при сборе материала для последующего анализа бактериальных сообществ методом метабаркодирования недостаточно (Moldovan et al., 2020). Ранее показано, что реальные размеры пор могут значительно отличаться от среднего номинального размера пор, указанного производителем (Turner et al., 2014). Причем значения этих отклонений непредсказуемы даже для производных одного и того же материала. В результате более мелкие клетки могут проходить через поры фильтра при сборе биомассы, хотя формально размер клетки превышает заявленный диаметр пор. Кроме того, значительную роль могут играть и характеристики поверхности фильтров: некоторые типы фильтров предназначены служить барьером, адсорбирующим все микроорганизмы на своей поверхности, тогда как другие склонны улавливать более мелкие организмы в своем объеме (Djurhuus et al., 2017). Это, в свою очередь, может повлиять на соотношение фрагментов ДНК разных организмов из-за различной эффективности смыывания собранной биомассы с фильтров, сделанных из разного материала.

В нашей работе мы протестировали фильтры из поликарбоната (PC) и ацетата целлюлозы (CA) для сбора бактериальной биомассы из пресноводных сообществ, чтобы определить влияние этапа фильтрации на эффективность выделения суммарной ДНК и последующие результаты профилирования бактериального сообщества с помощью метабаркодирования 16S рРНК.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Сбор проб и выделение ДНК

Пробы воды отобраны третьего сентября 2017 года на центральной станции разреза пос. Листвянка - пос. Танхой (оз. Байкал, Россия) из фотической зоны на глубинах 0, 5, 10, 15, 20 и 25 м с помощью батометра Нискина и объединены в одну интегральную пробу. Двадцать литров интегрального образца фильтровали в двух повторностях через фильтры PC (Whatman, США) с размером пор 0,2 мкм (Рис. 1В) и фильтры CA (Владисарт, Россия) с размером пор 0,2 мкм (Рис. 1А). Фильтр с биомассой помещали во флакон с 10 мл стерильного ТЕ-буфера (1 мМ ЭДТА и 10 мМ Трис-НСI; рН 7,5), расправляли при помощи пинцета, и смывали биомассу с поверхности фильтра при помощи автоматического дозатора. Смывы замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего анализа. Суммарную ДНК экстрагировали из образцов лизоцимом (1 мг/мл), протеиназой К (310 мкг/мл), 10% ДСН и смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) (Bukin et al., 2023).

### 2.2. Сканирующая электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) 20 мл из 200 мл образцов осаждали филь-

трованием на фильтрах PC и CA диаметром 13 мм и размером пор 0,2 мкм. Затем через фильтр пропускали 20 мл 70% этанола. Фильтр с исследуемым материалом и чистый фильтр, высушенный при комнатной температуре, прикрепляли к заглушке СЭМ двойной лентой, покрывали золотом в вакуумной напылительной установке SDC 004 (SD 004 Balzers, Лихтенштейн) и исследовали с помощью СЭМ QUANTA 200 (FEI Company; Хиллсборо, Орегон, США).

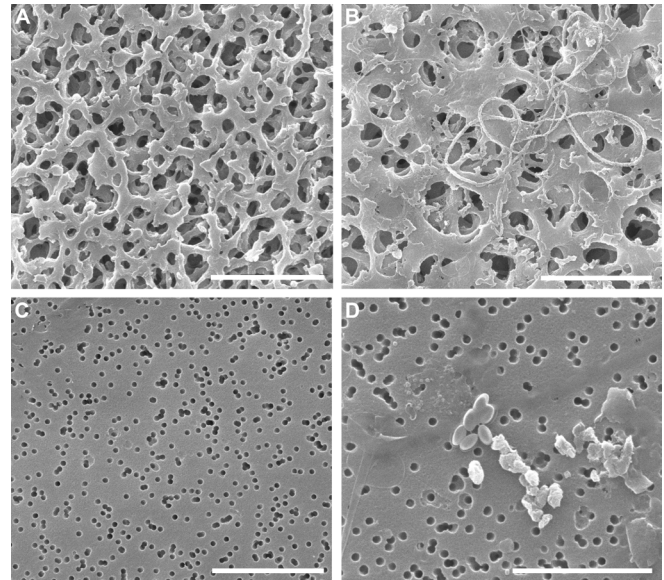
### 2.3. Подготовка и секвенирование библиотек ДНК

Подготовку библиотек ампликонов проводили, как описано в «Руководстве по подготовке метагеномной библиотеки Illumina 16S № 15044223 Ред. В». Область V3–V4 гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров U341F (5'-CCTACGGGRCAGCAG-3') и U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3') (Baker et al., 2003). Библиотеки анализировали с помощью секвенатора Illumina MiSeq (San Diego, USA) с набором реагентов v2 для получения парных концевых прочтений длиной 250 н.о. в компании Евроген (Москва, Россия) Были созданы две библиотеки ампликонов для каждого типа фильтра.

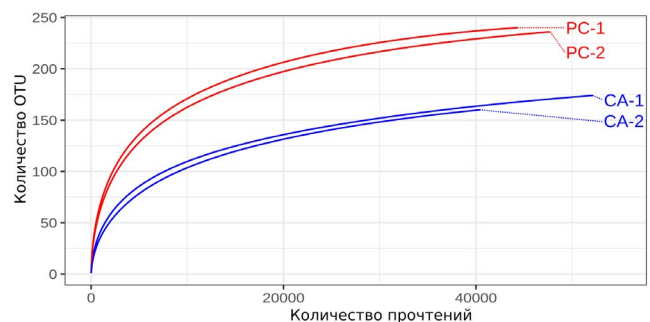
### 2.4. Обнаружение OTU и анализ разнообразия

Слияние пар прочтений и фильтрация данных по качеству проводили с использованием Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010) с максимальной ожидаемой ошибкой 1 н.о. на прочтение и минимальной длиной 350 н.о. Дерепликацию последовательностей проводили в Vsearch v2.16.0 (Rognes et al., 2016) с минимальной численностью 2. Предварительную кластеризацию последовательностей с порогом идентичности 97% и последующую фильтрацию химер *de novo* и на основе референсных последовательностей 16S рРНК проводили в Vsearch. Затем набор последовательностей без химер был предварительно кластеризован в Vsearch с тем же порогом идентичности 97%. Таксономическую классификацию полученных OTU проводили в mothur v.1.48.0 (Schloss et al., 2009) при помощи базы данных Silva v.138.1 с использованием метода Ванга и порогового значения 80. Неидентифицированные OTU были исключены из анализа.

Метрики альфа-разнообразия и несходство Брея-Кертиса рассчитывались с использованием функции разнообразия пакета Vegan 2.6.4 (Oksanen et al., 2022). Взвешенный индекс Unifrac рассчитывали в пакете phyloseq 1.40.0 (McMurdie and Holmes, 2013) с использованием консенсусной филогении IQ-TREE 2.2.0 (Minh et al., 2020), созданной с помощью модели замещения GTR+G+I и 1000 сверхбыстрых бутстреп-репликаций (Hoang et al., 2018). Дифференциальный анализ численности проводили в пакете DESeq2 1.36.0 (Love et al., 2014), используя локальный тип подгонки.



**Рис.1.** Сканирующая электронная микроскопия фильтров. А) СА-фильтр; В) СА-фильтр после фильтрации пробы воды; С) РС-фильтр; D) РС-фильтр после фильтрации пробы воды. Масштабная линейка: 5 мкм – А, С; 2 мкм – В; 4 мкм – D.



**Рис.2.** Кривые разрежения для анализируемых профилей бактериальных сообществ.

**Таблица 1.** Альфа-разнообразие бактериальных сообществ

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
Species richness (OTUs)	240	236	174	160
Shannon's index	2.29	2.2	1.56	1.41
Simpson's index	0.77	0.75	0.66	0.64

## 3. Результаты и обсуждение

Качественная оценка фильтров PC и CA проведена методом СЭМ (Рис. 1). Это позволило определить структуру и морфологию пор в зависимости от типа фильтрующего материала. Бактериальные клетки располагаются отдельно или в виде конгломератов на поверхности PC-фильтра (Рис. 1D). При использовании фильтров CA бактериальные клетки располагались как на поверхности фильтра, так и внутри пор фильтра (Рис. 1B). Мы предполагаем, что эта особенность фильтров CA способствовала тому, что биомасса не полностью смывалась



с поверхности фильтра, а часть клеток оставалась внутри фильтрующего материала. Это может изменить профили сообщества, собранные с помощью фильтров СА.

В результате секвенирования общее количество необработанных прочтений 16S рРНК составило 313 500, из них 289 100 (92.22%) были объединены и выровнены. Из них 16% прочтений были исключены из-за ожидаемой ошибки > 1. Предварительную кластеризацию прочтений проводили с порогом идентичности 3%, в результате чего было получено 590 кластеров, из которых 49.3% идентифицированы *de novo* как химеры и 50.7% как не химеры. Эта, казалось бы, высокая доля химерных чтений на самом деле является общей для разных конвейеров (например, Fonseca et al., 2012; Salonen et al., 2021). Последующая фильтрация на основе референсной базы данных 16S рРНК позволила отбросить 5.4% полученных кластеров как химеры. При повторной кластеризации этих отфильтрованных последовательностей с тем же порогом и исключением неидентифицируемых OTU было получено 277 OTU, использованных для дальнейшего анализа. Итоговая глубина секвенирования находилась в диапазоне от 40 000 до 52 000 прочтений на образец, что достаточно для последующего анализа профилей сообществ (Рис. 2).

Заметная разница выборок наблюдалась по метрикам альфа-разнообразия. При использовании РС-фильтров наблюдается в 1.425 раза больше OTU, чем при использовании СА-фильтров (Рис. 2, Таблица 1). Индексы разнообразия Шеннона и Симпсона различались в 1.512 раза ( $p = 0.02$ ) и 1.169 раза ( $p = 0.03$ ) соответственно между фильтрующими материалами. Учитывая широко используемый порог идентичности в 97%, такие различия могут влиять на последующую интерпретацию сезонной динамики, трофических сетей или метаболических путей сообществ. Интересно отметить, что, как сообщалось ранее, мембраны из смешанных эфиров целлюлозы, ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы успешно использовали при анализе бактериальных сообществ карстовых источников (Moldovan et al., 2020).

Как и ожидалось на основе показателей альфа-разнообразия, бета-разнообразие также различалось между профилями РС и СА (Таблица 2), в то время как профили одного и того же типа фильтра были очень близки друг к другу.

Анализ представленности OTU (Рис. 3, Таблица 3) показал, что как многочисленные, так и малочисленные OTU могут быть обогащены на фильтрах, изготовленных из разных материалов. Наиболее заметно, что профили, полученные при использовании РС-фильтров, имели большую долю малочисленных OTU, чем профили СА-фильтров. В то же время РС-профили имели большую долю последовательностей, специфичных для некультивируемых *Methylacidiphilaceae*, неклассифицированных *Sporichthyaceae* и *marine group CL500-29*, но при этом имели меньшую долю *Cyanobium gracile* PCC-6307 и неклассифицированных *Cyanobiaceae*

OTU. Обогащение различных бактериальных OTU можно объяснить тем, что бактерии задерживаются в СА-фильтре или даже проходят через его поры. Альтернативным объяснением может быть выброс химических соединений из фильтра СА, влияющих на ПЦР. Гипотетически такие соединения могут влиять на ПЦР на стадии отжига праймера, вызывая связывание праймера только с наиболее консервативными мотивами, тем самым повышая специфичность ПЦР, что может привести к преимущественной амплификации определенных таксонов (Chua et al., 2015).

Анализ дифференциальной численности с помощью DESeq2 выявил 15 OTU, которые значительно различались между профилями сообществ, обработанных РС и СА ( $p < 0.05$ ,  $\text{abs}(\log_2 FC) > 1.5$ ) (Таблица 3). Эти OTU принадлежали *Cyanobium gracile* PCC-6307, морской группе CL500-29, *Sphingomonas*, *Methylacidiphilaceae*, SAR11 Clade III, *Williamsia*, *Sporichthyaceae* hgcI clade и *Nocardioides*. Относительная численность 12 из этих 15 OTU была выше 0.1%. Состав выявленного бактериального сообщества согласуется с полученными ранее данными для оз. Байкал в этот временной период (Mikhailov et al., 2022).

#### 4. Выводы

В этом исследовании мы протестировали два типа фильтров для сбора биомассы из образцов пресной воды и оценили профили бактериальных сообществ. Мы считаем, что такое тестирование необходимо для лучшего контроля потенциальных ошибок и пакетного эффекта при планировании сложных экспериментов и сравнении данных различных исследований метабаркодирования. При выборе подходящего типа мембранного фильтра необходимо учитывать способность фильтра концентрировать микроорганизмы и смывать их с его поверхности. Очевидно, что профили ампликонов, обработанных РС, имеют более высокое альфа- и бета-разнообразие, чем профили, обработанные СА. Наиболее вероятными причинами этого эффекта могут быть: 1) структура СА-фильтра, представляющая лабиринтные трехмерные поры, способные необратимо захватывать некоторую часть биомассы внутри фильтра или даже на поверхности мембраны; 2) высвобождение химических соединений, которые потенциально могут повлиять на эффективность полимеразной цепной реакции.

**Таблица 2.** Бета-разнообразие бактериальных сообществ: индекс несходства Брея-Кертиса (над диагональю) и взвешенные расстояния Unifrac (под диагональю)

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
PC-1		0.074	0.237	0.173
PC-2	0.009		0.202	0.173
CA-1	0.058	0.054		0.129
CA-2	0.065	0.061	0.008	

**Таблица 3.** Численность OTU в зависимости от материала фильтра

ID	Taxon	$P_{adj}$	$\log_2$ -fold change	CA*	PC*
OTU161	Cyanobiaceae unclassified	5.18e-13	-1.79	5262.58	1518
OTU1	Cyanobium PCC-6307	6.85e-11	-1.67	27504.73	8613.97
OTU25	Methylacidiphilaceae uncultured	1.83e-09	1.85	188.74	684
OTU130	Cyanobiaceae unclassified	6.78e-09	-1.79	1229.24	355.35
OTU9	Sporichthyaceae unclassified	4.60e-06	1.81	209.26	739.81
OTU10	CL500-29 marine group	3.33e-05	1.73	233.16	780.59
OTU2	Cyanobium PCC-6307	9.74e-05	-1.38	30819.91	11809.67
OTU8	CL500-29 marine group	9.74e-05	1.59	203.45	610.51
OTU19	Sporichthyaceae unclassified	4.44e-03	2.35	16.58	86.64
OTU20	Sporichthyaceae unclassified	5.83e-03	2.4	14.05	75.02
OTU14	Clade III	1.17e-02	1.86	30.81	110.69
OTU80	Nocardioides	1.71e-02	5.64	0	14.02
OTU13	Methylacidiphilaceae uncultured	2.68e-02	1.54	51.42	149.39
OTU114	Sphingomonadaceae unclassified	2.73e-02	2.6	8.35	47.39
OTU149	Actinobacteria unclassified	4.86e-02	-2.58	25.04	4.25

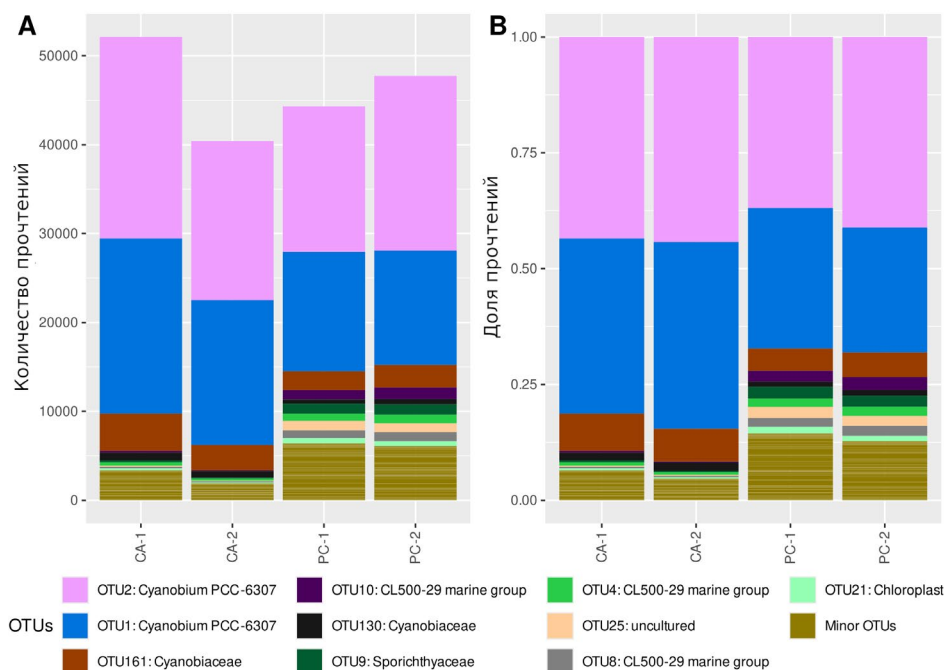
**Примечание:** \* Среднее значение численности в соответствующей группе (CA или PC)

Различия, наблюдаемые при профилировании сообществ с использованием разных фильтрующих материалов, указывает на то, что результаты, полученные на разных фильтрах, нельзя сравнивать, за исключением случаев, когда это специально сделано для оценки их разницы в эффективности фильтрации. Для проведения исследований следует выбирать производителя, тип и предпочтительно партию фильтра с учетом сравнения структуры и состава сообщества. Также следует учитывать химическую инертность фильтрующего материала, чтобы избежать выделения соединений, влияющих на экстрак-

цию и амплификацию ДНК. По нашим результатам, фильтры PC оказались более эффективными по сравнению с фильтрами CA при профилировании пресноводных бактериальных сообществ.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЛИН СО РАН: И.С. Михайлову за помощь в проведении полевых исследований и Е.В. Лихошвай за ценные советы при написании рукописи. Работа выполнена при поддержке проекта Министерства науки



**Рис.3.** Численность OTU в абсолютных значениях (А) и долях (В). Представлены топ-10 наиболее распространенных OTU. Остальные OTU объединены в категорию «Minor OTUs».

и высшего образования РФ: № 0279-2021-0009. Исследование выполнено с использованием микроскопов Приборный центр коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ»). Также выражаем благодарность Иркутскому суперкомпьютерному центру Сибирского отделения Российской академии наук за предоставление доступа к высокопроизводительному кластеру «Академик В.М. Матросов» и Центру коллективного пользования Единой информационно-вычислительной сети Иркутского научно-образовательного комплекса за предоставление инфраструктуры для хранения данных.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что нет никаких конфликтов интересов.

## Список литературы

- Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541-555. DOI: [10.1016/j.mimet.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009)
- Bukin Y.S., Mikhailov I.S., Petrova D.P. et al. 2023. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 229 DOI: [10.1007/s11274-023-03678-1](https://doi.org/10.1007/s11274-023-03678-1)
- Chua E-W., Miller A.L., Kennedy M.A. 2015. Choice of PCR microtube can impact on the success of long-range PCRs. *Analytical Biochemistry* 477: 115-117. DOI: [10.1016/j.ab.2015.02.023](https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.023)
- Djurhuus A., Port J., Closek C.J. et al. 2017. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science* 4: 314. DOI: [10.3389/fmars.2017.00314](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314)
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Eichmiller J.J., Miller L.M., Sorensen P.W. 2015. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources* 16(1): 56-68. DOI: [10.1111/1755-0998.12421](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421)
- Fonseca V.G., Nichols B., Lallias D. et al. 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSUmetagenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 40(9): e66. DOI: [10.1093/nar/gks002](https://doi.org/10.1093/nar/gks002)
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular biology and evolution* 35(2): 518-522. DOI: [10.1093/molbev/msx281](https://doi.org/10.1093/molbev/msx281)
- Hugon P., Lagier J., Colson P. et al. 2017. Repertoire of human gut microbes. *Microbial Pathogenesis* 106: 103-112. DOI: [10.1016/j.micpath.2016.06.020](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020)
- Li J., Lawson Handley L.J., Read D.S. et al. 2018. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*. DOI: [10.1111/1755-0998.12899](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899) Epub ahead of print. PMID: 29766663
- Love M.I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 *Genome Biology* 15(12): 550. DOI: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)
- McMurdie P.J., Holmes S. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8(4): e61217. DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)
- Mikhailov I.S., Galachyants Y.P., Bukin Y.S. et al. 2022. Seasonal Succession and Coherence Among Bacteria and Microeukaryotes in Lake Baikal. *Microbial Ecology* 84(2): 404-422. DOI: [10.1007/s00248-021-01860-2](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01860-2)
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1530-1534. DOI: [10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015)
- Moldovan O.T., Baricz A., Szekeres E. et al. 2020. Testing Different Membrane Filters for 16S rRNA Gene-Based Metabarcoding in Karstic Springs. *Water* 12(12): 3400. DOI: [10.3390/w12123400](https://doi.org/10.3390/w12123400)
- Oksanen J., Simpson G., Blanchet F. et al. 2022. vegan: Community Ecology Package. URL: [cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf](https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf)
- Rappé M.S., Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-94. DOI: [10.1146/annurev.micro.57.030502.090759](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759)
- Rognes T., Flouri T., Nichols B. et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584. DOI: [10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)
- Salonen I.S., Chronopoulou P., Nomaki H. et al. 2021. 16S rRNA Gene Metabarcoding Indicates Species-Characteristic Microbiomes in Deep-Sea Benthic Foraminifera. *Frontiers in Microbiology* 12: 694406. DOI: [10.3389/fmicb.2021.694406](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694406)
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-41. DOI: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)
- Takahashi M., Saccò M., Kestel J.H. et al. 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal bio-monitoring revolution. *Science of the Total Environment* 873: 162322. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.162322](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322)
- Turner C.R., Barnes M.A., Xu C.C. et al. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676-684. DOI: [10.1111/2041-210X.12206](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206)
- Разумов А.С. 1931. Прямой метод учета бактерии в воде. Сравнение его с методом Коха. *Микробиология* 1(2): 131-136.

# Phototrophic bacterioplankton of four stratified boreal ferruginous lakes of the Northern Hemisphere: comparative analysis of vertical 16S rRNA profiles

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Gorbunov M.Yu.\*

Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Ecology of the Volga Basin of the Russian Academy of Sciences, st. Komzina, 10, Togliatti, 445003 Russia

**ABSTRACT.** The aim of the study was to analyze the phototrophic bacterioplankton composition and vertical structure of Lake Linevo, a polyhumic iron-rich lake in the Raifa section of the Volga-Kama Nature Reserve (Tatarstan, Russia), and three other ferruginous boreal lakes in Russia, Finland, and Canada. The results demonstrated the presence of identical phylogenetic groups and dominant operational taxonomic units, but the intensity of development and overall structure of the phototrophic bacterioplankton community was nevertheless different. Highest abundance was detected in Lake Linevo which had a number of unique features when compared to the other studied lakes. In particular, it had the largest number of phototrophic bacteria and a significant abundance and diversity of phototrophic Chloroflexales that were scarce in the other lakes. It seems desirable to further characterize the oxygen-depleted zone of this lake in more detail and, if possibly, to apply metagenomic and whole-genome analysis methods that have already been used in lakes Lovojärvi and L227 as well as many other boreal brown-water lakes.

**Keywords:** boreal lakes, ferruginous hypolimnion, bacterioplankton, phototrophic bacteria

**For citation:** Gorbunov M.Yu. Phototrophic bacterioplankton of four stratified boreal ferruginous lakes of the Northern Hemisphere: comparative analysis of vertical 16S rRNA profiles // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 900-907. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-900](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-900)

## 1. Introduction

Many stratified lakes in the temperate forest zone have a ferruginous hypolimnion (Schiff et al., 2017). Such lakes are relatively rare in the Middle Volga region, and sporadically found mainly in the Mari and Nizhny Novgorod Polesie regions. However, there are several lakes of this type on the territory of the Raifa section of the Volga-Kama Nature Reserve, near Kazan city. The most characteristic of these is Lake Linevo. Since 2006, we have been studying the vertical structure of phototrophic bacterioplankton of this lake using “classical” methods. In 2022, we also determined the phylogenetic composition of microorganisms for the first time based on metabarcoding data from the hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene at five different horizons.

This study aims to compare the phototrophic bacterioplankton composition and vertical structure of this particular lake with the available data from three other ferruginous forest lakes: Lake Svetloe (Arkhangel'sk region, Russia), Lake Lovojärvi (Finland) and Lake

L227 (Experimental Lake Area, Ontario, Canada), to evaluate the similarities and differences between these lakes, and particularly the typical and unique features of Lake Linevo.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Physicochemical conditions

Lake Linevo is a flow-through lake on the Ser-Bulak creek with maximum depth of 5.75 m and surface area of about 0.07 km<sup>2</sup>. (Unkovskaya et al., 2009) Its water has a high color, 270 oPt, low mineralization and even in the surface layer contains high concentrations of iron (more than 10-20 µM). In summer, the lake is stratified; water layers below 1.5-2 m are sharply hypoxic or completely deprived of oxygen. Iron concentration in the near-bottom layers varied from 0.27 mM (2006) to 0.17 mM (2019) while the sulfide concentrations were always less than 10 µM.

The characteristics of lakes L227, Lovojärvi and Svetloe are given in the respective articles (Schiff et

\*Corresponding author.

E-mail address: [myugor1960@gmail.com](mailto:myugor1960@gmail.com) (M.Yu. Gorbunov)

Received: June 05, 2024; Accepted: June 20, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





al., 2017; van Grinsven et al., 2021, Kallistova et al., 2018). All these lakes have a high content of Fe (II) in the bottom layers, which reaches 0.17 mM, 0.83 mM and 0.24 mM, respectively. Lakes L227 and Lovojärvi are polyhumic, Lake Svetloe is clear-water and has confirmed meromixis. Lake Lovojärvi has a halocline from 12 to 15 m, below which, apparently, there is a small monimolimnion, which was not mentioned in (van Grinsven et al., 2021).

Deposition of the results of high-throughput sequencing of bacterioplankton samples from Lake Linevo is in preparation; archived results from the remaining lakes have been downloaded from the public SRA archives database (NCBI). Run numbers are: Lake L227 (2014) – SRR5050827, SRR5050844, SRR5050836, SRR5050838, SRR5050833 and SRR5050835; Lake Lovojärvi – SRR14118646 - SRR14118649, SRR14118651 - SRR14118658; Lake Svetloe – SRR6059086 - SRR6059086.

## 2.2. Bioinformatics processing

Paired sequences from lakes L227, Lovojärvi and Linevo were initially merged using the Usearch program (Edgar, 2010). The positions of primer sequences 515f and 806r (Walters et al., 2015) were determined; the fragments delimited by primers sequences were extracted, and the reads in which these sequences were not found were discarded. Further processing and clustering into operational taxonomic units (OTUs) was carried out using the Usearch program according to the standard pipeline.

The taxonomy of the obtained OTUs was assigned using the SINA online service on the Arb-Silva platform (database v.138.0) and refined using the databases PR2 and RDP v.19 and 16S-rRNA gene collection GTDB\_bac120\_arc53\_ssu\_r214\_fullTaxo.fa (Ali, 2023) as well as by search in Genbank using BLAST. OTUs identified as belonging to eukaryotes, mitochondria and chloroplasts were excluded from further analysis.

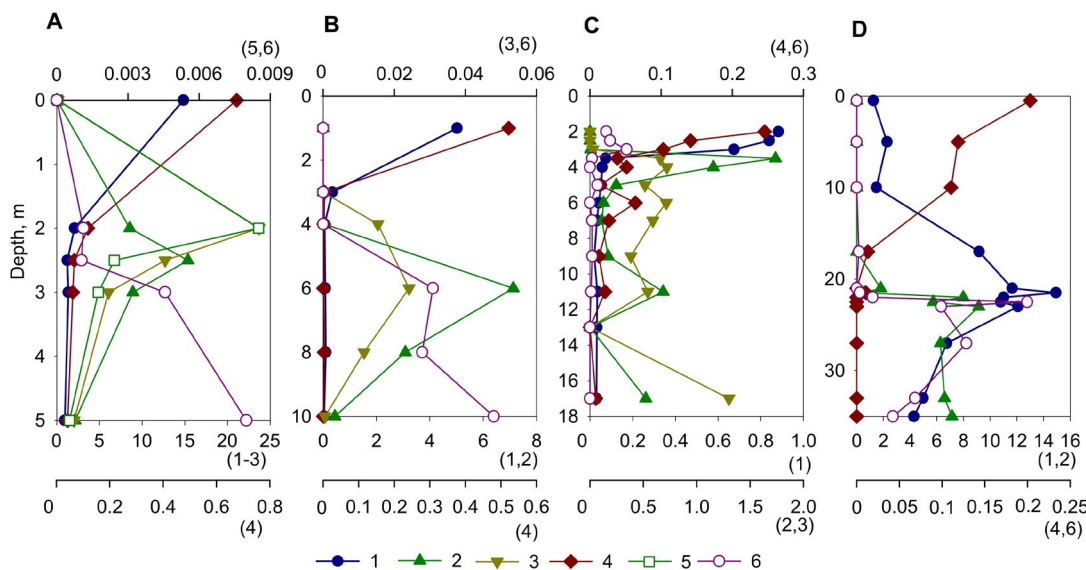
## 3. Results and discussion

The pooled library sequences were clustered into 7,717 prokaryotic operational taxonomic units (OTUs); 520 of these belonged to Archaea (10 phyla), 7,039 belonged to Bacteria (58 phyla) and 158 were unclassified at the kingdom level. The average number of ten bacterial phyla (in descending order: Pseudomonadota, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Desulfobacteria, Patescibacteria, Cyanobacteria, Planctomycota and Acidobacteria) and one archaeal phylum (Halobacteria) exceeded 1%.

Phototrophic bacteria in lakes were represented mainly by oxygenic cyanobacteria and anoxygenic Chlorobiaceae and Chloroflexaceae. Purple sulfur bacteria, Chromatiaceae, were almost absent. Identification of non-sulfur and aerobic APBs from the phyla Pseudomonadota and Gemmatimonadota, using the V4 region of the 16S rRNA, is hardly possible.

Cyanobacteria except for clear-water Lake Svetloe, were most numerous in the epilimnion; below their abundance decreases sharply (Figure A-C). In Lake Svetloye, their share was maximal in the chemocline zone, at 20-23 m (Figure D). The dominant group in all lakes was the family Cyanobiaceae, which includes single-celled picocyanobacteria and small-celled colonial forms, traditionally assigned to genera *Anathece*, *Aphanocapsa*, *Merismopedia*, *Cyanodictyon* and even some *Microcystis* (Callieri et al., 2012). In L227 Cyanobiaceae accounted for about half of all cyanobacteria, while in other lakes its abundance usually exceeds 80–90%. The rest of the cyanobacterial OTUs belonged mostly to filamentous forms, among which two families, Pseudanabaenaceae and Nostocaceae, were prominent. Although a total of 46 OTU belonging to Cyanobacteria were detected, only five, four *Cyanobia* and *Dolichospermium* sp. (Nostocaceae), were found in all lakes, and four other OTU were present in three of four studied lakes.

Among anoxygenic phototrophs, Chlorobia was the most important in all lakes. The dominant OTU-8



**Fig.** Vertical distribution of taxonomic groups of phototrophic bacteria in the studied lakes: A- lake. Linevo, B- lake L227, N- lake Lovojärvi, D - lake Svetloe. Designations of taxa: 1 – Cyanobacteriia, 2 – Chlorobiales, 3 –Chloroflexales, 4 – Roseflexaceae, 5 – Ca. Chloroheliales (54-19), 6 – Chromatiaceae. The scale along the x-axes is given as a percentage of total reads. The taxa associated with these axes is indicated in parentheses.

sequence matches the *Chlorobium* sp903851385 and is similar to the common *Pelodictyon clathratiforme* 4DE and two photoferrotrophs, *C. feroxidans* Kofox and *Ca. Chlorobium masyuteum*, suggesting possible iron oxidizing activity; the next most abundant OTU-107, which differs by one nucleotide from the *Chlorobium* sp909394635 (GCA\_90994463.1), is far from a photoferrotrophic species, but was isolated from a small forest lake, Lomtjärnan (Sweden), with a high methane content. This OTU occurs in significant amounts only in Lake Linevo, along with OTU-5599, which has no closely related cultured analogues and may belong to the epibionts of phototrophic consortia (similarity to the clone AJ272091 98.81%).

The most characteristic feature of bacterio-plankton in the anaerobic zone of Lake Linevo from the very beginning of our research there was the presence of planktonic Chloroflexales (Gorbunov, 2011) morphologically identified as “*Chloronema giganteum*”. According to metabarcoding data, fifteen OTUs of the phototrophic Chloroflexia were found in the studied lakes, twelve of them belonged to the Chloroflexaceae family. Eleven of these OTUs were present in Lake Linevo while the remaining one was found only in Lake L227. Only two OTU were registered in each of the lakes, L227 and Lovöjärvi, and they were absent from Lake Svetloe. Only OTU-48 and OTU-636 belonged to the *Chloronema giganteum* phylogenetic lineage GNSB-1. Both of them were found in Lake Linevo and were absent from other lakes. OTE-48 was almost absent at a depth of 2 m, but developed at 2.4 and 3 m, reaching an abundance of 2-3.5%. The share of the OTU-636 did not exceed 0.03%.

Six detected OTUs formed a common group with clone ENRICH SisoF2F (EU918581) from Lake Siso (Bañeras et al., 2009), and are more distantly related to the uncultured clones Um-2 (KP341999) from the microbial mat of the Umkey spring (Buryatia), and CAL M1 (FR675955) from ferruginous sands of Elba Island (Italy). These OTUs are distant from all cultured species. These included OTU-19, the absolute dominant in the lake Linevo at a depth of 2 m, where its abundance exceeded 10% of the total. The remaining five OTUs were sparse. Three more clones, OTU-50, OTU-67 and OTU-1319, belonged to the genus *Oscillochloris*. The first two OTUs reached a population of 4-5% at a depth of 2 m in the lake Linevo, and were found in small quantities in lake Lovöjärvi, and the third OTU was present in lake L227.

Two minor OTUs found in the epilimnion of all lakes belonged to the genus UBA965 (Roseiflexaceae). Since members of this genus contain the *pufM* gene and develop in the aerobic layer of many freshwater bodies (Villena-Aleman et al., 2023), they are likely aerobic APB. Thus, they were present in the epilimnion of the studied lakes and significantly reduced their numbers with depth (Fig.). These OTUs were the only members of Chloroflexales detected in Lake Svetloe. Clone OTU-383 found in the metalimnion of Lake Linevo had 94% similarity to the recently described *Ca. Chlorohelix allophototropa* (L227-S17 sp013390565). Noteworthy, no representatives of this genus were found in Lake L227 itself in 2014.

## 4. Conclusions

The presented data demonstrate that, despite the presence of similar metabolic groups of bacteria and archaea and individual dominant operational taxonomic units (OTUs), the overall structure of bacterio-plankton communities in ferruginous lakes differs. The ratios of metabolic groups and their subgroups are relatively stable within each lake but there is a sharp contrast between lakes which is often difficult to explain.

Lake Linevo has several unique features compared to other studied lakes. It has the largest development of phototrophic bacteria overall, as well as a significant development and diversity of phototrophic Chloroflexota, which are minor even in Lake L227. In future, it would be desirable to obtain more data to fully characterize the oxycline zone of this lake, especially the upper part of the oxycline zone. Given the presence of unidentified dominant sequences, the use of metagenomic and genome-wide analysis methods may have good prospects for studying this lake.

## Acknowledgements

The work was carried out within the framework of a State Assignment #122032500063-0 “Change, sustainability and conservation of biological diversity ... of the Volga basin”.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Ali A. 2023. DADA2 formatted 16S rRNA gene sequences for both bacteria & archaea (4.4) [Data set]. Zenodo. DOI: [10.5281/zenodo.10403693](https://doi.org/10.5281/zenodo.10403693)
- Bañeras L., Gich F., Martinez-Medina M. et al. 2009. New phylotypes of mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacteria enriched from sulfide-containing environments. *Environmental microbiology reports* 1(1): 86-93. DOI: [10.1111/j.1758-2229.2008.00009.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00009.x)
- Callieri C., Cronberg G., Stockner J.G. 2012. Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. In: *Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 229-269. DOI: [10.1007/978-94-007-3855-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_8)
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Gorbunov M.Yu. 2011. Vertical distribution of bacteriochlorophylls in humic lakes of the Volga-Kama National Biosphere reserve (Tatarstan Republic). *Povolzhsky Ecologicheskij Zhurnal [Volga Region Ecological Journal]* (3): 280-293. (in Russian)
- Kallistova A., Kadnikov V., Rusanov I. et al. 2018. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake. *Aquatic Microbial Ecology* 82(1): 1-18. DOI: [10.3354/ame01878](https://doi.org/10.3354/ame01878)
- Schiff S.L., Tsuji J.M., Wu L. et al. 2017. Millions of boreal shield lakes can be used to probe Archaeal Ocean biogeochemistry. *Scientific reports* 7(1): 46708. DOI: [10.1038/srep46708](https://doi.org/10.1038/srep46708)

Unkovskaya E.N., Shagidullin R.R., Tarasov O.Yu et al. 2009. The dynamics of the chemical composition of the lakes of the Volga-Kama Reserve. Samarskaya Luka: problemy regional'noj i global'noj ekologii [Samarskaya Luka: problems of regional and global ecology]. 18(3): 114-120. (in Russian)

Van Grinsven S., Oswald K., Wehrli B. et al. 2021. Methane oxidation in the waters of a humics-rich boreal lake stimulated by photosynthesis, nitrite, Fe (III) and humics. *Biogeosciences* 18: 3087–3101. DOI: [10.5194/bg-18-3087-2021](https://doi.org/10.5194/bg-18-3087-2021)

Villena-Aleman C., Mujakić I., Porcal P. et al. 2023. Diversity dynamics of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a freshwater lake. *Environmental Microbiology Reports* 15(1): 60-71. DOI: [10.1111/1758-2229.13131](https://doi.org/10.1111/1758-2229.13131)

Walters W., Hyde E.R., Berg-Lyons D. et al. 2015. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems* 1(1): e00009-15. DOI: [10.1128/mSystems.00009-15](https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15)

# Фототрофный бактериопланктон четырех стратифицированных ферругинозных озер лесной зоны Северного полушария: сравнительный анализ вертикальных профилей 16S рРНК

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Горбунов М.Ю.\*

Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, 445003 Россия

**АННОТАЦИЯ.** Целью исследования был анализ состава и вертикальной структуры фототрофного бактериопланктона полигуменного ферругинозного озера Линево Раифского участка Волжско-Камского заповедника (Татарстан, Россия) и трех других ферругинозных бореальных озер России, Финляндии и Канады. Результаты анализа продемонстрировали преобладание идентичных филогенетических групп и доминирующих операционных таксономических единиц фототрофных бактерий. Однако степень развития и структура фототрофного бактериопланктона, тем не менее, была различной. Наибольшая численность фототрофных бактерий отмечена в озере Линево, которое имело ряд уникальных особенностей по сравнению с другими изученными озерами. В частности, в нем значительная численность и разнообразие фототрофных Chloroflexales, которые были редки в других озерах. Представляется перспективным более детально охарактеризовать зону окисления этого озера и, по возможности, применить методы метагеномного и полногеномного анализа, которые уже были использованы в исследованиях озер Ловоярви и L227, а также многих других темноводных бореальных озер.

**Ключевые слова:** лесные озера, ферругинозный гиполимнион, бактериопланктон, фототрофные бактерии

Для цитирования: Горбунов М.Ю. Фототрофный бактериопланктон четырех стратифицированных ферругинозных озер лесной зоны Северного полушария: сравнительный анализ вертикальных профилей 16S рРНК // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 900-907. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-900](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-900)

## 1. Введение

Многие стратифицированные озера умеренной лесной зоны имеют ферругинозный гиполимнион (Schiff et al., 2017). В Среднем Поволжье они довольно редки, и спорадически встречаются в основном в Марийском и Нижегородском Полесье, однако имеется несколько озер этого типа в окрестностях г. Казани, на территории Раифского участка Волжско-Камского заповедника. Наиболее характерным из них является озеро Линево; с 2006 г. мы исследовали вертикальную структуру фототрофных бактерий этого озера «классическими» методами; в 2022 г., наряду с этим, впервые был определен филогенетический состав микроорганизмов по данным метабаркодинга гипервариабильного участка V4 гена 16S-рРНК на пяти горизонтах.

Целью настоящей работы является сравнение состава и вертикальной структуры фототрофного бактериопланктона этого озера с тремя другими лесными ферругинозными озерами, для которых доступны данные метабаркодинга: оз. Светлое (Архангельская обл., Россия), оз. Ловоярви (Финляндия) и оз. L227 (Экспериментальная Озерная Область (IISD-ELA), Онтарио, Канада), чтобы оценить его типичные и уникальные черты среди этой очень своеобразной группы озер.

## 2. Материалы и методы.

### 2.1. Физико-химические условия в озерах

Озеро Линево – это русловое озеро на ручье Сер-Булак, площадью около 7 га с максимальной

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [myugor1960@gmail.com](mailto:myugor1960@gmail.com) (М.Ю. Горбунов)

Поступила: 05 июня 2024; Принята: 20 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





глубиной 5.75 м (Унковская и др., 2009). Вода имеет высокую цветность, 270 оPt, низкоминерализована и даже в поверхностном слое содержит высокие концентрации железа (более 10-20 мкМ). Концентрация Fe в гипolimнионе в разные годы варьировала от 0.27 мМ (2006) до 0.17 мМ (2019), а концентрация сульфидов не превышала 10 мкМ. В летний период озеро стратифицировано; водные слои ниже 1.5-2 м резко гипоксичны или полностью лишены кислорода.

Характеристики озер L227, Ловоярви и Светлое даны в статьях, посвященных их исследованию (Schiff et al., 2017; van Grinsven et al., 2021, Kallistova et al., 2018). Все эти озера имеют высокое содержание Fe (II) в придонном слое, которое достигает, соответственно, 0.17, 0.83 и 0.24 мМ. Озеро Светлое – единственное достоверно меромиктическое и светловодное, L227 и Ловоярви – полигузмозные. Оз. Ловоярви имеет галоклин от 12 до 15 м, ниже которого, возможно, расположен небольшой по объему мнимолимнион.

Результаты высокопроизводительного секвенирования проб бактериопланктона из оз. Линево готовятся к депонированию, архивные результаты из остальных озер загружены из общедоступной базы данных SRA-архивов NCBI (оз. L227 (данные 2014 г.) – SRR5050827, SRR5050844, SRR5050836, SRR5050838, SRR5050833 и SRR5050835; оз. Ловоярви – SRR14118646 - SRR14118649, SRR14118651 - SRR14118658; оз. Светлое – SRR6059086 - SRR6059086).

## 2.2. Биоинформатическая обработка

Парные последовательности из озер L227, Ловоярви и Линево были предварительно объединены с помощью программы Usearch (Edgar, 2010). Из всех последовательностей были выделены участки, ограниченные снаружи праймерами 515f и 806r (Walters et al., 2015); последовательности, в

которых они не были обнаружены, отбрасывались. Дальнейшая обработка и выделение операционных таксономических единиц проводилась в программе Usearch по стандартной схеме.

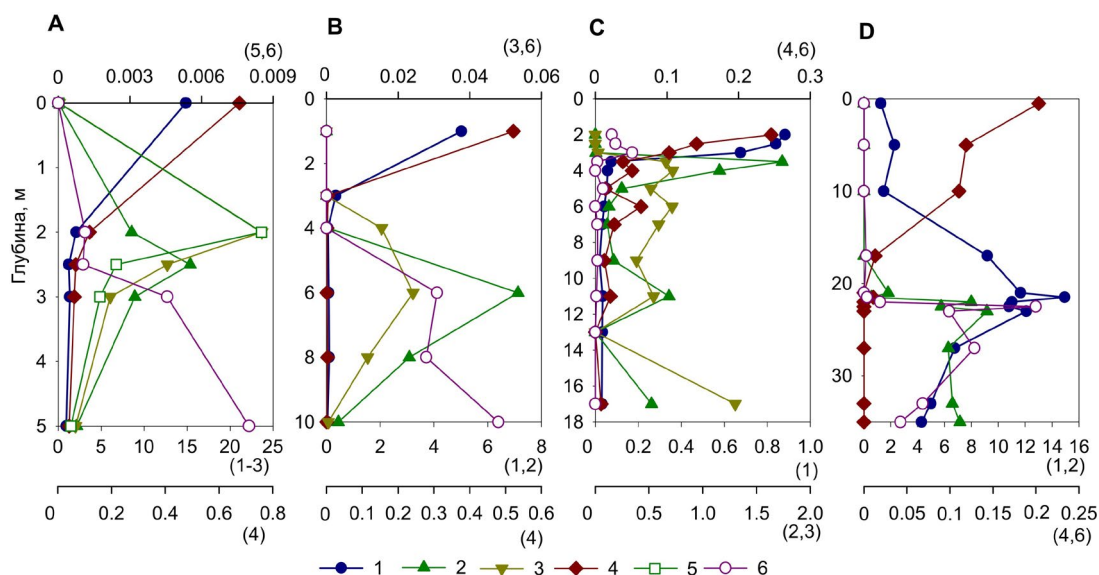
Таксономия полученных ОТЕ была присвоена с помощью online-сервиса SINA на платформе arb-silva (база данных v.138.0) и уточнена с использованием баз данных PR2, RDP v.19 и GTDB\_bac120\_arc53\_ssu\_r214\_fullTaxo.fa (Ali, 2023) и поиска в Genbank с помощью Blast. ОТЕ, идентифицированные как принадлежащие эукариотам, их митохондриям и хлоропластам были исключены из анализа.

## 3. Результаты и обсуждение

Последовательности объединенной библиотеки были кластеризованы в 7717 ОТЕ прокариот; 520 из них принадлежали археям (10 филумов), 7039 – бактериям (58 филумов) и 158 остались неклассифицированными до царства. Представители 10 филумов бактерий, в порядке убывания: Pseudomonadota, Bacteroidota (включая Chlorobia), Actinobacteriota, Verrucomicrobiota, Chloroflexota, Desulfobacterota, Patescibacteria, Cyanobacterota, Planctomycetota и Acidobacteriota, и одного филума архей, Halobacterota, по средней доле в исследованных пробах превышают порог 1%.

Фототрофные бактерии в озерах представлены кислородными цианобактериями и анаэробными Chlorobiaceae и Chloroflexaceae. Chromatiaceae практически отсутствуют; определение несерных и аэробных АФБ филумов Pseudomonadota и Gemmatimonadota по данным о V4-фрагменте 16S рРНК практически невозможно.

Цианобактерии, за исключением оз. Светлое, наиболее многочисленны в эпилимнионе и резко снижают вклад в общую численность с глубиной (Рис. А-С). В оз. Светлое их доля максимальна в зоне хемоклина, 20-23 м (Рис. D). Доминирующей группой в озерах является сем. Cyanobiaceae, объе-



**Рис.** Вертикальное распределение таксономических групп фототрофных бактерий в исследованных озерах: А- оз. Линево, В – оз. L227, С – оз. Ловоярви, D – оз. Светлое. Обозначения таксонов: 1- Cyanobacteria, 2 – Chlorobiales, 3 – Chloroflexaceae, 4 – Roseiflexaceae, 5 – Chlorohelicaceae, 6 – Chromatiaceae. По осям «х» - доли в общей численности, %.

диняющее одноклеточные и колониальные формы пикоцианобактерий, включая мелкоклеточные формы, традиционно относимые к родам *Anathece*, *Aphanocapsa*, *Merismopedia*, *Microcystis* и *Cyanodictyon* (Callieri et al., 2012). В оз. L227 Cyanobiaceae составляют около половины всех цианобактерий, в остальных озерах их численность, как правило, превышает 80-90% всех цианобактерий. Остальные ОТЕ принадлежат в основном к нитчатым формам, среди которых выделяются два семейства, Pseudanabaenaceae и Nostocaceae. Хотя в сумме обнаружено 46 ОТЕ, принадлежащих к Cyanobacteria, лишь пять из них – четыре Cyanobiaceae и *Dolichospermum* sp. (Nostocaceae) присутствуют во всех озерах, и еще четыре – в трех из четырех исследованных озерах.

Среди аноксигенных фототрофов наибольшее значение играют Chlorobiaceae. Последовательность доминирующего ОТЕ-8 совпадает с *Chlorobium* sp903851385 и близка к *C. feroxidans* KofoX и *Ca. Chlorobium masyuteum* и *Pelodictyon clathratiforme* 4DE, что указывает на возможную фотоферротрофию; следующий по численности и распространению ОТЕ-107 отличается одним нуклеотидом от *Chlorobium* sp903994635 (GCA\_903994635.1), далекого от фотоферротрофных видов, однако выделенного из небольшого лесного оз. Lomtjärnan (Швеция) с высокой концентрацией метана в воде. Этот ОТЕ присутствует в заметных количествах только в оз. Линево, как и еще один ОТЕ-5599. Последний не имеет близких культивируемых аналогов, и, возможно, принадлежит к эпибионтам фототрофных консорциев (сходство с клоном AJ272091 – 98.81%).

Самым характерным признаком бактериопланктона анаэробной зоны оз. Линево с самого начала наших исследований было присутствие планктонных Chloroflexales морфологически определенных как "*Chloronema giganteum*" (Горбунов, 2011). По данным метабаркодинга, в исследованных озерах обнаружены пятнадцать ОТЕ отряда Chloroflexales двенадцать из них относились к семейству Chloroflexaceae. Одиннадцать из этих OTU присутствовали в озере Линево, а отсутствовавший в нем OTU был обнаружен только в озере L227. В каждом из озера L227 и Ловоярви было зарегистрировано только по два OTU, а в озере Светлое они отсутствовали. Только OTU-48 и OTU-636 принадлежат к филогенетической линии *Chloronema giganteum* GNSB-1. Оба они были обнаружены только в озере Линево и отсутствовали в других озерах. ОТЕ-48 практически отсутствовал на глубине 2 м, но развивался на глубине 2,4 и 3 м, достигая численности 2-3,5%. Доля OTU-636 не превышала 0,03%.

Шесть обнаруженных ОТЕ входят в общую группу с клоном ENRICH SisoF2F (EU918581) из оз. Siso (Bañeras et al., 2009), более отдаленно родственны некультивируемым клонам Um-2 (KP341999) из микробного мата источника Умкей (Бурятия), и CAL M1 (FR675955) из железистых песков острова Эльба (Италия), и далеки от известных культивируемых видов. К этой группе при-

надлежал абсолютный доминант на глубине 2 м в оз. Линево, численность которого на этой глубине превышала 10% от общей, ОТЕ-19. Остальные пять ОТЕ были немногочисленны. Еще три клона, ОТЕ-50, ОТЕ-67 и ОТЕ-1319, принадлежали к роду *Oscillochloris*. Первые два из них достигали численности 4-5% на глубине 2 м в оз. Линево, и в небольших количествах обнаруживались в оз. Ловоярви, а третий – в оз. L227.

Два минорных ОТЕ, встречавшихся в эпилимнионе всех озера, относились к роду UBA965 (Roseiflexaceae). Поскольку представители этого рода содержат ген *rufM* и развиваются в аэробном слое многих пресных водоемов (Villena-Alemanu et al., 2023), они, вероятно, являются аэробными АФБ. Действительно, они присутствовали в эпилимнионе исследованных озера и снижали численность с глубиной (Рис.). Эти ОТЕ были единственными обнаруженными Chloroflexales в оз. Светлое. Клон ОТЕ-383, встречавшийся в металимнионе оз. Линево, имел 94% сходство с недавно описанным *Ca. Chlorohelix allophototropha* (L227-S17 sp013390565). Интересно, что в самом оз. L227 представители этого рода в 2014 г. не обнаруживались.

#### 4. Выводы

Представленные данные показывают, что несмотря на присутствие одних и тех же доминирующих ОТЕ, структура фоторофного бактериопланктона ферругинозных озера различна. Хотя в каждом из озера его вертикальная структура закономерно изменяется с глубиной, существует резкий и не всегда объяснимый контраст между озерами.

Озеро Линево имеет несколько уникальных черт: в нем наблюдаются высокие численности фототрофных бактерий в целом, а также массовое развитие и разнообразие фототрофных Chloroflexota, которые почти полностью отсутствуют даже в оз. L227. В будущем было бы желательно получить дополнительные данные для более подробной характеристики зоны оксиклина этого озера, и особенно его верхней части. Учитывая присутствие нескольких фототрофных клонов, далеких от известных видов, при дальнейшем изучении озера может иметь хорошие перспективы использование методов метагеномного и полногеномного анализа.

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изменение, устойчивость и сохранение биологического разнообразия...» № 122032500063-0

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Горбунов М.Ю. 2011. Вертикальное распределение бактериохлорофиллов в гумозных озёрах Волжско-Камского заповедника (Республика Татарстан). Поволжский экологический журнал (3): 280-293.

Унковская Е.Н., Шагидуллин Р.Р., Тарасов О.Ю. и др. 2009. Динамика химического состава озёр Волжско-Камского заповедника. Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии 18(3): 114-120.

Ali A. 2023. DADA2 formatted 16S rRNA gene sequences for both bacteria & archaea (4.4) [Data set]. Zenodo. DOI: [10.5281/zenodo.10403693](https://doi.org/10.5281/zenodo.10403693)

Bañeras L., Gich F., Martinez-Medina M. et al. 2009. New phylotypes of mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacteria enriched from sulfide-containing environments. Environmental microbiology reports 1(1): 86-93.

Callieri C., Cronberg G., Stockner J.G. 2012. Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. In: Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 229-269.

Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)

Kallistova A., Kadnikov V., Rusanov I. et al. 2018. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake. Aquatic Microbial Ecology 82(1): 1-18. DOI: [10.3354/ame01878](https://doi.org/10.3354/ame01878)

Schiff S.L., Tsuji J.M., Wu L. et al. 2017. Millions of boreal shield lakes can be used to probe Archaean Ocean biogeochemistry. Scientific reports 7(1): 46708. DOI: [10.1038/srep46708](https://doi.org/10.1038/srep46708)

Van Grinsven S., Oswald K., Wehrli B. et al. 2021. Methane oxidation in the waters of a humics-rich boreal lake stimulated by photosynthesis, nitrite, Fe (III) and humics. Biogeosciences 18: 3087-3101. DOI: [10.5194/bg-18-3087-2021](https://doi.org/10.5194/bg-18-3087-2021)

Villena-Aleman C., Mujakić I., Porcal P. et al. 2023. Diversity dynamics of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a freshwater lake. Environmental Microbiology Reports 15(1): 60-71. DOI: [10.1111/1758-2229.13131](https://doi.org/10.1111/1758-2229.13131)

Walters W., Hyde E.R., Berg-Lyons D. et al. 2015. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. mSystems 1(1): e00009-15. DOI: [10.1128/mSystems.00009-15](https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15)

# Characterization of Saccharimonadia bacteria in Lakes Baikal and Khubsugul: taxonomic and functional diversity

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Gutnik D.I.<sup>1\*</sup>, Potapov S.A.<sup>1</sup>, Krasnopeev A.Y.<sup>1</sup>, Tikhonova I.V.<sup>1</sup>, Bukin Yu.S.<sup>1</sup>, Gladkikh A.S.<sup>2</sup>, Klyuchnikova E.O.<sup>2</sup>, Sbarzaglia V.A.<sup>2</sup>, Aslamov I.A.<sup>1</sup>, Belykh O.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Saint Petersburg Pasteur Institute, 14 Mira Street, Saint Petersburg, 197101, Russia

**ABSTRACT.** Ultra-small bacteria are ubiquitous in the environment, but for some time they have remained out of scientific focus. One of the reasons is their small size. Ultramicrobacteria, which are defined as bacteria with a cell size of less than 0.1  $\mu\text{m}^3$ , can pass through a filter with a pore size of 0.2  $\mu\text{m}$ . Moreover, there are some difficulties associated with their cultivation. Currently, relatively pure cultures have been obtained, but mostly for dominant phyla. Rare phyla are represented only by single strains. At the same time, ultramicrobacteria are found in a wide range of environments, and their high-ordered, small genomes and unique physiological features attract the increasing attention of researchers. The development of metagenomics allows us to partially overcome cultivation limitations, and in this article, we present metagenomic assemblies derived from water samples of the largest oligotrophic lakes on the Earth, Baikal (Russian Federation) and Khubsugul (Mongolia). In this study, we carried out the taxonomic and functional analysis of reconstructed genomes of Saccharimonadia class bacteria (phylum Patescibacteria), which is intended to expand our knowledge of rare representatives of microbial communities and supplement the already available information regarding the inhabitants of the oldest ecosystems.

**Keywords:** Saccharimonadia, ultramicrobacteria, Baikal, Khubsugul, metagenomics, metabolism

**For citation:** Gutnik D.I., Potapov S.A., Krasnopeev A.Y., Tikhonova I.V., Bukin Yu.S., Gladkikh A.S., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Aslamov I.A., Belykh O.I. Characterization of Saccharimonadia bacteria in Lakes Baikal and Khubsugul: taxonomic and functional diversity // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 908-924. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-908

## 1. Introduction

The superphylum Patescibacteria, also known as the Candidate Phyla Radiation (CPR) (Rinke et al., 2013), according to The Genome Taxonomy Database (GTDB) (Parks et al., 2022), includes 30 classes that comprise more than 15% of all bacterial phyla (Brown et al., 2015; Fujii et al., 2022). Patescibacteria inhabit a wide variety of environments: aquifer sediments and reservoirs, water treatment plants, activated sludge, gold mines, polar and rainforest soils, human saliva, in association with sponges and cockroaches, predominating in many of them (Brown et al., 2015; Hug et al., 2016; Fujii et al., 2022).

Currently, little is known about the functional characteristics of these bacteria, and there is no consensus on whether all CPR representatives are endosymbionts that rely on other bacteria for their vital activity, or whether some of them are capable of free-living.

Knowledge about this group of bacteria is mainly limited because currently only a few cases of cultured Patescibacteria have been described; this fact is largely due to their symbiotic/parasitic nature (Soro et al., 2014; He et al., 2021; Ibrahim et al., 2021; Yakimov et al., 2022). Some of the cultured species (e.g., TM7x) (He et al., 2015) belong to the Saccharimonadia class. Representatives of this class were first discovered by analyzing partial 16S rDNA sequences from a peat bog in Germany (Rheims et al., 1996), and they are among the best known. Interest in studying Saccharimonadia is driven mainly by their putative role in the development of oral diseases. Saccharimonadia (previously described as TM7) cultured under laboratory conditions clearly demonstrated a symbiotic relationship with actinobacteria, and a similar pattern was observed for other few cultured CPRs. Indeed, known Patescibacteria typically possess a small genome size (up to 1.0 Mb) (Lemos et al., 2019; Nakai, 2020) and incomplete biosynthe-

\*Corresponding author.

E-mail address: [gutnik@lin.irk.ru](mailto:gutnik@lin.irk.ru) (D.I. Gutnik)

**Received:** August 08, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





sis pathways (Castelle et al., 2018). A combination of these characteristics suggests a host-associated, symbiotic or parasitic lifestyle.

However, the unique habitat conditions in large deep-water oligotrophic lakes, such as Baikal and Khubsugul, may explain the decrease in genome size and the presence of functional specificities. These ecosystems are also of interest in terms of bacterial evolution, taking into account the age and common origin of the two tectonic lakes in the Baikal rift zone. In addition, samples from Lake Baikal were collected at different depths: in the upper water layers, i.e. in the photic layer (up to 25 m) and at depths of 1250-1350 m, which also potentially affects bacterial metabolism.

Therefore, this study aims to analyze and compare the functional features and lifestyle of *Saccharimonadia* obtained from Baikal and Khubsugul water samples using metagenomic assemblies and genome reconstruction.

## 2. Materials and methods

Water samples were collected in Lake Baikal at the central station of the Maloye More strait, at the central stations of the transects Listvyanka settlement-Tankhoi settlement, Ukhan Cape-Tonky Cape, Elokhin Cape-Davsha settlement, 7 km and 3 km from the Listvyanka settlement, 3 km from the Turka settlement, and 3 km from Elokhin Cape in March-September 2018-2022. During open water periods, sampling was conducted at the depths of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 m by the SBE-32 bathometer system (Carousel Water Sampler, Sea Bird Electronics Inc., USA). During the freeze-up period, samples were taken under the ice using Niskin bathometers. In Lake Khubsugul, water samples were obtained 3 km from the Khankha settlement on October 13, 2023. Samples were collected from the water layers of 0, 10, 25, 40, 50 and 70 m using the bathometer from the boat.

Water samples were sequentially filtered through polycarbonate filters with pore diameters of 0.4  $\mu\text{m}$  and 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA) to remove large forms of plankton. The filtrates were concentrated using a VivaFlow 200 tangential flow ultrafiltration system (Sartorius, Germany) to a final volume of  $\sim 20$  ml. Samples were further concentrated using a Vivaspin Turbo 15 (50 kDa, Sartorius, Germany) tangential flow ultrafiltration system to a volume of  $\sim 100$   $\mu\text{L}$ .

DNA was extracted using the standard phenol-chloroform method. DNA libraries including A\_63, A\_68, A\_9 were sequenced using the Illumina MiSeq platform. Metagenomic data was deposited in bioproject PRJNA1006167. DNA sequencing for I\_78 was performed on the DNBSEQ-G50 platform (MGISEQ-200).

Additionally, we used eight sets of raw metagenomic reads generated by Shotgun sequencing and placed for public access in bioprojects (PRJNA396997, PRJNA521725, PRJNA615165). The sequencing material was taken from Lake Baikal water samples collected in summer, on July 12-13, 2018, 8 km from the Listvyanka settlement at four depths (5, 20, 1250, and 1350 m). Winter water samples were taken from 5 and 20 m depths on March 14, 2016 and from 1250 and 1350 m depths on March 29, 2018, 7 km from the Listvyanka settlement (Cabello-Yeves et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020; Coutinho et al., 2020). The information about the relationship between the names of the reconstructed genomes and the materials for their assemblies is provided in Table 1.

The reconstruction process of the A\_63, A\_68, and A\_9 genomes included sequencing quality assessment using the MultiQC v. 1.12 program (Ewels et al., 2016), removal of adaptors with the Trim Galore v. 0.6.5 program (Krueger et al., 2023), assembly of reads into contigs using SPAdes v. 3.15.5 (Bankevich et al., 2012), and alignment of reads to contigs via BWA v. 0.7.17 (Li and Durbin, 2010) and the Samtools package v. 1.18 (Danecek et al., 2021). Metagenomic binning and isolation of genomes from the assembly were performed using the MetaWRAP v. 1.3 software package (Uritskiy et al., 2018). Assembly and analysis of P\_794 and I\_78 genomes comprised sequencing quality assessment by the FastQC v. 0.12.1 program (Andrews et al., 2010), removal of adapters and short reads (less than 141 for P\_794 and 90 for I\_78) with the application of Trimmomatic v. 0.39 (Bolger et al., 2014), and purification from eukaryotic DNA by the Kraken 2 v. 2.1.3 software package (Wood et al., 2019; Lu et al., 2022).

To assemble contigs containing P\_794, an external assembly was performed by merging the reads of the corresponding direction from eight samples; thereby, the result was one merged set of paired-end reads, which were then assembled by the MEGAHIT assembler (Li et al., 2015). For external assembly, alignment of reads to contigs was performed using the Bowtie 2 v. 2.5.4 (Langmead et al., 2019) and the Samtools

**Table 1.** Sampling conditions and data sources

	P_794	A_63	A_68	A_9	I_78
Location	Baikal	Baikal			Khubsugul
Depths, m	5, 10, 1250, 1350	0, 5, 10, 15, 20, 25, 50			0, 10, 25, 40, 50, 70
Time Period	July-March, 2016-2018	March-September, 2018-2022			October, 2023
Source of Data	Data obtained from bioprojects: PRJNA396997, PRJNA521725, PRJNA615165 (Cabello-Yeves et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020; Coutinho et al., 2020)	Data were collected and processed independently. Raw reads deposited in the bioproject PRJNA1006167			Data were collected and processed independently

v. 1.20 package (Danecek et al., 2021). Based on the obtained coverage statistics, filtering and removal of short and low-coverage contigs were performed using the R script. Final contig assemblies were performed using the SqueezeMeta pipeline (Tamames and Puente-Sánchez, 2019), applying coassembly mode for P\_794, including all eight sets of reads and external assembly, and sequential mode for I\_78. The assembler used for P\_794 was MEGAHIT (Li et al., 2015), and for I\_78–SPAdes v. 3.15.5 (Bankevich et al., 2012). Binning was performed using CONCO v. 1.1.0 (Alneberg et al., 2014), MaxBin v. 2.2.7 (Wu et al., 2016), and MetaBAT2 v. 2.12.1 (Kang, 2015). The integration of the binning results was performed in DAS Tool v. 1.1.7 (Sieber, 2018).

Completeness of the final genomes were assessed using CheckM2 v. 1.0.2 (Chklovski et al., 2023). Open reading frames (ORFs) were detected using Prodigal v.2.6.3 (Hyatt et al., 2010). Gene annotation was performed using Bakta v1.9.2 (Schwengers et al., 2021) with default settings. KEGG annotation and assignment of KO numbers to proteins was performed by the KofamKOALA service (Aramaki et al., 2020). Genomes were taxonomically classified using the Genome Taxonomy Database Toolkit (GTDB-Tk) version 2.4.0 (Chaumeil et al., 2020). MacSyFinder v. 2.1.4 (Néron et al., 2023) and TXSScan v. 1.1.3 models (Abby et al., 2016) were used to search for protein secretion systems.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Genome description and taxonomic classification

Five *Saccharimonadia* genomes were assembled based on three metagenomic datasets. All of them show

a relatively high level of assembly completeness of 84.9-97.6%, with contamination below 2.6%, except for genome I\_78 where it was 7.0% (Table 2). Their coding density (median 90.5%; range 89.6%-91.8%) and GC content (median 42.2%; range 40,7-45,0%) are consistent with free-living organisms or facultative intracellular or extracellular symbionts/parasites (Chiriack et al., 2022).

P\_794 represents the largest genome with the maximum number of CDSs (1074) and a rather extensive range of functions for a member of the class. Furthermore, based on the GTDB taxonomic database search, it can be identified only up to genus, and the similarity with the nearest reference organism according to ANI is only 78.94. 93% of TPM (transcripts per kilobase million, the number of reads normalized by the length of each read multiplied by a million) belonging to this bin corresponds to the summer samples of Baikal water from 1250 and 1350 m depths.

Genomes A\_63, A\_68, and A\_9 were also obtained from Baikal samples at the upper water layers. The size of their genomes, as well as the number of CDSs, is approximately the same order of magnitude. Taxonomic identification by GTDB revealed a fairly close similarity in ANI for A\_63 and A\_9, identifying the genus of all genomes and, in the case of A\_63, the species as well.

I\_78 is a genome assembled from sequencing data of surface water samples from Lake Khubsugul. It is the second largest of those presented in the paper and the most contaminated. At the same time, the number of CDS in it amounts to 675. Interestingly, according to the taxonomic analysis, the most similar *Saccharimonadia* belonging to the same genus, according to the preliminary classification, are A\_68 from Baikal and I\_78 from Khubsugul samples.

**Table 2.** Description and taxonomic assignment of reconstructed genomes

Name	P_794	A_63	A_68	A_9	I_78
Genome Size, bp	984 478	655 626	594 118	612 023	718 727
Completeness, %	91.6	97.6	91.2	84.9	93.9
Contamination, %	2.08	-	0.29	2.56	7.00
GC Content, %	45	41	42	41	42
Contig N50, bp	10 865	57 148	35 054	12 346	3 970
Coding Density, %	89.6	90.7	89.6	91.8	90.5
CDS	1 016	686	594	645	675
Taxonomy					
Kingdom	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Phylum	Patescibacteria	Patescibacteria	Patescibacteria	Patescibacteria	Patescibacteria
Class	Saccharimonadia	Saccharimonadia	Saccharimonadia	Saccharimonadia	Saccharimonadia
Order	Saccharimonadales	CAILAD01	CAILAD01	Saccharimonadales	CAILAD01
Family	UBA1547_A	BJGX01	CAILAD01	AWTP1-31	CAILAD01
Genus	2011-GWC2-44-17	CALRAY01	CAILAD01	CAJAXB01	CAILAD01
Species	-	CALRAY01	-	-	-
Closest reference	GCA_016199685.1	GCA_943353705.1	GCA_013816445.1	GCA_943353855.1	GCA_903832035.1
Closest ANI	78.94	97.66	78.36	92.13	77.02

Classification to species level using GTDB is realized only for A\_63. The two genomes, P\_794 and A\_9, belong to the order Saccharimonadales and to uncultivated families and genera. A\_63, A\_68 and I\_78 are assigned to uncultivated taxa at all levels.

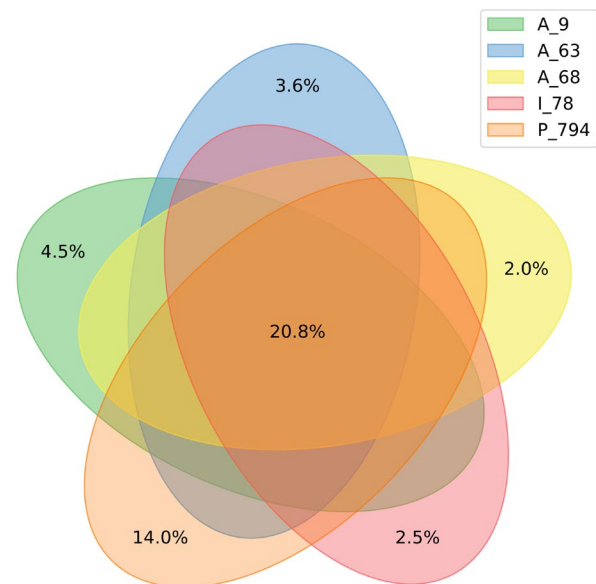
### 3.2. Annotation and functional analysis of genomes

Comparison of the annotated genomes by functional orthologs of the KEGG database showed that the number of common genes is 20.8% (Fig. 1). At the same time, the most unique gene set for this sample is possessed by P\_794, which has 14.0% of predicted genes that do not overlap with genes in the other studied genomes.

Functional analysis established a common mechanism, the most plausible for all genomes, for obtaining energy in the form of ATP—catabolism of carbohydrates with pyruvate synthesis. In this case, the production of pyruvate follows the de Vries-Stouthamer hexose monophosphate pathway or, in other words, the bifido-shunt (Pinevich, 2007). All the genomes have practically the entire set of enzymes necessary for its implementation: fructo-bisphosphate aldolase, transaldolase, and transketolase. It is remarkable that even in the absence of enzymes, a unified strategy is traced. The genes responsible for the production of phosphoglyceromutase, which is involved in the transformation of 3-phosphoglycerate into 2-phosphoglycerate and is necessary for the further pyruvate synthesis, are not present in all Saccharimonadia studied here.

From the stage of functional category analysis (Fig. 2), a distinctive feature of P\_794 was already apparent, namely, the presence of a cluster of genes responsible for the cleavage of sucrose and starch oligo- and polysaccharides to D-glucose, in particular through the production of  $\alpha$ -glucosidase, alpha-amylase, maltase-glucoamylase, etc. The second genome, in terms of the number of predicted genes, involved in carbohydrate metabolism is A\_63. However, its hexose monophosphate pathway begins with the cleavage of glucose-6-phosphate or fructose-6-phosphate. In other reviewed genomes, the functional set of carbohydrate metabolism is even smaller: A\_9, A\_68, and I\_78 are only capable of fructose-6-phosphate conversion.

Notably, in all studied Saccharimonadia, fermentation is not performed; the process is terminated by the formation of pyruvate and one ATP molecule per molecule of oxidized hexose. Normally, pyruvate, which is the most important intermediate of fermentation, undergoes oxidative carboxylation via one of the four pathways (Pinevich, 2007). In the case of the investigated genomes, the enzymes required for fermentation are absent in all genomes, except for A\_63. For this organism, lactate dehydrogenase is predicted to enable pyruvate-based lactic acid fermentation, which, however, does not find confirmation in the annotation by the KEGG. Moreover, other types of fermentation require the engagement of vitamins, the production of which is absent in all five microorganisms. At the same time, this practice is widespread in microbial commu-



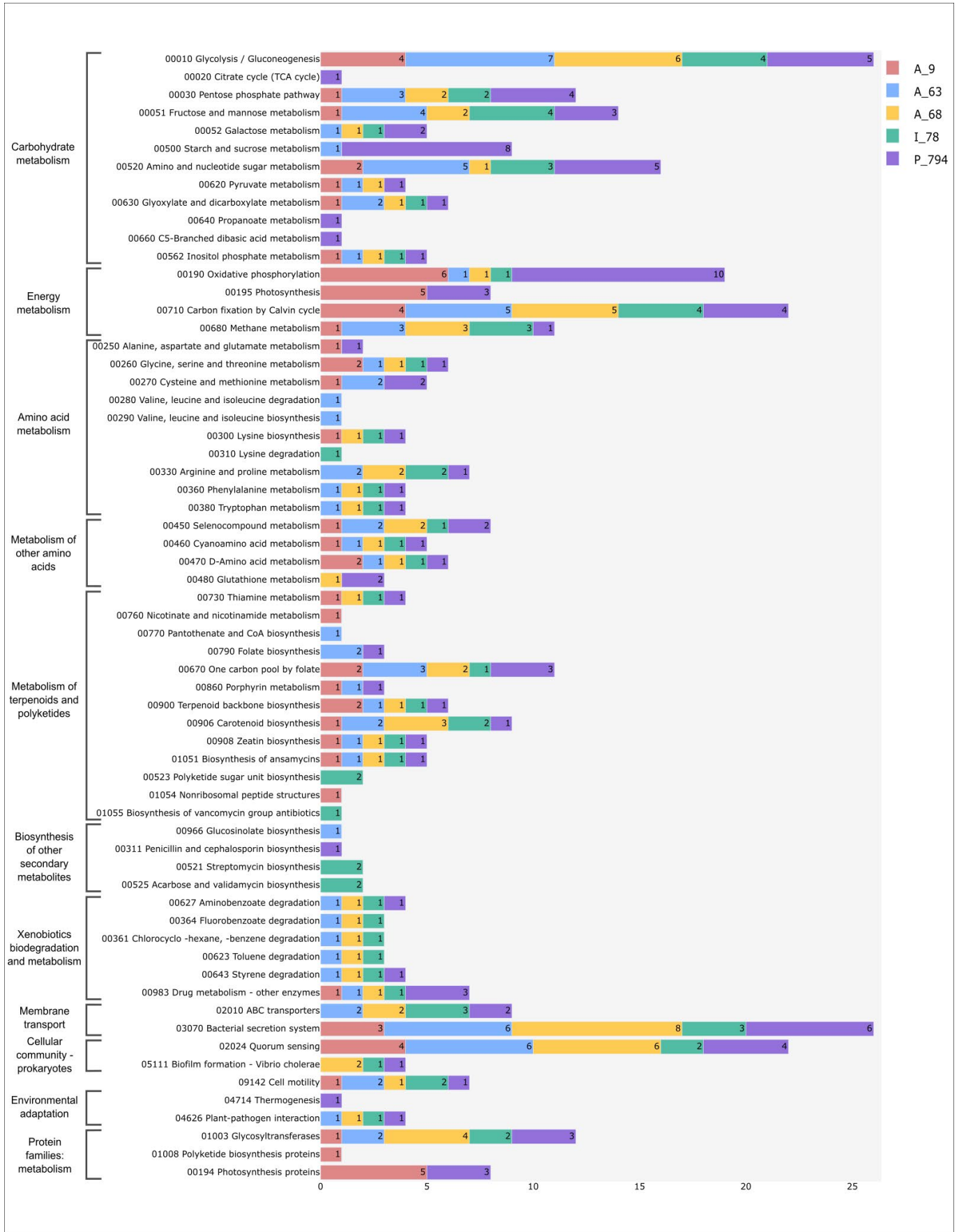
**Fig.1.** Venn diagram showing overlaps in Saccharimonadia genes annotated using the KEGG Orthology database

nities where there are major producers that supply the demand of other bacteria for essential vitamins for metabolic reactions.

Another distinguishing characteristic of P\_794 is the increased number of genes involved in oxidative phosphorylation in comparison with others. Thus, a complete oxidase complex consisting of five subunits (CyoA, CyoB, CyoC, CyoD, and CyoE) was found in it, which is an aerobic respiratory chain reacting with oxygen, reducing it to water with simultaneous transfer of four protons across the membrane (Chepuri et al., 1990). The presence of the enzyme FAD-dependent oxidoreductase also confirms the respiration ability. The A\_9 genome also contains genes that are part of the photosynthesis and oxidative phosphorylation complexes, but all are associated with the F-type ATPase, a multi-subunit enzyme complex whose role changes under aerobic and anaerobic conditions (Walker, 2013). Under anaerobic conditions, enzymes reverse the reaction and generate proton motive force by utilizing the energy released during hydrolysis of ATP (Walker and Dickson, 2006).

In general, the investigated Saccharimonadia do not possess synthesis of all essential nucleotides, amino acids, lipids, vitamins, cofactors, or the complete tricarboxylic acid (TCA) cycle, which is consistent with the results obtained previously. Biosynthesis of secondary metabolites is also barely represented. Although there are individual variations in the presence of certain genes, which, nevertheless, do not provide a complete cycle for the production of compounds.

According to studies some Saccharimonadia demonstrate the ability to produce rhodopsin (Jaffe et al., 2022), but in the current samples, the genes responsible for its synthesis are absent. Meanwhile, regions encoding the production of heliorhodopsin, a new family of rhodopsins, are predicted in four genomes (A\_9, A\_63, A\_68, and I\_78). Heliorhodopsin has been recently discovered, and is still poorly studied (Pushkarev et al., 2018). At the same time, there is a current assumption



**Fig.2.** Number of genes belonging to Saccharimonadia in the categories defined according to the KEGG PATHWAY classification



that the presence of heliorhodopsin is not possible in organisms with double membranes and requires direct interaction with the environment for its functioning (Flores-Urbe et al., 2019).

Saccharimonadia also show differences in the mechanisms of adaptation to the environment; A\_68 contains the maximum set of genes for the synthesis of bacterioruberin, which is responsible for membrane adaptation to low temperatures (Flegler and Lipski, 2022). A\_9, A\_68, and P\_794 have genes of superoxide dismutase. A\_63, A\_68 and I\_78 have a glutathione-S-transferase gene. Both enzymes are required to cope with oxygen stress, which is relevant for lakes with high oxygen content, such as Baikal and Khubsugul (Scott et al., 1987; Röth et al., 2011).

Being auxotrophs in many categories, Saccharimonadia require alternative ways to obtain the compounds necessary for life activity, suggesting their involvement in symbiotic or parasitic relationships with other organisms. When such relationships occur, they are thoroughly regulated through protein secretion; therefore, secretion systems must include mechanisms for translocation of secreted proteins (effectors and toxins) across the host plasma membrane.

The type 2 secretion system (T2SS) is not fully represented in genomes. The T2SS is Sec-dependent and includes pseudopiles, outer and inner membrane complexes (Korotkov et al., 2012; Lomovatskaya and Romanenko, 2020). Only A\_9 has one of the three proteins of the inner membrane platform of the T2SS—GspF. The remaining Saccharimonadia encode only GspG, which belongs to the pseudopiles. Furthermore, none of the outer membrane complex proteins, such as GspD and GspS, were identified, raising doubts about the functional ability of the T2SS. At the same time, the SecA gene (A\_9, A\_63, A\_68, and P\_794), responsible for ATP hydrolysis to trigger protein translocation, as well as SecD-G and SecY genes encoding the complete membrane complex, are present in almost all genomes (Schneewind and Missiakas, 2012; Chiriak et al., 2022). Additionally, A\_63, A\_68, and P\_794 contain the YidC protein, which mediates the incorporation of Sec proteins into the membrane (Kuhn et al., 2003).

As a plausible mechanism for enabling symbiotic or parasitic lifestyles, Saccharimonadia may utilize a type IV protein (T4aP) secretion system that forms a pili attached to the host outer membrane (Ibrahim et al., 2021; Hendrickson et al., 2022). Type IV pili are surface appendages involved in many processes, including adhesion to biotic and abiotic surfaces, aggregation, DNA and phage uptake, specific motility and electron transfer (Tammam et al., 2013; Berry and Pelicic, 2015). Search with MacSyFinder and the TXSScan model set revealed the diversity of pili in the genomes. All Saccharimonadia, except for I\_78, contain clusters of major and minor type IV pili: pilABCDE, piMNO, pilT, and pilVWX. Another argument in favor of a Saccharimonadia dependent lifestyle is the presence of ABC transporters, including those with specific functions, namely transport of ATP, cobalt, iron, and sugar as well as those with unknown functional properties (Fujii et al., 2022).

## 4. Conclusions

The development of metagenomic analysis techniques has greatly expanded our ability to study uncultured bacteria. Although the completeness and contamination of metagenomic data are limiting factors to take into account, especially in the functional analysis of poorly characterized organisms. Nevertheless, even a first approximation, representing the study of five metagenomic assemblies, provided previously inaccessible information on ultramicrobacteria inhabiting the unique ecosystems of oligotrophic lakes Baikal and Khubsugul.

Preliminary taxonomic analysis showed that the database contains a sufficiently close reference organism only for one of the studied genomes; for all the others, the similarity by ANI is very distant. Moreover, the investigated genomes also do not demonstrate taxonomic similarity among themselves, except for A\_68 and I\_78 presumably belonging to the same genus. Functional comparison also showed differences in genes. Only 20.8% of them are shared, while P\_794 contains 14% of unique genes different from the class members.

Functional comparison indicates rather extensive, especially in the context of a small genome, differences in genome metabolism. Thus, P\_794 possesses abilities to degrade sucrose and starch, and is also suspected to be a facultative anaerobe capable of oxygen respiration due to the presence of a complete oxidase complex. At the same time, all studied Saccharimonadia probably carry out energy metabolism by glycolysis through a metabolic loop, involving the de Vries-Stouthamer hexose monophosphate pathway. The fate of pyruvate in this pathway remains unknown because enzymes necessary for fermentation are missing.

Genomes also exhibit different ways of adaptation to the environment and protein secretion systems. The protein secretion systems, in particular, the wide representation of genes encoding T4aP, along with the limited metabolic potential and the presence of ABC transporters with unknown functions, suggest a symbiotic or parasitic lifestyle of the Saccharimonadia. This is supplemented by the observed coding density, which, although quite high, is still below the coding densities expected for free-living microorganisms, where values > 95% are common (Chiriak et al., 2022). Nevertheless, although the studied genomes possess incomplete pathways for biosynthesis of compounds required for cell construction and life activity, we cannot exclude the ability of Saccharimonadia to synthesize them de novo or obtain them from the environment via unknown pathways, and that such rationalized genome reduction did not arise as an adaptation to low or nutrient-limited environments.

## Acknowledgements

This study was supported by the State Project No. 0279-2021-0015. The authors thank the crews of the R/V “Vereshchagin” and “Titov” of the LIN SB RAS fleet, as well as I.V. Khanaev and M.M. Makarov for

their assistance in sampling. Sample collection from Lake Khubsugul was carried out according to the State Project No. 0279-2021-0004. Bioinformatic calculations were performed on the computational cluster at LIN SB RAS.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Abby S.S., Cury J., Guglielmini J. et al. 2016. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Scientific Reports* 6: 23080. DOI: [10.1038/srep23080](https://doi.org/10.1038/srep23080)
- Alneberg J., Bjarnason B.S., De Bruijn I. et al. 2014. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods* 11: 1144–1146. DOI: [10.1038/nmeth.3103](https://doi.org/10.1038/nmeth.3103)
- Andrews S., Krueger F., Segonds-Pichon A. et al. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data
- Aramaki T., Blanc-Mathieu R., Endo H. et al. 2020. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 36: 2251–2252. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz859](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859)
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology* 19: 455–77. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Berry J.-L., Pelicic V. 2015. Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives FEMS. *Microbiology Reviews* 39: 134–154. DOI: [10.1093/femsre/fuu001](https://doi.org/10.1093/femsre/fuu001)
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C. et al. 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523: 208–211. DOI: [10.1038/nature14486](https://doi.org/10.1038/nature14486)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Rosselli R. et al. 2018. Genomes of Novel Microbial Lineages Assembled from the Sub-Ice Waters of Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e02132-17. DOI: [10.1128/AEM.02132-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02132-17)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Zakharenko A.S. et al. 2020. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat. *Limnology and Oceanography* 65: 1471–1488. DOI: [10.1002/lno.11401](https://doi.org/10.1002/lno.11401)
- Castelle C.J., Brown C.T., Anantharaman K. et al. 2018. Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology* 16: 629–645. DOI: [10.1038/s41579-018-0076-20](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0076-20)
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P. et al. 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36: 1925–1927. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz848](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848)
- Chepuri V., Lemieux L., Au D.C. et al. 1990. The sequence of the cyo operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome o ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the aa3-type family of cytochrome c oxidases. *Journal of Biological Chemistry* 265: 11185–11192. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)38574-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38574-6)
- Chiriac M.-C., Bulzu P.-A., Andrei A.-S. et al. 2022. Ecogenomics sheds light on diverse lifestyle strategies in freshwater CPR. *Microbiome* 10: 84. DOI: [10.1186/s40168-022-01274-3](https://doi.org/10.1186/s40168-022-01274-3)
- Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20: 1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)
- Coutinho F. H., Cabello-Yeves P.J., Gonzalez-Serrano R. et al. 2020. New viral biogeochemical roles revealed through metagenomic analysis of Lake Baikal. *Microbiome* 8: 163. DOI: [10.1186/s40168-020-00936-4](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00936-4)
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10: giab008. DOI: [10.1093/gigascience/giab008](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008)
- Ewels P., Magnusson M., Lundin S. et al. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32: 3047–3048. DOI: [10.1093/bioinformatics/btw354](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354)
- Flegler A., Lipski A. 2022. The C50 carotenoid bacterioruberin regulates membrane fluidity in pink-pigmented *Arthrobacter* species. *Archives of Microbiology* 204: 70. DOI: [10.1007/s00203-021-02719-3](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02719-3)
- Flores-Urbe J., Hevroni G., Ghai R. et al. 2019. Heliorhodopsins are absent in diderm (Gram-negative) bacteria: Some thoughts and possible implications for activity. *Environmental Microbiology Reports* 11: 419–424. DOI: [10.1111/1758-2229.12730](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12730)
- Fujii N., Kuroda K., Narihiro T. et al. 2022. Metabolic potential of the superphylum Patescibacteria reconstructed from activated sludge samples from a municipal wastewater treatment plant. *Microbes and Environments* 37: n/a. DOI: [10.1264/jsme2.ME22012](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME22012)
- He C., Keren R., Whittaker M.L. et al. 2021. Genome-resolved metagenomics reveals site-specific diversity of episymbiotic CPR bacteria and DPANN archaea in groundwater ecosystems. *Nature Microbiology* 6: 354–365. DOI: [10.1038/s41564-020-00840-5](https://doi.org/10.1038/s41564-020-00840-5)
- He X., McLean J.S., Edlund A. et al. 2015. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 244–249. DOI: [10.1073/pnas.1419038112](https://doi.org/10.1073/pnas.1419038112)
- Hendrickson E.L., Bor B., Kerns K.A. et al. 2022. Transcriptome of epibiont *Saccharibacteria* *Nanosynbacter lyticus* strain TM7x during the establishment of symbiosis. *Journal of Bacteriology* 204: e00112-22. DOI: [10.1128/jb.00112-22](https://doi.org/10.1128/jb.00112-22)
- Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K. et al. 2016. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1: 16048. DOI: [10.1038/nmicrobiol.2016.48](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48)
- Hyatt D., Chen G.-L., LoCascio P.F. et al. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification *BMC Bioinformatics* 11: 119. DOI: [10.1186/1471-2105-11-119](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119)
- Ibrahim A., Maatouk M., Rajaonison A. et al. 2021. Adapted protocol for *Saccharibacteria* cocultivation: two new members join the club of candidate phyla radiation. *Microbiology Spectrum* 9: e01069-21. DOI: [10.1128/spectrum.01069-21](https://doi.org/10.1128/spectrum.01069-21)
- Jaffe A.L., Konno M., Kawasaki Y. et al. 2022. *Saccharibacteria* harness light energy using type-1 rhodopsins that may rely on retinal sourced from microbial hosts. *The ISME Journal* 16: 2056-2059. DOI: [10.1038/s41396-022-01231-w](https://doi.org/10.1038/s41396-022-01231-w)
- Kang D.D. 2015. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities.
- Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G.J. 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology* 10: 336–351. DOI: [10.1038/nrmicro2762](https://doi.org/10.1038/nrmicro2762)
- Krueger F., James F., Ewels P. et al. 2023. TrimGalore. DOI: [10.5281/zenodo.7598955](https://doi.org/10.5281/zenodo.7598955)
- Kuhn A., Stuart R., Henry R. et al. 2003. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facili-

tating membrane protein insertion? *Trends in Cell Biology* 13: 510–516. DOI: [10.1016/j.tcb.2003.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.08.005)

Langmead B., Wilks C., Antonescu V. et al. 2019. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics* 35: 421–432. DOI: [10.1093/bioinformatics/bty648](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty648)

Lemos L.N., Medeiros J.D., Dini-Andreote F. et al. 2019. Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultra-small *Saccharimonadia* (phylum CPR/Patescibacteria) suggest a symbiotic lifestyle. *Molecular Ecology* 28: 4259–4271. DOI: [10.1111/mec.15208](https://doi.org/10.1111/mec.15208)

Li H., Durbin R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26: 589–595. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp698](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698)

Li D., Liu C.-M., Luo R. et al. 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31: 1674–1676. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033)

Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S. 2020. Secret Systems of Bacterial Phytopathogens and Mutualists (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 56: 107–122. DOI: [10.31857/S0555109920020105](https://doi.org/10.31857/S0555109920020105) (in Russian).

Lu J., Rincon N., Wood D.E. et al. 2022. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols* 17: 2815–2839. DOI: [10.1038/s41596-022-00738-y](https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y)

Nakai R. 2020. Size matters: ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *microbes and environments* 35: n/a. DOI: [10.1264/jsme2.ME20025](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20025)

Néron B., Denise R., Coluzzi C. et al. 2023. MacSyFinder v2: Improved modelling and search engine to identify molecular systems in genomes. *Peer Community Journal* 3: e28. DOI: [10.24072/pcjournal.250](https://doi.org/10.24072/pcjournal.250)

Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C. et al. 2022. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research* 50: D785–D794. DOI: [10.1093/nar/gkab776](https://doi.org/10.1093/nar/gkab776)

Pinevich A.V. 2007. Microbiology. Biology of prokaryotes (in three volumes, 2nd edition). In: Harazova A.D., Gamalei Yu.V (Eds.), St. Petersburg: St. Petersburg University Press (in Russian)

Pushkarev A., Inoue K., Larom S. et al. 2018. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics. *Nature* 558: 595–599. DOI: [10.1038/s41586-018-0225-9](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0225-9)

Rheims H., Rainey F.A., Stackebrandt E. 1996. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17: 159–169. DOI: [10.1007/BF01574689](https://doi.org/10.1007/BF01574689)

Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A. et al. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499: 431–437. DOI: [10.1038/nature12352](https://doi.org/10.1038/nature12352)

Röth E., Marczin N., Balatonyi B. et al. 2011. Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured

cardiomyocytes. *Experimental and clinical cardiology* 16: 92–96.

Schneewind O., Missiakas D.M. 2012. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1123–1139. DOI: [10.1098/rstb.2011.0210](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0210)

Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M.A. et al. 2021. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics* 7: 000685. DOI: [10.1099/mgen.0.000685](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685)

Scott M.D., Meshnick S.R., Eaton J.W. 1987. Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 262: 3640–3645. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)61401-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61401-2)

Sieber C.M.K. 2018. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. *Nature Microbiology* 3: 836–843. DOI: [10.1038/s41564-018-0171-1](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1)

Soro V., Dutton L.C., Sprague S.V. et al. 2014. Axenic culture of a candidate division TM7 bacterium from the human oral cavity and biofilm interactions with other oral bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 6480–6489. DOI: [10.1128/AEM.01827-14](https://doi.org/10.1128/AEM.01827-14)

Tamames J., Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, A highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Frontiers in Microbiology* 9: 3349. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349)

Tammam S., Sampaleanu L.M., Koo J. et al. 2013. PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *Journal of Bacteriology* 195: 2126–2135. DOI: [10.1128/JB.00032-13](https://doi.org/10.1128/JB.00032-13)

Uritskiy G.V., DiRuggiero J., Taylor J. 2018. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome* 6: 158. DOI: [10.1186/s40168-018-0541-1](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0541-1)

Walker J.E. 2013. F-ATPases. In: Lennarz W.J., Lane M.D. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Waltham: Academic Press, pp. 269–274. DOI: [10.1016/B978-0-12-378630-2.00294-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00294-2)

Walker J.E., Dickson V.K. 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757: 286–296. DOI: [10.1016/j.bbabi.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.01.001)

Wood D.E., Lu J., Langmead B. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20: 257. DOI: [10.1186/s13059-019-1891-0](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0)

Wu Y.-W., Simmons B.A., Singer S.W. 2016. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 32: 605–607. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv638](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638)

Yakimov M.M., Merkel A.Y., Gaisin V.A. et al. 2022. Cultivation of a vampire: “Candidatus *Absconditococcus praedator*”. *Environmental Microbiology* 24: 30–49. DOI: [10.1111/1462-2920.15823](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15823)

# Характеристика бактерий класса *Saccharimonadia* в озерах Байкал и Хубсугул: таксономическое и функциональное разнообразие



Гутник Д.И.<sup>1\*</sup>, Потапов С.А.<sup>1</sup>, Краснопеев А.Ю.<sup>1</sup>, Тихонова И.В.<sup>1</sup>, Букин Ю.С.<sup>1</sup>, Гладких А.С.<sup>2</sup>, Ключникова Е.О.<sup>2</sup>, Сбарцалья В.А.<sup>2</sup>, Асламов И.А.<sup>1</sup>, Белых О.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лимнологический институт Сибирского отделения Российской Академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, г. Иркутск, 664033, Россия

<sup>2</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», ул. Мира, д. 14, г. Санкт-Петербург, 197101, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Ультрамелкие бактерии повсеместно распространены в окружающей среде, однако некоторое время они оставались в стороне от научного фокуса. Среди причин можно выделить их малый размер. Ультрамикробактерии, которые определяются как бактерии с объемом клетки менее 0,1 мкм<sup>3</sup>, могут проходить через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Кроме того, есть ряд сложностей, сопряжённых с их культивированием, на данный момент удалось получить чистые культуры, но, в основном, доминирующих филумов, редкие представлены лишь единичными штаммами. При этом ультрамикробактерии обнаружены в широком спектре сред, а их высокоупорядоченные, небольшие геномы и уникальные экофизиологические особенности привлекают все большее внимание исследователей. Развитие метагеномики позволяет частично преодолеть барьер, связанный с ограничениями в культивировании, и рассмотреть в данной статье метагеномные сборки, полученные из образцов воды крупнейших олиготрофных озёр Земли – Байкала и Хубсугула. В данном исследовании проведен таксономический и функциональный анализ реконструированных геномов бактерий класса *Saccharimonadia* (филум *Patescibacteria*), который призван расширить наши знания о редких представителях микробных сообществ и дополнить уже имеющиеся сведения информацией об обитателях древнейших экосистем.

**Ключевые слова:** *Saccharimonadia*, ультрамикробактерии, Байкал, Хубсугул, метагеномика, метаболизм

Для цитирования: Гутник Д.И., Потапов С.А., Краснопеев А.Ю., Тихонова И.В., Букин Ю.С., Гладких А.С., Ключникова Е.О., Сбарцалья В.А., Асламов И.А., Белых О.И. Характеристика бактерий класса *Saccharimonadia* в озерах Байкал и Хубсугул: таксономическое и функциональное разнообразие // *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. - № 4. - С. 908-924. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-908

## 1. Введение

Суперфилум *Patescibacteria*, также известный как Candidate Phyla Radiation (CPR) (Rinke et al., 2013), согласно базе данных The Genome Taxonomy Database (GTDB) (Parks et al., 2022), включает 30 классов, которые составляют больше 15% всех бактериальных филумов (Brown et al., 2015; Fujii et al., 2022). *Patescibacteria* обитают в самых разнообразных средах: осадки водоносных горизонтов и водоемы, водоочистные сооружения, активный ил, золотые прииски, полярные почвы и почвы тропических лесов, слюна человека, в ассоциации с губками и тараканами, и, более того, во многих из них они доминируют (Brown et al., 2015; Hug et al., 2016; Fujii et al., 2022).

На данный момент не так много известно о функциональных особенностях этих бактерий, а также не существует единого мнения о том, являются ли все представители CPR симбионтами, которые полагаются в своей жизнедеятельности на другие бактерии, или же некоторые из них способны к свободному существованию. Знания об этой группе бактерий ограничены в основном тем, что в настоящее время описаны только единичные случаи культивирования *Patescibacteria*; данный факт частично обусловлен их симбиотической/паразитической природой (Soro et al., 2014; He et al., 2021; Ibrahim et al., 2021; Yakimov et al., 2022). Одни из немногих культивированных видов (например, TM7х) (He et al., 2015) принадлежит классу *Saccharimonadia*. Представители данного класса впервые были обна-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [gutnik@lin.irk.ru](mailto:gutnik@lin.irk.ru) (Д.И. Гутник)

Поступила: 08 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





ружены при анализе частичных последовательностей 16S рДНК микробных сообществ торфяного болота в Германии (Rheims et al., 1996), и являются одними из самых известных. Интерес к изучению *Saccharimonadia* во многом вызван их предполагаемой ролью в развитии заболеваний полости рта. Те *Saccharimonadia*, которые удалось культивировать в лабораторных условиях, однозначно демонстрировали симбиотическую связь с актинобактериями, схожая картина наблюдалась и для других немногочисленных культивированных CPR. И действительно, известные *Patescibacteria* обычно обладают небольшим размером генома (до 1,0 Мб) (Lemos et al., 2019; Nakai, 2020) и неполными путями биосинтеза (Castelle et al., 2018), сочетание этих характеристик указывает на ассоциированный с хозяином, симбиотический или паразитический образ жизни.

Однако уникальные условия обитания в крупных глубоководных олиготрофных озерах, каковыми являются Байкал и Хубсугул, могут являться причиной уменьшения размеров геномов и отражаться в функциональных особенностях. Эти экосистемы также представляют интерес с точки зрения эволюции бактерий, принимая во внимания древность и общность происхождения двух тектонических озер Байкальской рифтовой зоны. Кроме того, образцы из оз. Байкал отобраны на разных глубинах: в верхних слоях воды, т.е. в фотическом слое (до 25 м) и на глубинах 1250-1350 м, что также потенциально влияет на метаболизм бактерий. Таким образом, целью работы является изучение и сравнение функциональных особенностей и образа жизни *Saccharimonadia*, полученных из проб воды Байкала и Хубсугула, с помощью метагеномных сборок и реконструкции геномов.

## 2. Материалы и методы

Пробы воды отобраны в оз. Байкал на центральной станции в проливе Малое Море, на центральных станциях разрезов пос. Листвянка – пос. Танхой, мыс Ухан – мыс Тонкий, мыс Елохин – пос. Давша, в 7 км и в 3 км от пос. Листвянка, в 3 км от пос. Турка, в 3 км от мыса Елохин в марте-сентябре 2018-2022 гг. В периоды открытой воды отбор проб проводили на глубинах 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 м, используя систему батометров SBE-32 (Carousel Water Sampler, Sea Bird Electronics Inc., США). В под-

лёдный период пробы отбирали со льда с помощью батометров Нискина. В оз. Хубсугул (Монголия) отбор проб воды произведён в 3 км от пос. Ханха в октябре 2023 г. Пробы отобраны на глубинах 0, 10, 25, 40, 50 и 70 м батометром с лодки.

Пробы воды последовательно фильтровали через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,4 и 0,2 мкм (Millipore, США) для удаления крупных форм планктона. Фильтраты концентрировали с помощью системы ультрафильтрации в тангенциальном потоке VivaFlow 200 (Sartorius, ФРГ) до конечного объема ~20 мл. Далее образцы концентрировали, применяя Vivaspin Turbo 15 (50 кДа, Sartorius, ФРГ) до объема ~100 мкл.

ДНК экстрагировали стандартным фенол-хлороформным методом. ДНК библиотеки, включающие A\_63, A\_68, A\_9 секвенировали с использованием платформы Illumina MiSeq, метагеномные данные размещены в биопроекте PRJNA1006167. Секвенирование ДНК для I\_78 происходило на платформе DNBSEQ-G50 (MGISEQ-200).

Кроме того, были использованы 8 наборов необработанных метагеномных прочтений, полученных с помощью Shotgun-секвенирования и размещенных для публичного доступа в биопроектах (PRJNA396997, PRJNA521725, PRJNA615165). Материалом для секвенирования послужили пробы воды оз. Байкал, взятые летом 12-13 июля 2018 г. в 8 км от пос. Листвянка на 4 глубинах (5, 20, 1250 и 1350 м), а также зимние пробы воды, отобранные с глубин 5 и 20 м – 14 марта 2016 г., и с глубин 1250 и 1350 м – 29 марта 2018 г. в 7 км от пос. Листвянка (Cabello-Yeves et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020; Coutinho et al., 2020). Информация о соответствии наименований реконструированных геномов и материалов, послуживших основой для их сборок, представлена в Таблице 1.

Процесс реконструкции геномов A\_63, A\_68, A\_9 включал оценку качества метагеномного секвенирования с помощью программы MultiQC v. 1.12 (Ewels et al., 2016), удаление адаптеров с помощью программы Trim Galore v. 0.6.5 (Krueger et al., 2023), сборку ридов в контиги с помощью SPAdes v. 3.15.5 (Bankevich et al., 2012) и выравнивание ридов на контиги посредством BWA v. 0.7.17 (Li and Durbin, 2010) и пакета SAMtools v. 1.18 (Danecsek et al., 2021). Метагеномный биннинг и выделение геномов из сборки проведены с использованием программного пакета MetaWRAP v. 1.3 (Uritskiy et al., 2018).

Таблица 1. Условия отбора проб и источники данных

	P_794	A_63	A_68	A_9	I_78
Водоем	Байкал	Байкал			Хубсугул
Глубины, м	5, 10, 1250, 1350	0, 5, 10, 15, 20, 25, 50			0, 10, 25, 40, 50, 70
Период	Июль-Март, 2016-2018	Март-Сентябрь, 2018-2022			Октябрь, 2023
Источник	Публичные данные: PRJNA396997, PRJNA521725, PRJNA615165 (Cabello-Yeves et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020; Coutinho et al., 2020)	Собственные данные: PRJNA1006167		Собственные данные	

Подготовка прочтений для сборок, относящихся к P\_794 и I\_78, состояла из оценки качества секвенирования программой FastQC v. 0.12.1 (Andrews et al., 2010), удаления адаптеров и коротких ридов (меньше 141 оснований для P\_794 и 90 для I\_78) с применением Trimomatic v. 0.39 (Bolger et al., 2014) и очистки от эукариотической ДНК программным комплексом Kraken 2 v. 2.1.3 (Wood et al., 2019; Lu et al., 2022). Для сборки контигов, содержащих P\_794, создана внешняя сборка путем слияния прочтений соответствующего направления из 8 образцов, отличающихся по глубине и сезону, в итоге получен один объединенный набор парных прочтений, которые затем собраны ассемблером MEGANIT (Li et al., 2015). Для внешней сборки произведено выравнивание ридов на контиги при помощи Bowtie 2 v. 2.5.4 (Langmead et al., 2019) и пакета Samtools v. 1.20 (Danecsek et al., 2021). Основываясь на полученной статистике по покрытию, осуществлены фильтрация и удаление коротких и контигов с низким покрытием с помощью скрипта R. Финальные сборки контигов для выделения геномов P\_794 и I\_78 выполнены с использованием конвейера SqueezeMeta (Tamames and Puente-Sánchez, 2019), для P\_794 применялся режим coassembly с включением всех 8 наборов прочтений и внешней сборки, а для I\_78 – sequential. В качестве ассемблера для P\_794 использован MEGANIT (Li et al., 2015), а для I\_78 – SPAdes v. 3.15.5 (Bankevich et al., 2012). Биннинг проведен с использованием CONCOAT v. 1.1.0 (Alneberg et al., 2014), MaxBin v. 2.2.7 (Wu et al., 2016) и MetaBAT2 v. 2.12.1 (Kang,

2015). Интеграция результатов биннинга осуществлена в DAS Tool v. 1.1.7 (Sieber, 2018).

Полнота и завершенность окончательных геномов оценена при помощи CheckM2 v. 1.0.2 (Chklovski et al., 2023). Открытые рамки считывания (open reading frame, ORF) определяли, используя Prodigal v.2.6.3 (Hyatt et al., 2010). Аннотация генов осуществлена с применением Bakta v.1.9.2 (Schwengers et al., 2021), с настройками по умолчанию. Аннотацию KEGG и присвоение номеров КО белкам проводили сервисом KofamKOALA (Aramaki et al., 2020). Геномы таксономически классифицированы с использованием набора инструментов базы данных таксономии генома (GTDB-Tk) v. 2.4.0 (Chaumeil et al., 2020). MacSyFinder v. 2.1.4 (Néron et al., 2023) и модели TXSScan v. 1.1.3 (Abby et al., 2016) применяли для поиска систем секреции белков.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Описание геномов и таксономическая классификация

На основе трех наборов метагеномных данных собрано пять геномов *Saccharimonadia*. Все они демонстрируют достаточно высокий уровень полноты сборки 84,9-97,6% с контаминацией ниже 2,6%, за исключением генома I\_78, где она составила 7,0% (Таблица 2). Плотность кодирования (медиана 90,5%; диапазон 89,6%-91,8%) и содержание GC (медиана 42,2%; диапазон 40,7-45,0%) у них соответствуют свободноживущим организмам или

Таблица 2. Описание и таксономическая принадлежность реконструированных геномов

	P_794	A_63	A_68	A_9	I_78
Описание					
Размер, н.п.	984 478	655 626	594 118	612 023	718 727
Полнота, %	91.6	97.6	91.2	84.9	93.9
Контаминация, %	2.08	-	0.29	2.56	7.00
Г + Ц, %	45.0	41.3	42.3	40.7	42.2
Контиг N50, н.п.	10 865	57 148	35 054	12 346	3 970
Плотность кодирования, %	89.6	90.7	89.6	91.8	90.5
Кол-во CDS	1 016	686	594	645	675
Таксономия					
Царство	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Филум	Patescibacteria	Patescibacteria	Patescibacteria	Patescibacteria	Patescibacteria
Класс	Saccharimonadia	Saccharimonadia	Saccharimonadia	Saccharimonadia	Saccharimonadia
Порядок	Saccharimonadales	CAILAD01	CAILAD01	Saccharimonadales	CAILAD01
Семейство	UBA1547_A	BJGX01	CAILAD01	AWTP1-31	CAILAD01
Род	2011-GWC2-44-17	CALRAY01	CAILAD01	CAJAXB01	CAILAD01
Вид	-	CALRAY01	-	-	-
Ближайший геном	GCA_016199685.1	GCA_943353705.1	GCA_013816445.1	GCA_943353855.1	GCA_903832035.1
ANI для ближайшего генома, %	78.94	97.66	78.36	92.13	77.02

факультативным внутриклеточным или внеклеточным симбионтам/паразитам (Chiriac et al., 2022).

Из исследуемых геномов P\_794 представляет собой самый крупный геном с максимальным числом CDS (1074) и достаточно обширным для представителя класса набором функций. При этом, согласно поиску по таксономической базе данных GTDB, определить его принадлежность возможно только до рода, причем сходство с ближайшим референсным организмом по ANI составляет всего 78,9%. 93% TPM (transcripts per kilobase million, число прочтений, нормализованных на длину каждого прочтения, умноженное на миллион), принадлежащих этому бину, соответствует июльским образцам воды Байкала с глубин 1250 и 1350 м.

Геномы A\_63, A\_68 и A\_9 также получены из байкальских проб с поверхностных горизонтов. Размер их геномов, как и число CDS, примерно одного порядка. Таксономическое определение с помощью GTDB позволило обнаружить достаточно близкое сходство по ANI для A\_63 и A\_9, определив род всех геномов, а в случае с A\_63 и вид.

I\_78 – геном, собранный из данных секвенирования поверхностных проб воды оз. Хубсугул. Он второй по величине из представленных в работе и наиболее контаминирован. При этом количество CDS у него составляет 675. Интересно, что согласно таксономическому анализу, наиболее близкими принадлежащими одному роду по предварительной классификации, оказались *Saccharimonadia* из поверхностных образцов Байкала A\_68 и Хубсугула I\_78.

Совпадения до вида с помощью классификации GTDB выявлено только для A\_63. Два генома P\_794 и A\_9 принадлежат порядку *Saccharimonadales* и некультивируемым семействам и родам. A\_63, A\_68 и I\_78 на всех уровнях отнесены к некультивируемым представителям.

### 3.2. Аннотация и функциональный анализ геномов

Сравнение аннотированных геномов по функциональным ортологам базы данных KEGG показало, что число общих генов составляет 20,8% (Рис. 1). При этом наиболее уникальным для данной выборки набором генов обладает P\_794, у которого 14,0% предсказанных генов не совпадают с генами других рассматриваемых геномов.

Функциональный анализ установил наиболее вероятную общую для всех геномов схему получения свободной энергии в форме АТФ – катаболизм углеводов с образованием пирувата. Причем в данном случае образование пирувата идет по гексозомонофосфатному пути де Фриза-Стаутамера или бифидо-шунту (Pinevich, 2007). Так, у всех геномов присутствует практически весь набор ферментов необходимых для его реализации: фруктозобисфосфат-альдолаза, трансальдолаза и транскетолаза. Примечательно, что и в отсутствие ферментов прослеживается единая стратегия. Гены, отвечающие за выработку фосфоглицеромутаза, участвующей в

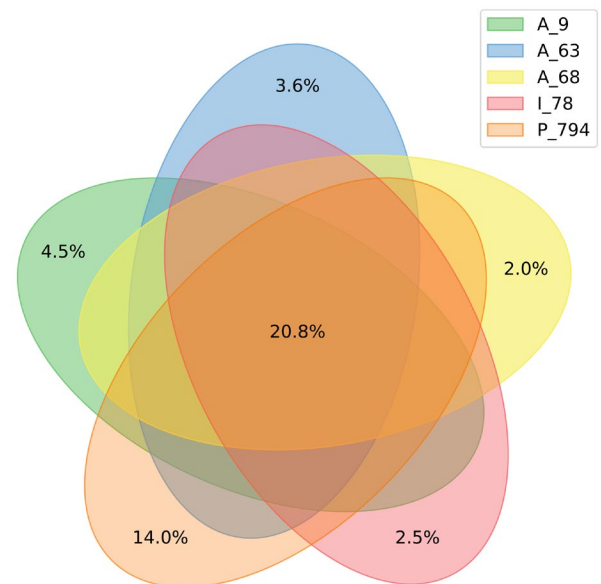


Рис.1. Диаграмма Венна, демонстрирующая пересечения в составе генов *Saccharimonadia*, аннотированных с помощью базы данных KEGG Orthology

реакции превращения 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат и необходимой для дальнейшего образования пирувата, отсутствуют у всех исследуемых в работе *Saccharimonadia*.

Уже на этапе анализа функциональных категорий (Рис. 2) можно отметить отличительную черту P\_794, а именно, присутствие кластера генов, отвечающих за расщепление олиго- и полисахаридов сахарозы и крахмала до D-глюкозы, в частности, за счет продукции  $\alpha$ -глюкозидазы, альфа-амилазы, мальтазы-глюкоамилазы и т.д. Вторым геномом по количеству предсказанных генов, задействованных в углеводном обмене, является A\_63. Однако, для него гексозомонофосфатный путь начинается с расщепления глюкозы-6-фосфат или фруктозы-6-фосфат. У остальных рассматриваемых геномов функциональный набор углеводного обмена еще меньше, A\_9, A\_68, I\_78 способны только к преобразованию фруктозы-6-фосфат.

Важно отметить, что у всех изучаемых *Saccharimonadia* отсутствует брожение, процесс обрывается на образовании пирувата и одной молекулы АТФ на молекулу окисленной гексозы. Обычно пируват, являющийся важнейшим промежуточным продуктом брожения, подвергается окислительному карбоксилированию по одному из 4 путей. В случае с изучаемыми геномами, необходимые для брожения ферменты отсутствуют у всех, кроме A\_63. Для этого организма предсказано наличие лактатдегидрогеназы, которая позволяет осуществлять молочнокислое брожение на основе пирувата, что, тем не менее, не находит подтверждение в аннотации с помощью KEGG. Кроме того, для осуществления других типов брожения необходимо участие витаминов, продукция которых отсутствует у всех пяти микроорганизмов. Вместе с тем, такая практика широко распространена в сообществах микроорга-

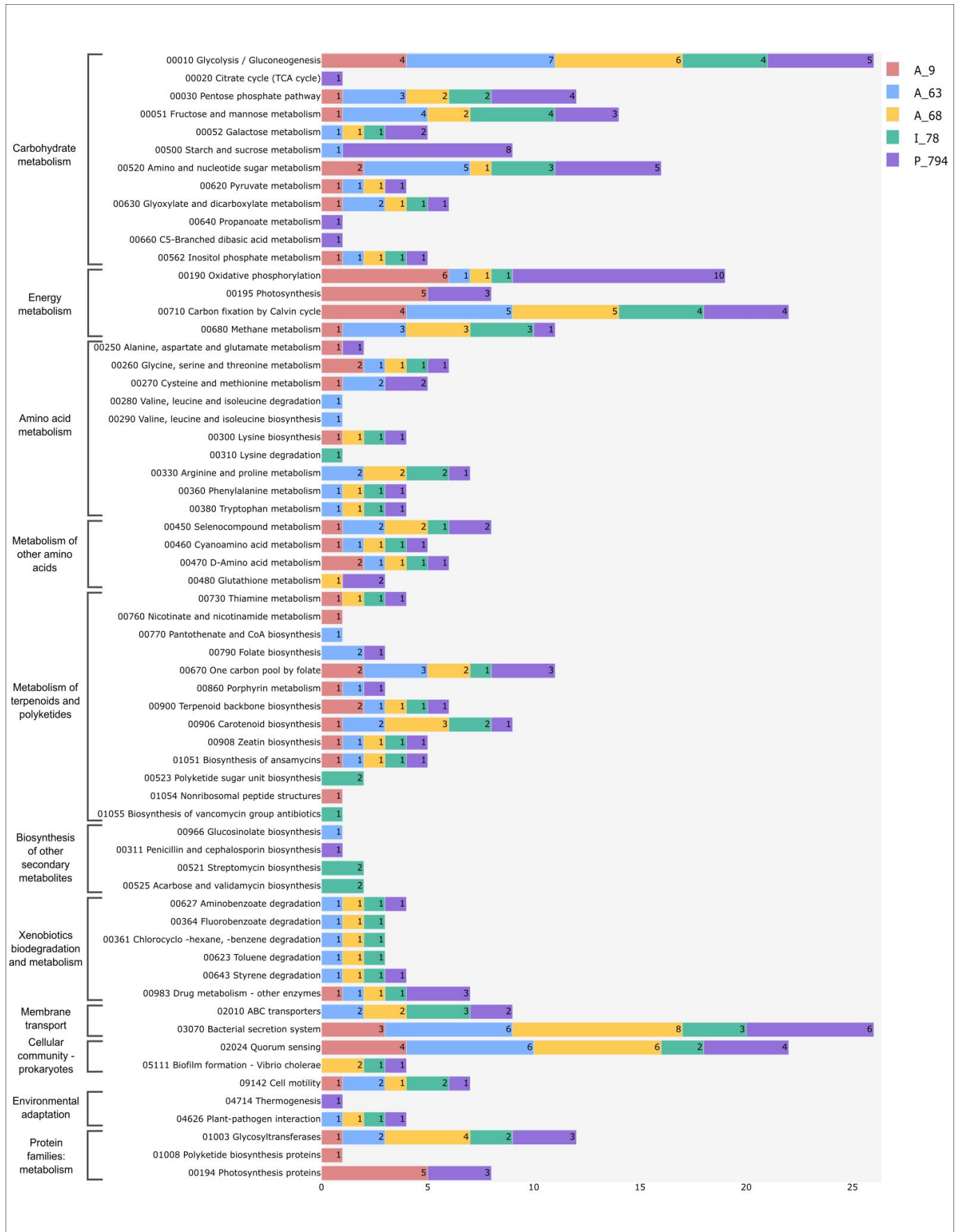


Рис.2. Количество генов у *Saccharimonadia* в категориях, определенных согласно классификации KEGG PATHWAY



низмов, когда существуют основные продуценты, обеспечивающие потребность других бактерий в незаменимых для реакций метаболизма витаминах.

Еще одной отличительной чертой P\_794 является увеличенное по сравнению с другими число генов, задействованных в окислительном фосфорилировании. Так, у него найден полный оксидазный комплекс, состоящий из пяти субъединиц (СуоА, СуоВ, СуоС, СуоD, СуоЕ), представляющий собой аэробную дыхательную цепь, реагирующую с кислородом, восстанавливая его до воды с одновременным переносом 4 протонов через мембрану (Cheruri et al., 1990). Способность к дыханию подтверждается и наличием фермента FAD-зависимой оксидоредуктазы. Геном A\_9 также содержит гены, входящие в состав комплексов фотосинтеза и окислительного фосфорилирования, но все они связаны с АТФазой F-типа – многосубъединичным ферментным комплексом, роль которого изменяется в аэробных и анаэробных условиях (Walker, 2013). В анаэробных условиях ферменты осуществляют обратную реакцию и генерируют протонную движущую силу, используя энергию, высвобождаемую при гидролизе АТФ (Walker and Dickson, 2006).

В целом, изучаемые *Saccharimonadia* не обладают синтезом всех необходимых нуклеотидов, аминокислот, липидов, витаминов, кофакторов или полным циклом трикарбоновых кислот (ТКК), что соответствует результатам, полученным в ранее опубликованных работах. Биосинтез вторичных метаболитов также практически не представлен, хотя и существуют индивидуальные особенности в наличии тех или иных генов, которые тем не менее не обеспечивают полного цикла производства веществ.

Согласно исследованиям, у некоторых *Saccharimonadia* обнаружена способность к продукции родопсина (Jaffe et al., 2022), однако в текущих образцах гены, отвечающие за его синтез, отсутствуют. При этом у четырех геномов (A\_9, A\_63, A\_68, I\_78) предсказаны области, кодирующие выработку гелиородопсина – нового семейства родопсинов. Гелиородопсин открыт совсем недавно, в 2018 году, и еще слабо изучен (Pushkarev et al., 2018). Вместе с тем на данный момент существует предположение, что наличие гелиородопсина невозможно у организмов с двойной мембраной и для его функционирования необходимо прямое взаимодействие с окружающей средой (Flores-Uribe et al., 2019).

*Saccharimonadia* демонстрируют отличия и в механизмах адаптации к окружающей среде, A\_68 обладает пусть и не полным, но максимальным среди рассматриваемых *Saccharimonadia* набором генов для синтеза бактериоруберина, отвечающего за адаптацию мембран к низким температурам (Flegler and Lipski, 2022). A\_9, A\_68 и P\_794 содержат гены супероксиддисмутазы. У A\_63, A\_68 и I\_78 обнаружена глутатион-S-трансфераза. Оба фермента необходимы для борьбы с кислородным стрессом, что актуально для озер с высоким содержанием кислорода, таких как Байкал и Хубсугул (Scott et al., 1987; Röth et al., 2011).

Будучи ауксотрофами по многим категориям, *Saccharimonadia* нуждаются в альтернативных путях получения необходимых для жизнедеятельности соединений, что позволяет предположить их вовлеченность в симбиотическое или паразитическое отношения с другими организмами. При возникновении такого рода связей происходит тщательная их регуляция посредством секреции белков, так, системы секреции должны включать механизмы для транслокации секретируемых белков (эффекторов и токсинов) через плазматическую мембрану хозяина.

Система секреции второго типа (T2SS) представлена в геномах неполно. T2SS является Sec-зависимой и включает в себя: псевдопили, внешний и внутренний мембранные комплексы (Korotkov et al., 2012; Lomovatskaya and Romanenko, 2020). Лишь у A\_9 обнаружен один из трех белков внутренней мембранной платформы T2SS – GspF. Остальные *Saccharimonadia* кодируют только GspG, относящейся к псевдопилям. Кроме того, не был определен ни один из белков комплекса внешней мембраны, таких как GspD и GspS, что ставит под сомнение функциональную способность T2SS. При этом почти у всех присутствуют ген SecA (A\_9, A\_63, A\_68 и P\_794), ответственный за гидролиз АТФ для запуска транслокации белков, а также SecD-G и SecY гены, кодирующие полный мембранный комплекс (Schneewind and Missiakas, 2012; Chiriac et al., 2022). Кроме того, A\_63, A\_68 и P\_794 содержат белок YidC, опосредующий встраивание в мембрану белков Sec (Kuhn et al., 2003).

В качестве вероятного механизма для обеспечения симбиотического или паразитического образа жизни *Saccharimonadia* могут использовать систему секреции белков IV типа (T4aP), на основе которых формируются пили, прикрепляющиеся к внешней мембране хозяина (Ibrahim et al., 2021; Hendrickson et al., 2022). Пили типа IV – это поверхностные придатки, участвующие во многих процессах, включая адгезию к биотическим и абиотическим поверхностям, агрегацию, поглощение ДНК и фагов, специфичную подвижность и перенос электронов (Tammam et al., 2013; Berry and Pelicic, 2015). Поиск с помощью MacSyFinder и набора моделей TXSScan показал разнообразие пилей в рассматриваемых геномах. Все *Saccharimonadia*, за исключением I\_78, содержали кластеры мажорных и минорных пилей IV типа: pilABCDE, piMNO, pilT и pilVWX. Еще одним аргументом в пользу зависимого образа жизни *Saccharimonadia* является наличие ABC-транспортёров, в том числе и с определенными функциями, а именно, перенос АТФ, кобальта, железа, сахара, а также и с неизвестными функциональными свойствами (Fujii et al., 2022).

#### 4. Выводы

Развитие методик метагеномного анализа существенно расширило наши возможности исследования некультивируемых бактерий. Хотя полнота и контаминация метагеномных данных являются

ограничивающими факторами, которые следует учитывать, особенно при функциональном анализе мало описанных организмов. Тем не менее, даже первое приближение, представляющее собой изучение пяти метагеномных сборок, позволило получить ранее недоступную информацию об ультрамикробактериях, обитающих в уникальных экосистемах олиготрофных озер Байкала и Хубсугула.

Предварительный таксономический анализ показал, что только для одного из изучаемых геномов в базе данных содержится достаточно близкий референсный организм, для всех остальных сходство по ANI очень отдаленное. Причем, между собой рассматриваемые геномы тоже не демонстрируют таксономического родства. За исключением A\_68 и I\_78, предположительно относящихся к одному роду. Функциональное сравнение также показало различия в генах, всего 20,8% среди них являются общими, в то время как P\_794 содержит 14,0% уникальных отличных от собратьев по классу генов.

Предметное функциональное сравнение свидетельствует о достаточно обширных, особенно в условиях небольшого генома, отличиях в метаболизме геномов. Так, P\_794 обладает способностями к деградации сахарозы и крахмала, а также предположительно является факультативным анаэробом, способным к кислородному дыханию благодаря наличию полного оксидазного комплекса. При этом все рассматриваемые *Saccharimonadia*, вероятно, осуществляют энергетический метаболизм за счет процесса гликолиза через метаболическую петлю, включающую гексозомонофосфатный путь де Фриза-Стаутамера. Открытым остается судьба пирувата в этом пути, поскольку ферментов, необходимых для брожения, не было обнаружено.

Геномы также демонстрируют различные способы адаптации к окружающей среде и системы секреции белков. Именно системы секреции белков, в частности, обширная представленность генов, кодирующих T4aP, наряду с ограниченным метаболическим потенциалом и наличием ABC-транспортеров с неизвестными функциями, свидетельствуют о симбиотическом или паразитическом способе существования рассматриваемых *Saccharimonadia*. Дополняет это предположение наблюдаемая плотность кодирования, которая хоть и является достаточно высокой, но все же ниже наблюдаемых плотностей кодирования у свободноживущих микробов, где значения > 95% являются обычными (Chiriac et al., 2022). Тем не менее, хотя изученные нами геномы и обладают неполными путями биосинтеза соединений, необходимых для построения клеток и жизнедеятельности, нельзя и исключать способность *Saccharimonadia* синтезировать их *de novo* или получать из окружающей среды по неизвестным путям, и того, что такое рационализированное сокращение генома не возникло как адаптация к условиям с низким или ограниченным содержанием питательных веществ.

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № 0279-2021-0015. Авторы выражают благодарность экипажам НИС «Верещагин», «Титов» флота ЛИН СО РАН, а также Ханаеву И.В., Макарову М.М. за помощь в отборе проб. Сбор проб планктона озера Хубсугул выполнен по теме Государственного задания 0279-2021-0004. Биоинформатические расчеты выполнены на вычислительном кластере ЛИН СО РАН.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Abby S.S., Cury J., Guglielmini J. et al. 2016. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Scientific Reports* 6: 23080. DOI: [10.1038/srep23080](https://doi.org/10.1038/srep23080)
- Alneberg J., Bjarnason B.S., De Bruijn I. et al. 2014. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods* 11: 1144–1146. DOI: [10.1038/nmeth.3103](https://doi.org/10.1038/nmeth.3103)
- Andrews S., Krueger F., Segonds-Pichon A. et al. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data
- Aramaki T., Blanc-Mathieu R., Endo H. et al. 2020. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 36: 2251–2252. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz859](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859)
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology* 19: 455-77. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Berry J.-L., Pelicic V. 2015. Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives FEMS. *Microbiology Reviews* 39: 134–154. DOI: [10.1093/femsre/fuu001](https://doi.org/10.1093/femsre/fuu001)
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C. et al. 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523: 208–211. DOI: [10.1038/nature14486](https://doi.org/10.1038/nature14486)
- Cabello-Yeves P.J., Zenskaya T.I., Rosselli R. et al. 2018. Genomes of Novel Microbial Lineages Assembled from the Sub-Ice Waters of Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e02132-17. DOI: [10.1128/AEM.02132-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02132-17)
- Cabello-Yeves P.J., Zenskaya T.I., Zakharenko A.S. et al. 2020. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat. *Limnology and Oceanography* 65: 1471–1488. DOI: [10.1002/lno.11401](https://doi.org/10.1002/lno.11401)
- Castelle C.J., Brown C.T., Anantharaman K. et al. 2018. Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology* 16: 629–645. DOI: [10.1038/s41579-018-0076-20](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0076-20)
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P. et al. 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36: 1925–1927. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz848](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848)
- Chepuri V., Lemieux L., Au D.C. et al. 1990. The sequence of the cyo operon indicates substantial structural similarities

between the cytochrome o ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the aa3-type family of cytochrome c oxidases. *Journal of Biological Chemistry* 265: 11185–11192. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)38574-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38574-6)

Chiriac M.-C., Bulzu P.-A., Andrei A.-S. et al. 2022. Ecogenomics sheds light on diverse lifestyle strategies in freshwater CPR. *Microbiome* 10: 84. DOI: [10.1186/s40168-022-01274-3](https://doi.org/10.1186/s40168-022-01274-3)

Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20: 1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)

Coutinho F. H., Cabello-Yeves P.J., Gonzalez-Serrano R. et al. 2020. New viral biogeochemical roles revealed through metagenomic analysis of Lake Baikal. *Microbiome* 8: 163. DOI: [10.1186/s40168-020-00936-4](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00936-4)

Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10: giab008. DOI: [10.1093/gigascience/giab008](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008)

Ewels P., Magnusson M., Lundin S. et al. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32: 3047–3048. DOI: [10.1093/bioinformatics/btw354](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354)

Flegler A., Lipski A. 2022. The C50 carotenoid bacterioruberin regulates membrane fluidity in pink-pigmented *Arthrobacter* species. *Archives of Microbiology* 204: 70. DOI: [10.1007/s00203-021-02719-3](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02719-3)

Flores-Uribe J., Hevroni G., Ghai R. et al. 2019. Heliorhodopsins are absent in diderm (Gram-negative) bacteria: Some thoughts and possible implications for activity. *Environmental Microbiology Reports* 11: 419–424. DOI: [10.1111/1758-2229.12730](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12730)

Fujii N., Kuroda K., Narihiro T. et al. 2022. Metabolic potential of the superphylum Patescibacteria reconstructed from activated sludge samples from a municipal wastewater treatment plant. *Microbes and Environments* 37: n/a. DOI: [10.1264/jsme2.ME22012](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME22012)

He C., Keren R., Whittaker M.L. et al. 2021. Genome-resolved metagenomics reveals site-specific diversity of episymbiotic CPR bacteria and DPANN archaea in groundwater ecosystems. *Nature Microbiology* 6: 354–365. DOI: [10.1038/s41564-020-00840-5](https://doi.org/10.1038/s41564-020-00840-5)

He X., McLean J.S., Edlund A. et al. 2015. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 244–249. DOI: [10.1073/pnas.1419038112](https://doi.org/10.1073/pnas.1419038112)

Hendrickson E.L., Bor B., Kerns K.A. et al. 2022. Transcriptome of epibiont *Saccharibacteria Nanosynbacter lyticus* strain TM7x during the establishment of symbiosis. *Journal of Bacteriology* 204: e00112-22. DOI: [10.1128/jb.00112-22](https://doi.org/10.1128/jb.00112-22)

Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K. et al. 2016. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1: 16048. DOI: [10.1038/nmicrobiol.2016.48](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48)

Hyatt D., Chen G.-L., LoCasio P.F. et al. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification *BMC. Bioinformatics* 11: 119. DOI: [10.1186/1471-2105-11-119](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119)

Ibrahim A., Maatouk M., Rajaonison A. et al. 2021. Adapted protocol for *Saccharibacteria* cocultivation: two new members join the club of candidate phyla radiation. *Microbiology Spectrum* 9: e01069-21. DOI: [10.1128/spectrum.01069-21](https://doi.org/10.1128/spectrum.01069-21)

Jaffe A.L., Konno M., Kawasaki Y. et al. 2022. *Saccharibacteria* harness light energy using type-1 rhodopsins that may rely on retinal sourced from microbial hosts. *The ISME Journal* 16: 2056-2059. DOI: [10.1038/s41396-022-01231-w](https://doi.org/10.1038/s41396-022-01231-w)

Kang D.D. 2015. MetaBAT, an efficient tool for accurately

reconstructing single genomes from complex microbial communities.

Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G.J. 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology* 10: 336–351. DOI: [10.1038/nrmicro2762](https://doi.org/10.1038/nrmicro2762)

Krueger F., James F., Ewels P. et al. 2023. TrimGalore. DOI: [10.5281/zenodo.7598955](https://doi.org/10.5281/zenodo.7598955)

Kuhn A., Stuart R., Henry R. et al. 2003. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends in Cell Biology* 13: 510–516. DOI: [10.1016/j.tcb.2003.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.08.005)

Langmead B., Wilks C., Antonescu V. et al. 2019. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics* 35: 421–432. DOI: [10.1093/bioinformatics/bty648](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty648)

Lemos L.N., Medeiros J.D., Dini-Andreote F. et al. 2019. Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultra-small *Saccharimonadia* (phylum CPR/Patescibacteria) suggest a symbiotic lifestyle. *Molecular Ecology* 28: 4259–4271. DOI: [10.1111/mec.15208](https://doi.org/10.1111/mec.15208)

Li H., Durbin R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26: 589–595. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp698](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698)

Li D., Liu C.-M., Luo R. et al. 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31: 1674–1676. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033)

Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S. 2020. Secret Systems of Bacterial Phytopathogens and Mutualists (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 56: 107–122. DOI: [10.31857/S0555109920020105](https://doi.org/10.31857/S0555109920020105) (in Russian).

Lu J., Rincon N., Wood D.E. et al. 2022. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols* 17: 2815–2839. DOI: [10.1038/s41596-022-00738-y](https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y)

Nakai R. 2020. Size matters: ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *microbes and environments* 35: n/a. DOI: [10.1264/jsme2.ME20025](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20025)

Néron B., Denise R., Coluzzi C. et al. 2023. MacSyFinder v2: Improved modelling and search engine to identify molecular systems in genomes. *Peer Community Journal* 3: e28. DOI: [10.24072/pcjournal.250](https://doi.org/10.24072/pcjournal.250)

Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C. et al. 2022. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research* 50: D785–D794. DOI: [10.1093/nar/gkab776](https://doi.org/10.1093/nar/gkab776)

Pinevich A.V. 2007. *Microbiology. Biology of prokaryotes* (in three volumes, 2nd edition). In: Harazova A.D., Gamalei Yu.V. (Eds.), St. Petersburg: St. Petersburg University Press (in Russian)

Pushkarev A., Inoue K., Larom S. et al. 2018. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics. *Nature* 558: 595–599. DOI: [10.1038/s41586-018-0225-9](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0225-9)

Rheims H., Rainey F.A., Stackebrandt E. 1996. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17: 159–169. DOI: [10.1007/BF01574689](https://doi.org/10.1007/BF01574689)

Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A. et al. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499: 431–437. DOI: [10.1038/nature12352](https://doi.org/10.1038/nature12352)

Röth E., Marczin N., Balatonyi B. et al. 2011. Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Experimental and clinical cardiology* 16: 92–96.

Schneewind O., Missiakas D.M. 2012. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 367: 1123–1139. DOI: [10.1098/rstb.2011.0210](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0210)

Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M.A. et al. 2021. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics* 7: 000685. DOI: [10.1099/mgen.0.000685](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685)

Scott M.D., Meshnick S.R., Eaton J.W. 1987. Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 262: 3640–3645. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)61401-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61401-2)

Sieber C.M.K. 2018. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. *Nature Microbiology* 3: 836–843. DOI: [10.1038/s41564-018-0171-1](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1)

Soro V., Dutton L.C., Sprague S.V. et al. 2014. Axenic culture of a candidate division TM7 bacterium from the human oral cavity and biofilm interactions with other oral bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 6480–6489. DOI: [10.1128/AEM.01827-14](https://doi.org/10.1128/AEM.01827-14)

Tamames J., Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, A highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Frontiers in Microbiology* 9: 3349. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349)

Tammam S., Sampaleanu L.M., Koo J. et al. 2013. PilMNO PQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that

interacts with PilA. *Journal of Bacteriology* 195: 2126–2135. DOI: [10.1128/JB.00032-13](https://doi.org/10.1128/JB.00032-13)

Uritskiy G.V., DiRuggiero J., Taylor J. 2018. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome* 6: 158. DOI: [10.1186/s40168-018-0541-1](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0541-1)

Walker J.E. 2013. F-ATPases. In: Lennarz W.J., Lane M.D. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Waltham: Academic Press, pp. 269–274. DOI: [10.1016/B978-0-12-378630-2.00294-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00294-2)

Walker J.E., Dickson V.K. 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757: 286–296. DOI: [10.1016/j.bbabi.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.01.001)

Wood D.E., Lu J., Langmead B. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20: 257. DOI: [10.1186/s13059-019-1891-0](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0)

Wu Y.-W., Simmons B.A., Singer S.W. 2016. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 32: 605–607. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv638](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638)

Yakimov M.M., Merkel A.Y., Gaisin V.A. et al. 2022. Cultivation of a vampire: “*Candidatus Absconditicoccus praedator*”. *Environmental Microbiology* 24: 30–49. DOI: [10.1111/1462-2920.15823](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15823)



# Growth patterns of bacterial cultures depending on the nitrogen availability



Kan G.V.\*, Suslova M.Yu., Tikhonova I.V., Lipko I.A., Belykh O.I.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Morphological and ultrastructural growth patterns of bacterial cultures in response to the nitrogen availability were demonstrated using cultivation and scanning electron microscopy (SEM). It was found that strains of *Pseudomonas* sp. 1CB and *Streptomyces* sp. 21A are able to grow only in the medium with available nitrogen. *Rhizobium* sp. 2A formed biofilm on glass in medium with nitrate and in medium without available nitrogen. In a non-nitrogenous medium, an increase in the diameter of bacterial cells was observed due to the intensive secretion of polysaccharide mucus, which can be considered a mechanism of protection of the nitrogenase complex from the damaging effect of oxygen.

**Keywords:** nitrogen, nitrogen-fixation, *Rhizobium*, scanning electron microscopy, Lake Baikal

**For citation:** Kan G.V., Suslova M.Yu., Tikhonova I.V., Lipko I.A., Belykh O.I. Growth patterns of bacterial cultures depending on the nitrogen availability // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 925-930. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-925

## 1. Introduction

One of the main nutrients limiting the growth of bacteria in water bodies is nitrogen. To maintain metabolism, microorganisms use dissolved inorganic nitrogen, such as nitrate or nitrite, which is reduced to ammonium and then is involved in a central nitrogen assimilation pathway known as the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle (Casciotti, 2016). In oligotrophic waters, an important source of nitrogen is urea, an organic compound, a co-product of cellular metabolism or the decomposition of dead biomass. Cyanobacteria and heterotrophic bacteria are known to produce urea, and representatives of some genera are able to hydrolyze it with the urease enzyme to a more highly digestible form, ammonium (Collier et al., 2009; Solomon et al., 2010). Biological nitrogen-fixation is also one of the sources of nitrogen in oligotrophic waters (Montoya et al., 2004). The reduction of molecular nitrogen to ammonia is catalyzed by the enzyme complex nitrogenase. Nitrogenase is sensitive to the action of oxygen, which not only inhibits the process of nitrogen fixation but can also prevent the synthesis of the enzyme itself. In some cyanobacteria, fixation of molecular nitrogen occurs in specialized cells with a thick cell wall, heterocysts, and free-living heterotrophic nitrogen-fixing organisms have unique biochemi-

cal and morphological mechanisms that protect nitrogenase from oxygen (Sabra et al., 2000; Bertsova et al., 2005).

The aim of this work is to experimentally determine the effect of nitrogen source on the growth of bacterial cultures.

## 2. Materials and methods

Pure cultures of strains isolated from Lake Baikal were used: *Rhizobium* sp. 2A (*Alphaproteobacteria*; *Hyphomicrobiales*), *Pseudomonas* sp. 1CB (*Gammaproteobacteria*; *Pseudomonadales*), and *Streptomyces* sp. 21A (*Actinomycetes*; *Kitasatosporales*). *Rhizobium* sp. 2A strain was isolated on nitrogen-free Ashby's medium from surface water microlayer; *Pseudomonas* sp. 1CB was isolated on Giltay medium from epilithic biofilm; and *Streptomyces* sp. 21A was isolated on RPA/10 medium from sponge bodies. The genome of *Streptomyces* sp. 21A includes genes encoding the synthesis of enzymes involved in the assimilative reduction of nitrate to ammonium. In the genome of *Pseudomonas* sp. 1CB, genes *narG*, *nirS*, *norB*, and *nosZ*, encoding enzymes necessary for complete denitrification, as well as genes responsible for the synthesis of enzymes for the dissimilatory reduction of nitrate to ammonium were identified (*nirBD*).

\*Corresponding author.

E-mail address: [podlesnaya@lin.irk.ru](mailto:podlesnaya@lin.irk.ru) (G.V. Kan)

**Received:** August 01, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



The strains were seeded on a solid R2A medium and cultured for 5 days at room temperature. Then the grown cell biomass was transferred by inoculation loop into 5 ml of sterile Baikal water and mixed thoroughly. Two variants of liquid Ashby's medium were prepared, each containing 60 ml of saccharose in 100 ml flasks: nitrogen-free and with the addition of 1 g/L  $\text{KNO}_3$ . The prepared media were seeded with a suspension of cells in an amount of 2 ml of the tested strains, mixed, and 25 ml was added to each sterile Petri dish with coverslips. Control Petri dishes with coverslips were filled with sterile medium.

Cultivation was carried out at 22-24°C for 7 days. Results were obtained in two replicates on 3, 5, and 7 days of cultivation. The coverslips were removed from the medium with sterile forceps, washed in sterile water, and prepared for scanning electron microscopy. Samples on coverslips were fixed for one hour with a 2.5% glutaric aldehyde solution in phosphate buffer. The solution was then dehydrated in a series of alcohols of ascending concentration (30% for 10 minutes, 50% for 10 minutes, 70% for 10 minutes, and 96% for 10 minutes), followed by drying in a thermostat at 65°C. The coverslips were adhered to the table with double-sided tape, gilded, and examined under an FEI Company Quanta 200 scanning electron microscope ("FEI Company", USA).

### 3. Results and discussion

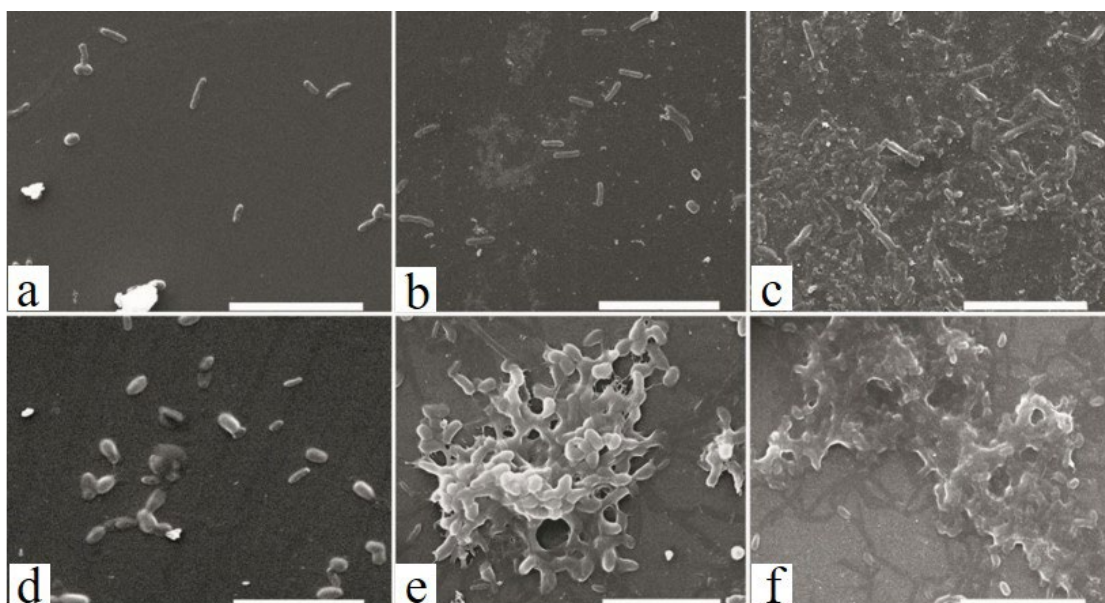
Scanning electron microscopy was used to reveal the growth patterns of strains *Rhizobium* sp. 2A, *Pseudomonas* sp. 1CB, and *Streptomyces* sp. 21A depending on nitrogen availability.

The strain *Rhizobium* sp. 2A formed a biofilm on glass in medium with nitrate (Fig. 1 a-c) and in medium without available nitrogen (Fig. 1 d-e) during 7 days

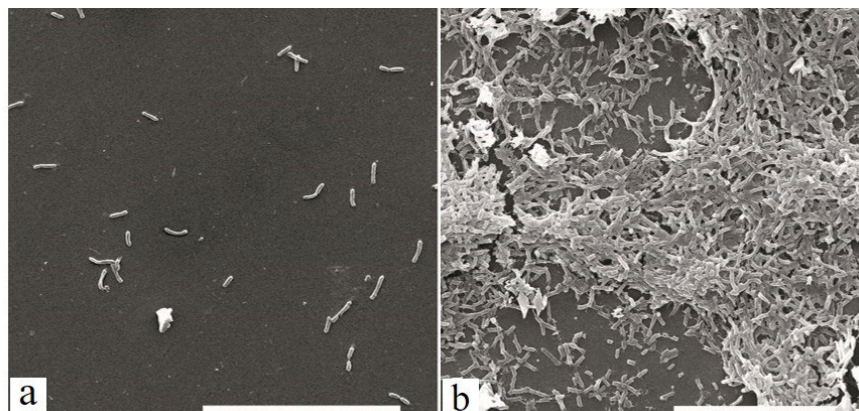
of cultivation. Microscopic observation in the medium without available nitrogen showed a 2-fold increase in the diameter of bacterial cells and more intensive secretion of polysaccharide mucus, which can be considered as a mechanism of protection of the nitrogenase complex from the damaging effect of oxygen. Thus, on the 7th day of cultivation, the cell diameter in the medium with nitrate was 0.75  $\mu\text{m}$  (SD=0.13), without nitrogen was 1.50  $\mu\text{m}$  (SD=0.16). Cell length did not change significantly and was 2.76  $\mu\text{m}$  (SD=0.72) and 2.64  $\mu\text{m}$  (SD=0.41), respectively.

Many nitrogen-fixing bacteria are known to be unable to assimilate  $\text{N}_2$  under conditions of high content of  $\text{O}_2$  in environment. Exceptions are microorganisms with physiological or morphological characteristics that protect nitrogenase. For example, in *Azotobacter vinelandii*, the respiratory protection mechanism includes two physiological processes: an increase in the respiration rate and a decrease in the rate of oxygen diffusion into the cell (Sabra et al., 2000; Bertsova et al., 2005). In terms of morphological adaptations, *A. vinelandii* is characterized by the formation of a dense polysaccharide capsule around the cell, which is also found in *Rhizobium* sp. strain 2A. The presence of such a capsule leads to a significant increase in the thickness of the unmixed layer and a decrease in the diffusion coefficient within it. The rate of production of exopolysaccharides, the "building material" of the capsule, rises with increasing concentration of  $\text{O}_2$  and during the transition of culture to diazotrophic growth, i.e., under conditions when the respiratory protection mechanism is required (Sabra et al., 2000; Bertsova et al., 2005).

Strains of *Pseudomonas* sp. 1CB and *Streptomyces* sp. 21A formed a biofilm on glass only in the medium with nitrate (Fig. 2, Fig. 3); single bacterial cells were detected in the medium without nitrogen.



**Fig. 1.** Biofilm formation by *Rhizobium* sp. 2A. strain on 3 (a), 5 (b), and 7 (c) days of cultivation in medium with nitrate and on 3 (d), 5 (e), and 7 (f) days of cultivation in medium without an available nitrogen source. SEM. Scale: a-d - 10  $\mu\text{m}$ , e - 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig.2.** Biofilm formation by *Pseudomonas* sp. 1CB in medium with nitrate at 3 (a) and 7 (b) days of cultivation. SEM. Scale - 20 µm.

#### 4. Conclusions

Thus, morphological changes were found in cells of the nitrogen-fixing culture of *Rhizobium* sp. 2A during the transition to diazotrophic growth. When the strain was cultured in nitrogen-free medium, i.e., when nitrogen fixation occurred, increased cell diameter and exopolysaccharide production were observed as evidence of adaptive mechanisms to protect nitrogenase from oxygen. Strains of *Pseudomonas* sp. 1CB and *Streptomyces* sp. 21A were able to grow only in medium with available nitrogen, converting soluble forms of inorganic nitrogen into organic nitrogen; in medium without nitrogen, the bacterial cells died within 7 days.

#### Acknowledgements

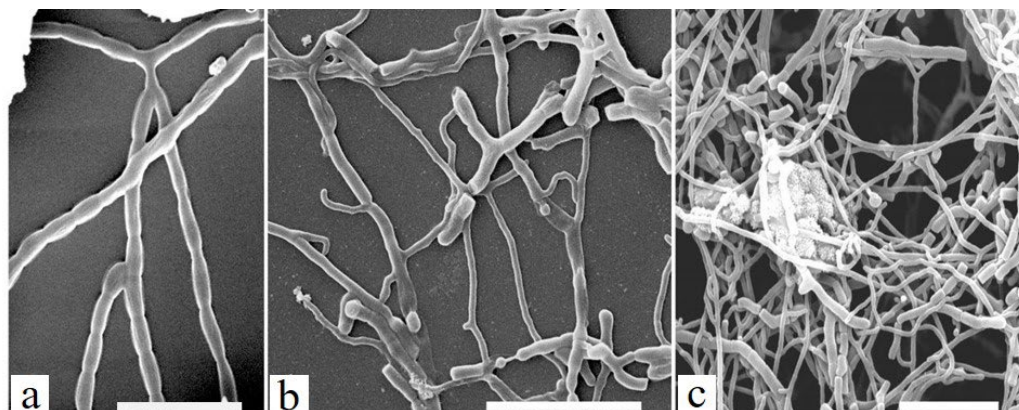
The study is carried out within the State Assignment No. 0279-2021-0015 (121032300269-9). The authors thank the staff of the “Electron Microscopy” instrumentation center of LIN SB RAS for the assistance.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### References

- Bertsova Yu.V., Demin O.V., Bogachev A.V. 2005. Respiratory protection of the nitrogenase complex in *Azotobacter vinelandii*. *Advances of Biological Chemistry* 45: 205–234.
- Casciotti K.L. 2016. Nitrogen and oxygen isotopic studies of the marine nitrogen cycle. *Annual Review of Marine Science*. 8: 379–407. DOI: [10.1146/annurev-marine-010213-135052](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135052)
- Collier J.L., Baker K.M., Bell S.L. 2009. Diversity of urea-degrading microorganisms in open-ocean and estuarine planktonic communities. *Environmental Microbiology*. 11 (12): 3118–3131. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x)
- Montoya J.P., Holl C.M., Zehr J.P. et al. 2004. High rates of N<sub>2</sub> fixation by unicellular diaotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430: 1027–1032. DOI: [10.1038/nature02824](https://doi.org/10.1038/nature02824)
- Sabra W., Zeng A.-P., Lünsdorf H. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9): 4037–4044. DOI: [10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000)
- Solomon C.M., Collier J.L., Berg G.M. et al. 2010. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology*. 59 (1): 67–88. DOI: [10.3354/ame01390](https://doi.org/10.3354/ame01390)



**Fig.3.** Biofilm formation by *Streptomyces* sp. 21A in medium with nitrate at 3 (a), 5 (b) and 7 (c) days of cultivation. SEM. Scale - 5 µm.



# Особенности роста бактериальных культур в зависимости от доступности азота

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Кан Г.В.\*, Сулова М.Ю., Тихонова И.В., Липко И.А., Белых О.И.

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** С помощью культивирования и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показаны морфологические и ультраструктурные особенности роста бактериальных культур в зависимости от доступности азота. Установлено, что штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А способны к росту только в среде с доступным азотом. *Rhizobium* sp. 2А формировал биопленку на стекле в среде с нитратом и в среде без доступного азота. В безазотистой среде отмечали увеличение диаметра клеток бактерии за счет интенсивного образования полисахаридной слизи, что можно рассматривать как механизм защиты нитрогеназного комплекса от повреждающего действия кислорода.

**Ключевые слова:** азот, азотфиксация, *Rhizobium*, сканирующая электронная микроскопия, озеро Байкал

Для цитирования: Кан Г.В., Сулова М.Ю., Тихонова И.В., Липко И.А., Белых О.И. Особенности роста бактериальных культур в зависимости от доступности азота // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 925-930. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-925

## 1. Введение

Одним из основных биогенных элементов, ограничивающих рост бактерий в водоемах, является азот. Для поддержания метаболизма микроорганизмы используют растворенный неорганический азот, например, нитрат или нитрит, который восстанавливается до аммония, а затем вступает в центральный путь ассимиляции азота, известный как цикл глутаминсинтетазы/глутаматсинтазы (Casciotti, 2016). В олиготрофных водах важным источником азота является мочевины – органическое соединение, побочный продукт клеточного метаболизма или разложения отмершей биомассы. Известно, что цианобактерии и гетеротрофные бактерии продуцируют мочевины, а представители некоторых родов способны гидролизовать ее с помощью фермента уреазы до более легкоусвояемой формы – аммония (Collier et al., 2009; Solomon et al., 2010). Биологическая азотфиксация также является одним из источников азота в олиготрофных водах (Montoya et al., 2004). Восстановление молекулярного азота в аммиак катализируется ферментным комплексом нитрогеназы. Нитрогеназа чувствительна к действию кислорода, который не только ингибирует процесс фиксации азота, но может препятствовать синтезу самого фермента. У некоторых

цианобактерий усвоение молекулярного азота происходит в специализированных клетках с толстой клеточной стенкой – гетероцистах, а у свободноживущих гетеротрофных азотфиксаторов существуют уникальные биохимические и морфологические механизмы, защищающие нитрогеназу от кислорода (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005).

Цель данной работы – экспериментально определить влияние источника азота на рост бактериальных культур.

## 2. Материалы и методы

Использовали чистые культуры штаммов, выделенные из оз. Байкал: *Rhizobium* sp. 2А (*Alphaproteobacteria*; *Hyphomicrobiales*), *Pseudomonas* sp. 1СБ (*Gamma*proteobacteria; *Pseudomonadales*) и *Streptomyces* sp. 21А (*Actinomycetes*; *Kitasatosporales*). Штамм *Rhizobium* sp. 2А изолирован на безазотистой среде Эшби из проб поверхностного микрослоя воды, *Pseudomonas* sp. 1СБ на среде Гильята из эпиплитной биопленки, *Streptomyces* sp. 21А на среде РПА/10 из тела губки. Геном *Streptomyces* sp. 21А включает гены, кодирующие синтез ферментов, осуществляющих ассимиляционное восстановление нитратов до аммония. В геноме *Pseudomonas* sp. 1СБ выявлены гены *narG*, *nirS*, *norB*, *nosZ*, кодирующие

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [podlesnaya@lin.irk.ru](mailto:podlesnaya@lin.irk.ru) (Г.В. Кан)

Поступила: 01 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





ферменты, необходимые для осуществления полной денитрификации, а также гены, ответственные за синтез ферментов диссимиляционного восстановления нитрата до аммония (*nirBD*).

Штаммы высевали на твердую среду R2A и культивировали в течение 5 суток при комнатной температуре. Затем выращенную клеточную биомассу бактериальной петлей переносили в 5 мл стерильной байкальской воды и тщательно перемешивали. Готовили два варианта жидкой среды Эшби с сахарозой по 60 мл в колбах на 100 мл: безазотистую и с добавлением  $\text{KNO}_3$  – 1 г/л. Приготовленные среды засеивали 2 мл суспензии клеток исследуемых штаммов, перемешивали и вносили по 25 мл в стерильные чашки Петри с покровными стеклами. Контрольные чашки Петри со стеклами заливали стерильной средой.

Культивирование проводили при 22-24°C в течение 7 суток. Результаты снимали в двух повторностях на 3, 5, 7 сутки культивирования. Стекла извлекали из среды стерильным пинцетом, отмывали в стерильной воде и подготавливали для сканирующей электронной микроскопии. Образцы на стеклах фиксировали в течение одного часа 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере, затем проводили обезвоживание препарата в серии спиртов восходящей концентрации (30% – 10 минут, 50% – 10 минут, 70% – 10 минут, 96% – 10 минут), после чего высушивали в термостате при 65°C. Стекла приклеивали к столику с помощью двустороннего скотча, напыляли золотом и просматривали в сканирующей электронной микроскоп FEI Company Quanta 200 («FEI Company», США).

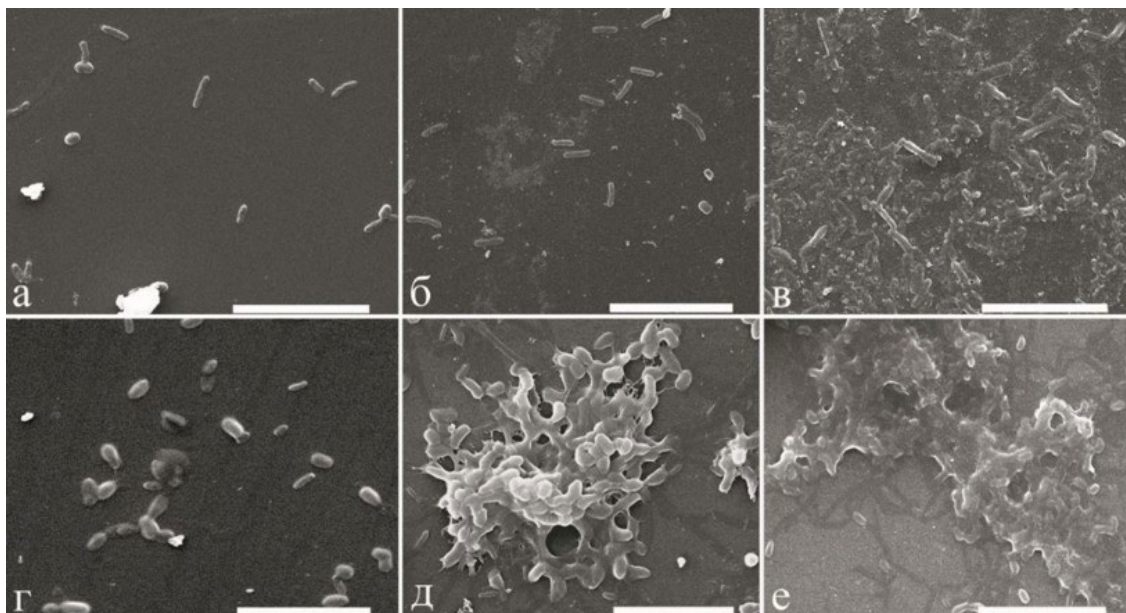
### 3. Результаты и обсуждение

С помощью сканирующей электронной микроскопии выявлены особенности роста штаммов *Rhizobium* sp. 2A, *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces*

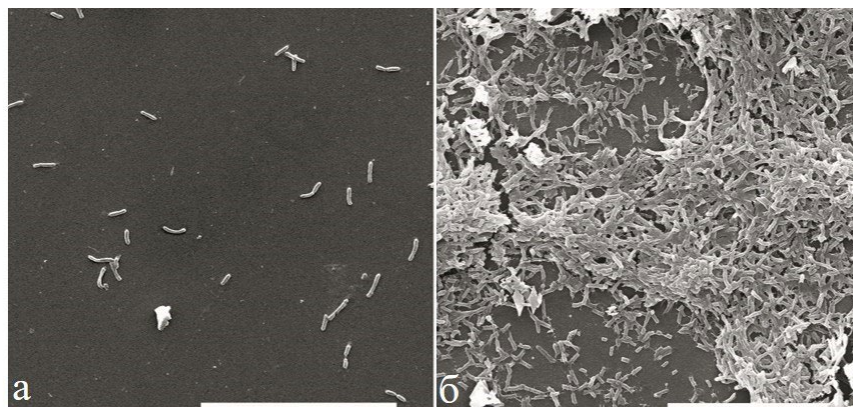
sp. 21A в зависимости от доступности азота.

Штамм *Rhizobium* sp. 2A формировал биопленку на стекле в среде с нитратом (Рис. 1 а-в) и в среде без доступного азота (Рис. 1 г-е) в течение 7 суток культивирования. При микроскопическом наблюдении в среде без доступного азота отмечали увеличение диаметра клеток бактерии в 2 раза и более интенсивное образование полисахаридной слизи, что можно рассматривать как механизм защиты нитрогеназного комплекса от повреждающего действия кислорода. Так на 7-е сутки культивирования диаметр клеток в среде с нитратом составил 0,75 мкм ( $SD=0,13$ ), без азота – 1,50 мкм ( $SD=0,16$ ). Длина клеток практически не изменялась и составила 2,76 мкм ( $SD=0,72$ ) и 2,64 мкм ( $SD=0,41$ ) соответственно.

Известно, что многие азотфиксирующие бактерии не способны ассимилировать  $\text{N}_2$  в условиях высокого содержания  $\text{O}_2$  в окружающей среде. Исключением являются микроорганизмы, способные защищать нитрогеназу благодаря физиологическим и морфологическим особенностям. К примеру, у *Azotobacter vinelandii* механизм дыхательной защиты состоит из двух физиологических процессов: увеличения скорости дыхания и уменьшения скорости диффузии кислорода в клетку (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005). С точки зрения морфологических приспособлений для *A. vinelandii* характерно образование плотной полисахаридной капсулы вокруг клетки, что обнаружено и у штамма *Rhizobium* sp. 2A. Наличие такой капсулы приводит к значительному увеличению толщины не перемешиваемого слоя и понижению коэффициента диффузии внутри него. Скорость продукции экзополисахаридов – «строительного материала» капсулы – повышается при увеличении концентрации  $\text{O}_2$  и при переходе культуры к diaзотрофному росту, то есть в тех условиях, когда необходима реализация механизма дыхательной защиты (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005).



**Рис.1.** Образование биопленки штаммом *Rhizobium* sp. 2A. на 3 (а), 5 (б), 7 (в) сутки культивирования в среде с нитратом и на 3 (г), 5 (д), 7 (е) сутки культивирования в среде без доступного источника азота. СЭМ. Масштаб: а-д – 10 мкм, е – 20 мкм.



**Рис.2.** Образование биопленки штаммом *Pseudomonas* sp. 1СБ в среде с нитратом на 3 (а) и 7 (б) сутки культивирования. СЭМ. Масштаб – 20 мкм.

Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А формировали биопленку на стекле только в среде с нитратом (Рис. 2, Рис. 3), в среде без азота обнаружены единичные клетки бактерий.

#### 4. Выводы

Таким образом, у клеток азотфиксирующей культуры *Rhizobium* sp. 2А при переходе к diazotrophic growth обнаружены морфологические изменения. При культивировании штамма в безазотистой среде, т.е. когда происходила фиксация азота, наблюдали увеличение диаметра клеток и продукции экзополисахарида как свидетельство наличия приспособительных механизмов защиты нитрогеназы от кислорода. Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А способны к росту только в среде с доступным азотом, осуществляя преобразование растворимых форм неорганического азота в органический, в среде без азота клетки бактерий погибали в течение 7 дней.

#### Благодарности

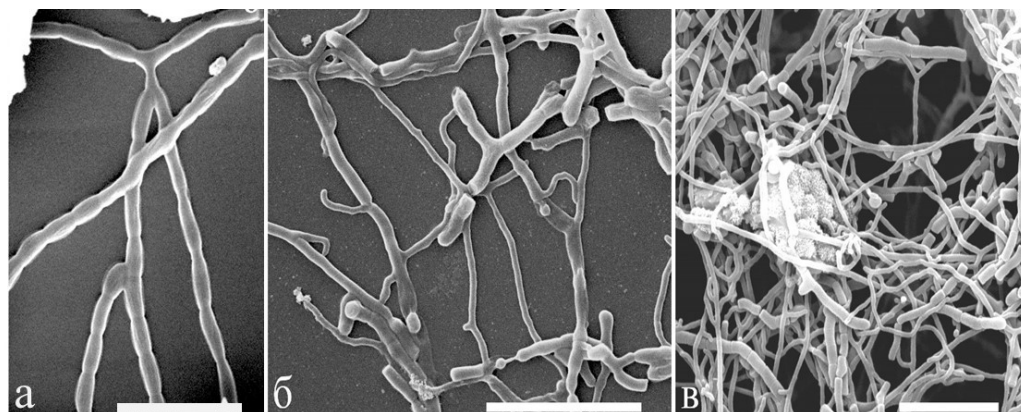
Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 0279-2021-0015 (121032300269-9). Авторы выражают благодарность сотрудникам приборного центра ЛИН СО РАН «Электронная микроскопия» за помощь в проведении работы.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Берцова Ю.В., Демин О.В., Богачев А.В. 2005. Дыхательная защита нитрогеназного комплекса у *Azotobacter vinelandii*. Успехи биологической химии 45: 205–234.
- Casciotti K.L. 2016. Nitrogen and oxygen isotopic studies of the marine nitrogen cycle. *Annual Review of Marine Science*. 8: 379–407. DOI: [10.1146/annurev-marine-010213-135052](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135052)
- Collier J.L., Baker K.M., Bell S.L. 2009. Diversity of urea-degrading microorganisms in open-ocean and estuarine planktonic communities. *Environmental Microbiology*. 11 (12): 3118–3131. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x)
- Montoya J.P., Holl C.M., Zehr J.P. et al. 2004. High rates of  $N_2$  fixation by unicellular diaotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430: 1027–1032. DOI: [10.1038/nature02824](https://doi.org/10.1038/nature02824)
- Sabra W., Zeng A.-P., Lünsdorf H. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9): 4037–4044. DOI: [10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000)
- Solomon C.M., Collier J.L., Berg G.M. et al. 2010. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology*. 59 (1): 67–88. DOI: [10.3354/ame01390](https://doi.org/10.3354/ame01390)



**Рис.3.** Образование биопленки штаммом *Streptomyces* sp. 21А в среде с нитратом на 3 (а), 5 (б) и 7 (в) сутки культивирования. СЭМ. Масштаб – 5 мкм.



# Phylogenetic diversity of prokaryotes from the Churek-Dorgun cold spring (Tuva Republic)

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Kashkak E.S.<sup>1\*</sup>, Lopsan-Endan A.B.<sup>1</sup>, Belkova N.L.<sup>2</sup>, Dagurova O.P.<sup>3</sup>,  
Danilova E.V.<sup>3</sup>, Abidueva E.Yu.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tuva State University, Lenin str., 36, Kyzyl 667000, Russia

<sup>2</sup>Research Center for Health and Human Reproduction, Institute of Epidemiology and Microbiology, K. Marx str., 3, Irkutsk, 664003, Russia

<sup>3</sup>Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Sakhyanovoy str., 6, Ulan-Ude, Russia

**ABSTRACT.** For the first time, the composition of microbial communities in the sediments of the cold freshwater spring Churek-Dorgun, located in the Kaa-Khem district of the Republic of Tuva, was studied using high-throughput sequencing. According to the chemical composition, the water of the Churek-Dorgun spring belonged to the sulfate-hydrocarbonate calcium type with weak mineralization (0.39 g / L) and neutral pH values (6.8 - 7.3). According to the sequencing results, 38,066 reads of 16S rRNA gene belonging to the *Bacteria* and *Archaea* domains were identified in the sediments sample. *Archaea* accounted for 0.27% of the microorganisms, with the phylum *Methanobacteriota* predominating. In total, 23 phyla in the bacterial microbial community were identified. Three bacterial phyla - *Pseudomonadota*, *Bacillota*, and *Bacteroidota* - which are typical of freshwater microbial communities dominated. The basis of the silt microbial community was widespread in different ecosystems microorganisms: *Aeromonas*, *Psychrosinus*, *Malikia*, *Dechloromonas*, *Sunxiuqinia*, *Thiobacillus*, *Geobacter*, *Litorilinea*, *Giesbergeria* and *Rivibacter*. They have different physiological properties and metabolism. Microorganisms involved in the sulfur cycle were also found in the silt, including chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genus *Thiobacillus* (class *Betaproteobacteria*, 3.02%), microaerophilic sulfur-reducing bacteria of the genus *Geobacter* (class *Deltaproteobacteria*, 2.86%), and sulfate-reducing *Deltaproteobacteria*.

**Keywords:** metagenomic analysis, bacterial diversity, cold springs, Churek-Dorgun, Republic of Tuva

**For citation:** Kashkak E.S., Lopsan-Endan A.B., Belkova N.L., Dagurova O.P., Danilova E.V., Abidueva E.Yu. Phylogenetic diversity of prokaryotes from the Churek-Dorgun cold spring (Tuva Republic) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 931-948. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-931](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-931)

## 1. Introduction

Mineral springs are favorable ecosystems for the existence and functioning of microbial communities that actively participate in the production and destruction of organic matter, the transformation of gases, the formation of minerals and biologically active substances (Zavarzin, 2003; Namsaraev et al., 2011; Alsop et al., 2014). Intensive physicochemical processes with the participation of photo- and chemosynthetic bacteria occur in water and sediments, where, along with producers, destructors play a large role in the cycle of carbon, sulfur, and iron (Namsaraev et al., 2011). Metagenomic studies of natural microbial communities have made it possible to determine the putative physiological and metabolic strategies of microorganisms and

their ecological roles (Li et al., 2012; Akimov et al., 2013; Alsop et al. 2014; Fang and Yan, 2022; Wang et al., 2022; etc.). In addition, the accumulated databases provide conditions for analyzing the diversity of cultured and uncultured microorganisms, clarifying the functional activity of microbial communities, and searching for new metabolic complexes with biotechnological and biomedical potential (Streit and Schmitz, 2004; Alsop et al. 2014).

Tuva Republic has numerous natural water healing resources, which are unique testing grounds for studying the microbial communities of aquatic systems. Almost all types of mineral springs are found on its territory: carbonic and nitrogen thermal springs, carbonic and hydrogen sulfide cold springs, salty and acidic, radon, and ferruginous springs (Arakchaa and

\*Corresponding author.

E-mail address: [klslena@yandex.ru](mailto:klslena@yandex.ru) (E.S. Kashkak)

**Received:** June 03, 2024; **Accepted:** June 17, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Kuzhuget, 2013). Studies of the microbial communities of mineral springs in this region are few, and the diversity of microbial communities by molecular genetic methods to date has not been studied.

The aim of this work was to study the hydrochemical characteristics and taxonomic diversity of microbial communities of silt in the Churek-Dorgun cold spring using high-throughput sequencing.

## 2. Materials and methods

The objects of the study were water and silt from the Churek-Dorgun fresh spring, located 5-6 km northwest of the former SovTuva state farm in the Kaa-Khem district of the Republic of Tuva (Fig. 1).

For this study, water and silt samples were obtained from two outlets in the studied source according to generally accepted methods corresponding to regulatory documents. For molecular genetic analysis, sediments samples were collected in sterile containers and fixed in a 1:1 volume ratio with 2×DNA/RNA Shield Stabilization Solution reagent (Zymo Research, USA).

Water and sediments analysis were carried out using classical and modern instrumental methods at the Laboratory of Physical and Chemical Research Methods of Tuva State University (Kyzyl). The physicochemical characteristics of water at the sampling sites were determined using portable devices and standard hydrochemistry methods that comply with regulatory documents. The collected sediments samples from the source under study were analyzed by X-ray fluorescence for the content of Mg, Al, Si, Zn, P, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Sr, V, Co, and Cu on a SPECTROSCAN MAX-GV analyzer (Russia).

Total DNA was isolated using commercial DNA-sorb kits (AmpliSens, Russia) and the Bacterial

Genomic DNA kit (Axygen, USA), taking into account the previously proposed modifications (Belkova, 2009). Sequencing of variable regions V3 – V4 of the 16S rRNA gene was performed at the Center for Collective Use of Scientific Equipment “Persistence of Microorganisms” of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Orenburg) on a MiSeq sequencer (Illumina, USA). Pyrosequencing pipeline resources (<https://pyro.cme.msu.edu>) were used for bioinformatic analysis of the libraries. The obtained reads were aligned and clustered using the Complete Linkage Clustering program (<https://pyro.cme.msu.edu>). The taxonomic diversity of the community was assessed at different cluster distances corresponding to the following taxa: 0.03 (97%) – species, 0.05 (95%) - genus, and 0.1 (90%) – family, using the Rarefaction program (<https://pyro.cme.msu.edu>). The classification of species was based on the genotypic approach in accordance with the International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characteristics of the mineral spring

The Churek-Dorgun spring (51°43' 46.16" E 094°45' 4.46" N) is located at the foot of the mountain in the Kaa-Khem district of the Republic of Tuva at an altitude of 850 m above sea level. The water temperature at the sampling sites reached 5-6°C. The color of the studied waters varied from 3.84 to 9.61 degrees of color (Table 1). Both water outlets had neutral pH values. The spring flow rate is low. The water of the Churek-Dorgun spring belonged to medium-hard waters. The dry residue content reached 0.40 mg/L. The total concentration of consumed oxygen, corresponding to the number of permanganate ions, in the studied water samples reached 3.5 mgO/L.

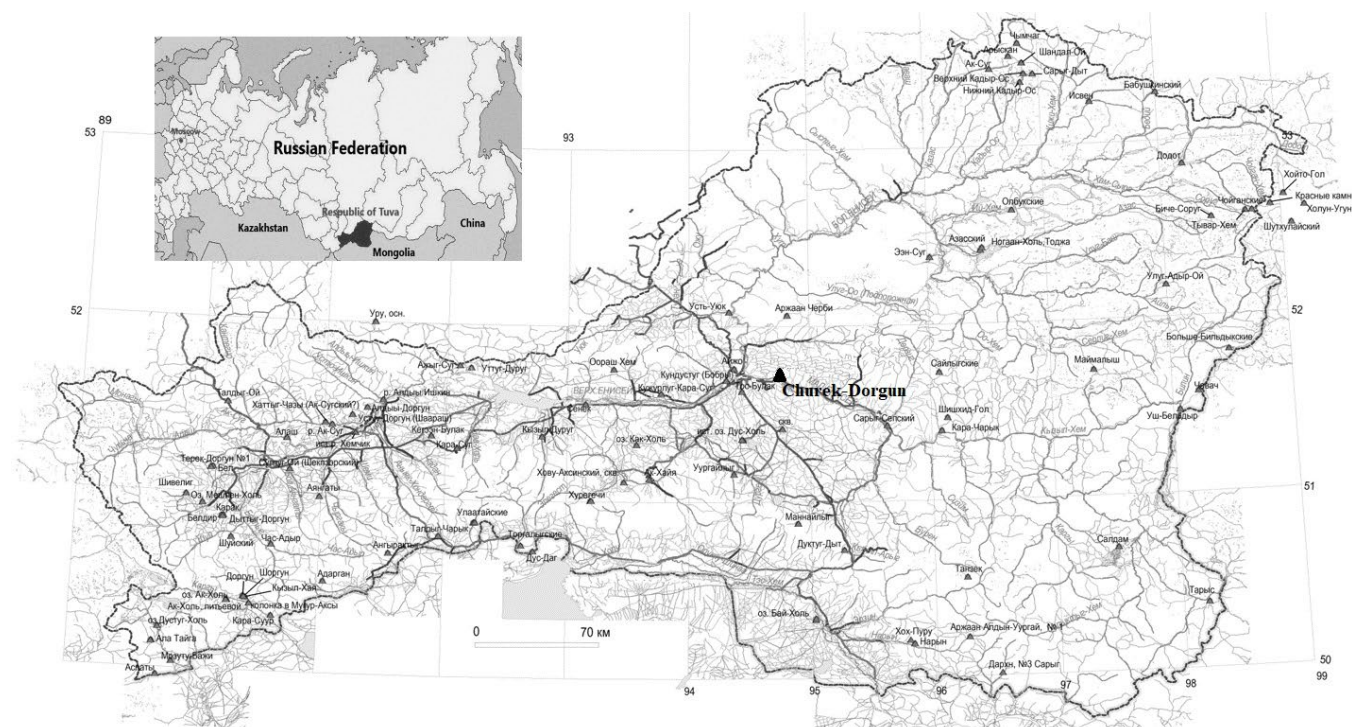


Fig.1. Map of the location of the Churek-Dorgun spring



**Table 1.** Physicochemical characteristics of the analyzed waters

Parameters	Sample No. 1	Sample No. 2	MAC*
Temperature, °C	5.0	6.0	20
pH	6.8	7.3	6–9
Color, degree of color	3.84	9.61	20
Turbidity, UF	0	0	2.6
Permanganate oxidizability, mgO/L	3.52 ± 0.70	3.44 ± 0.69	3.00
Free carbon dioxide, g/L	30.8 ± 3.0	28.6 ± 2.8	-
Total hardness, °Ж	6.1 ± 1.2	6.4 ± 1.2	7.0
Dry residue, mg/L	0.38 ± 0.07	0.40 ± 0.07	1000

**Note:** \*MAC value is given in accordance with SanPiN 2.1.3684-21

The content of free carbon dioxide was 31.0 mg/L, and hydrocarbonate ions were more than 200 mg/L. The concentration of sulfate ions reached 170 mg/L and that of chloride ions was 9.6 mg/L (Table 2). Nitrate and nitrite ions were present in smaller quantities.

The water contained up to 61 mg/L of calcium ions and up to 30 mg/L of magnesium ions, which play important roles in the functioning of the cardiovascular system, energy metabolism processes, and control of cholesterol levels in the human body. The content of ammonium ions (up to 0.8 mg/L) and total iron (up to 0.06 mg/L) in the studied spring waters was insignificant. All values did not exceed the MAC and corresponded to drinking water. When studying the elemental composition of the sediments samples from the Churek-Dorgun spring using the X-ray fluorescence analysis method, elements were found that can be divided into the following groups: vital (essential, biogenic) – macroelements (magnesium, sodium, phosphorus, sulfur, calcium, potassium, chlorine) and microelements (manganese, zinc, iron, chromium); conditionally essential (silicon); toxic (aluminum, barium) and potentially toxic (strontium, rubidium, titanium, nickel) (Skalny, 2003). In the studied sediments samples, Mg, K, Ca, and P were found among the macroelements (Table 3). The studied samples were dominated by calcium (4.48 – 6.55%) and magnesium (2.24

– 3.4%), which are essential (biogenic) elements that play an important role in the functioning of the cardiovascular system, energy metabolism processes, and control of cholesterol levels in the human body. The silicon content in the studied samples reached 56%, which improves kidney function and metabolism and helps with stomach and liver diseases.

The contents of metals (nickel, zinc, copper, and cobalt) in the studied sediments exceeded the MAC (Table 4), but in accordance with the scheme of standardization of heavy metals in soils adopted by doctors, the migration water index of harmfulness (transition into water) of nickel, copper, and cobalt was higher. This shows that the detected content of nickel, copper, and cobalt in the sediments is not dangerous to human life.

### 3.2. Phylogenetic diversity and functional characteristics of the microbial community in the sediments of the Churek-Dorgun spring

Based on the sequencing results, 38066 reads belonging to the *Bacteria* and *Archaea* domains were identified in the sediments sample. In the microbial community of the sediments, 104 reads (0.27%) were assigned to the *Archaea* domain, of which 85

**Table 2.** Ion content in water from the Churek-Dorgun spring

Determined components, mg/L	Sample №1	Sample №2	MAC*
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	271.5 ± 29.9	274.3 ± 30.2	500
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	166.5 ± 33.3	169.8 ± 33.9	500
Cl <sup>-</sup>	9.57 ± 1.53	8.86 ± 1.40	350
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.15 ± 0.56	2.85 ± 0.51	45
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	3.0
K <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup>	146.3 ± 29.3	160 ± 32	200
Ca <sup>2+</sup>	56.2 ± 2.8	60.8 ± 3.0	200
Mg <sup>2+</sup>	29.6 ± 4.4	27.1 ± 4.0	100
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.74 ± 0.19	0.80 ± 0.21	2.5
Fe <sup>2+</sup> + Fe <sup>3+</sup>	0.05 ± 0.013	0.06 ± 0.015	0.3

**Note:** \*MAC value is given in accordance with SanPiN 2.1.3684-21

were assigned to the phylum *Methanobacteriota*, 14 to *Nitrososphaerota*, and 5 to the phylum *Candidatus Pacearchaeota*. It should be noted that the reads were identified at the genus level: *Methanothrix* (class *Methanomicrobia*, *Methanobacteriota*), *Methanosarcina* (class *Methanomicrobia*, *Methanobacteriota*), *Methanomassiliicoccus* (class *Thermoplasmata*, *Methanobacteriota*), and *Nitrososphaera* (class *Nitrososphaeria*, *Nitrososphaerota*), as well as the *Pacearchaeota* *Incertae Sedis* AR13 group (class *Epsilonproteobacteria*, *Candidatus Pacearchaeota*). The genus *Methanomassiliicoccus* is represented by the only culturable species at the time of writing, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, which was isolated from human feces (Dridi et al., 2012). This species is a mesophilic, obligately anaerobic methanogen growing in the temperature range of 25–45°C (optimum at 37°C), pH 7.2–8.4 (optimum at pH 7.6), and salinity of 0.1–1.0% (optimum 1.0%). It produces methane from hydrogen and methanol. The genus *Nitrososphaera* is also represented by the only culturable species, *Nitrososphaera viennensis*, isolated from soil. It is a mesophilic, neutrophilic, and aerobic ammonium-oxidizing microorganism with an optimal growth temperature of 42°C and pH 7.5 (Stieglmeier et al., 2014). Thus, archaea comprised 0.27% of the microorganisms in the sediments community and were represented by mesophilic species.

The bacterial community of the sediments was quite diverse and represented by 2365 phylotypes. A total of 23 phyla were identified in the eubacterial microbial community, among which the dominant ones were *Pseudomonadota* (50.9% of the total number of reads), *Bacillota* (17.4%), *Bacteroidota* (15.9%), *Chloroflexota* (5.5%), *Actinomycetota* (3.8%), *Verrucomicrobiota* (1.7%), *Acidobacteriota* (1.3%), and *Mycoplasmata* (1.3%) (Fig. 2). The distribution of these phyla is typical of freshwater microbial communities located in different geographical zones of the world (Newton et al., 2011). The microbial community of the sediments consisted of the genera *Aeromonas*, *Psychrosinus*, *Malikia*,

**Table 3.** Content of macroelements in the studied samples of sediments from the Churek-Dorgun spring

Elements	Sample №1	Sample №2
Macroelements, %		
Ca	6,55	4,48
Mg	2,24	3,4
K	1,14	0,63
P	0,15	0,26
Conditionally essential elements, %		
Si	55,67	53,05

**Note:** \*MAC values of chemical substances in soils and permissible levels of their harmfulness are given in accordance with SanPiN 4266-87

*Dechloromonas*, *Sunxiuqinia*, *Thiobacillus*, *Geobacter*, *Litorilinea*, *Giesbergeria*, and *Rivibacter*, which are widespread in different ecosystems and have different physiological properties and metabolisms (Table 5). They have a high adaptive potential for survival under various conditions, including extreme ones. The sediments community is dominated by representatives of the phylum *Pseudomonadota* (50.9%), which is widespread in a variety of habitats and is characterized by high diversity and abundance (Tobler and Benning, 2011; Wang et al., 2012; Parfenova et al., 2013; De Leon et al., 2013; Zinke et al., 2018; Dagurova et al., 2023; etc.). In the bacterial community of the sediments, the class *Gammaproteobacteria* was characterized by the predominance of chemoorganotrophs of the genus *Aeromonas* (9.83%) and microaerophilic sulfur- and iron-reducing bacteria of the genus *Geobacter* (class *Deltaproteobacteria*, 2.86%). The genus *Aeromonas* includes more than 30 Gram-negative bacterial species that naturally inhabit aquatic environments (Aravena-Roman et al., 2013; Marti and Balcazar, 2015; etc.). In addition to water, *Aeromonas* are widely distributed in

**Table 4.** Trace element content in the studied sediments samples from the Churek-Dorgun spring

Elements	Sample №1	Sample №2	MAC <sub>sub&gt;</sub> mg/kg soil considering the background	Hazard indicators		
				Translocation	Water	General sanitary
Potentially toxic, mg/kg						
Ni	11.76 ± 0.03	9.82 ± 0.03	4.0	6.7	14.0	4.0
Sr	101.4 ± 0.8	349.3 ± 2.5	600			
Trace elements, mg/kg						
Mn	1472 ± 14	1149 ± 11	1500	3500.0	1500.0	1500.0
Zn	195.8 ± 2.1	196.8 ± 2.0	23.0	23.0	200.0	37.0
V	100.1 ± 0.8	63.1 ± 0.4	150.0	170.0	350.0	150.0
Cu	43.3 ± 3.2	42.6 ± 3.1	3.0	3.5	72.0	3.0
Co	18.4 ± 0.5	14.6 ± 0.2	5.0	25.0	>1000	5.0
Trace elements, %						
Fe	7.56	5.1	-			

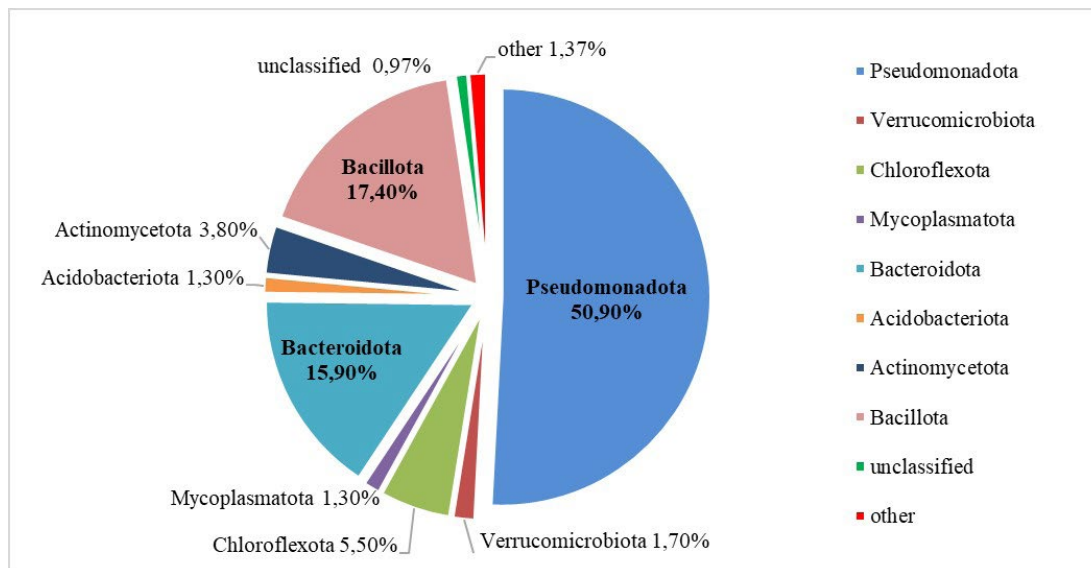


Fig.2. Bacterial community composition of the Churek-Dorgun spring sediments

a wide variety of sources, such as soil, vegetables, and food products (McMahon and Wilson, 2001; Gonçalves Pessoa et al., 2019; Barger et al., 2021; Pérez-García et al., 2021). These microorganisms, usually considered as pathogens of fish and some other animals, are gaining increasing importance in medical research because of their ability to colonize and infect humans (Mohan et al., 2017, Pessoa et al., 2022).

*Betaproteobacteria* were dominated by bacteria of the genera *Malikia* (5.55%), *Dechloromonas* (4.33%), *Thiobacillus* (3.02%), *Giesbergeria* (1.99%), *Rivibacter* (1.98%), *Rhodoferax* (1.62%), *Sideroxydans* (1.0%), and *Acidovorax* (1.0%). The genus *Malikia* includes two culturable species that accumulate polyhydroxyalkanoates and polyphosphates, *Malikia granosa*, isolated from activated sludge of a municipal waste-

Table 5. Representation of dominant phylotypes in microbial communities of the Churek-Dorgun spring sediments

No	Phylotype	Proportion of reads from the total number, %
1	<i>Aeromonas</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Gammaproteobacteria</i> )	9.83
2	<i>Psychrosinus</i> ( <i>Bacillota</i> , class <i>Negativicutes</i> )	8.48
3	<i>Malikia</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	5.55
4	<i>Dechloromonas</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	4.33
5	<i>Sunxiuqinia</i> ( <i>Bacteroidota</i> , class <i>Bacteroidia</i> )	3.89
6	<i>Thiobacillus</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	3.02
7	<i>Geobacter</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Deltaproteobacteria</i> )	2.86
8	<i>Litorilinea</i> ( <i>Chloroflexota</i> , class <i>Caldilineae</i> )	2.17
9	<i>Giesbergeria</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	1.99
10	<i>Rivibacter</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	1.98
11	<i>Mariniphaga</i> ( <i>Bacteroidota</i> , class <i>Bacteroidia</i> )	1.67
12	<i>Rhodoferax</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	1.62
13	<i>Prolixibacter</i> ( <i>Bacteroidota</i> , class <i>Bacteroidia</i> )	1.57
14	<i>Ornatilinea</i> ( <i>Chloroflexota</i> , class <i>Anaerolineae</i> )	1.53
15	<i>Mangrovibacterium</i> ( <i>Bacteroidota</i> , class <i>Bacteroidia</i> )	1.51
16	<i>Clostridium sensu stricto</i> ( <i>Bacillota</i> , class <i>Clostridia</i> )	1.45
17	<i>Ilumatobacter</i> ( <i>Actinomycetota</i> , class <i>Acidimicrobiia</i> )	1.04
18	<i>Tabrizicola</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Alphaproteobacteria</i> )	1.01
19	<i>Sideroxydans</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	1.0
20	<i>Acidovorax</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , class <i>Betaproteobacteria</i> )	1.0

water treatment plant, and *Malikia spinosa*, isolated from river in USA (Spring et al., 2005). The genus *Dechloromonas* is represented by chlorate-reducing bacteria (Achenbach et al., 2001; Wolterink et al., 2005). Representatives of *Betaproteobacteria* also include sulfur chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Thiobacillus* (3.02%), heterotrophic bacteria of the genera *Giesbergeria* (1.99%), and *Rivibacter* (1.98%), moderately psychrophilic non-sulfur bacteria of the genus *Rhodoferrax* (1.62%), and freshwater iron-oxidizing bacteria *Sideroxydans* (1.0%). The genus *Acidovorax* belongs to the *Comamonadaceae*, which contains some plant pathogens such as *Acidovorax avenae*, which cause bacterial fruit spots on melons (Willems et al., 1992). Other *Acidovorax* species oxidize ferrous iron under anaerobic conditions, forming iron minerals in the soil. Among them, psychrophilic hydrogen bacteria from tundra soil (Vasilyeva et al., 1998) and aerobic bacteria from the Collins Ice Front soil on the Fildes Peninsula, Antarctica (Xu et al., 2019) were also identified.

The *Alphaproteobacteria* class is represented by the genus *Tabrizicola* (family *Rhodobacteraceae*), the presence of which is usually associated with the biogeochemical cycling of sulfur (Chen et al., 2014).

It should be noted that in total, representatives of twenty dominant phylotypes in the microbial community account for approximately 58% of the total number of reads analyzed, and the remaining 42% are minor groups, which include bacteria of different phyla.

The phylum *Bacteroidota* accounts for 15.9% and is mainly represented by the phylotypes *Sunxiuqinia* (3.89%), *Mariniphaga* (1.67%), *Prolixibacter* (1.57%), and *Mangrovibacterium* (1.51%). Representatives of the genus *Prolixibacter* include a psychrotolerant anaerobe isolated from the surface of an electrode incubated in marine sediments. It is a facultative anaerobe that can ferment sugars by the mixed acid fermentation

pathway, and it can grow in a wide range of temperatures (4-42°C) (Holmes et al., 2007). The genus *Mangrovibacterium* is represented by lignin-degrading and nitrogen-fixing bacteria isolated from sediments under mangrove trees (Huang et al., 2014; Sun et al., 2020; Wu et al., 2014).

The phylum *Bacillota* include representatives of the genera *Psychrosinus* (8.48%, class *Negativicutes*). The genus *Psychrosinus* is currently represented by a single psychrophilic obligate anaerobic lactate-fermenting species *Psychrosinus fermentans* isolated from water sample from permanently ice-covered meromictic Lake Fryxell, Antarctica (Sattley et al., 2008).

The community structure at the top 20 phylotype level also includes *Chloroflexota* and *Actinomycetota*, accounting for 5.5% and 3.8% of the total reads, respectively.

The phylum *Chloroflexota* includes two genera, *Litorilinea* (2.17%) and *Ornatilinea* (1.57%), each of which currently has a single representative. The cellulolytic member of the class *Anaerolineae*, *Ornatilinea apprima*, is an obligate anaerobic, mesophilic, organotrophic bacterium that was isolated from a microbial mat formed in hot water from deep borehole in Western Siberia (Podosokorskaya et al., 2013). *Litorilinea aerophila* is an aerobic member of the class *Caldilineae*, isolated from a tidal hot spring in northwest Iceland (Kale et al., 2013).

The phylum *Actinomycetota* is represented by the genus *Ilumatobacter* isolated from estuarine sediments of Kuira-Gava River in Japan and coastal sand collected from the sea coast of Japan (Matsumoto et al., 2009; 2013).

The microbial community contains chemotrophic bacteria involved in the sulfur cycle. They are sulfur-reducing bacteria *Geobacter* (*Geobacteraceae*) and *Hippea* (*Desulfobacterales*), sulfur-oxidizing bacteria *Thiobacillus*

**Table 6.** Representation of functionally significant phylotypes of sulfur cycle bacteria in the microbial community of the Churek-Dorgun spring sediments

Phylotype	Number of reads, pcs.
<b>Sulfur-reducing bacteria</b>	
<i>Geobacter</i> ( <i>Geobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	1089
<i>Hippea</i> ( <i>Desulfobacterales</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<b>Sulfate-reducing bacteria</b>	
<i>Desulfocapsa</i> ( <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	232
<i>Desulfobulbus</i> ( <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	191
<i>Subdivision3 genera incertae sedis</i> ( <i>Thermodesulfobiaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	180
<i>Desulfobacterium</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	176
<i>Desulfoprunum</i> ( <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	151
<i>Desulfosalsimonas</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	116
<i>Desulfatirhabdium</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	44
<i>Aminicenantes genera incertae sedis</i> ( <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	35
<i>Desulfovibrio</i> ( <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	34
<i>Desulfonatronum</i> ( <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	25



Phylotype	Number of reads, pcs.
<i>Desulfopila</i> ( <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	23
<i>Desulforhabdus</i> ( <i>Syntrophobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	19
<i>Desulfofaba</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	17
<i>Desulfotomaculum</i> ( <i>Peptococcaceae_2</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	17
<i>Desulforegula</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	16
<i>Desulfomonile</i> ( <i>Syntrophaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	13
<i>Desulfomicrobium</i> ( <i>Desulfomicrobiaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	13
<i>Desulfobacca</i> ( <i>Syntrophaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	10
<i>Thermodesulfobivrio</i> ( <i>Nitrospiraceae</i> , <i>Nitrospira</i> )	7
<i>Desulfatiferula</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<i>Syntrophobacter</i> ( <i>Syntrophobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<i>Desulfotalea</i> ( <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<i>Desulforhopalus</i> ( <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	3
<i>Desulfococcus</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	3
<i>Desulfatiglans</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	3
<b>Sulfur-oxidizing bacteria</b>	
<i>Thiobacillus</i> ( <i>Hydrogenophilaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i> )	1147
<i>Sulfuritalea</i> ( <i>Rhodocyclaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i> )	111
<i>Thiohalomonas</i> ( <i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	78
<i>Sulfurisoma</i> ( <i>Rhodocyclaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i> )	54
<i>Sulfuricurvum</i> ( <i>Helicobacteraceae</i> , <i>Epsilonproteobacteria</i> )	34
<i>Thiohalocapsa</i> ( <i>Chromatiaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	32
<i>Thioalkalibacter</i> ( <i>Halothiobacillaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	30
<i>Thiohalophilus</i> ( <i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	26
<i>Thiogramum</i> ( <i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	12
<i>Halothiobacillus</i> ( <i>Sinobacteraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	11
<i>Thiopfundum</i> ( <i>Thioalkalispiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	7
<b>Purple sulfur bacteria</b>	
<i>Thiocapsa</i> ( <i>Chromatiaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	4
<b>Heterotrophic microorganisms that are potentially involved in the oxidation of hydrogen sulfide, molecular sulfur, and thiosulfate</b>	
<i>Pseudomonas</i> ( <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	26

(*Hydrogenophilaceae*), *Sulfuritalea* (*Rhodocyclaceae*), purple sulfur bacteria *Thiocapsa* (*Chromatiaceae*), and sulfate-reducing bacteria (Table 6).

#### 4. Conclusions

The Churek-Dorgun spring is a cold fresh spring with a mineralization of 0.39 g/L and neutral pH. The spring water is of medium hardness and belongs to the calcium sulfate-bicarbonate type. The element composition in silt was determined by the X-ray fluorescence method: calcium and magnesium dominated. Manganese, zinc and vanadium dominated among microelements. Balneological recommendations allow the use of the waters of the Churek-Dorgun spring in procedures for the treatment of cardiovascular diseases, hypertension, and headaches (Arakchaa, 1995).

For the first time, the taxonomic diversity of prokaryotes in sediments samples from the Churek-Dorgun spring was determined. Because of the analysis

of the obtained 16S rRNA gene sequencing, phylotypes belonging to the *Bacteria* and *Archaea* domains were identified. *Archaea* comprised 0.27% of the microorganisms in the sediments community and were represented by mesophilic species. The bacterial microbial community of the Churek-Dorgun cold spring the phyla typical of freshwater microbial communities *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Acidobacteriota*, and *Mycoplasmata* dominated. At a lower taxonomic level, bacterial phylotypes that are widespread in aquatic and soil ecosystems and completely ensure closed cycles of biogenic elements were dominated.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-24-10026.

## References

- Achenbach L.A., Michaelidou U., Bruce R.A. et al. 2001. *Dechloromonas agitate* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 527-533. DOI: [10.1099/00207713-51-2-527](https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-527)
- Akimov V.N., Shlyapnikov M.G., Podosokorskaya O.A. et al. 2013. Dominant phylotypes in the 16S rRNA gene clone libraries from bacterial mats of the Uzon caldera (Kamchatka, Russia) hydrothermal springs. *Microbiology (Moscow)* 82:6: 721-727. DOI: [10.7868/S0026365613060025](https://doi.org/10.7868/S0026365613060025) (in Russian)
- Alsop E.B., Boyd E.S., Raymond J. 2014. Merging metagenomics and geochemistry reveals environmental controls on biological diversity and evolution // *BMC Ecology* 14:16: 1-12. DOI: [10.1186/1472-6785-14-16](https://doi.org/10.1186/1472-6785-14-16)
- Arakchaa K.D. 1995. The word about the Arjaans of Tuva. Moscow: Poly-Com. (in Russian)
- Arakchaa K.D., Kuzhuget K.S. 2013. Natural water therapeutic resources of the Republic of Tuva: state and prospects of research. In: *International Scientific and Practical Conference "The resort base and natural health-improving areas of Tuva and neighboring regions: experience and prospects of use for the prevention of diseases, treatment and rehabilitation of patients"*, pp. 8-15. (in Russian)
- Aravena-Roman M., Beaz-Hidalgo R., Inglis T.J. et al. 2013. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2270-2276. DOI: [10.1099/ijs.0.040162-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.040162-0)
- Barger P.C., Liles M.R., Beck B.H. et al. 2021. Differential production and secretion of potentially toxigenic extracellular proteins from hypervirulent *Aeromonas hydrophila* under biofilm and planktonic culture. *BMC Microbiology* 21: 1-16. DOI: [10.1186/s12866-021-02088-3](https://doi.org/10.1186/s12866-021-02088-3)
- Belkova N.L. 2009. Molecular genetic methods of analysis of microbial communities. In: *The diversity of microbial communities of inland reservoirs of Russia: An educational and methodological guide*. Yaroslavl, pp. 53-63. (in Russian)
- Chen Z., Zhang J., Lei X. et al. 2014. Influence of plaque-forming bacterium, *Rhodobacteraceae* sp. on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 169: 784-788. DOI: [10.1016/j.biortech.2014.07.021](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.021)
- Dagurova O.P., Tsydenova B.V., Zaitseva S.V. 2023. Diversity of the microbial community of freshwater lake Baunt. *Nature of Inner Asia* 3:25: 31-39. DOI: [10.18101/2542-0623-2023-3-31-39](https://doi.org/10.18101/2542-0623-2023-3-31-39) (in Russian)
- De Leon K.B., Gerlach R., Peyton B.M. et al. 2013. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geysir Basin, Yellowstone National Park. *Frontiers in Microbiology* 4:330: 1-10. DOI: [10.3389/fmicb.2013.00330](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00330)
- Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B. et al. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1902-1907. DOI: [10.1099/ijs.0.033712-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0)
- Fang Shu, Yan Juan. 2022. Analysis of prokaryotic microbial diversity in hot spring water from Bantang (China) using the targeted amplicon analysis. *All Life*. 15: 325-339. DOI: [10.1080/26895293.2022.2049899](https://doi.org/10.1080/26895293.2022.2049899)
- Gonçalves Pessoa R.B., de Oliveira W.F., Marques D.S.C. et al. 2019. The genus *Aeromonas*: a general approach. *Microbial Pathogenesis* 130: 81-94. DOI: [10.1016/j.micpath.2019.02.036](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036)
- Holmes D.E., Nevin K.P., Woodard T.L. et al. 2007. *Prolixibacter bellariivorans* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum Bacteroidetes, isolated from a marine-sediment fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 701-707. DOI: [10.1099/ijs.0.64296-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.64296-0)
- Huang X.F., Liu Y.J., Dong J.D. et al. 2014. *Mangrovibacterium diazotrophicum* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove sediment, and proposal of *Prolixibacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 3: 875-881. DOI: [10.1099/ijs.0.052779-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052779-0)
- Kale V., Bjornsdottir S.H., Friethjonnsson O.H. et al. 2013. *Litorilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., an aerobic member of the class *Caldilineae*, phylum *Chloroflexi*, isolated from an intertidal hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 1149-1154. DOI: [10.1099/ijs.0.044115-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.044115-0)
- Li G., Jiang H., Hou W. et al. 2012. Microbial diversity in two cold springs on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Geoscience Frontiers* 3: 317-325. DOI: [10.1016/j.gsf.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.gsf.2011.12.004)
- Marti E., Balcazar J.L. 2015. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. *Journal of Basic Microbiology* 55: 1435-1439. DOI: [10.1002/jobm.201500264](https://doi.org/10.1002/jobm.201500264)
- Matsumoto A., Kasai H., Matsuo Y. et al. 2009. *Ilumatobacter fluminis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 201-205. DOI: [10.2323/JGAM.55.201](https://doi.org/10.2323/JGAM.55.201)
- Matsumoto A., Kasai H., Matsuo Y. et al. 2013. *Ilumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Ilumatobacter coccineum* sp. nov., isolated from seashore sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 3404-3408. DOI: [10.1099/ijs.0.047316-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.047316-0)
- McMahon M.A.S., Wilson I.G. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70: 155-162. DOI: [10.1016/S0168-1605\(01\)00535-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00535-9)
- Mohan B., Sethuraman N., Verma R. et al. 2017. Speciation, clinical profile & antibiotic resistance in *Aeromonas* species isolated from cholera-like illnesses in a tertiary care hospital in North India. *Indian Journal of Medical Research* 146: 517-520. DOI: [10.4103/ijmr.IJMR](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR)
- Namsaraev B.B., Barkhutova D.D., Danilova E.V. et al. 2011. Geochemical activity of microorganisms of hydrotherms of the Baikal rift zone. Novosibirsk: Academic publishing house "Geo". (in Russian)
- Newton R., Jones S., Eiler A. et al. 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 75: 14-49. DOI: [10.1128/MMBR.00028-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10)
- Parfenova V.V., Gladkikh A.S., Belykh O.I. 2013. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal. *Microbiology (Moscow)* 82:1: 91-101. DOI: [10.1134/S0026261713010128](https://doi.org/10.1134/S0026261713010128) (in Russian)
- Pérez-García D., Larios-Serrato V., Rojas-Rios R. et al. 2021. Frequency and diversity of small plasmids in mesophilic *Aeromonas* isolates from fish, water and sediment. *Plasmid* 118: 1-10. DOI: [10.1016/j.plasmid.2021.102607](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2021.102607)
- Pessoa R.B.G., Oliveira W.F., Correia M.T.S. et al. 2022. *Aeromonas* and Human Health Disorders: Clinical Approaches. *Frontiers in Microbiology* 13: 868890. DOI: [10.3389/fmicb.2022.868890](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.868890)
- Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Novikov A.A. et al. 2013. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 86-92. DOI: [10.1099/ijs.0.041012-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.041012-0)
- Sattley W.M., Jung D.O., Madigan M.T. 2008. *Psychrosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., a lactate-fermenting bacterium from near-freezing oxycline waters of a meromictic Antarctic lake. *FEMS Microbiology Letters* 287: 121-127. DOI: [10.1111/j.1574-6968.2008.01300.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01300.x)

Skalny A.V. 2003. Trace elements for your health. Moscow: ONYX 21st century. (in Russian)

Spring S., Wagner M., Schumann P. et al. 2005. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sediments, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 621-629. DOI: [10.1099/ijs.0.63356-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63356-0)

Stieglmeier M., Klingl A., Alves R.J.E. et al. 2014. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2738–2752. DOI: [10.1099/ijs.0.063172-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.063172-0)

Streit W.R., Schmitz R.A. 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* 7:5: 492–498. DOI: [10.1016/j.mib.2004.08.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002)

Sun C., Zeng X., Lai Q. et al. 2020. *Mangrovibacterium lignilyticum* sp. nov., a facultatively anaerobic lignin-degrading bacterium isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 4502-4507. DOI: [10.1099/ijsem.0.004305](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004305)

Tobler D.J., Benning L.G. 2011. Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects. *Extremophiles* 15: 473-485. DOI: [10.1007/s00792-011-0378-z](https://doi.org/10.1007/s00792-011-0378-z)

Vasilyeva L.V., Savelyeva N.D., Omelchenko M.V. et al. 1998. *Arthrobacter crygenae* sp. nov. and *Acidovorax psychrophacilis* sp. nov., psychrophilic hydrogen bacteria from tundra soil. *Microbiology (Moscow)* 67: 195-200. (in Russian)

Wang M., Zhang X., Shu Z. et al. 2022. Bacterial and archaeal communities within the alkaline soda Langaco Lake in the Qinghai-Tibet Plateau. *Annals of Microbiology* 72:33. DOI: [10.1186/s13213-022-01691-7](https://doi.org/10.1186/s13213-022-01691-7)

Wang Y., Sheng H.F., He Y. et al. 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Applied and Environmental Microbiology* 78:23: 8264–8271. DOI: [10.1128/AEM.01821-12](https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12)

Willems A., Goor M., Thielemans S. et al. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:107-119. DOI: [10.1099/00207713-42-1-107](https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-107)

Wolterink A., Kim S., Muusse M. et al. 2005. *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2063-2068. DOI: [10.1099/ijs.0.63404-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63404-0)

Wu W.J., Zhou Y.X., Liu Y. et al. 2014. *Mangrovibacterium marinum* sp. nov., isolated from a coastal sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107: 1583-1589. DOI: [10.1099/ijs.0.052779-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052779-0)

Xu Q., Peng X., Wang Y. et al. 2019. *Acidovorax antarcticus* sp. nov., isolated from a soil sample of Collins Glacier front, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71:3. DOI: [10.1099/ijsem.0.004744](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004744)

Zavarzin G.A. 2003. Lectures on natural microbiology. Moscow: Science. (in Russian)

Zinke L.A., Reese B.K., McManus J. et al. 2018. Sediment Microbial Communities Influenced by Cool Hydrothermal Fluid Migration. *Frontiers in Microbiology* 9: DOI: [10.3389/fmicb.2018.01249](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01249)

# Филогенетическое разнообразие прокариот холодного источника Чурек-Доргун (Республика Тыва)



Кашкак Е.С.\*<sup>1</sup>, Лопсан-Ендан А.Б.<sup>1</sup>, Белькова Н.Л.<sup>2</sup>, Дагурова О.П.<sup>3</sup>, Данилова Э.В.<sup>3</sup>, Абидуева Е.Ю.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Тувинский государственный университет, ул. Ленина, 36, Кызыл, 667000, Россия

<sup>2</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Институт эпидемиологии и микробиологии, ул. К. Маркса, 3, Иркутск, 664003, Россия

<sup>3</sup>Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Впервые методом высокопроизводительного секвенирования изучен состав микробных сообществ ила холодного пресного источника Чурек-Доргун, расположенного в Каа-Хемском районе Республики Тыва. По химическому составу воды источника Чурек-Доргун относились к сульфатно-гидрокарбонатному кальциевому типу со слабой минерализацией (0,39 г/дм<sup>3</sup>) и нейтральными значениями pH (6,8 – 7,3). По результатам секвенирования в образце ила было определено 38066 последовательностей гена 16S рРНК, принадлежащих доменам *Bacteria* и *Archaea*. Археи составили 0,27% микроорганизмов сообщества ила с преобладанием филума *Methanobacteriota*. Всего в составе бактериального микробного сообщества определено 23 филума; доминировали представители трех бактериальных филумов – *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Bacteroidota*, которые являются типичными для пресноводных микробных сообществ. Основу микробного сообщества ила составляли широко распространенные в разных экосистемах микроорганизмы – *Aeromonas*, *Psychrosinus*, *Malikia*, *Dechloromonas*, *Sunxiuqinia*, *Thiobacillus*, *Geobacter*, *Litorilinea*, *Giesbergeria*, *Rivibacter* с различными физиологическими свойствами и метаболизмом. В иле также обнаружены микроорганизмы, принимающие участие в цикле серы, среди которых хемолитотрофные сероокисляющие бактерии рода *Thiobacillus* (класс *Betaproteobacteria*, 3,02%), микроаэрофильные серовосстанавливающие бактерии рода *Geobacter* (класс *Deltaproteobacteria*, 2,86%) и сульфатредуцирующие дельта-протеобактерии.

**Ключевые слова:** метагеномный анализ, разнообразие бактерий, холодные источники, Чурек-Доргун, Республика Тыва

Для цитирования: Кашкак Е.С., Лопсан-Ендан А.Б., Белькова Н.Л., Дагурова О.П., Данилова Э.В., Абидуева Е.Ю. Филогенетическое разнообразие прокариот холодного источника Чурек-Доргун (Республика Тыва) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 931-948. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-931

## 1. Введение

Минеральные источники являются благоприятными экосистемами для развития и функционирования микробных сообществ, активно участвующих в продукции и деструкции органического вещества, трансформации газов, образовании минералов и биологически активных веществ (Заварзин, 2003; Намсараев и др., 2011; Alsop et al., 2014). В воде и осадках происходят интенсивные физико-химические процессы с участием фото- и хемосинтезирующих бактерий, где, наряду с продуцентами, в круговороте углерода, серы и железа большую

роль играют бактерии-деструкторы (Намсараев и др., 2011). Метагеномные исследования природных микробных сообществ дали возможность определить предполагаемые физиологические и метаболические стратегии микроорганизмов и их экологическую роль (Li et al., 2012; Акимов и др., 2013; Alsop et al., 2014; Fang and Yan, 2022; Wang et al., 2022 и др.). Кроме того, накопленные базы данных обеспечивают условия для анализа разнообразия культивируемых и некультивируемых микроорганизмов, выяснения функциональной активности микробных сообществ, а также поиска новых метаболических комплексов, имеющих биотехнологический и био-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [klslena@yandex.ru](mailto:klslena@yandex.ru) (Е.С. Кашкак)

Поступила: 03 июня 2024; Принята: 17 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





медицинский потенциал (Streit and Schmitz, 2004; Alsop et al., 2014).

Республика Тыва обладает многочисленными природными водными лечебными ресурсами, которые являются уникальным полигоном для исследования микробных сообществ водных систем. На ее территории встречаются практически все типы минеральных источников: углекислые и азотные термы, углекислые и сероводородные холодные источники, соленые и кислые, радоновые и железистые (Аракчаа и Кужугет, 2013). Исследования микробных сообществ минеральных источников в данном регионе немногочисленны, разнообразие микробных сообществ молекулярно-генетическими методами до настоящего времени не изучено.

Целью работы стало изучение гидрохимической характеристики и таксономического разнообразия микробного сообщества иловых отложений холодного источника Чурек-Доргун методом высокопроизводительного секвенирования.

## 2. Материалы и методы

Объектами исследования служили вода и ил пресного источника Чурек-Доргун, расположенного в 5-6 км к северо-западу от бывшего совхоза «СовТыва» в Каа-Хемском районе Республики Тыва (Рис. 1).

Для исследования были отобраны пробы воды и ила из двух выходов в исследуемом источнике согласно общепринятым методикам, соответствующих нормативным документам. Для молекулярно-генетического анализа пробы ила отбирали в стерильную посуду и фиксировали в объемном соотношении 1:1 реагентом 2×DNA/RNA Shield Stabilization Solution (Zymo Research, США).

Анализ вод и ила проводился классическими

и современными инструментальными методами на базе лаборатории физико-химических методов исследований Тувинского государственного университета (г. Кызыл). Определение физико-химических характеристик воды в местах отбора проб проводили с помощью портативных приборов и стандартных методов гидрохимии, соответствующих нормативным документам. Отобранные пробы ила исследуемого источника были проанализированы рентгенофлуоресцентным методом на содержание Mg, Al, Si, Zn, P, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Sr, V, Co, Cu на анализаторе «СПЕКТРОСКАН МАКС-GV» (Россия).

Тотальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб» (АмплиСенс, Россия) и «Bacterial Genomic DNA kit» (Axugen, США) с учетом предложенных ранее модификаций (Белькова, 2009). Секвенирование переменных участков V3–V4 гена 16S рНК проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Для биоинформационного анализа полученных библиотек использовали ресурсы Pyrosequencing pipeline (<https://pyro.cme.msu.edu>). Полученные последовательности выравнивали и кластеризовали с использованием программы Complete Linkage Clustering (<https://pyro.cme.msu.edu>). Таксономическое разнообразие сообщества оценивали при различных кластерных расстояниях, соответствующих следующим таксонам: 0,03 (97%) – вид, 0,05 (95%) – род, 0,1 (90%) – семейство, используя программу Rarefaction (<https://pyro.cme.msu.edu>). Классификацию видов производили на основе генотипического подхода в соответствии с международным кодом номенклатуры бактерий (ICNB).

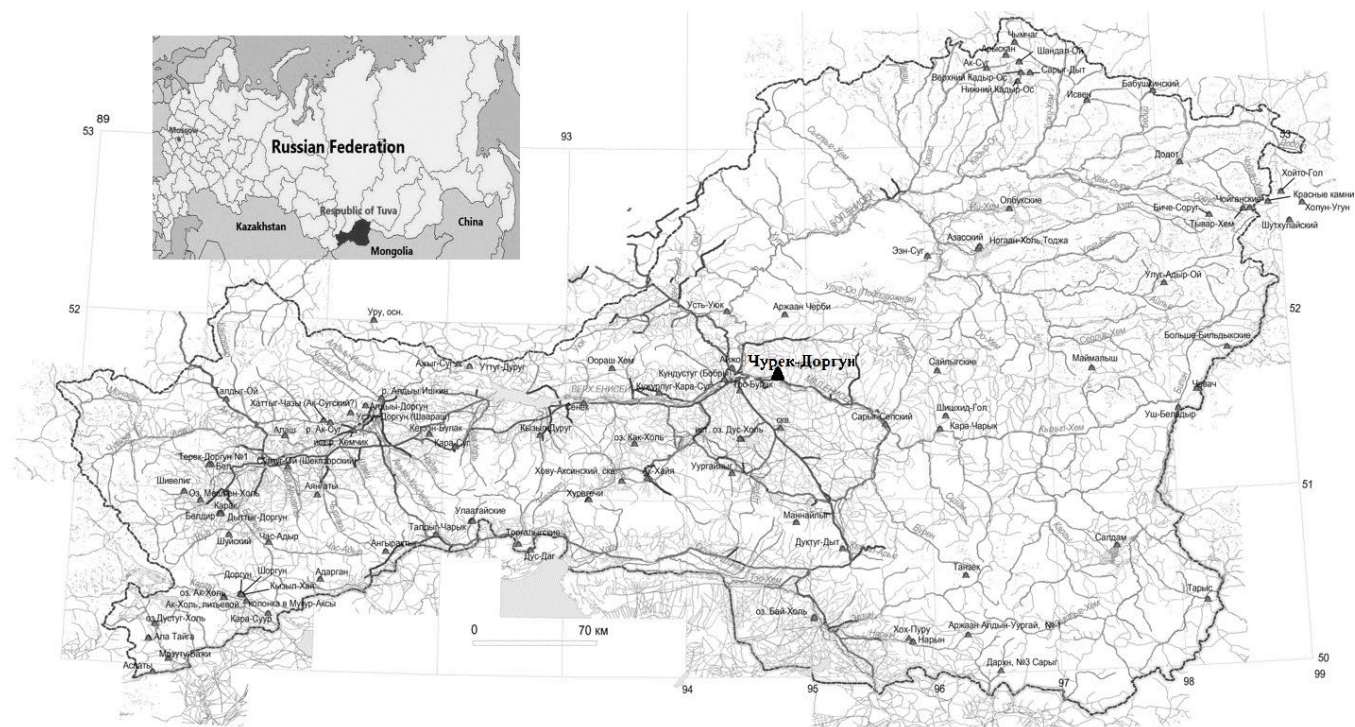


Рис.1. Карта расположения источника Чурек-Доргун

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Характеристика минерального источника

Источник Чурек-Доргун (51°43' 46.16» E 094°45' 4.46» N) расположен у подножия горы в Каа-Хемском районе Республики Тыва на высоте 850 м над уровнем моря. Температура воды в местах отбора проб достигала 5-6°С. Цветность исследуемых вод варьировала от 3,84 до 9,61 градусов цветности (Таблица 1). Оба выхода воды имели нейтральные значения pH. Дебит источника невысок. Вода источника Чурек-Доргун относилась к водам средней жесткости. Содержание сухого остатка достигало 0,40 мг/дм<sup>3</sup>. Общая концентрация потребляемого кислорода, соответствующая количеству перманганат-иона, в исследуемых пробах воды достигала 3,5 мгО/дм<sup>3</sup>.

Содержание свободной углекислоты составляло 31,0 мг/дм<sup>3</sup>, гидрокарбонат-ионов – более 200 мг/дм<sup>3</sup>. Концентрация сульфат-ионов достигала 170 мг/дм<sup>3</sup>, а хлорид-ионов – 9,6 мг/дм<sup>3</sup> (Таблица 2). Ионы нитратов и нитритов присутствовали в меньшем количестве.

Вода содержала до 61 мг/л ионов кальция и до 30 мг/л ионов магния, которые играют важную роль при работе сердечно-сосудистой системы, процессах энергетического обмена веществ и контроле уровня холестерина в организме человека. Содержание ионов аммония (до 0,8 мг/дм<sup>3</sup>) и общего железа (до 0,06 мг/дм<sup>3</sup>) в исследуемых водах источника было незначительным. Все значения не превышали ПДК и соответствовали питьевым водам.

При изучении элементного состава проб ила источника Чурек-Доргун рентгенофлуоресцентным методом анализа были обнаружены элементы, которые можно разделить на следующие группы: жизненно-важные (эссенциальные, биогенные) – макроэлементы (магний, натрий, фосфор, сера, кальций, калий, хлор) и микроэлементы (марганец, цинк, железо, хром); условно-эссенциальные (кремний); токсичные (алюминий, барий) и потенциально-токсичные (стронций, рубидий, титан, никель) (Скальный, 2003).

В исследуемых образцах ила среди макроэлементов были обнаружены Mg, K, Ca и P (Таблица 3). В исследуемых пробах преобладали кальций (4,48 – 6,55%) и магний (2,24 – 3,4%), которые относятся к эссенциальным (биогенным) элементам и играют важную роль при работе сердечно-сосудистой системы, процессах энергетического обмена веществ и контроле уровня холестерина в организме человека. Содержание кремния в исследуемых образцах достигало 56%, который улучшает работу почек и обмен веществ, помогает при заболеваниях желудка и печени.

Содержание никеля, цинка, меди и кобальта в исследуемых илах превышало ПДК (Таблица 4), но, в соответствии с принятой медиками схеме нормирования тяжелых металлов в почвах, миграционный водный показатель вредности (переход в воду) никеля, меди и кобальта выше. Это показывает, что выявленное содержание никеля, меди и кобальта в илах безопасно для жизнедеятельности человека.

#### 3.2. Филогенетическое разнообразие и функциональная характеристика микробного сообщества ила источника Чурек-Доргун

По результатам секвенирования в образце ила было определено 38066 последовательностей, принадлежащих доменам *Bacteria* и *Archaea*. В микробном сообществе ила к домену *Archaea* было отнесено 104 последовательности (0,27%), из них 85 отнесены к филуму *Methanobacteriota*, 14 – к *Nitrososphaerota* и 5 последовательностей к филуму *Candidatus Pacearchaeota*. Следует отметить, что последовательности идентифицированы на уровне рода: *Methanothrix* (класс *Methanomicrobia*, *Methanobacteriota*), *Methanosarcina* (класс *Methanomicrobia*, *Methanobacteriota*) *Methanomassiliicoccus* (класс *Thermoplasmata*, *Methanobacteriota*) и *Nitrososphaera* (класс *Nitrososphaeria*, *Nitrososphaerota*), а также группы *Pacearchaeota\_Incertae\_Sedis\_AR13* (класс *Epsilonproteobacteria*, *Candidatus Pacearchaeota*). Род *Methanomassiliicoccus* представлен единственным на

Таблица 1. Физико-химическая характеристика анализируемых вод

Параметры	Проба №1	Проба №2	ПДК*
Температура, 0С	5,0	6,0	20
pH	6,8	7,3	6–9
Цветность, градус цветности	3,84	9,61	20
Мутность, ЕМФ	0	0	2,6
Перманганатная окисляемость, мгО /дм <sup>3</sup>	3,52 ± 0,70	3,44 ± 0,69	3,00
Свободная углекислота, г/дм <sup>3</sup>	30,8 ± 3,0	28,6 ± 2,8	-
Общая жесткость, оЖ	6,1 ± 1,2	6,4 ± 1,2	7,0
Сухой остаток, мг/дм <sup>3</sup>	0,38 ± 0,07	0,40 ± 0,07	1000

Примечание: \*величина ПДК приведена в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21

Таблица 2. Содержание ионов в воде источника Чурек-Доргун

Определяемые компоненты, мг/дм <sup>3</sup>	Проба №1	Проба №2	ПДК*
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	271,5 ± 29,9	274,3 ± 30,2	500
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	166,5 ± 33,3	169,8 ± 33,9	500
Cl <sup>-</sup>	9,57 ± 1,53	8,86 ± 1,40	350
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,15 ± 0,56	2,85 ± 0,51	45
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	3,0
K <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup>	146,3 ± 29,3	160 ± 32	200
Ca <sup>2+</sup>	56,2 ± 2,8	60,8 ± 3,0	200
Mg <sup>2+</sup>	29,6 ± 4,4	27,1 ± 4,0	100
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,74 ± 0,19	0,80 ± 0,21	2,5
Fe <sub>общ</sub>	0,05 ± 0,013	0,06 ± 0,015	0,3

Примечание: \*величина ПДК приведена в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21

момент написания статьи культивируемым видом *Methanomassiliicoccus luminyensis*, выделенным из фекалий человека (Dridi et al., 2012). Данный вид является мезофильным, облигатно анаэробным метаногеном, растущим в диапазоне температур 25–45°C (оптимум при 37°C), pH 7,2–8,4 (оптимум при pH 7,6) и солености 0,1–1,0% (оптимум 1,0%). Образует метан из водорода и метанола. Род *Nitrososphaera* также представлен единственным культивируемым видом *Nitrososphaera viennensis*, выделенным из почвы. Это мезофильный, нейтрофильный и аэробный аммоний-окисляющий микроорганизм с оптимальной температурой роста 42°C и pH 7,5 (Stieglmeier et al., 2014). Таким образом, археи составляют 0,27% микроорганизмов сообщества ила и представлены мезофильными видами.

Бактериальное сообщество ила было достаточно разнообразным и представлено 2365 филотипами. Всего в составе бактериального микробного сообщества определено 23 филума, среди которых доминировали *Pseudomonadota* (50,9% от общего числа последовательностей), *Bacillota* (17,4%), *Bacteroidota* (15,9%), *Chloroflexota* (5,5%), *Actinomycetota* (3,8%), *Verrucomicrobiota* (1,7%), *Acidobacteriota* (1,3%) и *Mycoplasmata* (1,3%) (Рис. 2). Распространение этих филумов типично для пресноводных микробных сообществ, расположенных в разных географических зонах мира (Newton et al., 2011).

Основу микробного сообщества ила составляют широко распространенные в разных экосистемах микроорганизмы родов *Aeromonas*, *Psychrosinus*, *Malikia*, *Dechloromonas*, *Sunxiuqinia*, *Thiobacillus*, *Geobacter*, *Litorilina*, *Giesbergeria*, *Rivibacter* с различными физиологическими свойствами и метаболизмом (Таблица 5). Они обладают высоким адаптационным потенциалом для выживания в различных условиях, в том числе и экстремальных.

В сообществе ила доминируют представители филума *Pseudomonadota* (50,9%), которые широко распространены в самых различных местах обитания, характеризуются большим разнообразием и высокой численностью (Tobler and Benning, 2011; Wang et al., 2012; Парфенова и др., 2013; De Leon

et al., 2013; Zinke et al., 2018; Дагурова и др., 2023 и др.). В составе бактериального сообщества ила класс *Gamma*proteobacteria характеризовался преобладанием хемоорганотрофов рода *Aeromonas* (9,83%) и микроаэрофильных серо- и железовосстанавливающих бактерий рода *Geobacter* (класс *Delta*proteobacteria, 2,86%). Род *Aeromonas* включает более 30 грамотрицательных видов бактерий естественных обитателей водной среды (Aravena-Roman et al., 2013; Marti and Balcazar, 2015 и др.). Помимо воды, *Aeromonas* широко распространены в самых разнообразных источниках, таких как почва, овощи и пищевые продукты (McMahon and Wilson, 2001; Gonçalves Pessoa et al., 2019; Barger et al., 2021; Pérez-García et al., 2021). Эти микроорганизмы, обычно рассматриваемые как патогены рыб и некоторых других животных, приобретают все большее значение в медицинских исследованиях, благодаря своей способности колонизировать и инфицировать людей (Mohan et al., 2017, Pessoa et al., 2022).

Среди *Beta*proteobacteria доминировали бактерии родов *Malikia* (5,55%), *Dechloromonas* (4,33%), *Thiobacillus* (3,02%), *Giesbergeria* (1,99%), *Rivibacter* (1,98%), *Rhodofera* (1,62%), *Sideroxydans* (1,0%) и *Acidovorax* (1,0%). Род *Malikia* включает два культивируемых вида, накапливающих полигидроксиалканойаты и полифосфаты: *Malikia granosa*, выделенная из активного ила городской станции очистки сточных вод, и *Malikia spinosa*, выделенная из воды реки

Таблица 3. Содержание макроэлементов в исследуемых пробах ила источника Чурек-Доргун

Элементы	Проба №1	Проба №2
Макроэлементы, %		
Ca	6,55	4,48
Mg	2,24	3,4
K	1,14	0,63
P	0,15	0,26
Условно-эссенциальные элементы, %		
Si	55,67	53,05

Таблица 4. Содержание микроэлементов в исследуемых пробах ила источника Чурек-Доргун

Элементы	Проба №1	Проба №2	Величина ПДК <sub>подв'</sub> мг/кг почвы с учетом фона	Показатели вредности		
				Транслокационный	Водный	Общесанитарный
Потенциально-токсичные, мг/кг						
Ni	11,76 ± 0,03	9,82 ± 0,03	4,0	6,7	14,0	4,0
Sr	101,4 ± 0,8	349,3 ± 2,5	600			
Микроэлементы, мг/кг						
Mn	1472 ± 14	1149 ± 11	1500	3500,0	1500,0	1500,0
Zn	195,8 ± 2,1	196,8 ± 2,0	23,0	23,0	200,0	37,0
V	100,1 ± 0,8	63,1 ± 0,4	150,0	170,0	350,0	150,0
Cu	43,3 ± 3,2	42,6 ± 3,1	3,0	3,5	72,0	3,0
Co	18,4 ± 0,5	14,6 ± 0,2	5,0	25,0	> 1000	5,0
Микроэлементы, %						
Fe	7,56	5,1	-			

Примечание: \*величина ПДК химических веществ в почвах и допустимые уровни их содержания по показателям вредности приведены в соответствии с СанПиН 4266-87.

в США (Spring et al., 2005). Род *Dechloromonas* представлен бактериями, восстанавливающими хлорат (Achenbach et al., 2001; Wolterink et al., 2005). Среди представителей *Betaproteobacteria* также обнаружены широко распространенные в водных и почвенных экосистемах серные хемолитотрофные сероокисляющие бактерии рода *Thiobacillus* (3,02%), гетеротрофные бактерии родов *Giesbergeria* (1,99%) и *Rivibacter* (1,98%), умеренно психрофильные несерные бактерии рода *Rhodoferrax* (1,62%) и пресноводные железоокисляющие бактерии *Sideroxydans* (1,0%). *Acidovorax* – род семейства *Comamonadaceae*, который содержит некоторые патогены растений, такие как вид *Acidovorax avenae*, вызывающий бактериальную пятнистость плодов на бахчевых культурах (Willems et al., 1992). Другие виды *Acidovorax* осуществляют окисление двухвалентного железа в анаэробных условиях, образуя минералы железа в почве. Среди них также выявлены психрофильные

водородные бактерии из почвы тундры (Васильева и др., 1998) и аэробная бактерия из почвы ледникового фронта Коллинз на полуострове Филдес, Антарктида (Xu et al., 2019).

Класс *Alphaproteobacteria* был представлен родом *Tabrizicola* (семейство *Rhodobacteraceae*), наличие которого обычно ассоциируется с биогеохимическим круговоротом серы (Chen et al., 2014).

Следует отметить, что суммарно представители двадцати доминирующих филотипов в микробном сообществе составляют около 58% от общего числа проанализированных последовательностей, остальные 42% приходятся на минорные группы, в которые входят бактерии различных филумов.

Филум *Bacteroidota* составляет 15,9% и включает в основном фило типы *Sunxiuqinia* (3,89%), *Mariniphaga* (1,67%), *Prolixibacter* (1,57%) и *Mangrovibacterium* (1,51%). Среди представителей рода *Prolixibacter* встречается психротолерантный

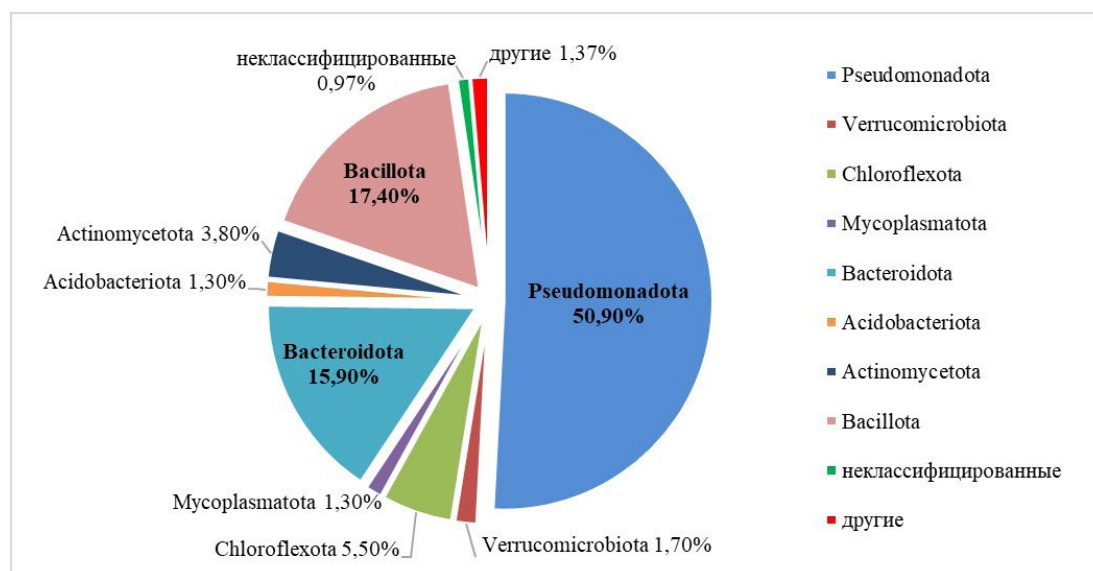


Рис.2. Состав бактериального сообщества ила источника Чурек-Доргун



Таблица 5. Представленность доминирующих фило типов в микробных сообществах ила источника Чурек-Доргун

№ п/п	Название фило типа	Доля последовательностей от общего числа, %
1	<i>Aeromonas</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Gamma</i> proteobacteria)	9,83
2	<i>Psychrosinus</i> ( <i>Bacillota</i> , класс <i>Negativicutes</i> )	8,48
3	<i>Malikia</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	5,55
4	<i>Dechloromonas</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	4,33
5	<i>Sunxiuqinia</i> ( <i>Bacteroidota</i> , класс <i>Bacteroidia</i> )	3,89
6	<i>Thiobacillus</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	3,02
7	<i>Geobacter</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Delta</i> proteobacteria)	2,86
8	<i>Litorilinea</i> ( <i>Chloroflexota</i> , класс <i>Caldilineae</i> )	2,17
9	<i>Giesbergeria</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	1,99
10	<i>Rivibacter</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	1,98
11	<i>Mariniphaga</i> ( <i>Bacteroidota</i> , класс <i>Bacteroidia</i> )	1,67
12	<i>Rhodoferax</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	1,62
13	<i>Prolixibacter</i> ( <i>Bacteroidota</i> , класс <i>Bacteroidia</i> )	1,57
14	<i>Ornatilinea</i> ( <i>Chloroflexota</i> , класс <i>Anaerolineae</i> )	1,53
15	<i>Mangrovibacterium</i> ( <i>Bacteroidota</i> , класс <i>Bacteroidia</i> )	1,51
16	<i>Clostridium sensu stricto</i> ( <i>Bacillota</i> , класс <i>Clostridia</i> )	1,45
17	<i>Illumatobacter</i> ( <i>Actinomycetota</i> , класс <i>Acidimicrobiia</i> )	1,04
18	<i>Tabrizicola</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Alpha</i> proteobacteria)	1,01
19	<i>Sideroxydans</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	1,0
20	<i>Acidovorax</i> ( <i>Pseudomonadota</i> , класс <i>Beta</i> proteobacteria)	1,0

анаэроб, который был выделен с поверхности электрода, инкубированного в морских отложениях. Это факультативный анаэроб, который может сбраживать сахара, используя путь смешанной кислотной ферментации, и он может расти в широком диапазоне температур (4-42°C) (Holmes et al., 2007). Род *Mangrovibacterium* представлен лигнинразлагающими и азотфиксирующими бактериями, выделенными из отложений под мангровыми деревьями (Huang et al., 2014; Sun et al., 2020; Wu et al., 2015).

Среди представителей филума *Bacillota* обнаружены бактерии рода *Psychrosinus* (8,48%, класс *Negativicutes*). Род *Psychrosinus* в настоящее время представлен единственным психрофильным облигатно-анаэробным лактат-ферментирующим видом *Psychrosinus fermentans*, выделенным из пробы воды из постоянно покрытого льдом меромиктического озера в Антарктиде (Sattley et al., 2008).

В структуру сообщества на уровне «топ-20» фило типов входят также представители *Chloroflexota* и *Actinomycetota*, на долю которых приходилось 5,5% и 3,8% от общего количества последовательностей образца соответственно.

Филум *Chloroflexota* включает два рода *Litorilinea* (2,17%) и *Ornatilinea* (1,57%), которые на данный момент имеют по единственному представителю. Целлюлолитический представитель класса *Anaerolineae* – *Ornatilinea apprima* – облигатно-анаэробная, мезофильная, органотрофная бактерия, была выделена из микробного мата, образовавшегося в горячей воде, вытекающей из скважины в

Западной Сибири (Podosokorskaya et al., 2013). Вид *Litorilinea aerophila* является аэробным представителем класса *Caldilineae*, выделен из приливно-отливного горячего источника на северо-западе Исландии (Kale et al., 2013).

Филум *Actinomycetota* был представлен родом *Illumatobacter*, изоляты которого были выделены из донных отложений устья реки Куира-Гава в Японии и прибрежного песка, собранного на морском побережье Японии (Matsumoto et al., 2009; 2013).

В составе микробного сообщества выявлены хемотрофные бактерии, участвующие в круговороте серы. Из бактерий серного цикла в микробном сообществе ила отмечены сероредуцирующие бактерии *Geobacter* (сем. *Geobacteraceae*) и *Hirpea* (сем. *Desulfobacterales*), сероокисляющие бактерии *Thiobacillus* (сем. *Hydrogenophilaceae*), *Sulfuritalea* (сем. *Rhodocyclaceae*), пурпурные серобактерии *Thiocapsa* (сем. *Chromatiaceae*) и сульфатредуцирующие бактерии (Таблица 6).

#### 4. Выводы

Источник Чурек-Доргун относится к холодным, пресным источникам с минерализацией 0,39 г/дм<sup>3</sup> и нейтральными значениями pH. Вода источника средней жесткости, относится к сульфатно-гидрокарбонатному кальциевому типу. Рентгенофлуоресцентным методом из образцов ила источника Чурек-Доргун были определены элементы, среди которых преобладало содержание

**Таблица 6.** Представленность функционально значимых филотипов бактерий цикла серы в микробном сообществе ила источника Чурек-Доргун (Тува)

Название филотипа	Число последовательностей, шт.
<b>Сероредуцирующие бактерии</b>	
<i>Geobacter</i> (сем. <i>Geobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	1089
<i>Hippea</i> (сем. <i>Desulfobacterales</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<b>Сульфатредуцирующие бактерии</b>	
<i>Desulfocapsa</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	232
<i>Desulfobulbus</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	191
<i>Subdivision3 genera incertae sedis</i> (сем. <i>Thermodesulfobiaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	180
<i>Desulfobacterium</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	176
<i>Desulfoprunum</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	151
<i>Desulfosalsimonas</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	116
<i>Desulfatirhabdium</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	44
<i>Aminicenantes genera incertae sedis</i> (сем. <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	35
<i>Desulfovibrio</i> (сем. <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	34
<i>Desulfonatronum</i> (сем. <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	25
<i>Desulfopila</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	23
<i>Desulforhabdus</i> (сем. <i>Syntrophobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	19
<i>Desulfofaba</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	17
<i>Desulfotomaculum</i> (сем. <i>Peptococcaceae_2</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	17
<i>Desulforegula</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	16
<i>Desulfomonile</i> (сем. <i>Syntrophaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	13
<i>Desulfomicrobium</i> (сем. <i>Desulfomicrobiaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	13
<i>Desulfobacca</i> (сем. <i>Syntrophaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	10
<i>Thermodesulfovibrio</i> (сем. <i>Nitrospiraceae</i> , <i>Nitrospira</i> )	7
<i>Desulfatiferula</i> ( <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<i>Syntrophobacter</i> (сем. <i>Syntrophobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<i>Desulfotalea</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	6
<i>Desulforhopalus</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	3
<i>Desulfococcus</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	3
<i>Desulfatiglans</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> )	3
<b>Сероокисляющие бактерии</b>	
<i>Thiobacillus</i> (сем. <i>Hydrogenophilaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i> )	1147
<i>Sulfuritalea</i> (сем. <i>Rhodocyclaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i> )	111
<i>Thiohalomonas</i> (сем. <i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	78
<i>Sulfurisoma</i> (сем. <i>Rhodocyclaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i> )	54
<i>Sulfuricurvum</i> (сем. <i>Helicobacteraceae</i> , <i>Epsilonproteobacteria</i> )	34
<i>Thiohalocapsa</i> (сем. <i>Chromatiaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	32
<i>Thioalkalibacter</i> (сем. <i>Halothiobacillaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	30
<i>Thiohalophilus</i> (сем. <i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	26
<i>Thiogranum</i> (сем. <i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	12
<i>Halothiobacillus</i> (сем. <i>Sinobacteraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	11
<i>Thiopfundum</i> (сем. <i>Thioalkalispiraceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	7
<b>Пурпурные серобактерии</b>	
<i>Thiocapsa</i> (сем. <i>Chromatiaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	4
<b>Гетеротрофные микроорганизмы, потенциально участвующие в окислении сероводорода, молекулярной серы и тиосульфата</b>	
<i>Pseudomonas</i> (сем. <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> )	26

кальция и магния. Среди микроэлементов доминировали марганец, цинк и ванадий. Бальнеологические рекомендации позволяют использовать воды источника Чурек-Доргун в процедурах для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонической болезни, головной боли (Аракчаа, 1995).

Впервые было определено таксономическое разнообразие прокариот в образцах ила из источника Чурек-Доргун. В результате анализа полученных последовательностей гена 16S рРНК были выявлены филоотипы, принадлежащие домену *Bacteria* и *Archaea*. Археи составили 0,27% микроорганизмов сообщества ила и были представлены мезофильными видами. В составе бактериального микробного сообщества ила холодного источника Чурек-Доргун было выявлено преобладание филумов *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Acidobacteriota* и *Mycoplasmata*, которые являются типичными представителями для пресноводных микробных сообществ. На более низком таксономическом уровне в микробном сообществе источника преобладали широко распространенные в водных и почвенных экосистемах филоотипы бактерий, обеспечивающие замкнутые круговороты биогенных элементов.

## Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ №23-24-10026.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Акимов В.Н., Подосокорская О.А., Шляпников М.Г. и др. 2013. Доминантные филоотипы в клонных библиотеках генов 16S рРНК из бактериальных матов гидротермальных источников кальдеры вулкана Узон, Камчатка. *Микробиология* 82(6): 721–727. DOI: [10.7868/S0026365613060025](https://doi.org/10.7868/S0026365613060025)
- Аракчаа К.Д. 1995. Слово об аржаанах Тыва. Москва: Поли-Ком.
- Аракчаа К.Д., Кужугет К.С. 2013. Природные водные лечебные ресурсы республики Тыва: состояние и перспективы исследований. Материалы Международной научно-практической конференции «Курортная база и природные лечебно-оздоровительные местности Тувы и сопредельных регионов: опыт и перспективы использования в целях профилактики заболеваний, лечения и реабилитации больных», с. 8-15.
- Белькова Н.Л. 2009. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ. В кн. *Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие*. Ярославль, с. 53-63
- Васильева Л.В., Савельева Н.Д., Омельченко М.В. и др. 1998. *Arthrobacter cryogenae* sp. nov. и *Acidovorax psychrophacilis* sp. nov. - психрофильные водородные бактерии из почвы тундры. *Микробиология* 67: 195-200.
- Дагурова О.П., Цыденова Б.В., Зайцева С.В. 2023. Разнообразие микробного сообщества пресного озера

Баунт. *Природа Внутренней Азии* 3(25): 31–39. DOI: [10.18101/2542-0623-2023-3-31-39](https://doi.org/10.18101/2542-0623-2023-3-31-39)

Заварзин Г.А. 2003. Лекции по природоведческой микробиологии. Москва: Наука.

Намсараев Б.Б., Бархутова Д.Д., Данилова Э.В. и др. 2011. Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Гео.

Парфенова В.В., Гладких А.С., Белых О.И. 2013. Сравнительный анализ биоразнообразия бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал. *Микробиология* 82 (1): 91-101. DOI: [10.1134/S0026261713010128](https://doi.org/10.1134/S0026261713010128)

Скальный А.В. 2003. Микроэлементы для вашего здоровья. Москва: ОНИКС 21 век.

Achenbach L.A., Michaelidou U., Bruce R.A. et al. 2001. *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 527-533. DOI: [10.1099/00207713-51-2-527](https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-527)

Alsop E.B., Boyd E.S., Raymond J. 2014. Merging metagenomics and geochemistry reveals environmental controls on biological diversity and evolution. *BMC Ecology* 14(16): 1-12. DOI: [10.1186/1472-6785-14-16](https://doi.org/10.1186/1472-6785-14-16)

Aravena-Roman M., Beaz-Hidalgo R., Inglis T.J. et al. 2013. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2270-2276. DOI: [10.1099/ijs.0.040162-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.040162-0)

Barger P.C., Liles M.R., Beck B.H. et al. 2021. Differential production and secretion of potentially toxigenic extracellular proteins from hypervirulent *Aeromonas hydrophila* under biofilm and planktonic culture. *BMC Microbiology* 21: 1–16. DOI: [10.1186/s12866-021-02088-3](https://doi.org/10.1186/s12866-021-02088-3)

Chen Z., Zhang J., Lei X. et al. 2014. Influence of plaque-forming bacterium, *Rhodobacteraceae* sp. on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 169: 784–788. DOI: [10.1016/j.biortech.2014.07.021](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.021)

De Leon K.B., Gerlach R., Peyton B.M. et al. 2013. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geysir Basin, Yellowstone National Park. *Frontiers in Microbiology* 4(330): 1-10. DOI: [10.3389/fmicb.2013.00330](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00330)

Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B. et al. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1902–1907. DOI: [10.1099/ijs.0.033712-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0)

Fang S., Yan J. 2022. Analysis of prokaryotic microbial diversity in hot spring water from Bantang (China) using the targeted amplicon analysis. *All Life* 15: 325-339. DOI: [10.1080/26895293.2022.2049899](https://doi.org/10.1080/26895293.2022.2049899)

Gonçalves Pessoa R.B., de Oliveira W.F., Marques D.S.C. et al. 2019. The genus *Aeromonas*: a general approach. *Microbial Pathogenesis* 130: 81–94. DOI: [10.1016/j.micpath.2019.02.036](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036)

Holmes D.E., Nevin K.P., Woodard T.L. et al. 2007. *Prolixibacter bellariivorans* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum Bacteroidetes, isolated from a marine-sediment fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 701-707. DOI: [10.1099/ijs.0.64296-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.64296-0)

Huang X.F., Liu Y.J., Dong J.D. et al. 2014. *Mangrovibacterium diazotrophicum* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove sediment, and proposal of *Prolixibacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 3: 875-881. DOI: [10.1099/ijs.0.052779-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052779-0)

- Kale V., Bjornsdottir S.H., Friethjonsson O.H. et al. 2013. *Litorilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., an aerobic member of the class *Caldilineae*, phylum *Chloroflexi*, isolated from an intertidal hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 1149-1154. DOI: [10.1099/ijs.0.044115-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.044115-0)
- Li G., Jiang H., Hou W. et al. 2012. Microbial diversity in two cold springs on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Geoscience Frontiers* 3: 317-325. DOI: [10.1016/j.gsf.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.gsf.2011.12.004)
- Marti E., Balcazar J.L. 2015. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. *Journal of Basic Microbiology* 55: 1435-1439. DOI: [10.1002/jobm.201500264](https://doi.org/10.1002/jobm.201500264)
- Matsumoto A., Kasai H., Matsuo Y. et al. 2009. *Ilumatobacter fluminis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 201-205. DOI: [10.2323/JGAM.55.201](https://doi.org/10.2323/JGAM.55.201)
- Matsumoto A., Kasai H., Matsuo Y. et al. 2013. *Ilumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Ilumatobacter coccineum* sp. nov., isolated from seashore sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 3404-3408. DOI: [10.1099/ijs.0.047316-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.047316-0)
- McMahon M.A.S., Wilson I.G. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70: 155-162. DOI: [10.1016/S0168-1605\(01\)00535-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00535-9)
- Mohan B., Sethuraman N., Verma R. et al. 2017. Speciation, clinical profile & antibiotic resistance in *Aeromonas* species isolated from cholera-like illnesses in a tertiary care hospital in North India. *Indian Journal of Medical Research* 146: 517-520. DOI: [10.4103/ijmr.IJMR](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR)
- Newton R., Jones S., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 14-49. DOI: [10.1128/MMBR.00028-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10)
- Pérez-García D., Larios-Serrato V., Rojas-Rios R. et al. 2021. Frequency and diversity of small plasmids in mesophilic *Aeromonas* isolates from fish, water and sediment. *Plasmid* 118: 1-10. DOI: [10.1016/j.plasmid.2021.102607](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2021.102607)
- Pessoa R.B.G., Oliveira W.F., Correia M.T.S. et al. 2022. *Aeromonas* and human health disorders: clinical approaches. *Frontiers in Microbiology* 13: 868890. DOI: [10.3389/fmicb.2022.868890](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.868890)
- Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Novikov A.A. et al. 2013. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 86-92. DOI: [10.1099/ijs.0.041012-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.041012-0)
- Sattley W.M., Jung D.O., Madigan M.T. 2008. *Psychrosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., a lactate-fermenting bacterium from near-freezing oxycline waters of a meromictic Antarctic lake. *FEMS Microbiology Letters* 287: 121-127. DOI: [10.1111/j.1574-6968.2008.01300.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01300.x)
- Spring S., Wagner M., Schumann P. et al. 2005. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 621-629. DOI: [10.1099/ijs.0.63356-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63356-0)
- Stieglmeier M., Klingl A., Alves R.J.E. et al. 2014. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2738-2752. DOI: [10.1099/ijs.0.063172-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.063172-0)
- Streit W.R., Schmitz R.A. 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* 7(5): 492-498. DOI: [10.1016/j.mib.2004.08.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002)
- Sun C., Zeng X., Lai Q. et al. 2020. *Mangrovibacterium lignilyticum* sp. nov., a facultatively anaerobic lignin-degrading bacterium isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 4502-4507. DOI: [10.1099/ijsem.0.004305](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004305)
- Tobler D.J., Benning L.G. 2011. Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects. *Extremophiles* 15: 473-485. DOI: [10.1007/s00792-011-0378-z](https://doi.org/10.1007/s00792-011-0378-z)
- Wang M., Zhang X., Shu Z. et al. 2022. Bacterial and archaeal communities within the alkaline soda Langaco Lake in the Qinghai-Tibet Plateau. *Annals of Microbiology* 72: 33. DOI: [10.1186/s13213-022-01691-7](https://doi.org/10.1186/s13213-022-01691-7)
- Wang Y., Sheng H.F., He Y. et al. 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags. *Applied and Environmental Microbiology* 78(23): 8264-8271. DOI: [10.1128/AEM.01821-12](https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12)
- Willems A., Goor M., Thielemans S. et al. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 107-119. DOI: [10.1099/00207713-42-1-107](https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-107)
- Wolterink A., Kim S., Muusse M. et al. 2005. *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2063-2068. DOI: [10.1099/ijs.0.63404-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63404-0)
- Wu W.J., Zhou Y.X., Liu Y. et al. 2015. *Mangrovibacterium marinum* sp. nov., isolated from a coastal sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107: 1583-1589. DOI: [10.1099/ijs.0.052779-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052779-0)
- Xu Q., Peng X., Wang Y. et al. 2019. *Acidovorax antarcticus* sp. nov., isolated from a soil sample of Collins Glacier front, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71: 3. DOI: [10.1099/ijsem.0.004744](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004744)
- Zinke L.A., Reese B.K., McManus J. et al. 2018. Sediment microbial communities influenced by cool hydrothermal fluid migration. *Frontiers in Microbiology* 9: DOI: [10.3389/fmicb.2018.01249](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01249)



# Dynamic changes in the microbiota of the middle Volga: a three-year study

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Khusnutdinova D.R.\*, Senina A.M., Aetdinova S.E., Markelova M.I., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Khaliullina L.J., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V.

Kazan Federal University, Kremlevskaya Str., 18, Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** The Volga River is one of the largest rivers in Russia, which plays an important role in the life of many plants, animals and humans. Annual research of the river microbiota is an integral part of the work to preserve the river ecosystem and ensure its sustainable development. The work analysed the composition of the microbiota using high-throughput sequencing methods, as well as physicochemical indicators over a three-year period from 2017 to 2019. A stable microbiota community and changes in chemical oxygen consumption and microbial diversity of the Volga River community were revealed.

**Keywords:** microbiota, river, Volga, high-throughput sequencing of 16S rRNA genes

**For citation:** Khusnutdinova D.R., Senina A.M., Aetdinova S.E., Markelova M.I., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Khaliullina L.J., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V. Dynamic changes in the microbiota of the middle Volga: a three-year study // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 949-954. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-949

## 1. Introduction

The Volga River is one of the largest rivers in Russia. The discharge of waste and chemical compounds into the river is one of the largest sources of environmental pollution due to inadequate treatment of domestic and industrial wastewater (Kora et al., 2017). River pollution can affect various economic sectors such as agriculture, livestock, industrial production and recreational activities (Paul, 2017). The microbial community of aquatic ecosystems is extremely important for the maintenance and sustainability of these environments. The microbiota of the Volga River is a unique ecosystem where microorganisms perform a number of important functions. They are involved in the processes of decomposition of organic matter, water purification and providing optimal living conditions for fish, plants and other organisms. In addition, the composition of the microbiota can be an indicator of the quality of the aquatic environment and the level of pollution of the river with various substances. Aim of the study: to characterise changes in the microbial community of the Volga River during the three-year period from 2017 to 2019.

## 2. Materials and methods

For three years, water samples were taken in the area of the Kuibyshev reservoir from the mouth of the

Volga River, water samples were taken from the surface into sterile test tubes (Table). 50 ml of water samples were centrifuged at 8000 rpm for 15 min to obtain a cell pellet. DNA was then isolated from the resulting sediment using the DNA-Express kit (NPF Lytech, Russia) according to the manufacturer's recommendations. Amplicon libraries were prepared using the "Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System" protocol. Amplification of the V3-V4 region of 16S rRNA was carried out using prokaryotic primers: forward-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGG-CWGCAG; reverse-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGG-GTATCTAATCC, followed by amplicon indexing. Sequencing of 16S rRNA amplicons was carried out on the MiSeq platform (Illumina, USA). Bioinformatic data processing was performed using the Qiime 1.9 program.

**Table.** Sample collection dates

2017	2018	2019
B-15 - 4 september	B-11 - 3 september	B-11 - 2 september
B-16 - 11 september	B-12 - 10 september	B-12 - 9 september
B-17 - 18 september	B-13 - 17 september	B-13 - 16 september
B-18 - 25 september	B-14 - 24 september	B-14 - 22 september

\*Corresponding author.

E-mail address: [dilyahusn@gmail.com](mailto:dilyahusn@gmail.com) (D.R. Khusnutdinova)

**Received:** June 01, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



### 3. Results and discussion

Temperature changes are known to be a prerequisite for influencing the composition of microbial communities (Glasl et al., 2018). According to the analysis of physicochemical parameters of the Volga River, the highest average water temperature was recorded in 2018 ( $18,2 \pm 0,8^\circ\text{C}$ ). In 2017 and 2019, the water temperature was  $2^\circ\text{C}$  lower ( $16,6 \pm 1,1^\circ\text{C}$  и  $16,2 \pm 0,7^\circ\text{C}$ , respectively). In addition to environmental factors, the composition of the microbiota is influenced by anthropogenic factors. One of the parameters used to assess the anthropogenic load and the level of river pollution is the level of chemical oxygen demand (COD) (Cai et al., 2022). COD is an indicator of the organic matter content of water. In 2017 and 2018, COD levels were above the maximum allowable concentration ( $30 \text{ mgO/dm}^3$ ) in all selected water samples. The highest COD levels of the Volga River were recorded in 2017 ( $47,7 \pm 1,6 \text{ mgO/dm}^3$ ), which is more than double the figure for 2019 ( $20,2 \pm 2,2 \text{ mgO/dm}^3$ ).

Metagenomic sequencing identified between 657 and 1081 operational taxonomic units (OTU). The highest number of OTU was found in water samples from 2018 ( $1001 \pm 40$ ,  $p=0,02$ ), compared to 2017 ( $782 \pm 58$ ) and 2018 ( $809 \pm 67$ ) (Fig.1). The most diverse microbial community was in 2018 - Shannon index  $7,14 (\pm 0,05)$ ; least diverse in 2017 -  $6,82 (\pm 0,35)$ ; in 2019 -  $6,88 (\pm 0,14)$ .

Volga River water samples were clustered according to the year of sampling (Fig. 2). The stable microbial community of the river for all three years included 46 OTUs, representing between 59,4% and 86,6% of the total community share at different times.

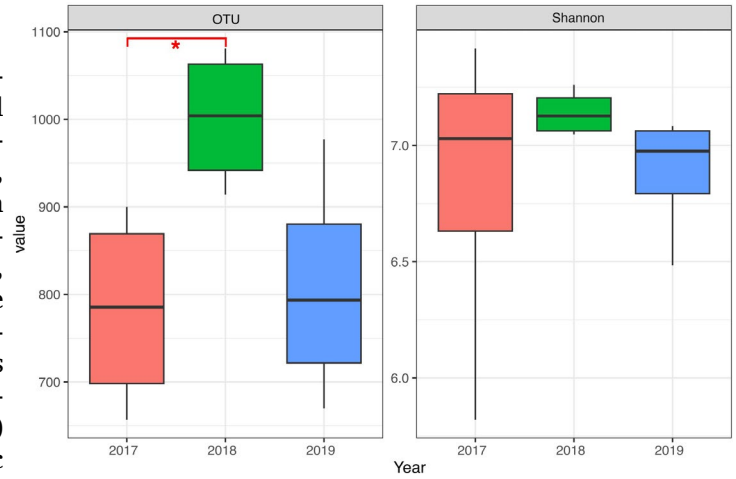


Fig.1. Diversity of the microbial community of the Volga River in 2017-2019 (\*- $p < 0,05$ ).

### 4. Conclusions

Between 2017 and 2019, there was a decrease in organic pollution in the Volga River, but this was not associated with an increase in the microbial diversity of the community. Thus, the diversity of the microbiota of the Volga River is more influenced by temperature and, probably, by other types of pollutants.

### Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan Federal University (PRIORITY-2030).

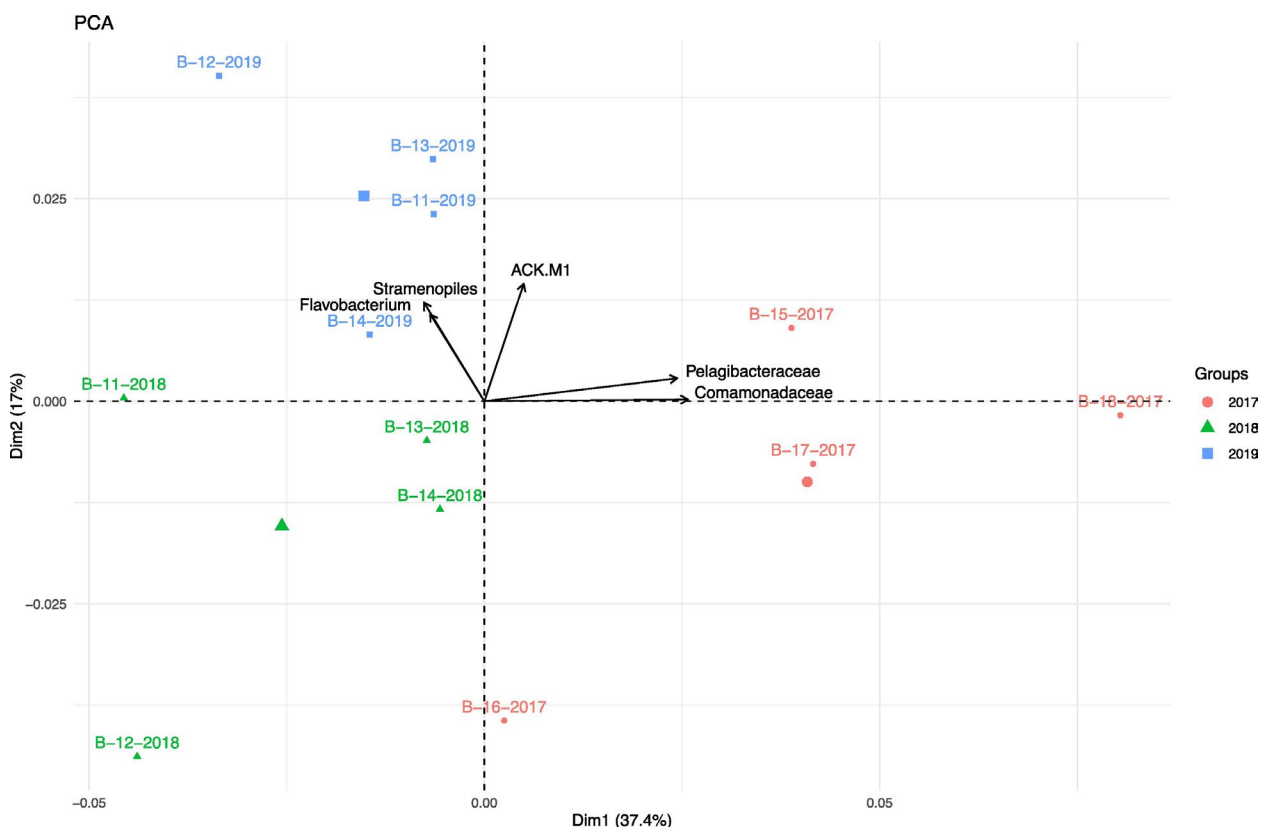


Fig.2. Clustering of samples using principal component analysis.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **References**

Cai J., Meng L., Liu H. et al. 2022. Estimating chemical oxygen demand in estuarine urban rivers using unmanned aerial vehicle hyperspectral images. *Ecological Indicators* 139: 108936. DOI: [10.1016/j.ecolind.2022.108936](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108936)

Glasl B., Smith C.E., Bourne D.G. et al. 2018. Exploring the diversity-stability paradigm using sponge microbial communities. *Scientific Reports* 8(1): 8425–8429. DOI: [10.1038/s41598-018-26641-9](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26641-9)

Kora A., Rastogi L., Kumar S. et al. 2017. Physico-chemical and bacteriological screening of Hussain Sagar lake: An urban wetland. *Water Science* 31: 24–33. DOI: [10.1016/j.wsj.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.wsj.2017.03.003)

Paul D. 2017. Research on heavy metal pollution of river Ganga: A review. *Annals of Agrarian Science* 15: 278–286. DOI: [10.1016/j.aasci.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.001)

# Динамические изменения микробиоты средней Волги: трехлетнее исследование

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Хуснутдинова Д.Р.\*, Сенина А.М., Аетдинова С.Э., Маркелова М.Н.,  
Синягина М.Н., Булыгина Е.А., Халиуллина Л.Ю.,  
Халиуллин И.И., Григорьева Т.В.

Казанский федеральный университет, ул. Кремлёвская, 18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Река Волга одна из крупнейших рек в России, которая играет важную роль в жизни многих растений, животных и человека. Ежегодное исследование микробиоты реки является неотъемлемой частью работы по сохранению экосистемы реки и обеспечению ее устойчивого развития. В работе проанализирован состав микробиоты с использованием методов высокопроизводительного секвенирования, а также физико-химические показатели за трёхлетний период с 2017 по 2019 год. Выявлено стабильное сообщество микробиоты и изменения в показателях химического потребления кислорода и микробном разнообразии сообщества реки Волга.

**Ключевые слова:** микробиота, река Волга, высокопроизводительное секвенирование генов 16S рНК

Для цитирования: Хуснутдинова Д.Р., Сенина А.М., Аетдинова С.Э., Маркелова М.Н., Синягина М.Н., Булыгина Е.А., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В. Динамические изменения микробиоты средней Волги: трехлетнее исследование // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 949-954. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-949

## 1. Введение

Река Волга является одной из крупнейших рек в России. Сброс отходов и химических соединений в реки является одним из основных источников загрязнения окружающей среды, из-за ненадлежащей очистки бытовых и промышленных сточных вод (Koga et al., 2017). Загрязнение рек способно затронуть различные экономические секторы, такие как сельское хозяйство, животноводство, промышленное производство и рекреационная деятельность (Paul, 2017). Микробное сообщество водных экосистем чрезвычайно важно для поддержания и устойчивости этих сред. Микробиота реки Волга представляет собой уникальную экосистему, где микроорганизмы выполняют ряд важных функций. Они участвуют в процессах декомпозиции органических веществ, очистки воды, обеспечивая оптимальные условия обитания для рыб, растений и других организмов. Кроме того, состав микробиоты может быть индикатором качества водной среды и уровня загрязнения реки различными веществами. Цель работы: охарактеризовать изменения микробного сообщества реки Волга в трехлетний период с 2017 по 2019 года.

## 2. Материалы и методы

Отбор проб воды проводился в течение трёх лет на территории Куйбышевского водохранилища из устья р. Волги с поверхности воды в стерильные пробирки (Таблица). Образцы воды объемом 50 мл центрифугировали 15 минут при 8000 об/мин для получения клеточного осадка. Затем из полученного осадка проводили выделение ДНК с использованием набора «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия), согласно рекомендациям производителя. Подготовку метагеномных библиотек осуществляли согласно протоколу «Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System».

Таблица. Даты отбора образцов

2017	2018	2019
В-15 - 4 сентября	В-11 - 3 сентября	В-11 - 2 сентября
В-16 - 11 сентября	В-12 - 10 сентября	В-12 - 9 сентября
В-17 - 18 сентября	В-13 - 17 сентября	В-13 - 16 сентября
В-18 - 25 сентября	В-14 - 24 сентября	В-14 - 22 сентября

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [dilyahusn@gmail.com](mailto:dilyahusn@gmail.com) (D.R. Khusnutdinova)

Поступила: 01 июня 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





Аmplификацию V3-V4 региона 16S рРНК проводили с использованием прокариотических праймеров: прямой –TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG-ACAGCCTACGGGNGGCWGCAG; обратный – GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC, с последующей индексацией ампликонов. Секвенирование ампликонов 16S рРНК проводили на платформе MiSeq (Illumina, США). Биоинформатическую обработку данных осуществляли с помощью программы Qiime 1.9.

### 3. Результаты и обсуждение

Известно, что изменение температуры является важным фактором влияющим на состав микробных сообществ (Glasl et al., 2018). Согласно анализу физико-химических показателей р.Волга наиболее высокая средняя температуры воды была зафиксирована в 2018 году ( $18,2 \pm 0,8^\circ\text{C}$ ). В 2017 и 2019 году температура воды была на 2 градуса ниже ( $16,6 \pm 1,1^\circ\text{C}$  и  $16,2 \pm 0,7^\circ\text{C}$ , соответственно). Помимо экологических факторов, на состав микробиоты оказывают влияние антропогенные факторы. Одним из параметров оценки антропогенной нагрузки и степени загрязнения рек является уровень химического потребления кислорода (ХПК) (Cai et al., 2022). ХПК - показатель содержания органических веществ в воде. В 2017 и 2018 году во всех отобранных пробах воды показатели ХПК были выше уровня предельно-допустимой концентрации –  $30 \text{ мгО/дм}^3$ . Самые высокие значения ХПК р.Волга были зафиксированы в 2017 году ( $47,7 \pm 1,6 \text{ мгО/}$

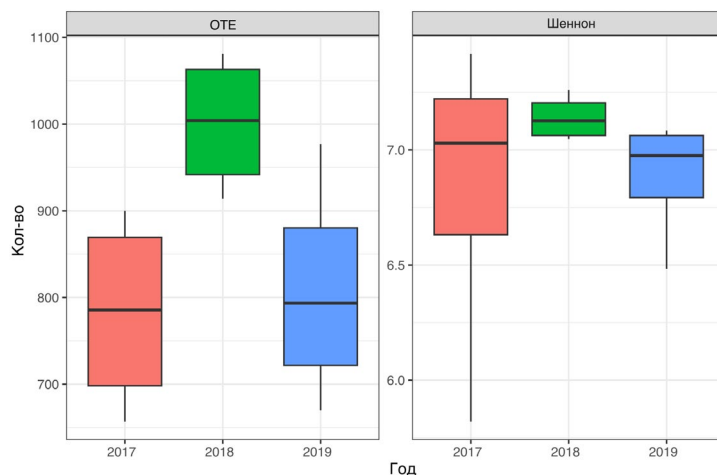


Рис.1. Разнообразие микробного сообщества р. Волга с 2017-2019 гг (\*- $p < 0,05$ ).

$\text{дм}^3$ ), что более чем в два раза выше по сравнению показателями за 2019 год ( $20,2 \pm 2,2 \text{ мгО/дм}^3$ ).

В результате метагеномного секвенирования было идентифицировано от 657 до 1081 операционных таксономических единиц (ОТЕ) (Рис. 1). В образцах воды за 2018 год было обнаружено наибольшее количество ОТЕ ( $1001 \pm 40$ ,  $p = 0,02$ ), по сравнению с 2017 ( $782 \pm 58$ ) и 2018 ( $809 \pm 67$ ) годом. Наиболее разнообразное микробное сообщество было в 2018 году - индекс Шеннона  $7,14 (\pm 0,05)$ ; наименее разнообразное в 2017 году -  $6,82 (\pm 0,35)$ ; в 2019 году -  $6,88 (\pm 0,14)$ .

Образцы воды р.Волга кластеризовались в соответствии с годом отбора проб (Рис. 2).

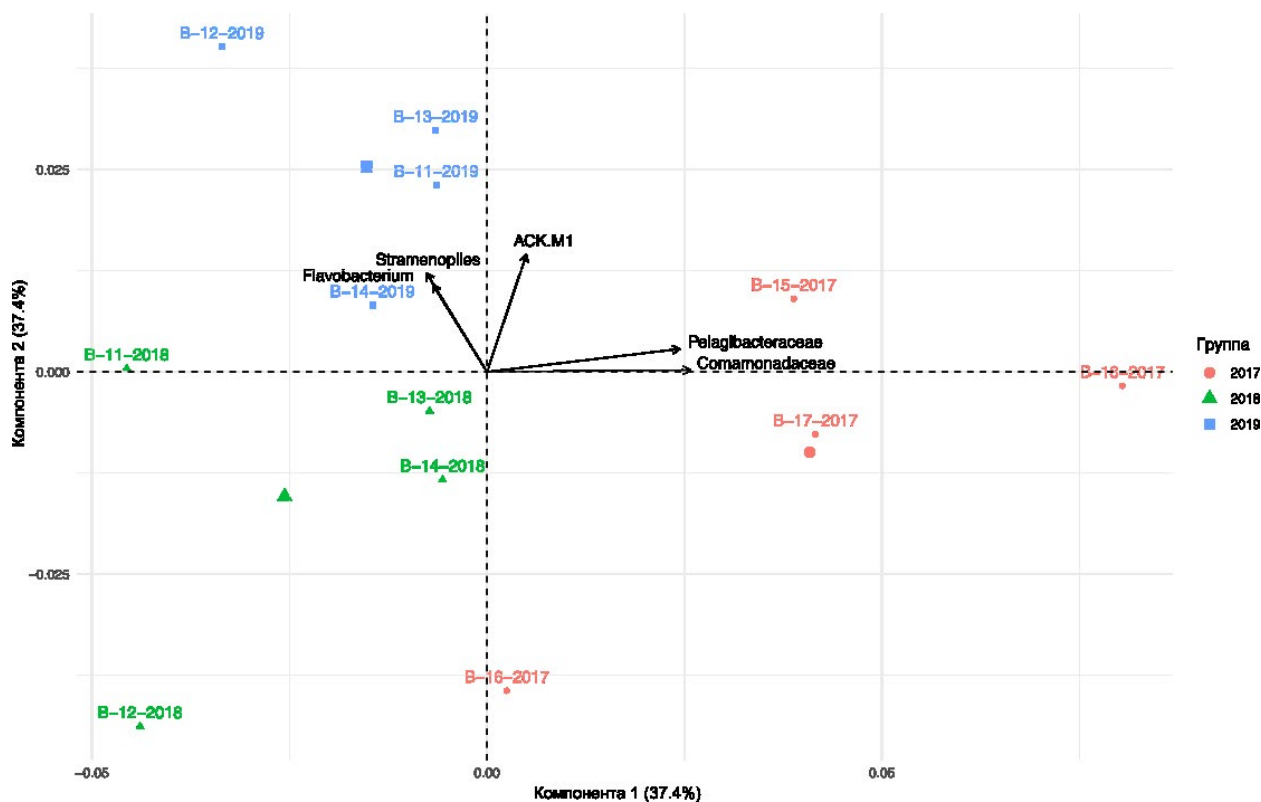


Рис.2. Кластеризация образцов с использованием метода главных компонент.

Стабильное микробное сообщество реки за все три года включало 46 ОТЕ, которые занимали от 59,4% до 86,6% от всего сообщества в разный момент времени.

#### 4. Выводы

За период с 2017 по 2019 год происходило снижение органических загрязнений в реке Волга, однако связи с увеличением микробного разнообразия сообщества не выявлено. Таким образом, на разнообразие микробиоты реки Волга большее влияние оказывает температуры и, вероятно, другие типы загрязняющих веществ.

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

Cai J., Meng L., Liu H. et al. 2022. Estimating chemical oxygen demand in estuarine urban rivers using unmanned aerial vehicle hyperspectral images. *Ecological Indicators* 139: 108936. DOI: [10.1016/j.ecolind.2022.108936](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108936)

Glasl B., Smith C.E., Bourne D.G. et al. 2018. Exploring the diversity-stability paradigm using sponge microbial communities. *Scientific Reports* 8(1): 8425–8429. DOI: [10.1038/s41598-018-26641-9](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26641-9)

Kora A., Rastogi L., Kumar S. et al. 2017. Physico-chemical and bacteriological screening of Hussain Sagar lake: An urban wetland. *Water Science* 31: 24–33. DOI: [10.1016/j.wsj.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.wsj.2017.03.003)

Paul D. 2017. Research on heavy metal pollution of river Ganga: A review. *Annals of Agrarian Science* 15: 278–286. DOI: [10.1016/j.aasci.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.001)

# Responses of microbial complexes to freezing/thawing in the surface and groundwater interaction zone

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Kondratyeva L.M.\*, Andreeva D.V.

Institute of Water and Ecology Problems, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Khabarovsk Federal Research Center, 56, Dikopolceva Str., Khabarovsk, 680000, Russia

**ABSTRACT.** This paper presents the research results of the activity of microbial communities (MCs) in relation to humic substances after cyclic freeze-thaw. Groundwater from different aquifer depths from wells at different distances from the riverbank filtration (RBF) zone and river water were used as inoculum. Cyclic freeze-thaw (CFT) was carried out in two stages: the first freezing lasted 30 days at  $-18^{\circ}\text{C}$ ; then 5 cycles of freezing and thawing were carried out alternately after 7 days. Two types of thawing conditions were created: slow thawing from  $-18^{\circ}\text{C}$  to  $+4^{\circ}\text{C}$  and fast thawing from  $-18^{\circ}\text{C}$  to  $+23^{\circ}\text{C}$ . Growth activity on peptone, an easily available substrate, confirmed the survival of the MCs from groundwater and river water after CFT. The maximum activity after CFT with sodium humate (HNa) at a thawing temperature of  $4^{\circ}\text{C}$  was shown by MCs from a depth of 41 m from wells 1,500 m off the bank. It was comparable to the MC activity in river water during the observation period. At a thawing temperature of  $23^{\circ}\text{C}$ , microorganisms in river and groundwater from wells close to the bank were highly active, regardless of the carbon source composition during the CFT period. The growth activity of MCs was affected by the thawing temperature of  $23^{\circ}\text{C}$  in distant wells following CFT, depending on the water sampling depth. Thus, in MCs from depths of 21 m and 41 m, the activity increased with the distribution of easy-to-access co-substrate. The thawing temperature had an impact on the change in the spectral characteristics of HNa after CFT. The distance of the wells from the bank affected the aromatic compound contribution to the composition of the HNa transformation products ( $\lambda = 275 \text{ nm}$ ). At a temperature of  $23^{\circ}\text{C}$ , the aromatic compound values were higher in the MCs of river water and wells located in the RBF zone compared to those at  $4^{\circ}\text{C}$ . Slow thawing at  $4^{\circ}\text{C}$  had a positive effect on the transformation of humic substances by microorganisms from distant wells due to their natural adaptation potential.

**Keywords:** microbial communities, freezing/thawing, riverbank filtration, humic substances

**For citation:** Kondratyeva L.M., Andreeva D.V. Responses of microbial complexes to freezing/thawing in the surface and groundwater interaction zone // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 955-970. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-955](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-955)

## 1. Introduction

Large-scale changes in the biosphere and cryosphere are predicted in the coming years due to global warming (Margesin and Collins, 2019). The consequences of permafrost thawing are associated with changes in the composition of surface and ground waters. Multiple studies in regions with thawing permafrost have shown that large-scale effects on terrestrial and aquatic ecosystems can be related to biogeochemical activity at the microscopic level (Zona, 2016).

Psychrophilic microorganisms are thought to be the most abundant organisms in terms of biomass and diversity: their adaptation to cold is the result of evolutionary selection and is genetically encoded in protein sequences (Struvay and Feller, 2012). The ability of microorganisms to survive at low temperatures is related to the production of cold-active enzymes that break down various organic substrates, including lactose, cellulose, lignin, starch, and lipids (Hou et al., 2017; Manyapu et al., 2022). Psychrophilic microorganisms are capable of transforming persistent organic matter (OM) in conditions of seasonal freezing and thawing in the aquatic environment. Experimental studies simulating permafrost thawing found that microbiome responses depended more on thawing temperature than on sampling and filtration location (Messan et al., 2020).

\*Corresponding author.

E-mail address: [kondratevalm@gmail.com](mailto:kondratevalm@gmail.com) (L.M. Kondratyeva)

Received: May 06, 2024; Accepted: May 27, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Humic substances (HS), which participate in complex biogeochemical processes, play an important role in the research of the OM transformation dynamics in seasonal freeze/thaw conditions. Microorganisms use HS to stimulate biodegradation processes and/or reduce the bioavailability of certain metals. HS, in turn, by controlling environmental conditions, change the structure of microbial communities (MCs) and their activity (Kulikova and Perminova, 2021). The biodegradation of HS affects the general condition and functioning of the hydrosphere by determining the chemical composition of water (Young et al., 2004).

The HS composition depends on the nature of the interaction of surface and ground waters with soils, rocks, and, to a large extent, climate change (Lipczynska-Kochany, 2018). The HS reactivity in the environment is thought to depend on the set of functional groups in the structure of the macromolecules (Lee et al., 2015). A change in the ratio of ketone and auxochrome groups in the aromatic rings affects the intensity of the coloration of the aquatic solution, and the color of a solution of HS is determined by the presence of chromophore functional groups: nitrogen-containing ( $-N=N-$ ), azomethine ( $>C=N-$ ), carboimine ( $>C=NH$ ), nitro- ( $-NO_2$ ), and nitroso groups ( $-NO$ ) (Chen et al., 2002).

Previously, on the basis of experimental studies, it was hypothesized that a significant part of HS fractions represents a dynamic system of macroaggregates differing in composition and character of subunit interactions. Macroaggregates are formed by means of hydrophobic, hydrogen, ester bonds, etc. The optical characteristics of the included HS and the reactivity of macromolecules are changed during freezing and thawing of various soils and stones (Shirshova et al., 2009). Some authors (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003) explain such processes by hydrophobic interaction between humic substances and extracellular polymers of bacterial cells.

The interaction of microorganisms with the HS macromolecules (biosorption) is the first step preceding their fermentative digestion, hydrolysis and microbiological consumption. The ability of microorganisms to produce extracellular polymers and the presence of divalent cations such as calcium and magnesium are key factors (Goode and Allen, 2011). The further evolution of HS depends on the presence of low-molecular-weight organic acids, the hydrophobicity of biopolymers, and various elements that form with them mobile chelate complexes (Huber et al., 2011).

It is established that resistance to stress factors and adaptation potential are increased under groundwater aeration. The microbial complexes of underground hydrosphere exist in the form of complex-structured consortia (Flemming and Wuertz, 2019). The adaptive potential of microorganisms to stress factors changes when groundwater is aerated by the inflow of surface and river waters.

Hypothetically, at the biogeochemical barrier in the riverbank filtration zone of river water into the aquifer (AF), iron may act as a regulator of organic matter behavior of different genesis. In this case, the

dominant process is the reaction of dissolved iron with humic substances (Krupińska, 2017). It has been demonstrated that approximately 90% of dissolved iron is combined with HS during extreme floods in the Amur River (Yan and Guan, 2014).

Pumped water from wells located in the riverbank filtration zone (RBF) contained three groups of microorganisms: autochthonous bacteria from the aquifer and pore space, allochthonous soil microorganisms entering with surface infiltration, and microorganisms entering the edge waters with river filtrate. Braun et al. (2016) previously found that the microbial community in unexploited wells was mainly dominated by the phylum *Proteobacteria* (95%), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (~5%). After saturation of AF with aerated water, there was a significant reorganisation of the community structure and an increase in microbial species diversity: *Actinobacteria* (~20-50%); *Proteobacteria* ~ 30-50%; *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* et al. (~20-50%).

In our opinion, the dominance of certain microorganisms depends not only on the depth of pumped water, but also on the organic matter (OM) that comes with surface water. The composition and availability of organic matter influences the activity, behavior and succession dynamics of dominant microbial groups. For example, more than 300 different organic compounds were detected in the thawing of Greenland frozen soils using mass spectrometry method (Kramshøj et al., 2018), and these compounds could include products of microbiological transformation of OM of different genesis.

Our research aimed to determine the activity of microbial communities under cyclic freeze/thaw conditions in relation to the low-molecular-weight peptides (peptone) and humic substances (sodium humate), as well as during the interaction of ground and surface waters in the riverbank filtration zone.

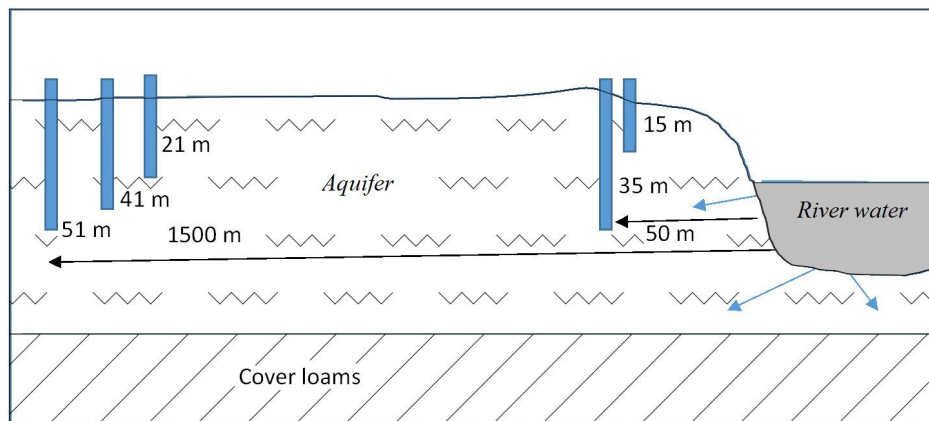
## 2. Materials and methods

The study area is located in the central part of the Middle Amur Lowland. Its relief is quite varied, with a slight slope in the northeast direction. The Amur River channel and floodplain form an extensive and complex floodplain-channel system. The floodplain is rather heavily watered, and during floods, a significant part of it is flooded. The morphology of the river channel in this zone is characterized by intensive bank erosion. In winter, up to 60% of the total Amur River flow passes along the left bank, and in summer, when levels rise by 4-5 m, the share of flow decreases to 45%.

The Tunguska groundwater deposit (GW) is located in the interstream of the Amur and Tunguska rivers in the aquifer of Pliocene-Quaternary alluvial deposits (sands, gravels). The observation wells are located at different distances from the Amur River channel (Fig.1). A biogeochemical barrier is formed at the site where the GW interacts with river water.

The contribution of each component depends on the hydrological regime and season. During low water periods, the interaction of surface and ground waters is





**Fig.1.** Location of observation wells for groundwater sampling from different depths of the aquifer and at different distances from the riverbank

multidirectional, resulting in the unloading of groundwater into the river channel. Conversely, during flood periods and catastrophic floods, there is a reverse infiltration of river water into the AF (Kulakov, 2024). The biogeochemical barrier, which is subject to seasonal freezing and thawing, is the site of a number of microbiological processes that have not been extensively studied. These processes contribute significantly to the formation of natural water quality.

The GW samples of the Tunguskoye deposit were collected in November 2023 from five wells at varying depths and distances from the left bank of the Pemzenskaya channel (Amur River). River water was sampled from a depth of 0.5 m from the surface and 50 m from the bank (Table 1).

The following carbon sources were used in the experiments: a preparation of humic substances (humic acid sodium salt, H16752, Germany), as an analogue of difficult-to-mineralize OMs; peptone (GOST 13805-76, Obolensk, series 299), which is a mixture of polypeptides, free amino acids, enzymes, and nucleic acids.

Cyclic freeze/thaw (CFT) was performed in sterile disposable 50-mL medical polymer containers with a lid (Berimed, EVROKEP LLC, Russian Federation). The containers were filled with two variants of sterile

medium (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1.33;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 2.67;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — 2;  $\text{KNO}_3$  — 2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.001;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.1. The first variant contained 0.2 g/L sodium humate (HNa), while the second one was supplemented with an additional co-substrate of 0.2% low-molecular-weight peptides (peptone). Each sample was inoculated with 5 ml of natural water.

The first freeze lasted 30 days in a freezer at  $-18^\circ\text{C}$ . Two groups of samples were then formed, differing in their thawing conditions. The first group underwent a slow thawing process at a temperature of  $-18^\circ\text{C}$  to  $+4^\circ\text{C}$ , while the second one underwent a rapid thawing process at a temperature of  $-18^\circ\text{C}$  to  $+23^\circ\text{C}$ . All samples were subjected to five cycles of alternating CFT after seven days. Control samples without inoculum were subjected to all stages of CFT.

The total number of culturable heterotrophic bacteria (CHB) was determined by the limiting dilution method on fish peptone agar diluted 10 times (FPA:10). Ammonifying bacteria (AFB), involved in the process of ammonification of OM, were grown on FPA (Namsaraev et al., 2006). The number of microorganisms was expressed in colony-forming units (CFU/ml).

A fluid nutrient medium on readily available carbon source (0.2% peptone) was used to assess the

**Table 1.** General characterization of groundwater from the monitoring wells in the riverbank filtration zone in November 2023

Water samples	Indicators								
	Distance from river bank, m	Depth, m	pH	Fe, mg/l	Mn, mg/l	$\text{NH}_4$ , mg/l	$\text{SAC}_{254}$ , $\text{m}^{-1}$	CHB, CFU/ml	AFB, CFU/ml
GW 1-15	50	15	6.57	18.0	1.40	0.274	20.5	185.3	126.3
GW 1-35		35	6.43	23.9	1.12	0.075	12.8	135.2	97.3
GW 51-21	1500	21	6.48	26.0	6.50	0.350	7.6	52.2	45.2
GW 51-41		41	6.46	24.7	1.15	0.404	8.2	79.3	63.4
GW 51-51		51	6.43	17.3	0.59	0.412	9.7	119.6	95.2
River water	50 m from the left bank	0.5	7.34	0.70	0.073	0.168	20.8	179.0	137.8

Note: CHB - cultivable heterotrophic bacteria; AFB - ammonifying bacteria; SAC – spectral absorption coefficient organic content; CFU - colony forming units

viability and growth activity of microbial communities (MCs) in natural waters after CFT. The nature of growth on peptone at 23°C was determined using photometric method by the change in the optical density (OD) of the culture fluid using KFK-3-01 spectrophotometer at a wavelength of 600 nm. The impact of varying thawing temperatures on the characteristics of microbiological transformation of HS was assessed by examining the absorbance values at different wavelengths: change in the total OM content at  $\lambda = 254$  nm; transformation of the aromatic compound of HS at  $\lambda = 275$  nm (Kumar, 2006); content of the chromophoric groups at  $\lambda = 465$  nm (Shirshova et al., 2015) using a SHIMADZU UV-3600 spectrophotometer.

### 3. Results and discussion

When analyzing the seasonal dynamics of the number of culturable heterotrophic bacteria (CHB) and ammonifying bacteria (AFB) in the river and ground waters sampled from wells located in the riverbank filtration zone (RBF), there was a general trend of increase in the number of microbial communities in the late autumn period (Table 2). The maximum CHB abundance in the AF during the observation period was recorded in November at a depth of 15.7 m and was comparable to the CHB abundance in river waters. More significant differences in CHB abundance between river and groundwater are recorded at 35.7 m depth during spring and autumn. The AFB abundance rates in ground waters were significantly lower than in river water, especially in the deeper AF layers where less OM was supplied as a result of vertical and horizontal filtration.

The total number of microorganisms in the lower AF layers can be supported by autochthonous OMs, which are formed as a result of microbiological processes during the interaction of water with rock formations. These may include microbial metabolites, including extracellular biopolymers and lysis products of bacterial biofilms.

#### 3.1. MC growth activity from river and groundwaters on peptone after CFT

At the end of the experiment, culture fluid samples after CFT were used as inoculum to evaluate the survival and growth activity of microbial communities (MCs) on nutrient medium with peptone (Table 3). The growth activity depended not only on the survival after

30 days of freezing at -18°C but also on the thawing temperature. The used carbon and nitrogen sources played an important role: variants with HNa alone and in combination with a co-substrate in the form of peptone (P).

When thawed at 4°C, the MCs from a depth of 41 m of the wells located 1,500 m from the bank showed the maximum activity after CFT with HNa. The differences in the activity of the MCs from the other depths were minimal. At this thawing temperature, their growth activity on peptone after CFT was high regardless of the presence of HS alone as a carbon source or with the supplemental addition of a low-molecular-weight co-substrate. Microbial communities of river water showed high activity with HNa after thawing at 4°C, even without co-substrate application. The MCs from groundwater sampled from a well as close to bank as possible at a depth of 15 m were less active, regardless of the composition of the OMs used.

When thawed at 23°C, the other patterns in MC responses were observed. Microorganisms of river and groundwater from wells close to the bank showed high protease activity independently of the composition of carbon sources during the CFT period. In wells far from the bank, the thawing at 23°C had an effect on the growth activity after CFT, depending on the depth of water sampling. For example, the activity in MCs from depths of 21 m and 41 m increased with the addition of co-substrate. The MC activity from a distant well at 51 m depth during thawing at 23°C remained high despite the combination of organic substrates. It should be noted that in the presence of HS alone as a carbon source, the thawing temperature did not significantly affect the protease activity of MCs from the RBF zone at 35 m depth and river water. This may explain the close relationship between surface water and groundwater in the bank zone, which is reflected in the similar responses of microbial communities to different thawing temperatures.

#### 3.2. Influence of microbial communities and thawing temperature on the spectral characteristics of HS after CFT

The ability of the vast majority of OMs of different classes to absorb light in the UV band at wavelengths of 250-280 nm is well known. Unsaturated and aromatic compounds with various atom groupings, including proteins, phenols, humic substances, lignin-sulfonic

**Table 2.** Seasonal dynamics of the abundance of culturable microbial communities of ground and surface waters in the riverbank filtration zone (CFU/ ml)

Sampling date	River water		GW from different depths			
	CHB	AFB	CHB		AFB	
			15.7 m	35.7 m	15.7 m	35.7 m
27.03.2023	56 ± 4	60 ± 2	62 ± 10	83 ± 6	15 ± 2	10 ± 2
1.06. 2023	69 ± 2	54 ± 2	58 ± 3	65 ± 2	22 ± 1	19 ± 2
1.08.2023	127 ± 8	93 ± 6	112 ± 7	100 ± 6	84 ± 5	53 ± 3
13.11.2023	179 ± 5	138 ± 6	185 ± 3	135 ± 3	126 ± 4	97 ± 3

**Note:** CHB – culturable heterotrophic bacteria, AFB- ammonifying bacteria

**Table 3.** Impact of the co-substrate and thawing temperature on the growth activity of microbial community after CFT

Microbial communities	OD, 600 nm			
	HS 4 °C	HS + P 4 °C	HS 23 °C	HS + P 23 °C
GW 1-15	0.100 ± 0.003	0.098 ± 0.003	0.133 ± 0.006	0.144 ± 0.009
GW 1-35	0.154 ± 0.010	0.108 ± 0.004	0.157 ± 0.010	0.150 ± 0.010
GW 51-21	0.115 ± 0.005	0.139 ± 0.008	0.095 ± 0.003	0.168 ± 0.012
GW 51-41	0.167 ± 0.012	0.169 ± 0.012	0.108 ± 0.004	0.141 ± 0.008
GW 51-51	0.115 ± 0.005	0.135 ± 0.007	0.136 ± 0.007	0.132 ± 0.007
River water	0.170 ± 0.012	0.131 ± 0.006	0.159 ± 0.010	0.160 ± 0.010

acids, and other complex compounds, are intensively absorbed in this UV band. Inorganic ions, with few exceptions, do not absorb in this band. There was a direct correlation between the UV-indicator values at  $\lambda = 254$  nm and the  $C_{org}$ , COD, and  $BOD_5$  indicators.

For the determination of fluorophores (chromophoric groups) formed during the microbiological transformation of terrigenous material and humic substances, the 450-500 nm wavelength range is often used (Birdwell and Engel, 2010). Natural and anthropogenic factors are thought to influence the relationship between absorption spectra and the molecular structure of HS (Shirshova et al., 2015). The choice of specific wavelengths for assessing changes in the molecular structure of HS is still a subject of debate.

After CFT during thawing at 4°C, the microbial communities from groundwater were actively involved in the transformation of sodium humate compared to microorganisms from river water (Table 4). Based on the spectral characteristics of the nutrient solution with sodium humate, changes in the aliphatic ( $\lambda = 254$  nm) and aromatic compounds of the molecule occurred with the participation of MCs ( $\lambda = 275$  nm). MCs from groundwater in the RBF zone increased their activity with depth. In groundwater sampled from distant wells, the MC responses differed by the AF layers. An active change in the aromatic compounds was observed in MCs present at 21 m and 51 m depths. Minimal changes in spectral characteristics at three wavelengths at this thawing temperature were observed in MCs from a depth of 41 m. Changes in the composition of chromophoric groups ( $\lambda = 465$  nm) coincided with the activity of MCs in relation to the aromatic compound of HNa.

During thawing at 23°C, the microbiological transformation of sodium humate also depended on the water of the sampling points and the corresponding MC activity in relation to different compounds of a humic substance molecule. MCs from river and ground waters sampled from a depth of 15 m in the RBF zone were characterized by minimal activity. The spectral characteristics of sodium humate after CFT at a thawing temperature of 23°C were comparable when MCs from wells at different distances from the bank and at different depths were used (GW 1-35 and GW 51-21). This may be related to the survival during rapid thawing of the same microbial species present in the general groundwater pool and capable of degrading hard-to-reach organic matter.

Changes in the spectral characteristics of HNa as a result of microbiological transformation are most commonly associated with changes in the condensed aromatic nucleus (aromatic compound at  $\lambda = 275$ ). Taking into account that aliphatic side chains without double bonds (polysaccharides, polypeptides, and saturated hydrocarbons) are not responsible for HS coloration, it can be assumed that the process of their utilization is related to the change in the absorbance value at  $\lambda = 254$  nm.

According to the conducted studies, MCs of groundwater after CFT, independent of the place of their localisation *in situ*, participated in the transformation of aliphatic and aromatic compounds of humic compounds at different thawing temperatures. In contrast, MCs in river water were less active in relation to sodium humate.

**Table 4.** Influence of microbial communities on changes in the spectral characteristics of HNa at different thawing temperatures

Microbial communities	Thawing temperature					
	4 °C			23 °C		
	254 nm	275 nm	465 nm	254 nm	275 nm	465 nm
Control of HNa	2.502	2.227	0.392	2.636	2.361	0.400
GW 1-15	1.952	1.698	0.256	2.150	1.894	0.309
GW 1-35	1.682	1.470	0.216	1.769	1.553	0.245
GW 51-21	1.649	1.430	0.217	1.772	1.555	0.237
GW 51-41	1.960	1.733	0.302	1.900	1.672	0.274
GW 51-51	1.743	1.510	0.221	1.745	1.539	0.250
River water	2.269	1.980	0.331	2.185	1.925	0.327

### 3.3. Change in the component composition of complex nutrient medium after CFT

As shown above, in the MC freeze/thaw experiment with a single carbon source of sodium humate (HS), changes in the spectral characteristics were related to the metabolic activity of microbial communities from different habitats. However, the changes in the state of humic substances may not only be related to the transformation of their macromolecules. An important factor is biosorption, which is associated with specific mechanisms of hydrophobic interaction between HS and extracellular polymers of bacterial cells (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003).

It's worth to remark that the addition of a readily available co-substrate to a nutrient solution containing HS resulted in a significant alteration in its optical properties. In comparison to the control, the absorbance values at the three wavelengths demonstrated an increase (Fig.1), which can be attributed to the functioning of MS. In addition to the aliphatic and aromatic compounds resulting from the HNa metabolism, products of the peptone metabolism may also be present. Moreover, the sequence of consumption of each carbon source and the contribution of specific metabolic products to changes in spectral characteristics are challenging to predict under CFT conditions. It is not excluded that in our experiment, there was a partial biosorption of HNa on the biomass of developing microorganisms due to the consumption of low-molecular-weight peptides. This biomass was removed by filtration before using spectrophotometry. Nevertheless, it was found that there were some differences in the spectral characteristics of the culture fluid when MCs of groundwater at different thawing temperatures were involved.

Thus, following CFT, the change in the total OM content (at  $\lambda = 254$  nm) when MCs were cultured with HNa in the presence of co-substrate depended on the thawing temperature and on the location of the microbial community (Fig. 2). The highest level of the activity was observed in microbial communities (MCs) from wells situated at a distance from the riverbank, at a thawing temperature of 4°C. This level of activ-

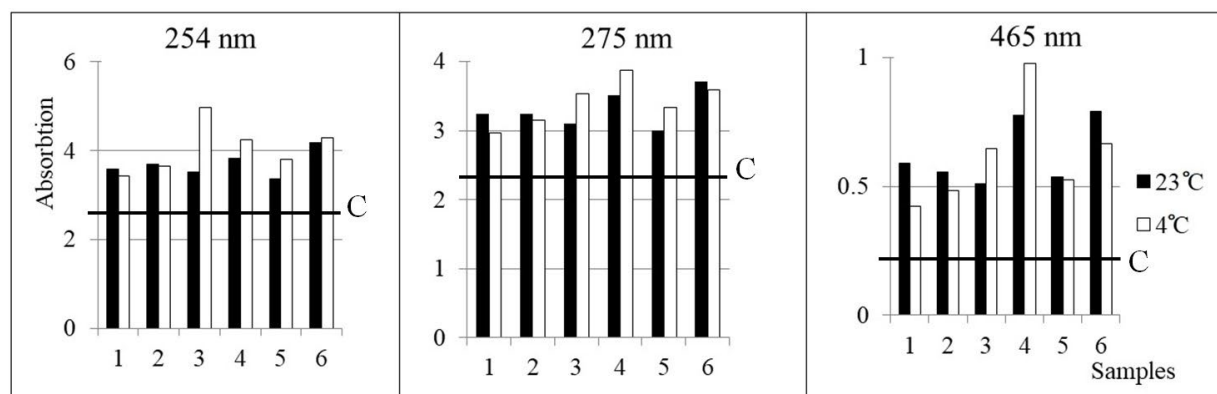
ity decreased with the depth of the active layer (AF). Groundwater samples collected from the RBF zone did not exhibit a response to the thawing temperature, but their activity was lower than that of MCs from river water.

The distance of the wells from the riverbank influenced the contribution of the aromatic compound to the OM composition (at  $\lambda = 275$  nm). However, the slow thawing temperature of 4°C had a positive effect on MC from the distant wells. This is caused by the natural adaptation of MCs to the corresponding temperatures. In the RBF zone, the temperature regime is influenced by river water, while in the distant wells, the temperature is more stable between 4-6°C, depending on the depth of groundwater sampling. Therefore, the diversity of the HNa transformation metabolites in the presence of readily available sources of nitrogen-containing OM related to aromatic compounds may increase in distant wells, especially during spring. At a thawing temperature of 23°C, the MCs of river and ground waters from a distant well at a depth of 41 m were more active.

The response of chromophoric groups ( $\lambda = 465$  nm) determining the colour of natural waters also depended on two factors: the distance of the wells from the bank and the thawing temperature during CFT. Figure 2 shows that the most active in the HNa transformation processes in the presence of co-substrate at 4°C were the MCs of the groundwater sampled from a depth of 41 m of the distant well GW 51-41. However, at a thawing temperature of 23°C, the spectral characteristics of the chromophoric groups were comparable when the MCs from the distant well GW 51-41 and the MCs of the river water were involved. Microorganisms from this AF layer in the distant well had high adaptive potential for transforming a mixture of carbon sources during rapid and slow thawing.

### 4. Conclusions

The conducted studies showed that staying frozen at -18°C for 30 days and 5 freeze/thaw cycles had no effect on the viability of microorganisms. The thawing range and the presence of readily available co-substrate



**Fig.2.** Changes in the spectral characteristics of nutrient medium (HNa + co-substrate) involving microbial communities of ground and river waters after CFT at different thawing temperatures: 1– GW 1-15; 2 – GW 1-35; 3 – GW 51-21; 4 – GW 51-41; 5 – GW 51-51; 6 – river water; C – control.



proved to be important factor affecting the HNa transformation. According to the spectral characteristics of HNa after CFT, the responses of the MC of groundwater differed among the aquifer layers. A change in the aromatic compound was observed at a thawing temperature of 4°C in MCs present at depths of 21 m and 51 m in wells located at a distance from the bank. At a thawing temperature of 23°C, close absorption values for the content of aromatic groups were recorded with the participation of the MCs from the different aquifer depths and independently of the distance of wells from the bank.

After CFT in the presence of co-substrate, thawing temperature affected subsequent growth on peptone and the manifestation of proteolytic activity. At a thawing temperature of 4°C, the high activity of MCs from wells located 1,500 m from the bank was preserved. However, at the thawing temperature, activity decreased in MCs of river water and MCs from the deep aquifer layers in wells located in the riverbank filtration zone. A distinct pattern was observed at a thawing temperature of 23°C in the presence of a co-substrate in the MCs from wells that were maximally distant from the bank. The highest activity was observed in microbial communities from the upper layers of the aquifer, and it gradually decreased with depth.

When a complex medium with two substrates was used, the most significant changes in the spectral characteristics of the culture fluid at different thawing temperatures were observed when the MCs of groundwater were applied. They responded to the thawing temperature with a greater change in spectral characteristics responsible for the chromophoric groups. Their abundance was maximized at 4°C with the MCs from a distant well (41 m depth). The MCs from river water were less dependent in their activity on thawing temperature, rather preferring 23°C.

It is important to emphasize that the activation of proteolytic activity in the MCs was accompanied by active gas generation and biofilm formation. These characteristics of the MC responses may provide evidence that readily available carbon sources entering groundwater during the summer can have a significant impact on the groundwater quality, with biofilm formation acting as a risk factor for the colmatage of wells.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Birdwell J.E., Engel A.S. 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* 41: 270–280. DOI: [10.1016/j.orggeochem.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.11.002)
- Braun B., Schröder J., Knecht H. et al. 2016. Unraveling the microbial community of a cold groundwater catchment system. *Water Research* 107(15): 113–126.
- Chen J., Gu B., LeBoeuf E.J. et al. 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48 (1): 59–68.
- Esparza-Soto M., Westerhoff P. 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Water Research* 37 (10): 2301–2310.
- Flemming H.-C., Wuertz S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 17(4): 247–260.
- Goode C., Allen D.G. 2011. Effect of calcium on moving-bed biofilm reactor biofilms. *Water Environment Research* 83 (3): 220–232.
- Hou N., Wen L., Cao H. et al. 2017. Role of psychrotrophic bacteria in organic domestic waste composting in cold regions of China. *Bioresource Technology* 236: 20–28.
- Huber S.A., Balz A., Abert M. et al. 2011. Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography – organic carbon detection – organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Research* 45(2): 879–885.
- Kramshøj M., Albers C.N., Holst T. et al. 2018. Biogenic volatile release from permafrost thaw is determined by the soil microbial sink. *Nature Communications* (9): e-3412. DOI: [10.1038/s41467-018-05824-y](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05824-y)
- Krupińska I. 2017. Effect of organic substances on the efficiency of Fe (II) to Fe (III) oxidation and removal of iron compounds from groundwater in the sedimentation process. *Civil and Environmental Engineering Reports* 26: 15–29.
- Kulakov V.V. 2024. Interaction of surface and groundwater in the Khabarovsk Amur water hub. In: *Rivers of Siberia and the Far East. Preservation of river ecosystems in the era of global changes*. B.A. Voronov, O.I. Nikitina (Ed.). Moscow: World of Science: 28–31. (in Russian)
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Kumar S. 2006. *Organic chemistry. Spectroscopy of Organic Compounds*: Guru Nanak Dev University. 36 p.
- Lee B.M., Seo Y.S., Hur J. 2015. Investigation of adsorptive fractionation of humic acid on graphene oxide using fluorescence EEM-PARAFAC. *Water Research* 73C: 242–252. DOI: [10.1016/j.watres.2015.01.020](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.020)
- Lipczynska-Kochany E. 2018. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: A review. *Science Total Environment* 640–641: e 1548.
- Manyapu V., Lepcha A., Sharma S.K. et al. 2022. Role of psychrotrophic bacteria and cold-active enzymes in composting methods adopted in cold regions. Chapter One. *Advances in Applied Microbiology* 121: 1–26.
- Margesin R., Collins T. 2019. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Applied microbiology and biotechnology* 103: 1–13. DOI: [10.1007/s00253-018-9435-1](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9435-1)
- Namsaraev B.B., Barkhutova D.D., Khakhinov V.V. 2006. *Field workshop on aquatic microbiology and hydrochemistry*, ed. M.B. Weinstein. Publishing house of Buryat State University, Ulan-Ude. 68 p.
- Messan K.S., Jones R.M., Doherty S.J. et al. 2020. The role of changing temperature in microbial metabolic processes during permafrost thaw. *Public Library of Science One* 15(4): e 0232169. DOI: [10.1371/journal.pone.0232169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232169)
- Shirshova L.T., Kholodov A.L., Zolotareva B.N. et al. 2009. Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands. *Geoderma* 149 (1–2): 116–123.
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19(4): 94–106. (in Russian)
- Struvay C., Feller G. 2012. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13(9): 11643–11665. DOI: [10.3390/](https://doi.org/10.3390/)

[ijms130911643](#)

Zona D. 2016. Long-term effects of permafrost thaw. *Nature* 537 (7622): 625–626.

Yan B., Guan J. 2014. Effects of extreme flood on dissolved iron in Amur river basin. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Meeting of Amur-Okhotsk Consortium*: 25–27. URL: <http://amurokhotsk.com/>

Young K.C., Maurice P.A., Docherty K.M. et al. 2004. Bacterial degradation of dissolved organic matter from two northern Michigan streams. *Geomicrobiology Journal* 21: 521–528.

# Ответные реакции микробных комплексов на замерзание/оттаивание в зоне взаимодействия поверхностных и подземных вод



Кондратьева Л.М.\*, Андреева Д.В.

Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Хабаровского федерального исследовательского центра, Дикопольцева, 56, Хабаровск, 680000 Россия

**АННОТАЦИЯ.** В работе представлены результаты исследований активности микробных сообществ (МС) по отношению к гуминовым веществам после циклического замерзания/оттаивания. В качестве инокулята использованы подземные воды с разной глубины водоносного горизонта из скважин, расположенных на разном удалении от зоны речной береговой фильтрации (РБФ), и речная вода. Циклическое замораживание/оттаивание (ЦЗО) проходило в два этапа: первое замораживание длилось 30 суток при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ ; затем проводили поочередно 5 циклов замораживания и оттаивания через 7 суток. Были сформированы два варианта условий оттаивания: медленное оттаивание от  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $+4^{\circ}\text{C}$ ; быстрое оттаивание от  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $+23^{\circ}\text{C}$ . Выживаемость МС из подземных и речных вод после ЦЗО подтверждена по активности роста на легкодоступном субстрате пептоне. Максимальную активность после ЦЗО с одним гуматом натрия (ГNa) при температуре оттаивания  $4^{\circ}\text{C}$  проявляли МС с глубины 41 м из скважин, удаленных от берега на расстоянии 1500 м. Она была сопоставимой с активностью МС из речной воды в период наблюдений. При температуре оттаивания  $23^{\circ}\text{C}$  микроорганизмы из речных и подземных вод из скважин, расположенных близко к берегу, проявляли высокую активность независимо от состава источников углерода в период ЦЗО. В удаленных от берега скважинах температура оттаивания  $23^{\circ}\text{C}$  влияла на активность роста МС после ЦЗО в зависимости от глубины отбора проб воды. Так у МС с глубины 21 м и 41 м активность увеличивалась при внесении легкодоступного ко-субстрата. Температура оттаивания оказывала влияние на изменение спектральных характеристик ГNa после ЦЗО. На вклад ароматической составляющей в составе продуктов трансформации ГNa ( $\lambda = 275 \text{ nm}$ ) влияла удаленность скважин от берега. При участии МС речной воды и МС из скважин, расположенных в зоне РБФ при температуре оттаивания  $23^{\circ}\text{C}$  показания содержания ароматических соединений были выше, чем при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Медленное оттаивание при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  оказывало положительный эффект на трансформацию гуминовых веществ микроорганизмами из удаленных скважин за счет их природного адаптационного потенциала.

**Ключевые слова:** микробные сообщества, замерзание/оттаивание, речная береговая фильтрация, гуминовые вещества

Для цитирования: Кондратьева Л.М., Андреева Д.В. Ответные реакции микробных комплексов на замерзание/оттаивание в зоне взаимодействия поверхностных и подземных вод // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 955-970. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-955

## 1. Введение

В ближайшие годы в связи с глобальным потеплением прогнозируют крупномасштабные изменения в биосфере и криосфере (Margesin and Collins, 2019). Последствия таяния многолетней мерзлоты связывают с изменением состава поверхностных и подземных вод. Многочисленные исследования в регионах с оттаивающей многолетней мерзлотой

показали, что крупномасштабные эффекты для наземных и водных экосистем могут быть связаны с биогеохимической активностью на микроскопическом уровне (Zona, 2016).

Считают, что наиболее распространенными организмами с точки зрения биомассы и разнообразия являются психрофильные микроорганизмы, их адаптация к холоду является результатом эво-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [kondratevalm@gmail.com](mailto:kondratevalm@gmail.com) (Л.М. Кондратьева)

Поступила: 06 мая 2024; Принята: 27 мая 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



люционного отбора и генетически закодирована в последовательности белков (Struvay and Feller, 2012). Способность микроорганизмов выживать при низких температурах, связывают с продукцией холодоактивных ферментов, расщепляющих различные органические субстраты, включая лактозу, целлюлозу, лигнин, крахмал и липиды (Hou et al., 2017; Manuaru et al., 2022). Психрофильные микроорганизмы способны трансформировать стойкие органические вещества (ОВ) в условиях сезонного замерзания и оттаивания водной среды. В результате экспериментальных исследований, имитирующих оттаивание многолетней мерзлоты, установлено, что ответные реакции микробиомов зависели в значительной степени от температуры оттаивания, чем от местоположения отбора проб и их фильтрации (Messan et al., 2020).

Важное место в исследованиях динамики трансформации ОВ в условиях сезонного замерзания/оттаивания занимают гуминовые вещества (ГВ), которые участвуют в сложных биогеохимических процессах. Микроорганизмы используют ГВ для стимулирования процессов биоразложения и/или снижения биодоступности некоторых металлов. В свою очередь ГВ, контролируя окружающие условия, изменяют структуру микробных сообществ (МС) и их активность (Kulikova and Perminova, 2021). Биодegradация ГВ влияет на общее состояние и функционирование гидросферы, определяя химический состав воды (Young et al., 2004).

Состав ГВ зависит от характера взаимодействия поверхностных и подземных вод с почвами, горными породами, и в значительной степени от изменения климата (Lipczynska-Kochany, 2018). Считают, что реакционная способность ГВ в окружающей среде зависит от набора функциональных групп в структуре макромолекул (Lee et al., 2015). Изменение соотношения кетонных и аукохромных групп в составе ароматических колец влияет на интенсивность окрашивания водной среды, а цветность раствора ГВ обусловлена присутствием хромофорных функциональных групп: азотсодержащих ( $-N=N-$ ), азометиновых ( $>C=N-$ ), карбоиминовых ( $>C=NH$ ), нитро- ( $-NO_2$ ) и нитрозогрупп ( $-NO$ ) (Chen et al., 2002).

Ранее, на основании экспериментальных исследований была выдвинута гипотеза о том, что значительная часть фракций HS представляют собой динамичную систему макроагрегатов, различающихся составом и характером взаимодействия субъединиц. Макроагрегаты формируются за счет гидрофобных, водородных, сложноэфирных связей и др. При промерзании и оттаивании разных почв и пород меняются не только оптические свойства включенных в них HS, но и реакционная способность макромолекул (Shirshova et al., 2009). Подобные процессы некоторые авторы (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003) объясняют гидрофобным взаимодействием между гуминовыми веществами и внеклеточными полимерами бактериальных клеток.

Взаимодействие микроорганизмов с макромолекулами ГВ (биосорбция) является первым

шагом, предшествующим их ферментативному расщеплению, гидролизу и микробиологическому потреблению. Ключевыми факторами выступают способность микроорганизмов продуцировать внеклеточные полимеры и присутствие двухвалентных катионов, в том числе кальция и магния (Goode and Allen, 2011). Дальнейшая судьба ГВ зависит от присутствия низкомолекулярных органических кислот, гидрофобности биополимеров и различных элементов, образующих с ними подвижные хелатные комплексы (Huber et al., 2011).

Установлено, что при аэрации подземных вод повышаются устойчивость к стресс-факторам и адаптационный потенциал. Микробные комплексы подземной гидросферы, существуют в виде сложно-структурированных консорциумов (Flemming and Wuertz, 2019). При аэрации подземных вод за счет поступления поверхностных и речных вод изменяется их адаптационный потенциал к стресс-факторам.

Гипотетически на биогеохимическом барьере в зоне береговой фильтрации речной воды в водоносный горизонт (ВГ) железо может выступать регулятором поведения ОВ различного генезиса. В этом случае доминирующим процессом выступает реакция взаимодействия растворенного железа с гуминовыми веществами (Krupińska, 2017). Показано, что в период экстремальных наводнений в р. Амур около 90 % растворенного железа находится в комбинации с ГВ (Yan and Guan, 2014).

В откачиваемой воде из скважин, расположенных в зоне речной береговой фильтрации могли присутствовать три группы микроорганизмов: автохтонные бактерии из водоносного горизонта и порового пространства; аллохтонные почвенные микроорганизмы, поступающие с поверхностной инфильтрацией; микроорганизмы, поступающие в пластовые воды с речным фильтратом.

Ранее было установлено (Braun et al., 2016), что в неэксплуатируемых скважинах в микробном сообществе в основном доминировали филумы Proteobacteria (95%) Actinobacteria, Bacteroidetes ~ 5%. После насыщения ВГ аэрируемой водой, происходила значительная перестройка структуры сообщества и увеличивалось видовое разнообразие микроорганизмов: Actinobacteria ~ 20-50%; Proteobacteria ~ 30-50%; Bacteroidetes, Nitrospirae, Firmicutes, Chloroflexi, Verrucomicrobia и др. ~ 20-50%.

На наш взгляд, доминирование той или иной группы микроорганизмов зависит не только от глубины залегания откачиваемой воды, а также от вклада ОВ, поступающих с поверхностными водами. Состав и доступность ОВ влияют на активность микробных сообществ, их поведение и динамику сукцессии доминантных групп. Например, при оттаивании мерзлых грунтов Гренландии методом масс-спектрометрии обнаружено более 300 различных органических соединений (Kramshøj et al., 2018), в их состав могли входить продукты микробиологической трансформации ОВ различного генезиса.



Цель наших исследований состояла в определении активности микробных сообществ в условиях циклического замерзания/оттаивания по отношению к легкодоступным низкомолекулярным пептидам (пептон) и гуминовым веществам (гумат натрия), при взаимодействии подземных и поверхностных вод в зоне речной береговой фильтрации.

## 2. Материалы и методы

Район исследований расположен в центральной части Среднеамурской низменности. Ее рельеф достаточно разнообразен с незначительным наклоном в северо-восточном направлении. Русло и пойма р. Амур, образуют обширную сложную пойменно-русловую систему. Пойма довольно сильно обводнена и во время паводков значительная ее часть затапливается. Морфология русла реки на этом участке характеризуется интенсивным размывом берегов. В зимний период вдоль левого берега проходит до 60 % всего стока р. Амур, а летом при подъеме уровней на 4-5 м доля стока уменьшается до 45 %.

Тунгусское месторождение подземных вод (ПВ) находится в междуречье рек Амур и Тунгуска в водоносном горизонте плиоцен-четвертичных аллювиальных отложений (пески, гравий). Наблюдательные скважины расположены на разном удалении от русла р. Амур (Рис. 1). На участке, где ПВ взаимодействуют с речной водой, формируется биогеохимический барьер. Вклад каждой составляющей зависит от гидрологического режима и времени года. Разнонаправленное взаимодействие поверхностных и ПВ в период межени приводит к разгрузке подземных вод в русло реки, а в период паводков и катастрофических наводнений происходит обратная инфильтрация речных вод в ВГ (Kulakov, 2024). Именно здесь, на биогеохимическом барьере, в период сезонного замерзания и оттаивания происходят мало изученные микробиологические процессы, вносящие существенный вклад в формирование качества природных вод.

Пробы ПВ Тунгусского месторождения отбирали в ноябре 2023 г. из 5 скважин, с разной глу-

бины ВГ и расположенных на разном удалении от левого берега Пемзенской протоки (р. Амур); речную воду отбирали с глубины 0.5 м от поверхности в 50 м от берега (Таблица 1).

Для экспериментов в качестве источников углерода использовали: препарат гуминовых веществ (Humic acid sodium salt, H16752, Germany), как аналог трудно минерализуемых ОВ; пептон (ГОСТ 13805-76, г. Оболенск, серия 299), представляющий собой смесь полипептидов, свободных аминокислот, ферментов и нуклеиновых кислот.

Циклическое замораживание/оттаивание (ЦЗО) проводили в стерильных одноразовых медицинских полимерных контейнерах на 50 мл с крышкой (Berimed, ООО «ЕВРОКЭП», РФ). В контейнеры заливали два варианта стерильной среды (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1.33;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 2.67;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — 2;  $\text{KNO}_3$  — 2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.001;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.1. Первый вариант содержал 0.2 г/л гумата натрия (ГNa), во второй вариант вносили дополнительный ко-субстрат 0.2 % низкомолекулярных пептидов (пептон). В качестве инокулята использовали по 5 мл природных вод.

Первое замораживание длилось 30 суток в морозильной камере при температуре  $-18^\circ\text{C}$ . Затем были сформированы две группы образцов, которые отличались условиями оттаивания: первая — оттаивание в холодильнике от  $-18^\circ\text{C}$  до  $+4^\circ\text{C}$ ; вторая — быстрое оттаивание, при комнатной температуре от  $-18^\circ\text{C}$  до  $+23^\circ\text{C}$ . Все образцы прошли 5 циклов поочередного ЦЗО через 7 суток. Контрольные образцы без инокулята проходили все этапы ЦЗО.

Общую численность культивируемых гетеротрофных бактерий (КГБ) определяли методом предельных разведений на рыбо-пептонном агаре, разбавленном в 10 раз (РПА:10). Аммонифицирующих бактерий (АМБ), участвующих в процессе аммонификации ОВ, выращивали на РПА (Намсараев и др., 2006). Численность микроорганизмов выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл).

Для оценки жизнеспособности и активности роста микробных сообществ (МС) природных вод после ЦЗО использовали жидкую питательную среду с легкодоступным источником углерода (0.2

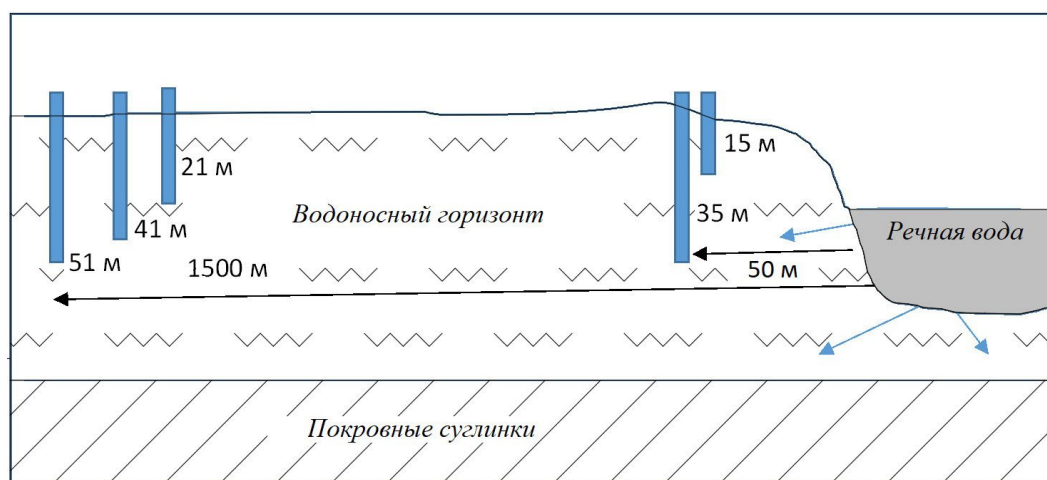


Рис.1. Расположение наблюдательных скважин по отбору подземных вод с разной глубиной водоносного горизонта и на разном расстоянии от берега реки.

**Таблица 1.** Общая характеристика подземных вод из наблюдательных скважин в зоне речной береговой фильтрации в ноябре 2023 г.

Образцы воды	Индикаторы								
	Расстояние от речного берега, м	Глубина, м	pH	Fe, мг/л	Mn, мг/л	NH <sub>4</sub> , мг/л	SAC <sub>254</sub> , м <sup>-1</sup>	КГБ, КОЕ/мл	АМБ, КОЕ/мл
ПВ 1-15	50	15	6.57	18.0	1.40	0.274	20.5	185.3	126.3
ПВ 1-35		35	6.43	23.9	1.12	0.075	12.8	135.2	97.3
ПВ 51-21	1500	21	6.48	26.0	6.50	0.350	7.6	52.2	45.2
ПВ 51-41		41	6.46	24.7	1.15	0.404	8.2	79.3	63.4
ПВ 51-51		51	6.43	17.3	0.59	0.412	9.7	119.6	95.2
Речная вода	50 м от левого берега	0.5	7.34	0.70	0.073	0.168	20.8	179.0	137.8

**Примечание:** КГБ – культивируемые гетеротрофные бактерии; АМБ – аммонифицирующие бактерии; SAC<sub>254</sub> – спектральный абсорбционный показатель содержания ОВ; КОЕ/мл - количество колонии образующих единиц в 1 мл.

% пептон). Характер роста на пептоне при температуре 23°C определяли фотометрическим методом по изменению оптической плотности (ОП) культуральной жидкости на КФК-3-01 при длине волны 600 нм. Влияние диапазона температуры оттаивания на особенности микробиологической трансформации ГНа оценивали по изменению значений абсорбции при разных длинах волн: изменение общего содержания ОВ при  $\lambda = 254$  нм; трансформацию ароматической составляющей ГНа при  $\lambda = 275$  нм (Kumar, 2006), содержание хромофорных групп при  $\lambda = 465$  нм (Shirshova et al., 2015), используя спектрофотометр SHIMADZU UV-3600.

### 3. Результаты и обсуждение

При анализе сезонной динамики численности культивируемых гетеротрофных бактерий (КГБ) и аммонифицирующих бактерий (АМБ) в речной воде и подземных водах, отобранных из скважин, расположенных в зоне речной береговой фильтрации (РБФ), был отмечен общий тренд увеличения численности микробных сообществ в позднесенний период (Таблица 2). Максимальная численность КГБ в ВГ за период наблюдения установлена в ноябре на глубине 15.7 м, она была сопоставима с численностью КГБ в речных водах. Более существенные различия в численности КГБ между речными и

подземными водами установлены на глубине 35.7 м в весенний и осенний периоды. Показатели численности АМБ в подземных водах были значительно ниже, чем в речной воде, особенно в более глубоких слоях ВГ, куда в меньшем количестве поступали ОВ в результате вертикальной и горизонтальной фильтрации.

Общую численность микроорганизмов в нижних слоях ВГ могут поддерживать автохтонные ОВ, которые образуются в результате микробиологических процессов при взаимодействии воды с горными породами. Среди них могут присутствовать микробные метаболиты, включая внеклеточные биополимеры и продукты лизиса бактериальных биопленок.

#### 3.1. Активность роста МС из речных и подземных вод на пептоне после ЦЗО

В конце эксперимента образцы культуральной жидкости после ЦЗО были использованы в качестве инокулята для оценки выживаемости и активности роста микробных сообществ (МС) на питательной среде с пептоном (Таблица 3). Активность роста зависела не только от выживания после 30-суточного заморозания при -18°C, а также от температуры оттаивания. Важную роль играли используемые

**Таблица 2.** Сезонная динамика численности культивируемых микробных сообществ подземных и поверхностных вод в зоне речной береговой фильтрации (КОЕ/мл)

Дата	Речная вода		Подземная вода на разной глубине			
	КГБ	АМБ	КГБ		АМБ	
			15.7 м	35.7 м	15.7 м	35.7 м
27.03.2023	56 ± 4	60 ± 2	62 ± 10	83 ± 6	15 ± 2	10 ± 2
1.06. 2023	69 ± 2	54 ± 2	58 ± 3	65 ± 2	22 ± 1	19 ± 2
1.08.2023	127 ± 8	93 ± 6	112 ± 7	100 ± 6	84 ± 5	53 ± 3
13.11.2023	179 ± 5	138 ± 6	185 ± 3	135 ± 3	126 ± 4	97 ± 3

Таблица 3. Влияние ко-субстрата и температуры оттаивания на активность роста микробных сообществ после ЦЗО

Микробные сообщества	ОП, 600 нм			
	ГNa 4°C	ГNa + П 4°C	ГNa 23°C	ГNa + П 23°C
ПВ 1-15	0.100 ± 0.003	0.098 ± 0.003	0.133 ± 0.006	0.144 ± 0.009
ПВ 1-35	0.154 ± 0.010	0.108 ± 0.004	0.157 ± 0.010	0.150 ± 0.010
ПВ 51-21	0.115 ± 0.005	0.139 ± 0.008	0.095 ± 0.003	0.168 ± 0.012
ПВ 51-41	0.167 ± 0.012	0.169 ± 0.012	0.108 ± 0.004	0.141 ± 0.008
ПВ 51-51	0.115 ± 0.005	0.135 ± 0.007	0.136 ± 0.007	0.132 ± 0.007
Речная вода	0.170 ± 0.012	0.131 ± 0.006	0.159 ± 0.010	0.160 ± 0.010

источники углерода и азота: варианты только с ГNa и в сочетании с ко-субстратом в виде пептона (П).

При температуре оттаивания 4°C максимальную активность после ЦЗО с ГNa проявляли МС с глубины 41 м из скважин, удаленных от берега на расстоянии 1500 м. Различия в активности между МС с других глубин были минимальными. При этой температуре оттаивания их активность роста на пептоне после ЦЗО была высокой независимо от присутствия в качестве источника углерода одного ГNa или при дополнительном внесении низкомолекулярного ко-субстрата. Микробные сообщества из речных вод проявляли высокую активность на ГNa после оттаивания при 4°C даже без внесения ко-субстрата. МС из подземных вод, отобранных из скважины максимально приближенной к берегу с глубины 15 м были менее активными, независимо от состава использованных ОМ.

При температуре оттаивания 23°C отмечены иные закономерности в ответных реакциях МС. Микроорганизмы речных и подземных вод из скважин, расположенных близко к берегу, проявляли высокую протеазную активность независимо от состава источников углерода в период ЦЗО в зависимости от глубины отбора проб воды. Так у МС с глубины 21 м и 41 м активность увеличивалась при внесении ко-субстрата. Активность МС из удаленной скважины на глубине 51 м при температуре оттаивания 23°C сохранялась высокой независимо от сочетания органических субстратов. Стоит подчеркнуть, что в присутствии только ГNa в качестве источника углерода, температура оттаивания не оказывала существенного влияния на протеазную активность МС из зоны РБФ на глубине 35 м и речных вод. Этим можно объяснить тесную взаимосвязь между поверхностными и подземными водами в прибрежной зоне, которая проявляется в одинаковых ответных реакциях микробных сообществ на разную температуру оттаивания.

### 3.2. Влияние микробных сообществ и температуры оттаивания на спектральные характеристики ГNa после ЦЗО

Известна способность подавляющего большинства ОВ различных классов поглощать свет в УФ-области при длинах волн 250-280 нм. В этой

области интенсивно поглощают ненасыщенные соединения и соединения ароматического ряда с различными группировками атомов, в том числе протеины, фенолы, гуминовые вещества, лигнин-сульфоновые кислоты и другие сложные соединения. Неорганические ионы, за малым исключением, в этой области не поглощают. Уставлена прямая корреляция значений УФ-показателя при  $\lambda = 254$  нм с показателями  $S_{\text{орг}}$ , ХПК и БПК<sub>5</sub>.

Для определения флуорофоров (хромофорных групп), образующихся при микробиологической трансформации терригенного материала и гуминовых веществ, часто используют диапазон длин волн от 450-500 нм (Birdwell and Engel, 2010). При этом считают, что связь между спектрами поглощения и молекулярной структурой ГВ, зависит от природных и антропогенных факторов (Shirshova et al., 2015). Выбор конкретных длин волн для оценки изменения молекулярной структуры ГВ по-прежнему является предметом дискуссий.

После ЦЗО при температуре оттаивания 4°C микробные сообщества из подземных вод, по сравнению с микроорганизмами речной воды принимали активное участие в трансформации ГNa (Таблица 4). Если судить по спектральным характеристикам питательного раствора с гуматом натрия, при участии МС происходили изменения в его алифатической ( $\lambda = 254$  нм) и ароматической составляющей молекулы ( $\lambda = 275$  нм). МС из подземных вод в зоне РБФ увеличивали свою активность с глубиной. В подземных водах, отобранных из удаленных скважин, ответные реакции МС различались по слоям ВГ. Активное изменение ароматической составляющей отмечено у МС, присутствующих на глубине 21 м и 51 м. Минимальные изменения спектральных характеристик при трех длинах волн при этой температуре оттаивания наблюдали у МС с глубины 41 м. Изменения в составе хромофорных групп ( $\lambda = 465$  нм) совпадали с активностью МС по отношению к ароматической составляющей ГNa.

При температуре оттаивания 23°C микробиологическая трансформация ГNa также зависела от мест отбора проб воды и соответствующей активности МС по отношению к разным составляющим молекулы гуминового вещества. Минимальной активностью отличались МС из речной воды и из подземных вод, отобранных с глубины 15 м в зоне РБФ. Спектральные характеристики гумата натрия после ЦЗО при температуре оттаивания 23°C оказа-

**Таблица 4.** Влияние микробных сообществ на изменение спектральных характеристик ГНа при разной температуре оттаивания

Микробные сообщества	Температура оттаивания					
	4 °С			23 °С		
	254 нм	275 нм	465 нм	254 нм	275 нм	465 нм
Контроль ГНа	2.502	2.227	0.392	2.636	2.361	0.400
GW 1-15	1.952	1.698	0.256	2.150	1.894	0.309
GW 1-35	1.682	1.470	0.216	1.769	1.553	0.245
GW 51-21	1.649	1.430	0.217	1.772	1.555	0.237
GW 51-41	1.960	1.733	0.302	1.900	1.672	0.274
GW 51-51	1.743	1.510	0.221	1.745	1.539	0.250
Речная вода	2.269	1.980	0.331	2.185	1,925	0.327

лись сопоставимыми при участии МС из скважин, удаленных от берега на разное расстояние и находящиеся на разной глубине (ПВ 1-35 и ПВ 51-21). Это может быть связано с выживаемостью при быстром оттаивании одних и тех же видов микроорганизмов, присутствующих в общем пуле подземных водах и способных разлагать труднодоступные органические вещества.

Изменение спектральных характеристик ГВ в результате микробиологической трансформации чаще всего связано с изменением конденсированного ароматического ядра (ароматическая составляющая при  $\lambda = 275$ ). Принимая во внимание, что алифатические боковые цепи, не несущие двойных связей, (полисахариды, полипептиды, насыщенные углеводороды), не отвечают за окраску ГВ можно предположить, что процесс их утилизации связан с изменением величины абсорбции при  $\lambda = 254$  нм.

Согласно проведенным исследованиям МС подземных вод после ЦЗО независимо от места их локализации *in situ* принимали участие в трансформации алифатической и ароматической составляющей гуминовых соединений при разном диапазоне температуры оттаивания. В отличие от них МС из речной воды оказались менее активными по отношению к ГНа.

### 3.3. Изменение компонентного состава сложной питательной среды после ЦЗО

Как было показано выше, в вариантах эксперимента по замерзанию/оттаиванию МС с одним источником углерода — гуматом натрия (ГНа) изменение его спектральных характеристик было связано с метаболической активностью микробных сообществ из разных местообитаний. Однако, изменение состояния гуминовых веществ может быть связано не только с трансформацией их макромолекул. Важным фактором выступает биосорбция, связанная с особыми механизмами гидрофобного взаимодействия между ГВ и внеклеточными полимерами бактериальных клеток (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003).

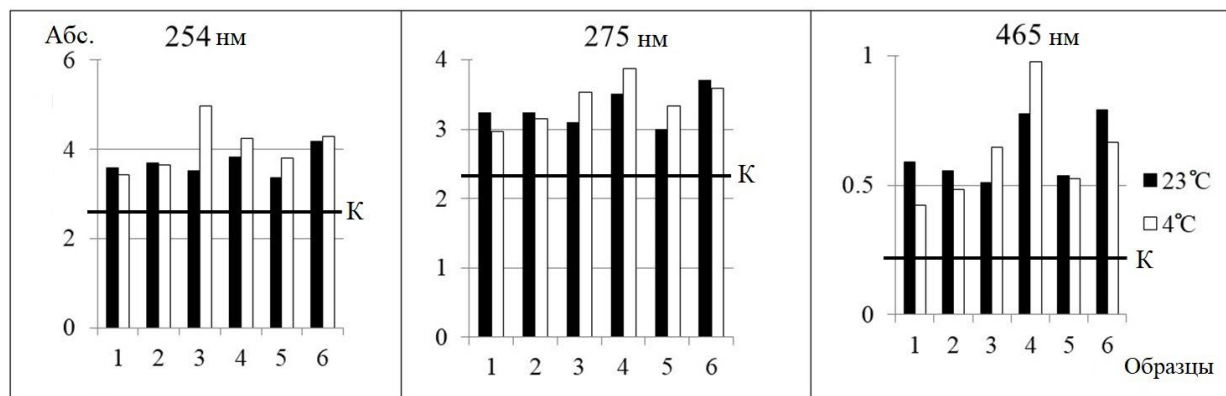
Стоит отметить, что при дополнительном внесении легкодоступного ко-субстрата в пита-

тельный раствор, содержащий ГНа, происходило существенное изменение его оптических свойств. По сравнению с контролем мы наблюдали увеличение показателей абсорбции при трех длинах волн (Рис.1) за счет функционирования МС. Среди алифатических и ароматических компонентов могут присутствовать не только продукты метаболизма НS, но и пептона. Причем последовательность потребления каждого источника углерода и вклад конкретных продуктов метаболизма в изменение спектральных характеристик трудно прогнозировать в условиях ЦЗО. Не исключено, что в нашем эксперименте происходила частичная биосорбция ГНа на биомассе развивающихся микроорганизмов за счет потребления низкомолекулярных пептидов. Эта биомасса удалялась фильтрованием перед проведением спектрофотометрии. Но, несмотря на это, были установлены некоторые различия в спектральных характеристиках культуральной жидкости при участии МС из подземных вод при разной температуре оттаивания.

Так после ЦЗО изменение общего содержания ОМ (при  $\lambda = 254$  нм) при культивировании МС на ГНа в присутствии ко-субстрата зависело от температуры оттаивания и от локации микробного сообщества (Рис. 2). Максимальную активность проявляли МС из удаленных от берега скважин при температуре оттаивания 4°С, которая снижалась с глубиной ВГ. Микроорганизмы из подземных вод, отобранных в зоне РБФ, фактически не реагировали на температуру оттаивания, но их активность была ниже, чем у МС из речной воды.

На вклад ароматической составляющей в составе ОМ (при  $\lambda = 275$  нм) влияла удаленность скважин от берега. При температуре оттаивания 23°С показания содержания ароматических соединений были немного выше, чем при температуре 4°С при участии МС из речной воды и скважин, расположенных в зоне РБФ. Однако медленная температура оттаивания при 4°С оказывала положительный эффект на МС из удаленных скважин. Это обусловлено природной адаптацией МС к соответствующим температурам. В зоне РБФ на температурный режим влияют речные воды, а в удаленных скважинах температура более стабильная в пределах 4-6°С, в зависимости от глубины отбора подземных вод.





**Рис.2.** Изменение спектральных характеристик питательной среды (ГNa + ко-субстрат) при участии микробных сообществ подземных и речных вод после ЦЗО при разной температуре оттаивания: 1–ПВ 1-15; 2–ПВ 1-35; 3–ПВ 51-21; 4–ПВ 51-41; 5–ПВ 51-51; 6–речная вода; К–контроль.

Поэтому разнообразие метаболитов трансформации ГВ в присутствии легкодоступных источников азотсодержащих ОВ, относящихся к ароматическим соединениям, может увеличиваться в удаленных скважинах, особенно в весенний период. При температуре оттаивания близкой к 23°C более активными оказались МС речной воды и МС подземных вод из удаленной скважины с глубины 41 м.

Поведение хромофорных групп ( $\lambda = 465$  нм), определяющих цветность природных вод также зависло от двух факторов: удаленности скважин от берега и от температуры оттаивания вовремя ЦЗО. На рисунке 1 видно, что наиболее активными в процессах трансформации ГNa в присутствии ко-субстрата при температуре 4°C оказались МС подземных вод, отобранных с глубины 41 м из удаленной скважины ПВ 51-41. Однако при температуре оттаивания 23°C спектральные характеристики хромофорных групп были сопоставимыми при участии МС из удаленной скважины ПВ 51-41 и МС речных вод. Микроорганизмы из этого слоя ВГ в удаленной скважине обладали высоким адаптационным потенциалом при трансформации смеси источников углерода при быстром и медленном оттаивании.

#### 4. Выводы

Проведенные исследования показали, что пребывание микроорганизмов в замороженном состоянии при -18°C в течение 30 суток и 5 циклов заморозания/оттаивания, не оказало влияния на их жизнеспособность. Важным фактором, влияющим на трансформацию ГNa, оказался диапазон оттаивания и присутствие легкодоступного ко-субстрата.

Согласно спектральным характеристикам ГNa после ЦЗО ответные реакции МС подземных вод различались по слоям водоносного горизонта. Активное изменение ароматической составляющей при температуре оттаивания 4°C отмечено у МС, присутствующих на глубине 21 м и 51 м в удаленных от берега скважинах. При температуре оттаивания 23°C близкие значения абсорбции по содержанию ароматических групп были зарегистрированы при участии МС с разных глубин водоносного горизонта и независимо от удаленности скважин от берега.

После ЦЗО в присутствии ко-субстрата температура оттаивания влияла на последующий рост на пептоне и проявление протеолитической активности. При температуре оттаивания 4°C сохранялась высокая активность МС из скважин, удаленных на 1500 м от берега. Однако при этой температуре оттаивания снижалась активность у МС речной воды и МС из глубоких слоев водоносного горизонта в скважинах, расположенных в зоне речной береговой фильтрации. Совсем иная закономерность установлена при температуре оттаивания 23°C в присутствии ко-субстрата у сообществ из скважин максимально удаленных от берега. Самая высокая активность отмечена у сообществ микроорганизмов из верхних слоев водоносного горизонта, с глубиной она постепенно снижалась.

При использовании сложной среды с двумя субстратами наиболее существенные изменения в спектральных характеристиках культуральной жидкости при разной температуре оттаивания отмечены при участии МС подземных вод. Они реагировали на температуру оттаивания, в большей степени изменяя спектральные характеристики ответственные за хромофорные группы. Их количество максимально увеличивалось при температуре 4°C при участии МС из удаленной скважины (глубина 41 м). МС из речных вод в меньшей степени зависели в своей активности от температуры оттаивания, скорее предпочитали 23°C.

Важно подчеркнуть, что активизация протеолитической активности МС сопровождалась активным газообразованием и формированием биопленок. Эти особенности ответных реакций МС могут служить в качестве свидетельства того, что легкодоступные источники углерода, поступающие в подземные воды в летний период, могут оказывать существенное влияние на их качество, а образование биопленок выступает фактором риска кольматажа скважин.

#### Конфликт интересов

Авторы декларируют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Birdwell J.E., Engel A.S. 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* 41: 270–280. DOI: [10.1016/j.orggeochem.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.11.002)
- Braun B., Schröder J., Knecht H. et al. 2016. Unraveling the microbial community of a cold groundwater catchment system. *Water Research* 107(15): 113–126.
- Chen J., Gu B., LeBoeuf E.J. et al. 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48 (1): 59–68.
- Esparza-Soto M., Westerhoff P. 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Water Research* 37 (10): 2301–2310.
- Flemming H.-C., Wuertz S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 17(4): 247–260.
- Goode C., Allen D.G. 2011. Effect of calcium on moving-bed biofilm reactor biofilms. *Water Environment Research* 83 (3): 220–232.
- Hou N., Wen L., Cao H. et al. 2017. Role of psychotrophic bacteria in organic domestic waste composting in cold regions of China. *Bioresource Technology* 236: 20–28.
- Huber S.A., Balz A., Abert M. et al. 2011. Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography – organic carbon detection – organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Research* 45 (2): 879–885.
- Kramshøj M., Albers C.N., Holst T. et al. 2018. Biogenic volatile release from permafrost thaw is determined by the soil microbial sink. *Nature Communications* (9). e-3412. DOI: [10.1038/s41467-018-05824-y](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05824-y)
- Krupińska I. 2017. Effect of organic substances on the efficiency of Fe (II) to Fe (III) oxidation and removal of iron compounds from groundwater in the sedimentation process. *Civil and Environmental Engineering Reports* 26: 15–29.
- Kulakov V.V. 2024. Interaction of surface and groundwater in the Khabarovsk Amur water hub. In: *Rivers of Siberia and the Far East. Preservation of river ecosystems in the era of global changes*. B.A. Voronov, O.I. Nikitina (Ed.). Moscow: World of Science: 28–31. (in Russian)
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Kumar S. 2006. Organic chemistry. Spectroscopy of Organic Compounds: Guru Nanak Dev University. 36 p.
- Lee B.M., Seo Y.S., Hur J. 2015. Investigation of adsorptive fractionation of humic acid on graphene oxide using fluorescence EEM-PARAFAC. *Water Research* 73C: 242–252. DOI: [10.1016/j.watres.2015.01.020](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.020)
- Lipczynska-Kochany E. 2018. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: A review. *Science Total Environment* 640–641: e 1548.
- Messan K.S., Jones R.M., Doherty S.J. et al. 2020. The role of changing temperature in microbial metabolic processes during permafrost thaw. *Public Library of Science One* 15(4): e 0232169. DOI: [10.1371/journal.pone.0232169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232169)
- Manyapu V., Lepcha A., Sharma S.K. et al. 2022. Role of psychrotrophic bacteria and cold-active enzymes in composting methods adopted in cold regions. Chapter One. *Advances in Applied Microbiology* 121: 1–26.
- Margesin R., Collins T. 2019. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Applied microbiology and biotechnology* 103: 1–13. DOI: [10.1007/s00253-018-9435-1](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9435-1)
- Намсараев Б.Б., Бархутова Д.Д., Хахинов В.В. 2006. Полевой практикум по водной микробиологии и гидрохимии, под ред. М.Б. Вайнштейна. Изд-во Бурятского государственного университета, Улан-Удэ. 68 с.
- Shirshova L.T., Kholodov A.L., Zolotareva B.N. et al. 2009. Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands. *Geoderma* 149 (1–2): 116–123.
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19(4): 94–106. (in Russian)
- Struvay C., Feller G. 2012. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (9): 11643–11665. DOI: [10.3390/ijms130911643](https://doi.org/10.3390/ijms130911643)
- Zona D. 2016. Long-term effects of permafrost thaw. *Nature* 537 (7622): 625–626.
- Yan B., Guan J. 2014. Effects of extreme flood on dissolved iron in Amur river basin. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Meeting of Amur-Okhotsk Consortium*: 25–27. URL: <http://amurokhotsk.com/>
- Young K.C., Maurice P.A., Docherty K.M. et al. 2004. Bacterial degradation of dissolved organic matter from two northern Michigan streams. *Geomicrobiology Journal* 21: 521–528.

# Abundant and Rare Microbial Subcommunities in Soda Lake Nukhe-Nur (Barguzin Depression, Russia)

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Lavrentyeva E.V.<sup>1,2,\*</sup>, Banzaraktsaeva T.G.<sup>1</sup>, Dambaev V.B.<sup>1</sup>, Buyantueva L.B.<sup>2</sup>, Ivanov V.L.<sup>1</sup>, Nikitina E.P.<sup>3</sup>, Tkachev P.A.<sup>1</sup>, Dorzhiev Ts.Z.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of General and Experimental Biology SB RAS, 6, Sakhyanovoi Str., Ulan-Ude, Russia

<sup>2</sup>Buryat State University, 20a Smolina Str., Ulan-Ude, Russia

<sup>3</sup>Baikal Institute of Nature Management 6, Sakhyanovoi Str., Ulan-Ude, Russia

**ABSTRACT.** In this study, we first investigated the composition of microbial communities of abundant, intermediate and rare subcommunities in soda Lake Nukhe-Nur (the Barguzin Basin) using Illumina MiSeq high-throughput sequencing. The results showed that abundant subcommunities mainly consisted of *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacteroidota* и *Bacillota*. In contrast, the rare subcommunities in the microbial mats were mainly composed of *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacillota*, *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Kiritimatiellaeota*. In the rare subcommunity of the bottom sediments, *Euryarchaeota*, *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Gemmatimonadota*, *Verrucomicrobiota*, *Epsilonbacteraeota*, and *Deinococcota* were found. However, the dominant phyla of the abundant subcommunity were also found in the intermediate and rare subcommunities. The predictive analysis of the microbial ecological function has revealed a broad potential diversity of metabolic pathways in the abundant, intermediate, and rare subcommunities of microbial mats and bottom sediments in Lake Nukhe-Nur. In soda lakes, rare subcommunities may play a greater role in the decomposition of organic matter than do abundant subcommunities. Overall, this study provides a better understanding of the microbial community structure and potential ecological functions of abundant and rare subcommunities in soda lakes ecosystems. The identified rare taxa open new opportunities for ecological, taxonomic, and genomic discoveries in Barguzin soda lakes.

**Keywords:** abundant, intermediate and rare subcommunities, soda lake

**For citation:** Lavrentyeva E.V., Banzaraktsaeva T.G., Dambaev V.B., Buyantueva L.B., Ivanov V.L., Nikitina E.P., Tkachev P.A., Dorzhiev Ts.Z. Abundant and Rare Microbial Subcommunities in Soda Lake Nukhe-Nur (Barguzin Depression, Russia) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 971-985. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-971

## 1. Introduction

Microbial communities play a key role in the structure and functioning of natural aquatic ecosystems (Simon et al., 2002; Sang et al., 2018; Chen et al., 2019; Zhang et al., 2023). High taxonomic and functional diversity of microbial communities is particularly characteristic of soda lakes (Sorokin et al., 2014). Typically, microbial communities consist of a few abundant dominant taxa and numerous rare taxa. In terms of their contribution to the total microbial community, taxa can be categorized into abundant and rare (relative abundance > 1% and < 0.1%, respectively), with the former making a significant contribution to biomass (but low biodiversity) and the latter making a minor contribution to biomass (but high biodiversity) (Zhang et al.,

2018). Although rare taxa are characterized by very low relative abundance, they play an important ecological role in microbial communities by maintaining microbial diversity (Jia et al., 2022). Additionally, the rare taxa could respond differentially at different environmental changes. Consequently, the presence of rare subcommunities can enhance the resilience of microbial communities to fluctuations in various environmental parameters (Jones and Lennon, 2010). Recent studies employing high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene have demonstrated that rare taxa should be regarded as an indispensable component of microbial communities due to their high genetic diversity and a considerable number of metabolically active lineages (Jones and Lennon, 2010; Leininger et al., 2006; Sjöstedt et al., 2011; Sauret et al., 2014; Jiao et al.,

\*Corresponding author.

E-mail address: [lana\\_l@mail.ru](mailto:lana_l@mail.ru) (E.V. Lavrentyeva)

**Received:** June 02, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2017). In the Barguzin depression, several soda lakes have relatively high sodium carbonate content. Recent studies of the taxonomic composition of microbial communities in these saline lakes, using high-throughput 16S rRNA gene sequencing, have focused primarily on abundant taxa (>1%) (Lavrentyeva et al., 2020; Lavrentyeva et al., 2023). In this context, our study is the first comprehensive investigation of the taxonomic diversity and potential ecological functions of abundant, intermediate, and rare subcommunities in Lake Nukhe-Nur (the Barguzin depression).

## 2. Materials and methods

Lake Nukhe-Nur (53°38'781" N, 109°56'807" E, elevation 479 m above sea level), with an area of about 2-2.5 km<sup>2</sup>, is located in the steppe part of the valley, on the right bank of the Barguzin River. The lake consists of two reservoirs and has the shape of an asymmetrical figure eight, extending from north to south. Bottom sediments are represented by finely dispersed silt that uniformly covers the lake bottom. Sampling was carried out in the northern reservoir of Lake Nukhe-Nur.

Bottom water pH and temperature were measured during the summer season using a portable pH meter pH-200 (HM Digital, South Korea) with a sensor thermometer. Mineralization was determined using a TDS-4 test conductometer (Singapore). For hydrochemical analysis, water was sampled in a sterile plastic bottle. The analysis of macrocomponent composition of water was carried out by hydrochemical methods at the Research Equipment Sharing Center, Geological Institute SB RAS (Russia, Ulan-Ude).

Lake Nukhe-Nur (the northern reservoir) is a carbonate-sodium type lake. The main cations in the water were Na<sup>+</sup> (105.90-106.62 mg/L) and Ca<sup>2+</sup> (84.24-85.80 mg/L), while the dominant anions were HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (472.34-476.17 mg/L) and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (75.97-76.43 mg/L). The mean water temperature in mid-July was 16.7 °C, while the pH of the water was alkaline, ranging from 8.54 to 8.62.

For molecular genetic analysis, bottom sediment samples were collected in sterile 15 ml Falcon plastic tubes and fixed with ethanol to a final concentration of 50% (v/v). Samples were shipped to the laboratory within 24 hours and stored at +4 °C until DNA extraction.

DNA was extracted from the bottom sediments using DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's protocol. Qualitative and quantitative evaluation of the obtained DNA preparations was performed using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using primers 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') and 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Amplification was conducted under conditions previously described (Brouchkov et al., 2017). Sequencing was performed at "Biospark" Center (Moscow) on a MiSeq system (Illumina, USA) using a reagent kit that provided a read length of 300 nucleotides from each end of the amplicon. Demultiplexing was conducted using the

appropriate scripts included in QIIME software version 1.9.0 (Caporaso et al., 2010). Subsequent processing and analysis of the sequences was also performed in QIIME version 1.9.0. Data were filtered with a minimum nucleotide read quality score of 30 and a minimum read length of 350 bp. Chimera checking was performed using the identify\_chimeric\_seqs.py script with the USEARCH algorithm version 6.1544 (Edgar, 2010) and the Silva 123 16S-rRNA reference database (Quast et al., 2013).

The OTU table was generated using the pick\_open\_reference\_otus.py script. Sequences were clustered into OTUs with a cutoff value of 97% (Schloss and Handelsman, 2006) using the USEARCH algorithm version 6.1544 (Edgar, 2010) and the Silva 123 16S-rRNA reference database (Quast et al., 2013). The NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) servers were utilized to identify the closest homologs. To process the data annotated in the SILVA database, the program Tax4Fun was used. The resulting table contained the KO (KEGG ORTHOLOGY) relative abundance values. The KO profiles were used for functional diversity profiling based on the KEGG pathways, modules, or EC categories.

Sampling was performed in different biotopes: microbial mats (m) and bottom sediments (s). The rare and abundant OTUs were arbitrarily defined as follows: 'A - abundant': >1% and 'R - rare': <0.1% (Pedrós-Alió, 2006). Taxa abundant between 0.1 and 1% were defined as 'I - intermediate' subcommunity. Because the cutoff values used to identify rare taxa may affect the main results of this study, we also tested the 1% cutoff (in addition to 0.1%) to ascertain that the observed significance of the results is not an artifact (Wenkai et al., 2017).

## 3. Results

### 3.1. Microbial diversity and its composition (abundant, intermediate and rare subcommunities)

A total of 80,031 sequences were obtained from six sediment and microbial mat samples. Rarefaction analysis indicated that the number of sequence reads was sufficient to cover most taxa in each sampling. The observed OTUs, as well as Shannon and Simpson indices in the three subcommunities of the studied lake, are presented in Table.

A total of 18,223 OTUs were obtained from the microbial communities of microbial mats and bottom sediments. Among these, 62, 769, and 17,392 OTUs were identified as abundant, intermediate, and rare, respectively. The Venn diagram (Fig. 1) illustrates the distribution of abundant, intermediate, and rare OTUs. Notably, 27 OTUs were found to be common across the abundant, intermediate, and rare subcommunities in microbial mats. In contrast, only 9 OTUs were common among the abundant, intermediate, and rare subcommunities in bottom sediments. It is characteristic that no OTUs were common between the abundant and



**Table.** Alpha diversity indices at the 97% OTU level of 16S rRNA gene libraries of the studied soda lake samples

Biotope	Subcommunity	Number of reads	Number of OTUs	Simpson index	Shannon index	Community contribution, %
NN_1m	A	5559	11	0.73	1.8	40
NN_1m	I	4020	120	0.99	4.6	30
NN_1m	R	4035	2038	1.00	7.5	30
NN_2m	A	6132	16	0.88	2.5	50
NN_2m	I	2906	98	0.98	4.4	24
NN_2m	R	3181	1634	1.00	7.3	26
NN_3m	A	6137	16	0.89	2.5	45
NN_3m	I	3338	98	0.98	4.4	24
NN_3m	R	4282	2126	1.00	7.5	31
NN_1s	A	2217	8	0.86	2.0	15
NN_1s	I	5821	157	0.99	4.9	39
NN_1s	R	6848	3514	1.00	8.0	46
NN_2s	A	647	3	0.63	1.1	5
NN_2s	I	5328	163	0.99	4.9	40
NN_2s	R	7379	4347	1.00	8.3	55
NN_3s	A	1564	8	0.84	2.0	13
NN_3s	I	4317	133	0.99	4.7	35
NN_3s	R	6320	3733	1.00	8.2	52

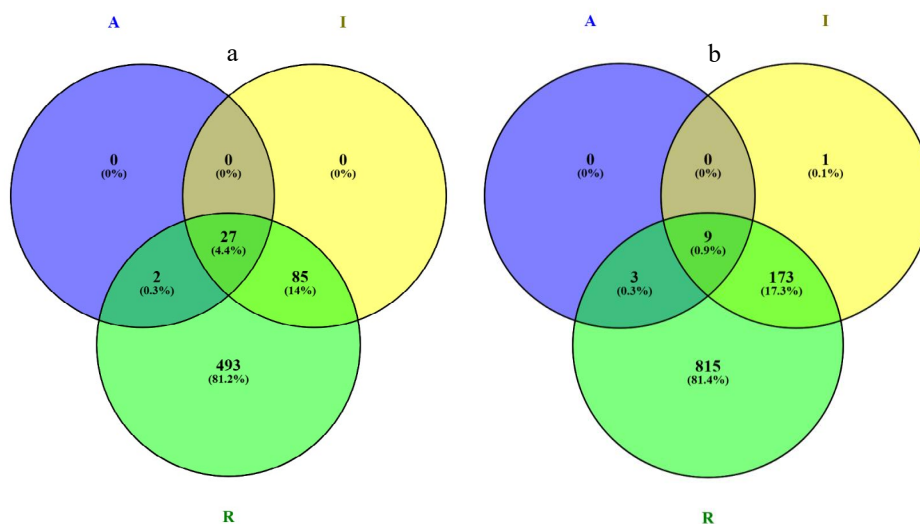
intermediate subcommunities in both microbial mats and bottom sediments.

In microbial mats, 85 OTUs were common to the intermediate and rare subcommunities and 2 OTUs were common to the abundant and rare subcommunities. In the microbial communities of bottom sediments, 173 OTUs were common to the intermediate and rare subcommunities and 3 OTUs were common to the abundant and rare subcommunities. The identified abundant, intermediate, and rare OTUs covered 5-50%, 24-40%, and 26-55% of the total sequences obtained, respectively.

Furthermore, 493 and 815 OTUs were identified as unique in the rare microbial mat and bottom sediment subcommunities, respectively.

In the abundant subcommunity (>1%) of microbial mats, the major phyla were *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacteroidota*, *Bacillota*, *Thermodesulfobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Epsilonbacteraeota*, *Deinococcota*, and *Planctomycetota*. At the family level, the most prevalent OTUs (>1%) were assigned to *Rhodocyclaceae*, *Trueperaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Trueperaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sulfurospirillaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Nitrincolaceae*, *Cyanobiaceae*, and *Ectothiorhodospiraceae*.

The abundant subcommunity (>1%) of bottom sediments was dominated by the phyla *Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, and *Bacillota*. At the family level, the most prevalent OTUs were assigned to ML635J-40 aquatic



**Fig.1.** Common and unique OTUs in different subcommunities (A – abundant, I – intermediate, and R – rare) in the samples of microbial mats (a) and bottom sediments (b) of Lake Nukhe-Nur.

group, *Anaerolineaceae*, *Bacteroidetes vadinHA17*, *Hydrogenophilaceae*, *Rhodocyclaceae*, and *Woeseiaceae*.

Analysis of phylogenetic composition revealed that the intermediate subcommunity (0.1-1%) was slightly different from the more abundant subcommunity, but was more diverse. Specifically, the top dominant phyla in the intermediate subcommunity of microbial mat were as follows: *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacteroidota*, *Bacillota*, *Thermodesulfobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Epsilonbacteraeota*, *Deinococcota*, *Planctomycetota*, *Acidobacteriota*, and *Spirochaetota*. At the family level (0.1-1%), the most prevalent OTUs were assigned to *Chromatiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Rhodocyclaceae*, *Nitrincolaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*. The composition of the intermediate subcommunity of bottom sediments was dominated by *Pseudomonadota*, *Planctomycetes*, *Spirochaetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*. The predominant OTUs at the family level were assigned to *Bacteroidetes vadinHA17*, *Rhodocyclaceae*, *Clostridiaceae 2*, *Spirochaetaceae*, *Chromatiaceae*, *Cryomorphaeae*, *Trueperaceae*.

In contrast, the rare subcommunity (<0.1%) exhibited a phylogenetic composition that was clearly distinct from that of the abundant and intermediate subcommunities. The top dominant phyla in the microbial mat included *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacillota*, *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, and *Kiritimatiellaota*. At the family level (<0.1%), the most prevalent OTUs were assigned to *Pseudomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Syntrophomonadaceae*, *Phycisphaeraceae*, *Woeseiaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Phycisphaeraceae*, *Burkholderiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, and *Desulfobacteraceae*.

In the bottom sediments, the top 10 dominant phyla in the rare subcommunity (<0.1%) were represented by *Euryarchaeota*, *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobiota*, *Epsilonbacteraeota*, and *Deinococcota*. At the family level (<0.1%), the most prevalent OTUs were assigned to

*Methanocorpusculaceae*, *Chromatiaceae*, *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Marinilabiliaceae*, *Bacteroidetes vadinHA17*, *Peptococcaceae*, *Desulfobacteraceae*, and *Syntrophomonadaceae*.

It should be noted that the phyla dominant in the abundant subcommunity were also found in the intermediate and rare subcommunities.

Thus, the abundant, intermediate, and rare subcommunities of microbial mats and bottom sediments serve as important reservoirs of microbial diversity. Notable differences were observed in the community diversity and taxonomic composition of the abundant, intermediate, and rare taxa of each biotope.

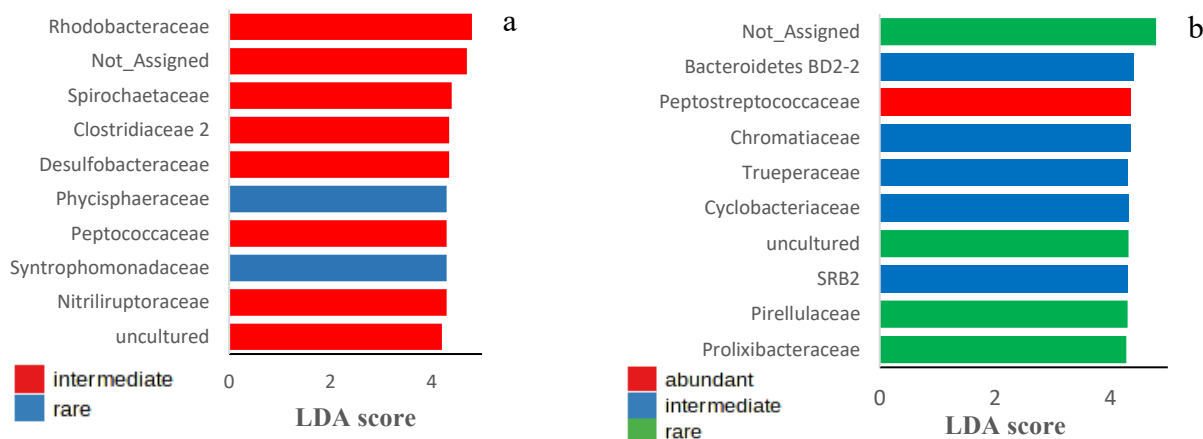
### 3.2. Characterization of microbial communities using LefSe analysis

In accordance with established biomarker screening criteria (LDA > 4), we employed LefSe to identify the microbial lineages that best characterize each subcommunity type (Fig. 2).

The biomarker of the abundant subcommunity for the microbial mat was not identified, whereas for the bottom sediments it was represented by the family *Peptostreptococcaceae*.

The indicator taxa for the intermediate subcommunity of microbial mats were *Rhodobacteraceae*, *Spirochaetaceae*, *Clostridiaceae 2*, *Desulfobacteraceae*, *Peptococcaceae*, and *Nitriliruptoraceae*. In contrast, *Syntrophomonadaceae* and *Phycisphaeraceae* were the indicator taxa for the rare subcommunity of microbial mat.

Representatives of the families *Chromatiaceae*, *Trueperaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Bacteroidetes BD2-2*, and SRB2 were significantly more abundant within the intermediate subcommunity of bottom sediments. Additionally, taxonomic lineages of *Pirellulaceae* and *Prolixibacteraceae* were identified in the rare subcommunity.



**Fig.2.** Biomarkers of different subcommunities (A – abundant, I – intermediate, and R – rare) identified in samples from microbial mats (a) and bottom sediments (b) of Lake Nukhe-Nur (prokaryotic taxa that best characterize each subcommunity type using LDA scores).

### 3.3. Functional prediction

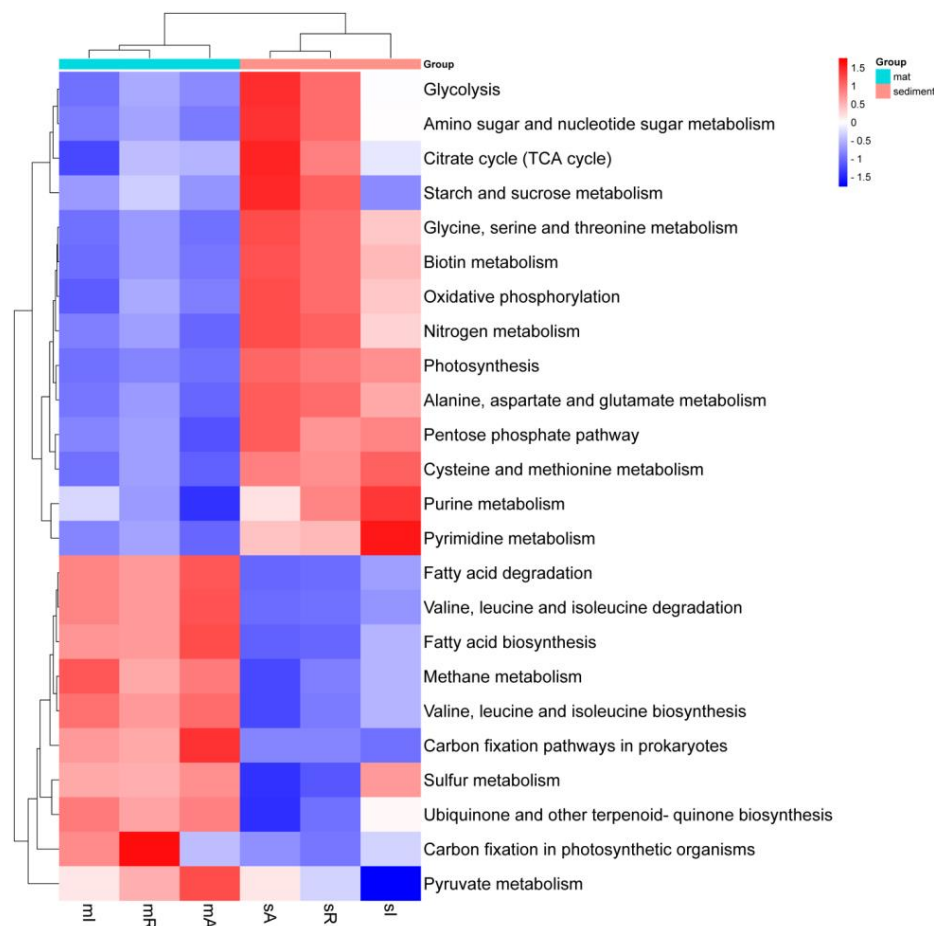
A heatmap of functional prediction of microbial subcommunities in microbial mats and bottom sediments was generated based on the genes annotated in the KEGG database (Fig. 3). The analysis revealed the presence of 10 enriched pathways in the intermediate and rare subcommunities of microbial mats, as well as 14 enriched pathways in the abundant and rare subcommunities of bottom sediments. Genes related to methane, sulfur, fatty acid metabolism, carbon fixation, synthesis and degradation of valine, leucine and isoleucine, as well as ubiquinone synthesis and pyruvate metabolism were predicted in the subcommunities of microbial mats.

In all subcommunities of bottom sediments, enriched pathways were represented by nucleotide metabolism, amino acid, nitrogen, and biotin metabolism, as well as oxidative phosphorylation, photosynthesis, and the pentose phosphate pathway for glucose oxidation. The intermediate subcommunity of bottom sediments exhibited specific characteristics, with predicted 11 metabolic pathways, including sulfur metabolism, which had previously been predicted for microbial mats.

## 4. Discussion

Jousset et al., 2017 reported that between 1.5% and 28% of all microbes are “conditionally rare taxa”, which are typically rare in most conditions, but in cer-

tain instances are dominant. Often overlooked, these taxa may hold the key to understanding the formation and functioning of microbial communities (Jousset et al., 2017). In contemporary research, rare species are increasingly recognized as drivers of key functions in terrestrial and aquatic ecosystems. This is primarily due to the fact that species that are considered functionally insignificant under certain environmental conditions can become important under changing conditions, providing new interspecific interactions for community functioning (Shade et al., 2014; Fetzer et al., 2015). To date, numerous taxa belonging to the abundant subcommunity (representing more than 1% of the total number of all sequences) have formed the basis of contemporary understanding of microbial diversity in the lakes of the Barguzin depression (Lavrentyeva et al., 2020; Lavrentyeva et al., 2023). This study provides new insights into the structure and composition of microbial communities in the ecosystem of soda Lake Nukhe-Nur. The differentiation of the microbial community into abundant, intermediate, and rare subcommunities has expanded our understanding of the composition and structure of the microbial community in soda Lake Nukhe-Nur. The diversity indices have demonstrated that the rare subcommunity made the greatest contribution to the composition of microbial mats and bottom sediments of Lake Nukhe-Nur. Overall, the rare and intermediate subcommunities contributed to the community’s diversity and provided a genetic resource pool for Lake Nukhe-Nur, which can be activated under changing environmental conditions



**Fig.3.** The potential microbial ecological functions identified from prediction and their relative abundance in the abundant, intermediate, and rare subcommunities of the studied soda lake Nukhe-Nur.

(seasonal temperature changes, fluctuations in salinity, pH, etc.).

With regard to taxonomic diversity, our findings were in line with those of previous studies, which indicated that the dominant taxa observed in the abundant subcommunity (>1%) (*Pseudomonadota* and CFB bacteria) were commonly present in microbial mats and bottom sediments of other soda lakes (Jiang et al., 2006; Szabó et al., 2017). A high abundance of these bacteria has been previously reported in various alkaline lakes (Humayoun et al., 2003; Vavourakis et al., 2016; Zhao et al., 2020). The presence of unclassified and unculturable prokaryotes in Lake Nukhe-Nur, in addition to the dominant taxa, suggests that these groups may play a significant role in the ecosystem of this lake.

Using established biomarker screening criteria (LDA score >4), we assessed the significance of differences between subcommunities at the family level. It was found that *Peptostreptococcaceae* can serve as a biomarker for an abundant subcommunity of bottom sediments. Bacteria of the family *Peptostreptococcaceae* were abundant in the bottom sediments of the lake studied and their share was more than 1%. Previously, He et al., 2022 showed that members of the family *Peptostreptococcaceae* were widely distributed in saline lakes (salinity >35g/L) of the Tibetan Plateau.

Bacteria enriched in the intermediate subcommunity (0,1-1%) of microbial mats and bottom sediments were assigned to *Rhodobacteraceae*, *Spirochaetaceae*, *Clostridiaceae* 2, *Desulfobacteraceae*, *Peptococcaceae*, *Nitiliruptoraceae*, *Chromatiaceae*, *Trueperaceae*, *Cyclobacteriaceae*, and SRB2, which have previously been found in soda lakes in Kenya, the Kulunda Steppe, and Mongolia Sorokin et al., 2004; Rees et al., 2004; Sorokin and Kuenen, 2005; Grant and Jones, 2016; Tandon et al., 2020). Representatives of the rare subcommunity of microbial mats (<0,1%), specifically *Syntrophomonadaceae* of the phylum *Bacillota*, has the capacity to convert fatty acids produced by fermenting bacteria into acetate, formate, or hydrogen, which can then be utilized by methanogens (Dworkin et al., 2006). Typically, syntrophic bacteria can be found in environments containing decomposing organic matter in the absence of inorganic electron acceptors.

The aerobic organoheterotrophic *Phycisphaerae* of the phylum *Planctomycetota* are also a biomarker of a rare subcommunity (<0.1%) of microbial mats. Metabolic analysis of *Phycisphaerae* revealed that they are capable of utilizing complex sugars (Robbins et al., 2016). Currently, little is known about the family *Phycisphaerae* isolated from salt lakes. However, it has been reported that an isolate of the bacterium *Phycisphaerales* PLM2.Bin57, derived from a microbial mat of a Canadian soda lake, has undergone whole-genome shotgun sequencing and been registered in NCBI (BioSample: SAMN10237425).

The family *Pirellulaceae* of the phylum *Planctomycetota* is a representative of a rare subcommunity (<0.1%) of the bottom sediments of Lake Nukhe-Nur. Espín et al., 2021 reported that representatives of the *Pirellulaceae* family were involved in the anammox processes in the bottom sediments of stratified saline

lakes in Spain. Members of the family *Prolixibacteraceae* (phylum *Bacteroidota*) are also biomarkers of a rare subcommunity in bottom sediments and include Gram-negative bacteria that specialize in the degradation of high molecular weight compounds in the marine environment (Fernandez-Gomez et al., 2013).

A functional prediction of microbial communities in microbial mats and bottom sediments of Lake Nukhe-Nur showed a wide potential diversity of metabolic pathways. In addition, its rare subcommunities exhibited a comparable diversity of predicted functions to the abundant subcommunities. This likely confirms the important role of rare taxa in ecosystem stability in response to environmental changes (Ashley et al., 2012; Lynch and Neufeld, 2015).

The conducted studies demonstrated that the microbial communities of Lake Nukhe-Nur exhibit high taxonomic and functional diversity. A relatively small number of abundant taxa coexist with a significant proportion of rare taxa. Assessing microbial communities by considering abundant, intermediate, and rare subcommunities is important for understanding the heterogeneous and rapidly changing nature of soda lake ecosystems in a cryoarid climate.

## Acknowledgements

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation 24-24-20050, <https://rscf.ru/en/project/24-24-20050/>.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Ashley S., Hannes P., Allison S.D. et al. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* 3:416. DOI: [10.3389/fmicb.2012.00417](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417)
- Brouchkov A., Kabilov M., Filippova S. et al. 2017. Bacterial community in ancient permafrost alluvium at the Mammoth Mountain (Eastern Siberia). *Gene* 636: 48–53. DOI: [10.1016/j.gene.2017.09.021](https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.021)
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336. DOI: [10.1038/nmeth.f.303](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303)
- Chen L., Hu B.X., Dai H. 2019. Characterizing microbial diversity and community composition of groundwater in a salt-freshwater transition zone. *Science of the Total Environment* 678: 574–584. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.05.017](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.017)
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. 2006. *The Prokaryotes*: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. New York: Springer Science and Business Media.
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460–2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Espín Y., Menchén A., Moreno J.L. et al. 2021. Water and sediment bacterial communities in a small Mediterranean, oxygen-stratified, saline lake (Lake Alboraj, SE Spain). *Applied Sciences* 11: 6309. DOI: [10.3390/app11146309](https://doi.org/10.3390/app11146309)
- Fernandez-Gomez B., Richter M., Schuler M. et al. 2013. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics



approach. *ISME Journal* 7(5): 1026–1037. DOI: [10.1038/ismej.2012.169](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.169)

Fetzer I., Johst K., Schaewe R. et al. 2015. The extent of functional redundancy changes as species roles shift in different environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 112: 14888–14893.

Grant W.D., Jones B.E. 2016. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes. In: Schagerl M. (Ed.), *Soda lakes of East Africa*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 97–148.

He Y., He L., Wang Z. et al. 2022. Salinity shapes the microbial communities in surface sediments of salt lakes on the Tibetan plateau, China. *Water* 14(24): 4043. DOI: [10.3390/w14244043](https://doi.org/10.3390/w14244043)

Humayoun S.B., Bano N., Hollibaugh J.T. et al. 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 1030–42. DOI: [10.1128/AEM.69.2.1030-1042](https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1030-1042)

Jia Y., Zhao S., Guo W. et al. 2022. Sequencing introduced false positive rare taxa lead to biased microbial community diversity, assembly, and interaction interpretation in amplicon studies. *Environmental Microbiome* 17: 43. DOI: [10.1186/s40793-022-00436-y](https://doi.org/10.1186/s40793-022-00436-y)

Jiang H.C., Dong H.L., Zhang G.X. et al. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3832–3845. DOI: [10.1128/AEM.02869-05](https://doi.org/10.1128/AEM.02869-05)

Jiao S., Luo Y., Lu M. et al. 2017. Distinct succession patterns of abundant and rare bacteria in temporal microcosms with pollutants. *Environmental Pollution* 225: 497–505. DOI: [10.1016/j.envpol.2017.03.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.015)

Jones S.E., Lennon J.T. 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107(13): 5881–5886. DOI: [10.1073/pnas.0912765107](https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107)

Jousset A., Bienhold C., Chatzinotas A. 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME Journal* 11(4): 853–862. DOI: [10.1038/ismej.2016.174](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174)

Lavrentyeva E.V., Erdyneeva E.B., Banzaraksava T.G. et al. 2020. Prokaryotic diversity in the biotopes of the Gudzhirganskoe salinellake (Barguzin valley, Russia). *Microbiology* 89: 359–368. DOI: [10.1134/S0026261720030157](https://doi.org/10.1134/S0026261720030157)

Lavrentyeva E., Banzaraksava T., Dambaev V. et al. 2023. Taxonomic diversity and functional potential of microbial communities in salt lakes Gudzhirganskoe and Nukhe-Nur (Barguzin depression, Baikal Rift Zone). *Biological Communications* 68(2): 86–96. DOI: [10.21638/spbu03.2023.203](https://doi.org/10.21638/spbu03.2023.203)

Leininger S., Urlich T., Schloter M. et al. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806–809. DOI: [10.1038/nature04983](https://doi.org/10.1038/nature04983)

Lynch Michael D.J., Neufeld J.D. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology* 13(4): 217–29. DOI: [10.1038/nrmicro3400](https://doi.org/10.1038/nrmicro3400)

Pedró-Alió C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* 14: 257–263. DOI: [10.1016/j.tim.2006.04.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.007)

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D590–D596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)

Rees H.C., Grant W.D., Jones B.E. et al. 2004. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods. *Extremophiles* 8: 63–71. DOI: [10.1007/s00792-003-0361-4](https://doi.org/10.1007/s00792-003-0361-4)

Robbins S.J., Evans P.N., Parks D.H. et al. 2016. Genome-centric analysis of microbial populations enriched by hydro-

lic fracture fluid additives in a coal bed methane production well. *Frontiers in Microbiology* 7: 731. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00731](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00731)

Sang S.L., Zhang X.Y., Dai H. et al. 2018. Diversity and predictive metabolic pathways of the prokaryotic microbial community along a groundwater salinity gradient of the Pearl River Delta, China. *Scientific Reports* 8: 1–11. DOI: [10.1038/s41598-018-35350-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-35350-2)

Sauret C., Séverin T., Vétion G. et al. 2014. Rare biosphere bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. *Environmental Pollution* 194: 246–253. DOI: [10.1016/j.envpol.2014.07.024](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.024)

Schloss P.D., Handelsman J. 2006. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10): 6773–6779. DOI: [10.1128/AEM00474-06](https://doi.org/10.1128/AEM00474-06)

Shade A., Jones S.E., Caporaso J.G. et al. 2014. Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *Mbio* 5: e01371–01314.

Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B. et al. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 175–211. DOI: [10.3354/ame028175](https://doi.org/10.3354/ame028175)

Sjöstedt J., Koch-Schmidt P., Pontarp M. et al. 2011. Recruitment of members from the rare biosphere of marine bacterioplankton communities after an environmental disturbance. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1361–1369. DOI: [10.1128/AEM.05542-11](https://doi.org/10.1128/AEM.05542-11)

Sorokin D., Gorlenko V., Namsaraev B. et al. 2004. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes. *Hydrobiologia* 522: 235–248. DOI: [10.1023/B:HYDR.0000029989.73279.e4](https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000029989.73279.e4)

Sorokin D.Y., Kuenen J.G. 2005. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 52(3): 287–295. DOI: [10.1016/j.femsec.2005.02.012](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.012)

Sorokin D.Y., Berben T., Denise E. et al. 2014. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* 8(5). DOI: [10.1007/s00792-014-0670-9](https://doi.org/10.1007/s00792-014-0670-9)

Szabó A., Korponai K., Kerepesi C. et al. 2017. Soda pans of the Pannonian steppe harbor unique bacterial communities adapted to multiple extreme conditions. *Extremophiles* 21(3):639–649. DOI: [10.1007/s00792-017-0932-4](https://doi.org/10.1007/s00792-017-0932-4)

Tandon K., Baatar B., Chiang P.W. et al. 2020. A large-scale survey of the bacterial communities in lakes of western Mongolia with varying salinity regimes. *Microorganisms* 4: 8(11): 1729. DOI: [10.3390/microorganisms8111729](https://doi.org/10.3390/microorganisms8111729)

Vavourakis C.D., Ghai R., Rodriguez-Valera F. et al. 2016. Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Frontiers in Microbiology* 7: 211. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00211](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00211)

Wenkai Y., Hongmei M., Guitao S. et al. 2017. Independent shifts of abundant and rare bacterial populations across East Antarctica glacial foreland. *Frontiers in Microbiology* 8: 1534. DOI: [10.3389/fmicb.2017.01534](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01534)

Zhang H., Xing D., Wu Y. et al. 2023. Editorial: Microbial ecology and function of the aquatic systems. *Frontiers in Microbiology*. 15(13): 1109221. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1109221](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1109221)

Zhang Y., Wu G., Jiang H. et al. 2018. Abundant and rare microbial biospheres respond differently to environmental and spatial factors in Tibetan hot springs. *Frontiers in Microbiology* 9: 2096. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02096](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02096)

Zhao D., Zhang S., Xue Q. et al. 2020. Abundant taxa and favorable pathways in the microbiome of soda-saline lakes in inner Mongolia. *Frontiers in Microbiology* 24(11): 1740. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01740](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01740)

# Обильное и редкое субсообщество в содовом озере Нухэ-Нур (Баргузинская котловина, Россия)



Лаврентьева Е.В.<sup>1,2\*</sup>, Банзаракцаева Т.Г.<sup>1</sup>, Дамбаев В.Б.<sup>1</sup>, Буянтуева Л.Б.<sup>2</sup>, Иванов В.Л.<sup>1</sup>, Никитина Е.П.<sup>3</sup>, Ткачев П.А.<sup>1</sup>, Доржиев Ц.З.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой 6, Улан-Удэ, 670047, Россия

<sup>2</sup> Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, ул. Смолина 20а, Улан-Удэ, 670000, Россия

<sup>3</sup> Байкальский институт природопользования СО РАН, ул. Сахьяновой 6, Улан-Удэ, 670047, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В данной работе мы впервые исследовали состав микробных сообществ обильных, промежуточных и редких субсообществ в содовом озере Нухэ-Нур (Баргузинская котловина) с использованием высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq. Результаты показали, что обильные субсообщества в основном состояли из *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacteroidota* и *Bacillota*. В отличие от них, редкие субсообщества в микробных матах в основном состояли из *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacillota*, *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Kiritimatiellaeota*. В редком субсообществе донных осадков обнаружены *Euryarchaeota*, *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Gemmatimonadota*, *Verrucomicrobiota*, *Epsilonbacteraeota*, *Deinococcota*. Тем не менее, доминирующие филумы обильного субсообщества были обнаружены в промежуточном и редком субсообществах. Прогнозирование микробной экологической функции показало широкое потенциальное разнообразие метаболических путей в обильных, промежуточных и редких субсообществах микробных матов и донных осадков в содовом озере Нухэ-Нур. Редкие субсообщества могут играть более важную роль в разложении органического вещества, чем обильные субсообщества в содовых озерах. В совокупности это исследование обеспечивает лучшее понимание структуры микробного сообщества и потенциальных экологических функций обильных и редких субсообществ в экосистемах содовых озер. Выявленные редкие таксоны открывают новые возможности для экологических, таксономических и геномных открытий в содовых озерах Баргузинской котловины.

**Ключевые слова:** многочисленное, промежуточное, редкое субсообщество, содовое озеро

**Для цитирования:** Лаврентьева Е.В., Банзаракцаева Т.Г., Дамбаев В.Б., Буянтуева Л.Б., Иванов В.Л., Никитина Е.П., Ткачев П.А., Доржиев Ц.З. Обильное и редкое субсообщество в содовом озере Нухэ-Нур (Баргузинская котловина, Россия) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 971-985. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-971](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-971)

## 1. Введение

Микробные сообщества играют ключевую роль в структурировании и функционировании природных водных экосистем (Simon et al., 2002; Sang et al., 2018; Chen et al., 2019; Zhang et al., 2023). Микробные сообщества характеризуются высоким таксономическим и функциональным разнообразием в содовых озерах (Sorokin et al., 2014). Микробные сообщества обычно состоят из обильных микробов с несколькими доминирующими таксонами и многочисленных редких таксонов. По вкладу таксонов в микробное сообщество можно

разделить на многочисленные и редкие (относительная численность  $> 1$  и  $< 0,1\%$  соответственно) таксоны, причем первые вносят значительный вклад в биомассу, но незначительное биоразнообразие, а вторые вносят незначительный вклад в биомассу, но большое биоразнообразие (Zhang et al., 2018). Редкие таксоны хотя и существуют в очень низкой относительной численности, но играют важную экологическую роль в микробных сообществах, что делает их ключевыми участниками микробного разнообразия (Jia et al., 2022). Кроме того, редкие субсообщества могут дифференцированно реагировать

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [lana.l@mail.ru](mailto:lana.l@mail.ru)

Поступила: 02 июня 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



при различных изменениях окружающей среды. Таким образом, редкие субсообщества могут повысить устойчивость микробного сообщества к изменениям параметров окружающей среды (Jones and Lennon, 2010). Недавние исследования на основе высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК показали, что редкие таксоны следует рассматривать в качестве незаменимого компонента микробных сообществ из-за их большого генетического разнообразия и значительного количества метаболически активных линий (Jones and Lennon, 2010; Leininger et al., 2006; Sjöstedt et al., 2011; Sauret et al., 2014; Jiao et al., 2017).

В Баргузинской котловине есть ряд содовых озер, которые представляют собой особый тип солевых озер за счет относительно большого количества карбоната натрия. Все недавние исследования по изучению таксономического состава микробных сообществ солевых озёр Баргузинской котловины с использованием высокопроизводительного секвенирования на основе гена 16S рРНК рассматривали лишь многочисленные таксоны (>1%) (Lavrentyeva et al., 2020; Lavrentyeva et al., 2023). В связи с этим, в данной работе нами впервые было проведено целостное исследование таксономического разнообразия и потенциальных экологических функций многочисленных, промежуточных и редких субсообществ в содовом озере Нухэ-Нур (Баргузинская котловина).

## 2. Материалы и методы

Озеро Нухэ-Нур (53°38'781" с.ш. 109°56'807" в.д., высота 479 м над уровнем моря), площадью около 2-2.5 км<sup>2</sup> располагается в надпойменном понижении на степном участке долины, по правому берегу реки Баргузин. Озеро состоит из двух водоемов, и имеет форму асимметричной восьмерки, вытянутой с севера на юг. Донные отложения представлены мелкодисперсным илом, равномерно покрывающим дно озера. Отбор образцов проводили в северном озере Нухэ-Нур.

В придонной воде (летом) были измерены рН и температура с помощью портативного рН метра рН-200 НМ Digital (Южная Корея) с сенсорным термометром. Минерализацию определяли при помощи тест-кондуктометра TDS-4 (Сингапур). Для гидрохимического анализа воду отбирали в стерильную пластиковую бутылку. Макрокомпонентный состав воды определяли с помощью гидрохимических методов в ЦКП ГИН СО РАН (г. Улан-Удэ).

Нухэ-Нур северный - озеро карбонатно-натриевого типа. Основными катионами воды в нем были Na<sup>+</sup> (105,90–106,62 мг/л) и Ca<sup>2+</sup> (84,24–85,80 мг/л), доминирующими анионами были HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (472,34–476,17 мг/л) и CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (75,97–76,43 мг/л). Средняя температура воды в середине июля составляла 16,7 °С, в то время как рН воды был щелочным и колебался в пределах от 8,54 до 8,62.

Для молекулярно-генетического анализа пробы донных осадков отбирали в стерильные пластиковые 15 мл пробирки типа Falcon и фиксиро-

вали этанолом до конечной концентрации 50% (об./об.). Пробы были доставлены в лабораторию в течение суток и до выделения ДНК находились в холодильнике при + 4°С.

Выделение ДНК из осадков проводили с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, США) по протоколу производителя. Качественную и количественную оценку полученных препаратов ДНК проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Регион V3-V4 гена 16S рРНК был амплифицирован с помощью праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVTGGGTWTCTAAT-3'). Амплификацию проводили в условиях описанных ранее (Brouchkov et al., 2017). Секвенирование проводили в ЦКП "Биоспарк" (г. Москва) на системе MiSeq ("Illumina", США) с использованием набора реагентов, обеспечивающего длину прочтения 300 нуклеотидов с каждого конца ампликона. Демультиплексирование проводили при помощи соответствующих скриптов ПО QIIME версии 1.9.0 (Caporaso et al., 2010). Последующую обработку и анализ последовательностей также проводили в QIIME ver. 1.9.0. Данные были пропущены через фильтр с минимальным качеством прочтения нуклеотида 30 и минимальной длиной прочтения 350 п.о. Проверку прочтений на химерность проводили с помощью скрипта identify\_chimeric\_seqs.py по алгоритму USEARCH версии 6.1544 (Edgar, 2010) и референсной базой прочтений 16S рРНК Silva 123 (Quast et al., 2013). Формирование таблицы ОТЕ производили с помощью скрипта pick\_open\_reference\_otus.py. Последовательности группировали в ОТЕ с уровнем сходства 97% (Schloss and Handelsman, 2006), используя алгоритм USEARCH версии 6.1544 (Edgar, 2010) и референсную базу прочтений 16S рРНК Silva 123 версии (Quast et al., 2013). Серверы NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) были использованы для поиска ближайших гомологов. Программу Tax4Fun использовали для данных, аннотированных в базе данных SILVA. Результатом является таблица, содержащая относительные уровни содержания КО (KEGG ORTHOLOGY). Профили КО использовали для профилирования функционального разнообразия на основе KEGG (пути, модули или категории EC).

Места отбора проб осуществлялись в различных биотопах: микробные маты (m) и донные осадки (s). Редкие и многочисленные ОТЕ были произвольно определены следующим образом: обильные: >1% и редкие: <0,1% (Pedrós-Alió, 2006). Таксоны численностью от 0,1 до 1% были определены как промежуточное субсообщество. Поскольку пороговые значения, используемые для определения редких таксонов, могут повлиять на основные результаты, представленные в этом исследовании, мы проверили пороговое значение 1% помимо 0,1%, чтобы уточнить, что значимость результатов является маловероятным артефактом (Wenkai et al., 2017)

### 3. Результаты

#### 3.1. Микробное разнообразие и состав общей, многочисленной, промежуточной и редкой биосферы

Из 6 образцов донных осадков и микробных матов было получено в общей сложности 80031 последовательностей. Анализ редкостей указывает на то, что количество прочтений последовательностей было достаточным для охвата большинства таксонов в каждой выборке. Наблюдаемые ОТЕ, индексы Shannon и Simpson в трех субсообществах исследуемого озера представлены в Таблице.

В микробных сообществах микробных матов и донных осадков всего было получено 18223 ОТЕ. Из них 62, 769 и 17392 ОТЕ были идентифицированы как многочисленные, промежуточные и редкие соответственно. На диаграмме Венна (Рис. 1) показано распределение обильных, промежуточных и редких ОТЕ. В общей сложности 27 ОТЕ были общими для многочисленного, промежуточного и редкого субсообществ микробного мата. Для донных осадков 9 ОТЕ были распространенными среди многочисленного, промежуточного и редкого субсообществ. Характерно, что в микробном мате и в донных осадках не обнаружено общих ОТЕ у обильного и промежуточного субсообществ.

В микробном мате было обнаружено 85 общих ОТЕ для промежуточного и редкого субсообществ и 2 общих ОТЕ для обильного и редкого субсообществ.

В микробных сообществах донных осадков 173 ОТЕ были общими для промежуточного и редкого субсообществ и 3 ОТЕ были общими для обильного и редкого субсообщества.

Идентифицированные обильные, промежуточные и редкие ОТЕ охватывали 5-50%, 24-40% и 26-55% от общего числа полученных последовательностей соответственно.

Кроме того, 493 и 815 ОТЕ были уникальными в редком субсообществе микробных матов и донных осадках, соответственно.

В обильном субсообществе ( $\geq 1\%$ ) микробных матов доминирующими филумами были *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacteroidota*, *Bacillota*, *Thermodesulfobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Epsilonbacteraeota*, *Deinococcota* и *Planctomycetota*. На уровне семейства наиболее распространенные ОТЕ ( $\geq 1\%$ ) были отнесены к *Rhodocyclaceae*, *Trueperaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Trueperaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sulfurospirillaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Nitrincolaceae*, *Cyanobiaceae*, and *Ectothiorhodospiraceae*. В обильном субсообществе донных осадков ( $\geq 1\%$ ) доминировали филумы *Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Bacillota*. На уровне семейств в донных осадках обнаружено наибольшее количество ОТЕ ( $\geq 1\%$ ), отнесенных к ML635J-40 aquatic group, *Anaerolineaceae*, *Bacteroidetes vadinHA17*, *Hydrogenophilaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Woeseiaceae*.

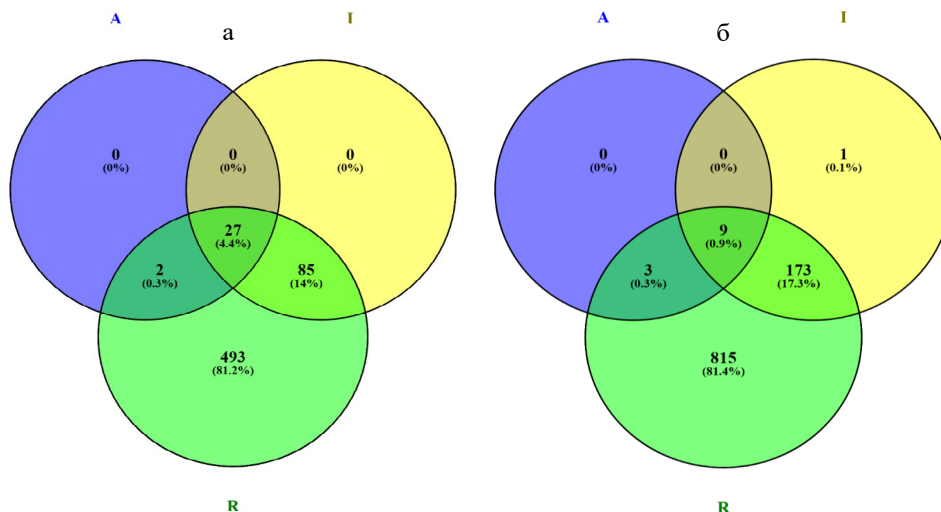
При анализе филогенетического состава было показано, что промежуточное субсообщество, незначительно отличалось от многочисленного суб-

**Таблица.** Индексы альфа-разнообразия на уровне 97% ОТЕ библиотек генов 16S рРНК исследованных образцов содового озера

Биотоп	Субсообщество	Количество прочтений	Количество ОТЕ	Simpson	Shannon	Вклад в сообщество %
NN_1m	A	5559	11	0,73	1,8	40
NN_1m	I	4020	120	0,99	4,6	30
NN_1m	R	4035	2038	1,00	7,5	30
NN_2m	A	6132	16	0,88	2,5	50
NN_2m	I	2906	98	0,98	4,4	24
NN_2m	R	3181	1634	1,00	7,3	26
NN_3m	A	6137	16	0,89	2,5	45
NN_3m	I	3338	98	0,98	4,4	24
NN_3m	R	4282	2126	1,00	7,5	31
NN_1s	A	2217	8	0,86	2,0	15
NN_1s	I	5821	157	0,99	4,9	39
NN_1s	R	6848	3514	1,00	8,0	46
NN_2s	A	647	3	0,63	1,1	5
NN_2s	I	5328	163	0,99	4,9	40
NN_2s	R	7379	4347	1,00	8,3	55
NN_3s	A	1564	8	0,84	2,0	13
NN_3s	I	4317	133	0,99	4,7	35
NN_3s	R	6320	3733	1,00	8,2	52

**Примечание:** А – обильное субсообщество  $\geq 1\%$  ОТЕ; I – промежуточное субсообщество 0,1-1% ОТЕ; R – редкое субсообщество  $< 0,1\%$  ОТЕ





**Рис.1.** Общие и уникальные ОТЕ в различных субсообществах (многочисленные А, промежуточные I и редкие R) в образцах микробных матов (а) и донных осадков (б) озера Нухэ-Нур

сообщества, но было более разнообразным. В частности, в топ доминирующих филумов в промежуточном субсообществе (0,1-1%) микробных матов вошли *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacteroidota*, *Bacillota*, *Thermodesulfobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Epsilonbacteraeota*, *Deinococcota*, *Planctomycetota*, *Acidobacteriota*, *Spirochaetota*. На уровне семейств наиболее распространенные ОТЕ (0,1-1%) были отнесены к *Chromatiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Rhodocyclaceae*, *Nitrincolaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*. В составе промежуточного субсообщества (0,1-1%) донных осадков доминировали *Pseudomonadota*, *Planctomycetes*, *Spirochaetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*. Наибольшее ОТЕ (0,1-1%) на уровне семейств отнесено к *Bacteroidetes vadinHA17*, *Rhodocyclaceae*, *Clostridiaceae 2*, *Spirochaetaceae*, *Chromatiaceae*, *Cryomorphaceae*, *Trueperaceae*.

Напротив, редкое субсообщество продемонстрировало филогенетический состав, явно отличающийся от обильного и промежуточного субсообществ. В топ доминирующих филумов (<0,1%) в микробном мате вошли *Pseudomonadota*, *Cyanobacteriota*, *Bacillota*, *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, and *Kiritimatiellaeota*. На уровне семейства наиболее многочисленные ОТЕ (<0,1%) отнесены к *Pseudomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Syntrophomonadaceae*, *Phycisphaeraceae*, *Woeseiaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Phycisphaeraceae*, *Burkholderiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Desulfobacteraceae*.

В топ-10 наиболее доминирующих филумов редкого субсообщества (<0,1%) в донных осадках отнесены *Euryarchaeota*, *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobiota*, *Epsilonbacteraeota*, *Deinococcota*. На уровне семейства наиболее распространённые ОТЕ (<0,1%) отнесены к *Methanocorpusculaceae*, *Chromatiaceae*, *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Marinilabiliaceae*, *Bacteroidetes vadinHA17*, *Peptococcaceae*, *Desulfobacteraceae*, and *Syntrophomonadaceae*.

Следует отметить, что доминирующие

филумы обильного субсообщества были обнаружены в промежуточном и редком субсообществах.

Таким образом, обильные, редкие и промежуточные субсообщества служат огромными хранилищами микробного разнообразия в микробных матах и донных осадках, а разнообразие сообществ и таксономический состав многочисленных, промежуточных и редких таксонов каждого биотопа заметно отличались.

### 3.2. Характеристика микробных сообществ с помощью LEfSe анализа

В соответствии с установленными критериями скрининга биомаркеров (оценка LDA > 4) мы использовали LEfSe для идентификации специализированных линий микроорганизмов, которые лучше всего характеризуют каждый тип субсообщества (Рис. 2).

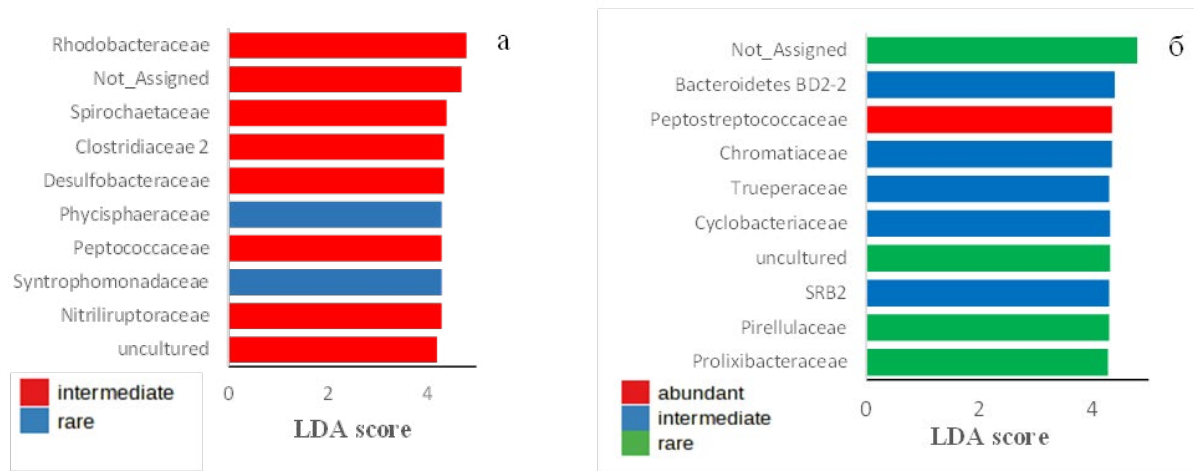
Характерно, что для микробного мата не обнаружен биомаркер обильного субсообщества. Тогда как в донных осадках обильное субсообщество представлено семейством *Peptostreptococcaceae*.

Семейства *Rhodobacteraceae*, *Spirochaetaceae*, *Clostridiaceae 2*, *Desulfobacteraceae*, *Peptococcaceae*, *Nitriliruptoraceae* были индикаторными таксонами для промежуточного субсообщества микробного мата, *Syntrophomonadaceae* и *Phycisphaeraceae* являлись маркерными таксонами для редкого субсообщества микробного мата.

Представители семейства *Chromatiaceae*, *Trueperaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Bacteroidetes BD2-2*, *SRB2* были значительно более многочисленны в промежуточном субсообществе донных осадков. В редком субсообществе выявлены таксономические линии *Pirellulaceae* и *Prolixibacteraceae*.

### 3.3. Функциональный прогноз

Сгенерированная тепловая карта функционального прогнозирования микробных сообществ мата и донных осадков на основе аннотиро-



**Рис.2.** Биомаркеры различных субсообществ (многочисленные А, промежуточные I и редкие R) определенные в образцах микробных матов (а) и донных осадков (б) озера Нухэ-Нур (прокариотические таксоны, которые лучше всего характеризуют каждый тип субсообщества с помощью баллов LDA).

ванных генов КЕГГ, показала 10 более обогащенных путей в промежуточном и редком субсообществах микробных матов и 14 более обогащенных путей в обильном и редком субсообществах донных осадков (Рис. 3). В субсообществах микробного мата были спрогнозированы гены, связанные с метаболизмом метана, серы, жирных кислот, фиксацией углерода, синтезом и разрушением валина, лейцина и изолейцина, синтезом убихинона и метаболизмом пирувата.

Пути, обогащенные во всех субсообществах донных осадков, были представлены нуклеотидным метаболизмом, метаболизмом аминокислот, азота, биотина, окислительным фосфорилированием, фотосинтезом и пентозофосфатным путем окисления глюкозы. Промежуточное субсообщество донных осадков имело свои особенности. В данном субсообществе было предсказано 11 метаболических путей, в том числе метаболизм серы, который ранее был спрогнозирован в микробном мате.

#### 4. Обсуждение

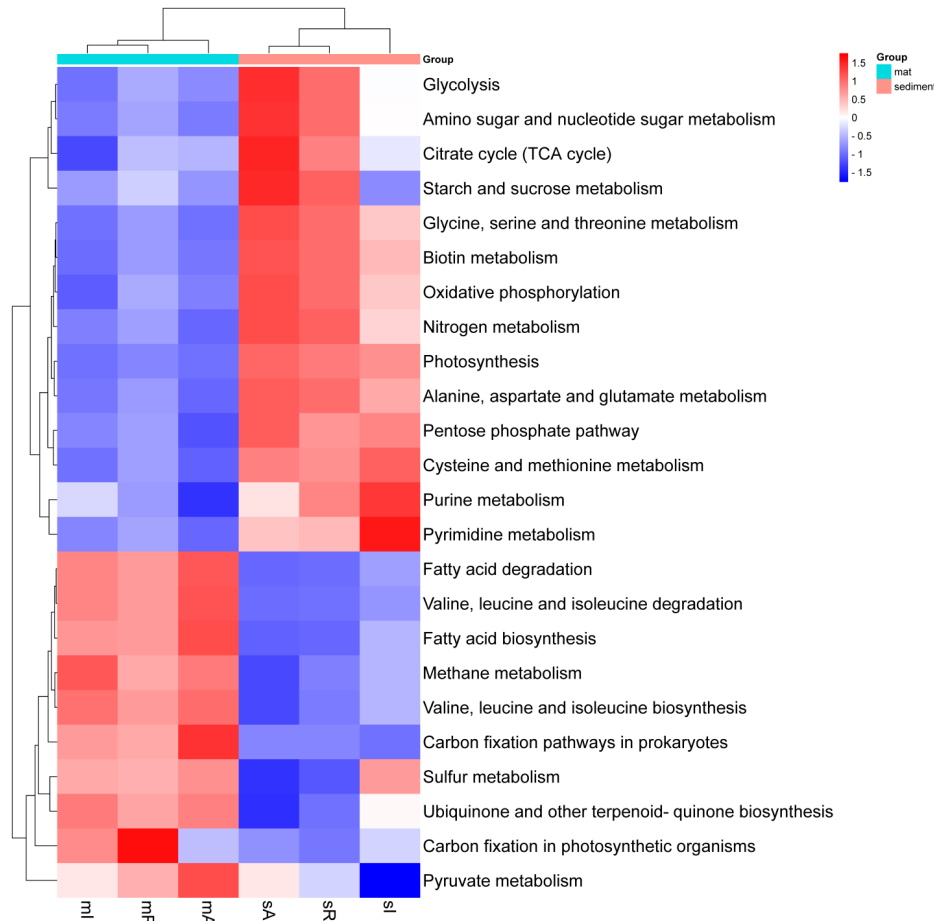
В статье Jousset et al., 2017 сообщается, что от 1,5 до 28% всех микробов являются «условно редкими таксонами», которые редки в большинстве случаев, но иногда становятся доминирующими. Эти таксоны, которые часто упускаются из виду, могут быть ключом к пониманию формирования и функционирования сообществ (Jousset et al., 2017). В современных исследованиях редкие виды все чаще признаются движущей силой ключевых функций в наземных и водных экосистемах. В первую очередь это связано с тем, что в естественных условиях окружающей среды, редкие виды могут стать важными компонентами в изменяющихся условиях, обеспечивая новые межвидовые взаимодействия для функционирования сообщества (Shade et al., 2014; Fetzer et al., 2015).

До сегодняшнего дня, многочисленные таксоны обильного субсообщества (>1% от общего числа всех последовательностей) составляли основу большей части наших современных представлений

о микробном разнообразии озер Баргузинской котловины (Lavrentyeva et al., 2020; Lavrentyeva et al., 2023). Это исследование дает новое представление о структуре и составе микробных сообществ в экосистеме содового озера Нухэ-Нур. Проведенная дифференциация микробного сообщества на обильные, промежуточные и редкие субсообщества расширили наше понимание состава и структуры исследуемого содового озера Нухэ-Нур. Индексы разнообразия показали наибольший вклад редкого субсообщества в состав микробных матов и донных осадков озера Нухэ-Нур. В целом редкие и промежуточные субсообщества вносят вклад в разнообразие сообщества и обеспечивают пул генетических ресурсов озера Нухэ-Нур, которые могут быть активированы при изменении условий окружающей среды (сезонные изменения температуры, колебания минерализации, pH и другие).

По таксономическому разнообразию наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями, показывающими, что доминирующие таксоны обильного субсообщества (>1%) (*Pseudomonadota* и бактерии филогенетической группы CFB) обычно наблюдаются в микробных матах и донных отложениях других содовых озер (Jiang et al., 2006; Szabó et al., 2017). Ранее сообщалось о большом количестве таких бактерий в различных щелочных озерах (Humayoun et al., 2003; Vavourakis et al., 2016; Zhao et al., 2020). Наряду с доминирующими таксонами, присутствие неклассифицированных и некультивируемых прокариот в озере Нухэ-Нур, может указывать на значительную роль этих групп в экосистеме этого озера.

Сравнение значимости различий между субсообществами на уровне семейства в соответствии с установленными критериями скрининга биомаркеров (оценка LDA >4) мы обнаружили *Peptostreptococcaceae* как биомаркер обильного субсообщества для донных осадков. Бактерии семейства *Peptostreptococcaceae* распространены в донных осадках исследуемого нами озера и их доля составила более 1%. Ранее, в работе He et al., 2022 было показано, что представители семейства



**Рис.3.** Прогнозируемые потенциальные экологические функции и их относительное обилие в обильном, промежуточном и редком субсообществах содового озера Нухэ-Нур.

*Peptostreptococcaceae* широко распространены в соленых озерах (соленость > 35г/л) Тибетского плато.

Бактерии, обогащенные в промежуточном субсообществе (0,1-1%) микробного мата и донных осадков были отнесены к *Rhodobacteraceae*, *Spirochaetaceae*, *Clostridiaceae* 2, *Desulfobacteraceae*, *Peptococcaceae*, *Nitiliruptoraceae*, *Chromatiaceae*, *Trueperaceae*, *Cyclobacteriaceae*, SRB2, которые ранее обнаруживались в содовых озерах Кении, Кулундинской степи, Монголии (Sorokin et al., 2004; Rees et al., 2004; Sorokin and Kuenen, 2005; Grant and Jones, 2016; Tandon et al., 2020). Представители редкого субсообщества микробного мата (<0,1%) *Syntrophomonadaceae* филума *Bacillota* могут преобразовывать жирные кислоты, вырабатываемые ферментирующими бактериями, в ацетат, формиат или водород, которые затем могут потребляться метаногенами (Dworkin et al., 2006). Как правило, синтрофные бактерии обнаруживаются при разложении органического вещества и отсутствии неорганических акцепторов электронов.

Аэробные органогетеротрофные *Phycisphaerae* филума *Planctomycetota* также являются биомаркером редкого субсообщества микробного мата (<0,1%). Метаболический анализ *Phycisphaerae* показал, что они способны использовать сложные сахара (Robbins et al., 2016). В настоящее время мало что известно о семействе *Phycisphaerae*, выделенных из соленых озер. Известно, что благодаря полногеномному shotgun sequence выделен изолят

бактерии *Phycisphaerales* PLM2.Bin57 из микробного мата содового озера Канады и зарегистрирован в NCBI (BioSample: SAMN10237425).

Семейство *Pirellulaceae* филума *Planctomycetota* является представителем редкого субсообщества донных осадков (<0,1%) озера Нухэ-Нур. В работе Espín et al., 2021 отмечено, что в донных отложениях стратифицированного соленого озера Испании представители семейства *Pirellulaceae* участвуют в анаммокс-процессах. Представители семейства *Prolixibacteraceae* филума *Bacteroidota* также являются биомаркерами редкого субсообщества в донных осадках и включают грамотрицательные бактерии, которые специализируются на разложении высокомолекулярных соединений в морской среде (Fernandez-Gomez et al., 2013).

Функциональное прогнозирование в микробных сообществах микробных матов и донных осадков озера Нухэ-Нур показало широкое потенциальное разнообразие метаболических путей. Причем редкие субсообщества микробных матов и донных осадков не уступали по разнообразию прогнозируемых функций от обильных субсообществ, что вероятно подтверждает важную роль редких таксонов в стабильности экосистемы в ответ на изменения окружающей среды (Ashley et al., 2012; Lynch and Neufeld, 2015).

Таким образом, проведенные исследования показали, что микробные сообщества озера Нухэ-Нур отличаются высоким таксономическим и



функциональным разнообразием и при этом относительно небольшое количество распространенных таксонов сосуществует со значительной долей редких таксонов. Оценка микробных сообществ с учетом многочисленных, промежуточных и редких субсообществ имеет решающее значение для понимания неоднородной и быстро меняющейся природы экосистем содовых озер в криоаридном климате.

## Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20050, <https://rscf.ru/project/24-24-20050/>

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Ashley S., Hannes P., Allison S.D. et al. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* 3:416. DOI: [10.3389/fmicb.2012.00417](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417)
- Brouchkov A., Kabilov M., Filippova S. et al. 2017. Bacterial community in ancient permafrost alluvium at the Mammoth Mountain (Eastern Siberia). *Gene* 636: 48–53. DOI: [10.1016/j.gene.2017.09.021](https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.021)
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336. DOI: [10.1038/nmeth.f.303](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303)
- Chen L., Hu B.X., Dai H. 2019. Characterizing microbial diversity and community composition of groundwater in a salt-freshwater transition zone. *Science of the Total Environment* 678: 574–584. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.05.017](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.017)
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. 2006. *The Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York: Springer Science and Business Media.
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460–2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Espín Y., Menchén A., Moreno J.L. et al. 2021. Water and sediment bacterial communities in a small Mediterranean, oxygen-stratified, saline lake (Lake Alboraj, SE Spain). *Applied Sciences* 11: 6309. DOI: [10.3390/app11146309](https://doi.org/10.3390/app11146309)
- Fernandez-Gomez B., Richter M., Schuler M. et al. 2013. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME Journal* 7(5): 1026–1037. DOI: [10.1038/ismej.2012.169](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.169)
- Fetzer I., Johst K., Schaewe R. et al. 2015. The extent of functional redundancy changes as species roles shift in different environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 112: 14888–14893.
- Grant W.D., Jones B.E. 2016. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes. In: Schagerl M. (Ed.), *Soda lakes of East Africa*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 97–148.
- He Y., He L., Wang Z. et al. 2022. Salinity shapes the microbial communities in surface sediments of salt lakes on the Tibetan plateau, China. *Water* 14(24): 4043. DOI: [10.3390/w14244043](https://doi.org/10.3390/w14244043)
- Humayoun S.B., Bano N., Hollibaugh J.T. et al. 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 1030–42. DOI: [10.1128/AEM.69.2.1030-1042](https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1030-1042)
- Jia Y., Zhao S., Guo W. et al. 2022. Sequencing introduced false positive rare taxa lead to biased microbial community diversity, assembly, and interaction interpretation in amplicon studies. *Environmental Microbiome* 17: 43. DOI: [10.1186/s40793-022-00436-y](https://doi.org/10.1186/s40793-022-00436-y)
- Jiang H.C., Dong H.L., Zhang G.X. et al. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3832–3845. DOI: [10.1128/AEM.02869-05](https://doi.org/10.1128/AEM.02869-05)
- Jiao S., Luo Y., Lu M. et al. 2017. Distinct succession patterns of abundant and rare bacteria in temporal microcosms with pollutants. *Environmental Pollution* 225: 497–505. DOI: [10.1016/j.envpol.2017.03.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.015)
- Jones S.E., Lennon J.T. 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107(13): 5881–5886. DOI: [10.1073/pnas.0912765107](https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107)
- Jousset A., Bienhold C., Chatzinotas A. 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME Journal* 11(4): 853–862. DOI: [10.1038/ismej.2016.174](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174)
- Lavrentyeva E.V., Erdyneeva E.B., Banzaraktsaeva T.G. et al. 2020. Prokaryotic diversity in the biotopes of the Gudzhirganskoe salinellake (Barguzin valley, Russia). *Microbiology* 89: 359–368. DOI: [10.1134/S0026261720030157](https://doi.org/10.1134/S0026261720030157)
- Lavrentyeva E., Banzaraktsaeva T., Dambaev V. et al. 2023. Taxonomic diversity and functional potential of microbial communities in salt lakes Gudzhirganskoe and Nukhe-Nur (Barguzin depression, Baikal Rift Zone). *Biological Communications* 68(2): 86–96. DOI: [10.21638/spbu03.2023.203](https://doi.org/10.21638/spbu03.2023.203)
- Leininger S., Urich T., Schloter M. et al. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806–809. DOI: [10.1038/nature04983](https://doi.org/10.1038/nature04983)
- Lynch Michael D.J., Neufeld J.D. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology* 13(4): 217–29. DOI: [10.1038/nrmicro3400](https://doi.org/10.1038/nrmicro3400)
- Pedrós-Alió C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* 14: 257–263. DOI: [10.1016/j.tim.2006.04.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.007)
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D590–D596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)
- Rees H.C., Grant W.D., Jones B.E. et al. 2004. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods. *Extremophiles* 8: 63–71. DOI: [10.1007/s00792-003-0361-4](https://doi.org/10.1007/s00792-003-0361-4)
- Robbins S.J., Evans P.N., Parks D.H. et al. 2016. Genome-centric analysis of microbial populations enriched by hydraulic fracture fluid additives in a coal bed methane production well. *Frontiers in Microbiology* 7: 731. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00731](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00731)
- Sang S.L., Zhang X.Y., Dai H. et al. 2018. Diversity and predictive metabolic pathways of the prokaryotic microbial community along a groundwater salinity gradient of the Pearl River Delta, China. *Scientific Reports* 8: 1–11. DOI: [10.1038/s41598-018-35350-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-35350-2)
- Sauret C., Séverin T., Vétion G. et al. 2014. Rare biosphere bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. *Environmental Pollution* 194: 246–253. DOI: [10.1016/j.envpol.2014.07.024](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.024)
- Schloss P.D., Handelsman J. 2006. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10): 6773–6779. DOI: [10.1128/AEM00474-06](https://doi.org/10.1128/AEM00474-06)



- Shade A., Jones S.E., Caporaso J.G. et al. 2014. Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *Mbio* 5: e01371–01314.
- Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B. et al. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 175–211. DOI: [10.3354/ame028175](https://doi.org/10.3354/ame028175)
- Sjöstedt J., Koch-Schmidt P., Pontarp M. et al. 2011. Recruitment of members from the rare biosphere of marine bacterioplankton communities after an environmental disturbance. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1361–1369. DOI: [10.1128/AEM.05542-11](https://doi.org/10.1128/AEM.05542-11)
- Sorokin D., Gorlenko V., Namsaraev B. et al. 2004. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes. *Hydrobiologia* 522: 235–248. DOI: [10.1023/B:HYDR.0000029989.73279.e4](https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000029989.73279.e4)
- Sorokin D.Y., Kuenen J.G. 2005. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 52(3): 287–295. DOI: [10.1016/j.femsec.2005.02.012](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.012)
- Sorokin D.Y., Berben T., Denise E. et al. 2014. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* 8(5). DOI: [10.1007/s00792-014-0670-9](https://doi.org/10.1007/s00792-014-0670-9)
- Szabó A., Korponai K., Kerepesi C. et al. 2017. Soda pans of the Pannonian steppe harbor unique bacterial communities adapted to multiple extreme conditions. *Extremophiles* 21(3):639–649. DOI: [10.1007/s00792-017-0932-4](https://doi.org/10.1007/s00792-017-0932-4)
- Tandon K., Baatar B., Chiang P.W. et al. 2020. A large-scale survey of the bacterial communities in lakes of western Mongolia with varying salinity regimes. *Microorganisms* 4: 8(11): 1729. DOI: [10.3390/microorganisms8111729](https://doi.org/10.3390/microorganisms8111729)
- Vavourakis C.D., Ghai R., Rodriguez-Valera F. et al. 2016. Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Frontiers in Microbiology* 7: 211. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00211](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00211)
- Wenkai Y., Hongmei M., Guitao S. et al. 2017. Independent shifts of abundant and rare bacterial populations across East Antarctica glacial foreland. *Frontiers in Microbiology* 8: 1534. DOI: [10.3389/fmicb.2017.01534](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01534)
- Zhang H., Xing D., Wu Y. et al. 2023. Editorial: Microbial ecology and function of the aquatic systems. *Frontiers in Microbiology*. 15(13): 1109221. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1109221](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1109221)
- Zhang Y., Wu G., Jiang H. et al. 2018. Abundant and rare microbial biospheres respond differently to environmental and spatial factors in Tibetan hot springs. *Frontiers in Microbiology* 9: 2096. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02096](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02096)
- Zhao D., Zhang S., Xue Q. et al. 2020. Abundant taxa and favorable pathways in the microbiome of soda-saline lakes in inner Mongolia. *Frontiers in Microbiology* 24(11): 1740. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01740](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01740)

# Formation of Actinobacteria biofilms during groundwater treatment



Litvinenko Z.N.\* , Kondratyeva L.M.

Institute of the Water and Ecology Problems, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Khabarovsk Federal Research Center, Dikopoltsev Str., 56, Khabarovsk, 680000, Russia

**ABSTRACT.** The paper presents the results of a study of the reasons for the formation of biofilms during the purification of groundwater with use of natural sorbents. Analysis of the microbial complexes structure at different stages of water treatment showed that their numbers increased after filtration through a load with granular activated carbon. In some cases, it remained high in storage tanks containing purified water. In fact, at all stages of water treatment, representatives of *Actinobacteria* were found in the community structure, which formed biofilms in the technical system, as well as after 14 days of storage in bottled water. It was established that representatives of actinomycetes in the planktonic state formed flakes from mycelium, and on filter media they formed biofilms in the form of a complex structured community. *Actinobacteria* strains isolated from water and activated carbon biofilms differed in their cultural and morphological characteristics. However, they were characterized by a common ability to produce polymeric substances that formed a protective matrix and promoted cell adhesion to various substrates and surfaces. Scanning electron microscopy shown that sporulation promoted survival during all stages of groundwater treatment, including chlorination and ozonation.

**Keywords:** biofilms, *Actinobacteria*, mycelium, groundwater, water treatment

**For citation:** Litvinenko Z.N., Kondratyeva L.M. Formation of Actinobacteria biofilms during groundwater treatment // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 986-991. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-986

## 1. Introduction

In connection with anthropogenic pollution of natural waters, the issues of providing the population with high-quality drinking water by improving water treatment methods are especially pressing (Liu et al., 2017). However, sometimes the quality of water can deteriorate as it passes through a water treatment system or water distribution system. The main attention is paid to the formation of biofilms in distribution system pipes (Makris et al., 2014; Van der Wielen and Lut, 2016). Accumulated experience indicates that changes in the quality of water supplied to the population can cause physicochemical and microbiological problems, example – destruction of the pipe material (corrosion), the formation of biofilms and loose deposits in the distribution system (Liu et al., 2017). It is known that only 10% of the dry mass of biofilms is represented by microorganism cells, and more than 90% is the share of the polymer matrix (Flemming and Wingender, 2010), which plays the role of an accumulator of organic and mineral substances (Wang et al., 2012) and ensures the

stability of microbial community, increasing its adaptive potential (Oppenheimer-Shaanan et al., 2016).

Recently particular attention has been paid to the biostability of drinking groundwater. The term “biological stability” in this context refers to the concept of maintaining the microbiological quality of water from the moment of production of drinking water to the consumption (Favere, 2023). The issue of groundwater safety is a priority and, as a rule, depends on many natural and anthropogenic factors (Muhisen et al., 2019). Changes in microbiological parameters in the water treatment system can have a negative impact on the quality of drinking water and the health of consumers (Prest et al., 2016).

In this regard, studies of changes in the main microbiological characteristics of water at different stages of groundwater purification are relevant. The purpose of our work was to identify risk factors for the development of biofilms in the groundwater treatment system and the reasons for the formation of *Actinobacteria* mycelium aggregates in drinking water.

\*Corresponding author.

E-mail address: [zoyana2003@mail.ru](mailto:zoyana2003@mail.ru) (Z.N. Litvinenko)

**Received:** May 06, 2024; **Accepted:** May 27, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



## 2. Materials and methods

The objects of the study were microbial communities (MC) of natural groundwater and water purified with sorbents; biofilms and mycelium formed at various stages of water treatment in the technology line and in bottled water. Groundwater samples were taken from a production well (depth 45 m), which is actively used for pumping groundwater, its further water treatment and sale of drinking water in retail chains in bottled form. The well is located on the territory of the Tunguska groundwater field, which belongs to the Middle Amur Artesian Basin, in the area of the Sredneamurskaya Lowland.

Methods generally accepted in microbiology were used in the work: cultivation of microorganisms on agar and liquid nutrient media; isolation of microorganism strains and determination of their activity; experimental modeling with granular activated carbon (GAC). The content of organic substances in water was determined by the spectrophotometric method (SHIMADZU UV-3600) at different wavelengths (Shirshova et al., 2015). Biofilms were studied with use of scanning electron microscopy (SEM) (VEGA 3 LMH TESCAN, Czech Republic) at the Khabarovsk Innovation and Analytical Center for Collective Use at the Institute of Tectonics and Geophysics, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences.

## 3. Results and discussion

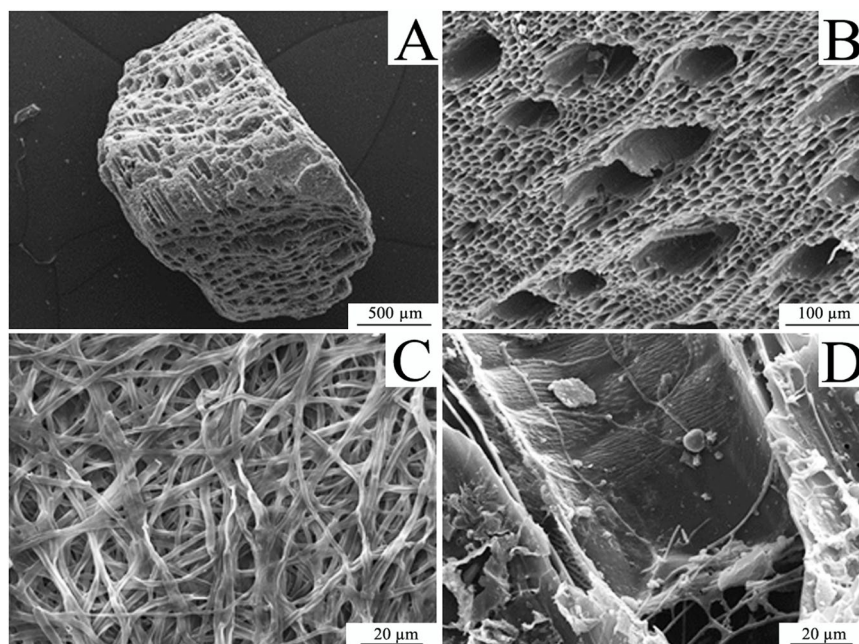
All types of groundwater contain structurally diverse classes of organic compounds (hydrocarbons, carboxylic acids, alcohols, aldehydes, ketones, amines), as well as humic substances. All these components are involved in complex biogeochemical processes and can act as risk factors, activating the development of complex microbial consortium in treated water in the form

of equipment fouling, biofilms and mycelial aggregates in bottled water. Research on changes in planktonic and biofilm communities, as well as the key factors influencing their behavior, is important for understanding and managing microbiological water quality (Ren et al., 2024).

As a result of studying the structure of groundwater microbial complexes at different stages of water treatment, a significant contribution of microorganisms producing mucous polymer substances was established. Large spores were regularly present; it germinated and formed mycelium in the form of loose, visually distinguishable aggregates when various carbon sources were added *in vitro*.

Studies of biofilms formed on GAC have shown that they are represented by complex microorganisms that are capable of producing polymer compounds and forming aggregates of mycelium. When glucose was added to the culture medium, the MC structure was dominated by bacterial cells synthesizing mucous capsules. SEM studies of the GAC surface showed high porosity of the particles; some retained fragments of the plant framework (Fig. A, B). Microorganisms in the attached state on GAC formed a mycelial rete (Fig. D). Biofilms which were founded in bottled water in immature state were represented by an accumulation of thin mycelium (Fig. B). According to cultural and morphological studies of mycelium formed on activated carbon *in vitro* and in bottled water, including at the sporulation stage, this group of chemoheterotrophic microorganisms was classified as representatives of the phylum *Actinobacteria* (class *Actinobacteria*).

It has been established that under favorable growth conditions, actinobacteria can release products of their metabolism that affect the taste and smell of water. They have one of the most complex cellular structures among microorganisms and are capable of forming filamentous mycelium. *Actinobacteria* often



**Fig.** Microstructure of granular activated carbon and *Actinobacteria* biofilm: A – GAC x 95; B – GAC x 500; C – young mycelium in bottled water, 14 days after purification (x 2000); D – surface of activated carbon *in vitro* with mycelium of actinobacteria (x 2000).

become a problem for water treatment plants, as mycelial fragments and spores enter water supplies, take root in technological systems and affect the organoleptic characteristics of water (Barka et al., 2016).

We noted that in the presence of humic substances (HS) and a lack of easy available carbon sources, the process of sporulation accelerates, and various bacterial forms develop on the collapsing mycelium. Some of them are characterized by sliding growth, which is accompanied by the formation of dendrite-like structures. Their biomass is represented by small oval cells immersed in a mucous matrix. SEM images also revealed microcolonies consisting of clusters of cells encrusted with oxides of various elements, including those normative values in drinking water. It is known that HS, by controlling environmental conditions, change the structure of MC and stimulate the processes of decomposition of organic substances (OS) and reduce the bioavailability of some metals (Kulikova and Perminova, 2021).

#### 4. Conclusions

As a result of studying the structure of microbial communities at different stages of water treatment, biofilms formed in an experiment on granular activated carbon in the presence of different carbon sources, the main risk factor for reducing the quality of purified water was established. Despite the use of various sorbents and disinfection methods (chlorination and ozonation), representatives of *Actinobacteria* included in biofilms retained their viability in tanks with clean water and influenced the organoleptic characteristics of bottled water. A hypothesis has been put forward about the negative role of activated carbon, which acts as an accumulator of organic substances, as well as a site of adhesion of *Actinobacteria* spores and bacterial cells that synthesize a polymer matrix. To prevent a decrease in the quality of treated water, it is necessary to control the regulations for the regeneration of sorbents or their replacement.

#### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L. et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 80 (1): 1–43. DOI: [10.1128/membr.00019-15](https://doi.org/10.1128/membr.00019-15)
- Favere J. 2023. Biostability of drinking water systems: from online monitoring to microbial quality management. Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering: 219. URL: <http://hdl.handle.net/1854/LU-01GVJKHN3DVVY9P68JARE18B5S>
- Flemming H.-C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623–633.
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Liu G., Zhang Y., Knibbe W.J. et al. 2017. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. *Water Research* 116: 135–148
- Makris K.C., Andra S.S., Botsaris G. 2014. Pipe scales and biofilms in drinking-water distribution systems: undermining finished water quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44 (13): 1477–1523.
- Muhisen M. AL, Gokcekus H., Ozsahin D.U. 2019. The most common factors effecting ground water quality. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering* 8 (3): C2586018319 URL: [www.ijitee.org](http://www.ijitee.org)
- Oppenheimer-Shaanan Y., Sibony-Nevo O., Bloom-Ackermann Z. et al. 2016. Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2: e 15031. DOI: [10.1038/npjbiofilms.2015.31](https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.31)
- Prest E.I., Hammes F., van Loosdrecht M. et al. 2016. Biological Stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 7: 45. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00045](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00045)
- Ren A., Yao M., Fang J. et al. 2024. Bacterial communities of planktonic bacteria and mature biofilm in service lines and premise plumbing of a megacity: composition, diversity, and influencing factors. *Environment International* 185 (3): e 108538 DOI: [10.1016/j.envint.2024.108538](https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108538)
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19 (4): 94–106. (in Russian)
- Van der Wielen P.W., Lut M.C. 2016. Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply* 16 (4): 896–904.
- Wang Z., Hessler C.M., Xue Z. et al. 2012. The role of extracellular polymeric substances on the sorption of natural organic matter. *Water Research* 46 (4): 1052–1060



# Формирование биопленок *Actinobacteria* при очистке подземных вод



Литвиненко З.Н.\*, Кондратьева Л.М.

Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Хабаровского федерального исследовательского центра, Дикопольцева, 56, Хабаровск, 680000, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В работе представлены результаты исследования причин формирования биопленок в процессе очистки подземных вод с использованием природных сорбентов. Анализ структуры микробных комплексов на разных этапах водоподготовки показал, что их численность увеличивалась после фильтрации через загрузку с гранулированным активированным углем. В некоторых случаях она сохранялась высокой в накопительных резервуарах с очищенной водой. Фактически, на всех этапах водоподготовки в структуре сообщества встречались представители класса *Actinobacteria*, которые формировали биопленки в технической системе, а также через 14 суток хранения в бутилированной воде. Установлено, что представители актиномицетов в планктонном состоянии образовывали хлопья из мицелия, а на фильтрующих загрузках формировали биопленки в виде сложно структурированного сообщества. Штаммы *Actinobacteria*, выделенные из воды и биопленок с активированного угля, отличались по своим культуральным и морфологическим характеристикам. Однако для них была характерна общая способность к продуцированию полимерных веществ, которые формировали защитный матрикс и усиливали адгезию клеток к различным субстратам и поверхностям. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что спорообразование способствовало выживанию микроорганизмов на всех этапах очистки подземных вод, включая хлорирование и озонирование.

**Ключевые слова:** биопленки, *Actinobacteria*, мицелий, подземные воды, водоподготовка

Для цитирования: Литвиненко З.Н., Кондратьева Л.М. Формирование биопленок *Actinobacteria* при очистке подземных вод // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 986-991. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-986

## 1. Введение

В связи с антропогенным загрязнением природных вод особенно актуальными являются вопросы обеспечения населения качественной питьевой водой путем совершенствования методов водоподготовки (Liu et al., 2017). Однако, иногда качество воды может ухудшаться при ее прохождении через систему водоочистки или при ее распределении по водопроводным сетям. Основное внимание уделяется формированию биопленок в трубах распределительной системы (Makris et al., 2014; Van der Wielen and Lut, 2016). Накопленный опыт свидетельствует о том, что изменения качества подаваемой воды населению могут вызвать физико-химическое и микробиологическое разрушение материала труб (коррозия), формирование биопленок и рыхлых отложений в распределительной системе (Liu et al., 2017). Известно, что только 10 % сухой массы

биопленок представлено клетками микроорганизмов, а более 90% приходится на долю полимерного матрикса (Flemming and Wingender, 2010), который играет роль аккумулятора органических и минеральных веществ (Wang et al., 2012) и обеспечивает устойчивость микробного сообщества, повышая его адаптационный потенциал (Oppenheimer-Shaanan et al., 2016).

Особое внимание в последнее время уделяется показателям биостабильности питьевых подземных вод. Термин “биологическая стабильность” в данном контексте относится к концепции поддержания микробиологического качества воды от момента производства питьевой воды до момента ее потребления (Favere, 2023). Вопрос безопасности подземных вод является приоритетным и, как правило, зависит от множества природных и антропогенных факторов (Muhisen et al., 2019). Изменения микробиологических показателей в системе водо-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [zoyana2003@mail.ru](mailto:zoyana2003@mail.ru) (З.Н. Литвиненко)

Поступила: 06 мая 2024; Принята: 27 мая 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



подготовки могут оказать негативное воздействие на качество питьевой воды и здоровье потребителей (Prest et al., 2016).

Поэтому наиболее значимыми являются исследования изменений основных микробиологических характеристик воды на разных этапах очистки подземных вод. Цель нашей работы заключалась в выявлении факторов риска развития биопленок в системе водоподготовки подземных вод и причин формирования агрегатов мицелия *Actinobacteria* в питьевой воде.

## 2. Материалы и методы

Объектом исследования являлись микробные сообщества (МС) природных подземных вод, и вода, прошедшая очистку с помощью сорбентов; биопленки и мицелий, формирующиеся на различных этапах водоподготовки в технологической линии и бутилированной воде. Пробы подземной воды были отобраны из эксплуатационной скважины, (глубина 45 м), которая активно используется для откачки подземных вод, их дальнейшей водоподготовки и реализации питьевой воды в розничных сетях в бутилированной форме. Скважина расположена на территории Тунгусского месторождения, принадлежащего Средне-Амурскому артезианскому бассейну, на участке Среднеамурской низменности.

В работе были использованы общепринятые в микробиологии методы: культивирование микроорганизмов на агаризованных и жидких питательных средах; выделение штаммов микроорганизмов и определение их активности; экспериментальное моделирование с гранулированным активированным углем (ГАУ). Содержание органических веществ в воде определяли спектрофотометрическим методом (SHIMADZU UV-3600) при разных длинах волн (Shirshova et al., 2015). Биопленки

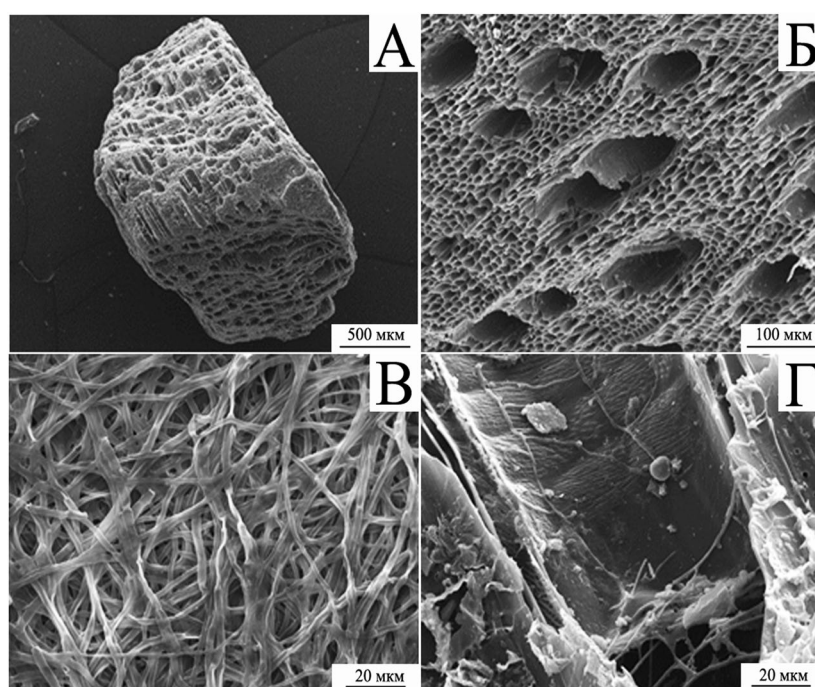
исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (VEGA 3 LMN TESCAN, Чехия) в Хабаровском инновационно-аналитическом центре коллективного пользования на базе Института тектоники и геофизики ДВО РАН.

## 3. Результаты и обсуждение

Во всех типах подземных вод содержатся разнообразные по строению классы органических соединений (углеводороды, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, амины), а также гумусовые вещества. Все эти компоненты вовлекаются в сложные биогеохимические процессы и могут выступать факторами риска, активизируя развитие сложных микробных комплексов в очищаемой воде в виде обрастаний оборудования, биопленок и мицелиальных агрегатов в бутилированной воде. Исследования изменений в сообществах планктонных бактерий и биопленок, а также ключевых факторов, влияющих на их поведение, важно для понимания и управления микробиологическим качеством воды (Ren et al., 2024).

В результате исследования структуры МС подземных вод на разных этапах водоподготовки установлен существенный вклад микроорганизмов, продуцирующих слизистые полимерные вещества. Регулярно присутствовали крупные споры, которые при внесении разных источников углерода *in vitro* прорастали и формировали мицелий в виде рыхлых, визуальнo различимых агрегатов.

Исследования биопленок, сформированных на ГАУ показали, что они представлены сложными МС, которые способны продуцировать полимерные соединения и формировать агрегаты из мицелия. Отмечено, что при внесении глюкозы в питательную среду в структуре МС доминировали бактериальные клетки, синтезирующие слизистые



**Рис.** Микроструктура гранулированного угля и биопленки *Actinobacteria*: А – ГАУ x 95; Б – ГАУ x 500; В – молодой мицелий в бутилированной воде через 14 суток после ее очистки (x 2000); Г – поверхность активированного угля *in vitro* с мицелием актинобактерий (x 2000).

капсулы. Исследования поверхности ГАУ с помощью СЭМ показали высокую пористость частиц, в некоторых сохранялись фрагменты растительного каркаса (Рис. А,Б). Микроорганизмы в прикрепленном состоянии на ГАУ формировали мицелиальную сеть (Рис. Г). Обнаруженные в бутилированной воде биопленки в молодом возрасте были представлены скоплением тонкого мицелия (Рис. В). Согласно культурально-морфологическим исследованиям мицелия, образованного на активированном угле *in vitro* и в бутилированной воде, в том числе на стадии спорообразования, эта группа хемогетеротрофных микроорганизмов была отнесена к представителям филума *Actinobacteria* (класс *Actinobacteria*).

Установлено, что при благоприятных условиях роста, актинобактерии могут выделять продукты своего метаболизма, влияющие на вкус и запах воды. Они обладают одной из самых сложных клеточных структур среди микроорганизмов и способны формировать нитчатый мицелий. *Actinobacteria* часто становятся проблемой для предприятий по водоподготовке, так как фрагменты мицелия и споры попадают в источники водоснабжения, приживаются в технологических системах и влияют на органолептические показатели воды (Barka et al., 2016).

Нами отмечено, что в присутствии гуминовых веществ (ГВ) и недостатке легкодоступных источников углерода, ускоряется процесс спорообразования, а на разрушающемся мицелии развиваются различные бактериальные формы. Некоторые из них отличаются скользящим ростом, который сопровождается образованием дендритоподобных структур. Их биомасса представлена мелкими овальными клетками, погруженными в слизистый матрикс. На СЭМ изображениях также были обнаружены микроколонии из скопления клеток, инкрустированных оксидами разных элементов, включая нормируемые в питьевой воде. Известно, что ГВ контролируя окружающие условия, изменяют структуру МС и стимулируют процессы разложения органических веществ (ОВ) и снижают биодоступность некоторых металлов (Kulikova and Perminova, 2021).

#### 4. Выводы

В результате исследования структуры микробных сообществ на разных этапах водоподготовки, биопленок, формирующихся в эксперименте на гранулированном активированном угле в присутствии разных источников углерода, установлен основной фактор риска снижения качества очищенной воды – развитие актинобактерий. Несмотря на использование различных сорбентов, методов дезинфекции (хлорирование и озонирование) представители *Actinobacteria*, входящие в состав биопленок, сохраняли свою жизнеспособность в резервуарах с чистой водой и влияли на органолептические показатели бутилированной воды. Высказана гипотеза о негативной роли активированного угля, выступающего аккумулятором органических веществ, а

также местом адгезии спор актинобактерий и бактериальных клеток, синтезирующих полимерный матрикс. Для предотвращения снижения качества очищаемой воды требуется контролировать регламент регенерации сорбентов или их замены.

#### Конфликт интересов

Авторы декларируют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Barka E. A, Vatsa P., Sanchez L. et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 80 (1): 1–43. DOI: [10.1128/membr.00019-15](https://doi.org/10.1128/membr.00019-15)
- Favere J. 2023. Biostability of drinking water systems: from online monitoring to microbial quality management. Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering: 219. URL: <http://hdl.handle.net/1854/LU-01GVJKHN3DVVY9P68JARE18B5S>
- Flemming H.-C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623–633.
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Liu G., Zhang Y., Knibbe W.J. et al. 2017. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. *Water Research* 116: 135–148
- Makris K.C., Andra S.S., Botsaris G. 2014. Pipe scales and biofilms in drinking-water distribution systems: undermining finished water quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44 (13): 1477–1523.
- Muhisen M. AL, Gokcekus H., Ozsahin D.U. 2019. The most common factors effecting ground water quality. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering* 8 (3): C2586018319 URL: [www.ijitee.org](http://www.ijitee.org)
- Oppenheimer-Shaanan Y., Sibony-Nevo O., Bloom-Ackermann Z. et al. 2016. Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2: e 15031. DOI: [10.1038/npjbiofilms.2015.31](https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.31)
- Prest E.I., Hammes F., van Loosdrecht M. et al. 2016. Biological Stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 7: 45. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00045](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00045)
- Ren A., Yao M., Fang J. et al. 2024. Bacterial communities of planktonic bacteria and mature biofilm in service lines and premise plumbing of a megacity: composition, diversity, and influencing factors. *Environment International* 185 (3): e 108538 DOI: [10.1016/j.envint.2024.108538](https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108538)
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19 (4): 94–106. (in Russian)
- Van der Wielen P.W., Lut M.C. 2016. Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply* 16 (4): 896–904.
- Wang Z., Hessler C.M., Xue Z. et al. 2012. The role of extracellular polymeric substances on the sorption of natural organic matter. *Water Research* 46 (4): 1052–1060

# Association between hydrochemical parameters and microbial community structure in rivers of the Republic of Tatarstan

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Markelova M.I.\*, Khusnutdinova D.R., Senina A.M., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Khaliullina L.J., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V.

Kazan Federal University, Kremlyovskaya Str., 18, Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** Microbiota plays an important role in the aquatic ecosystem, maintaining balance through its ability to utilize and synthesize various substances. Anthropogenic pollution affects the composition of the aquatic microbiota, thereby disrupting the stability of the system. In this work, a comprehensive analysis of the hydrochemical parameters of the rivers of Tatarstan was carried out together with the microbiome. This has enabled the identification of bacteria that can be used as bioindicators of pollution in aquatic ecosystems. It was found that the abundance of the cyanobacteria *Synechococcaceae* was reduced in samples with high organic matter content, and the abundance of *Microcystaceae* was increased with high levels of total phosphorus and phosphates. There is also evidence that members of the *Proteobacteria* phylum can be bioindicators of high nitrate levels in water.

**Keywords:** river microbiome, 16S rRNA gene, hydrochemical parameters, Republic of Tatarstan, next generation sequencing

**For citation:** Markelova M.I., Khusnutdinova D.R., Senina A.M., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Khaliullina L.J., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V. Association between hydrochemical parameters and microbial community structure in rivers of the Republic of Tatarstan // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 992-997. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-992

## 1. Introduction

Microbiota plays a key role in maintaining the balance of river ecosystems through its involvement in various biochemical processes. Hydrochemical indicators such as pH, hardness, phosphorus, nitrite, nitrate and other elements characterize water quality and may indicate the presence of anthropogenic pollution. Hydrochemical parameters are also known to affect organisms and biochemical processes in aquatic environments (Lebedeva et al., 2021; Corniello et al., 2022). River microbiome analysis can identify microorganisms that are bioindicators of aquatic contamination as well as active participants in self-cleaning processes. Thus, the aim of the work was to identify the association between the abundance of bacterial families in the microbiota and hydrochemical parameters of rivers of the Republic of Tatarstan.

## 2. Materials and methods

Water samples were collected in sterile tubes from the surface of the mouths of the Volga, Kama, and

Kazanka rivers in the territory of the Kuibyshev reservoir in the Republic of Tatarstan for three years (four sampling points each in September 2017, 2018, and 2019). Water sample parameters evaluated included pH, total hardness, total phosphorus, manganese, ammonium, nitrate, nitrite, phosphate, bicarbonate, biological and chemical oxygen demand (BOD5 and COD), color, clarity, suspended solids and temperature. Water samples of 50 ml were centrifuged at 8000 rpm for 15 minutes to obtain a sediment from which DNA was isolated using the “DNA-Express” kit (Lytech, Russia). Next, amplicon libraries of the V3-V4 variable regions of the 16S rRNA gene were prepared and sequenced on the MiSeq platform (Illumina, USA). Bioinformatic data processing was performed using the Qiime 1.9 program. Spearman correlations were calculated using the “psych” package in R.

## 3. Results and discussion

Correlation analysis revealed many statistically significant associations between bacterial family abundance and water parameters (Fig.). The largest number

\*Corresponding author.

E-mail address: [mimarkelova@gmail.com](mailto:mimarkelova@gmail.com) (M.I. Markelova)

**Received:** June 01, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





of significant correlations with microbiota was found for water clarity and suspended solids. This confirms the results found in artificial marine aquariums (Patin et al., 2018). Most of the positive correlations with the clarity were found for the bacterial families of the phyla *Proteobacteria* and *Chloroflexi*, and negative ones — for representatives of the phylum *Bacteroidetes*. It was also found that with an increase in pH and BOD5 levels, as well as a decrease in nitrate content in water samples, the abundance of families of the phylum *Proteobacteria* decreases. This decrease was previously identified both in aquatic and soil ecosystems (Lindström et al., 2005; Kim et al., 2016; Kim et al., 2021; Saneha et al., 2023). Therefore, representatives of *Proteobacteria* (families *Pelagiobacteraceae*, *Methylophilaceae* and an unidentified member of the order *Burkholderiales*) are bioindicators of rivers with low content of organic matter, which can be biochemically utilized, and high content of nitrates. It was also found that the proportion of the cyanobacterial family *Synechococcaceae* decreases with increasing COD levels. Therefore, *Synechococcaceae* can be used as bioindicator of water pollution by organic substances that cannot be biochemically degraded (Kim et al., 2016). The abundance of other cyanobacteria, *Microcystaceae*, was positively correlated with increases

in total phosphorus and phosphate concentrations in water samples. This was also found in the anthropogenically polluted Taihu Lake in China (Qian et al., 2017). Thus, *Microcystaceae* can be used as a bioindicator for the pollution of water systems by wastewater.

#### 4. Conclusion

Bacteria that can be used as bioindicators of pollution in aquatic ecosystems were identified through a comprehensive analysis of hydrochemical parameters of rivers in Tatarstan together with the microbiome.

#### Acknowledgements

The work was carried out at the Interdisciplinary Center of Shared Use of Kazan Federal University and funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (#FZSM-2023-0013).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

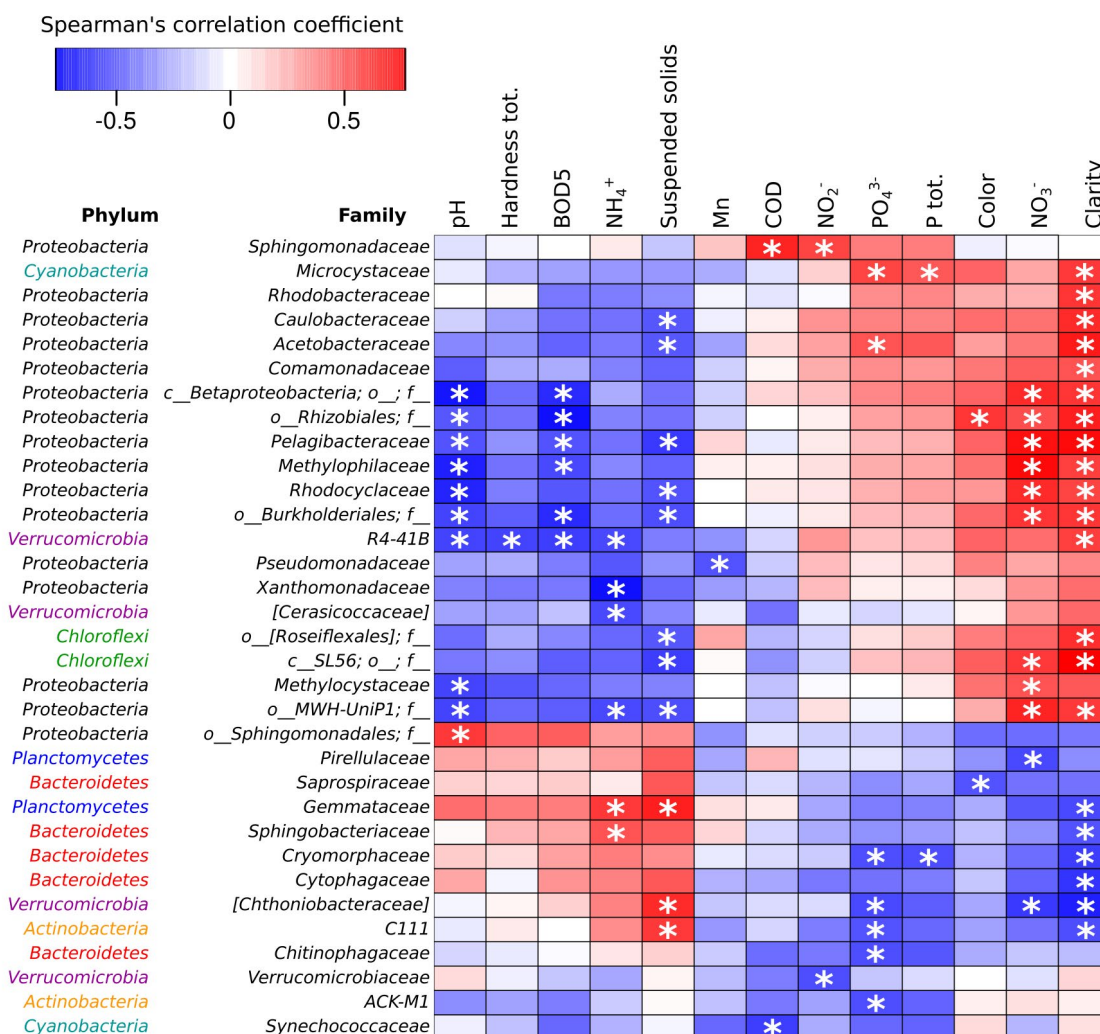


Fig. Correlations between the hydrochemical parameters and the microbial families.

## References

Corniello A., Guida M., Stellato L. et al. 2022. Hydrochemical, isotopic and microbiota characterization of telese mineral waters (Southern Italy). *Environmental Geochemistry and Health* 44: 1-22. DOI: [10.1007/s10653-021-00806-4](https://doi.org/10.1007/s10653-021-00806-4)

Kim H.J., Jung S.W., Lim D.I. et al. 2016. Effects of temperature and nutrients on changes in genetic diversity of bacterioplankton communities in a semi-closed bay, South Korea. *Marine pollution bulletin* 106: 139-148. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2016.03.015](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.015)

Kim H.S., Lee S.H., Jo H.Y. et al. 2021. Diversity and composition of soil Acidobacteria and Proteobacteria communities as a bacterial indicator of past land-use change from forest to farmland. *Science of the Total Environment* 797: 148944. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.148944](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148944)

Lebedeva E.G., Kharitonova N.A., Chelnokov G.A. 2021. Microbiota and hydrochemistry of thermal groundwaters of the Kuldur Spa (Far East, Russia). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 666:022095. DOI: [10.1088/1755-1315/666/2/022095](https://doi.org/10.1088/1755-1315/666/2/022095)

Lindström E.S., Kamst-Van Agterveld M.P., Zwart G. 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8201-8206. DOI: [10.1128/AEM.71.12.8201-8206.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8201-8206.2005)

Patin N.V., Pratte Z.A., Regensburger M. et al. 2018. Microbiome dynamics in a large artificial seawater aquarium. *Applied and Environmental Microbiology* 84(10): e00179-18. DOI: [10.1128/AEM.00179-18](https://doi.org/10.1128/AEM.00179-18)

Qian H., Lu T., Song H. et al. 2017. Spatial variability of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in Lake Taihu (China). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 99: 380-384. DOI: [10.1007/s00128-017-2149-8](https://doi.org/10.1007/s00128-017-2149-8)

Saneha S., Pattamapitoon T., Bualert S. et al. 2023. Relationship between bacteria and nitrogen dynamics in wastewater treatment oxidation ponds. *Global Journal of Environmental Science and Management* 9(4): 707-718. DOI: [10.22034/gjesm.2023.04.04](https://doi.org/10.22034/gjesm.2023.04.04)

# Взаимосвязь гидрохимических показателей с составом микробных сообществ рек Республики Татарстан

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Маркелова М.И.\*, Хуснутдинова Д.Р., Сенина А.М., Синягина М.Н., Булыгина Е.А., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В.

Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, д.18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Микробиота играет значительную роль в экосистеме водоемов, поддерживая баланс за счет способности утилизировать и синтезировать различные вещества. Антропогенное загрязнение оказывает влияние на состав микробиоты водоемов, нарушая тем самым устойчивость системы. В настоящей работе был проведен комплексный анализ гидрохимических показателей рек Татарстана совместно с микробиомом, что позволило выявить бактерии, которые могут быть использованы в качестве биоиндикаторов загрязнения водных экосистем. Установлено, что доля представителей цианобактерий *Synechococcaceae* была снижена в образцах с высоким загрязнением органическими веществами, а доля *Microcystaceae* повышена при высоком содержании общего фосфора и фосфатов. Также выявлено, что представители филы *Proteobacteria* могут являться биоиндикаторами высокого содержания нитратов в воде.

**Ключевые слова:** микробиом рек, ген16S рРНК, гидрохимические показатели рек, Республика Татарстан, секвенирование следующего поколения

Для цитирования: Маркелова М.И., Хуснутдинова Д.Р., Сенина А.М., Синягина М.Н., Булыгина Е.А., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В. Взаимосвязь гидрохимических показателей с составом микробных сообществ рек Республики Татарстан // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 992-997. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-992

## 1. Введение

Микробиота играет ключевую роль в поддержании баланса экосистемы рек, участвуя в различных биохимических процессах. Гидрохимические показатели воды, такие как рН, жесткость, содержание фосфора, нитритов, нитратов и других элементов, характеризуют качество воды и могут указывать на наличие антропогенных загрязнений. Также известно, что гидрохимические параметры оказывают влияние на живые организмы и биохимические процессы, происходящие в водной среде (Lebedeva et al., 2021; Corniello et al., 2022). Анализ микробиома рек может позволить выявить как микроорганизмы-биоиндикаторы загрязнения водоема, так и обнаружить активных участников процессов самоочищения. Таким образом, целью работы явилось выявление взаимосвязей между представленностью бактериальных семейств микробиоты и гидрохимическими параметрами рек Республики Татарстан.

## 2. Материалы и методы

Пробы воды отбирались в стерильные пробирки с поверхности устья рек Волга, Кама и Казанка на территории Куйбышевского водохранилища в Республике Татарстан в течение трех лет (по 4 точки отбора в сентябре 2017, 2018 и 2019 гг.). Оценивались показатели образцов воды, такие как рН, общая жесткость, содержание общего фосфора, марганца, ионов аммония, нитрата, нитрита, фосфата, гидрокарбоната, а также биологическое и химическое потребление кислорода (БПК<sub>5</sub> и ХПК), цветность, прозрачность, взвешенные вещества и температура воды. Образцы воды объемом 50 мл центрифугировали в течение 15 минут при 8000 об/мин для получения осадка, из которого выделяли ДНК с использованием набора «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия). Далее осуществляли подготовку библиотек ампликонов переменных регионов V3-V4 гена 16S рРНК с последующим секвенированием на платформе MiSeq (Illumina, США). Биоинформатическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Qiime 1.9. Корреляции Спирмена были рассчитаны с использованием пакета «psych» в среде R.

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [mimarkelova@gmail.com](mailto:mimarkelova@gmail.com) (М.И. Маркелова)

Поступила: 01 июня 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



### 3. Результаты и обсуждение

Корреляционный анализ позволил выявить множество статистически значимых взаимосвязей представленности бактериальных семейств и исследуемых параметров воды (Рис.). Наибольшее количество достоверных корреляций с микробиотой было обнаружено для показателя прозрачности воды и содержания взвешенных веществ, что подтверждает результаты, выявленные для искусственных морских аквариумов (Patin et al., 2018). Причем большая часть положительных корреляций с прозрачностью выявлена для бактериальных семейств фил *Proteobacteria* и *Chloroflexi*, а отрицательные — для представителей филы *Bacteroidetes*. Также было выявлено, что при увеличении уровня pH и БПК5, а также снижении содержания нитратов в образцах воды снижается доля ряда семейств филы *Proteobacteria*, что ранее было выявлено как в водоемах, так и в почвенных экосистемах (Lindström et al., 2005; Kim et al., 2016; Kim et al., 2021; Sanaha et al., 2023). Следовательно, представители *Proteobacteria* (семейства *Pelagibacteraceae*, *Methylophilaceae* и неопределенный представитель порядка *Burkholderiaceae*) являются биоиндикато-

рами водоемов с низким содержанием органического вещества, которое может быть утилизировано биохимически, и высоким содержанием нитратов. Кроме того, было установлено, что при увеличении ХПК снижается доля семейства цианобактерий *Synechococcaceae*. Таким образом, представители *Synechococcaceae* могут быть использованы в качестве биомаркера загрязнения водоемов органическими веществами, которые не могут быть деградированы биохимически (Kim et al., 2016). Доля другого представителя цианобактерий — *Microcystaceae* — положительно коррелировала с увеличением концентрации общего фосфора и фосфатов в образцах воды, что также характерно для антропогенно загрязненного озера Тайху в Китае (Qian et al., 2017). Таким образом, *Microcystaceae* могут являться биоиндикатором загрязнения водоемов сточными водами.

### 4. Выводы

Комплексный анализ гидрохимических показателей рек Татарстана совместно с микробиомом позволил выявить бактерии, которые могут быть использованы в качестве биоиндикаторов загрязнения водных экосистем.

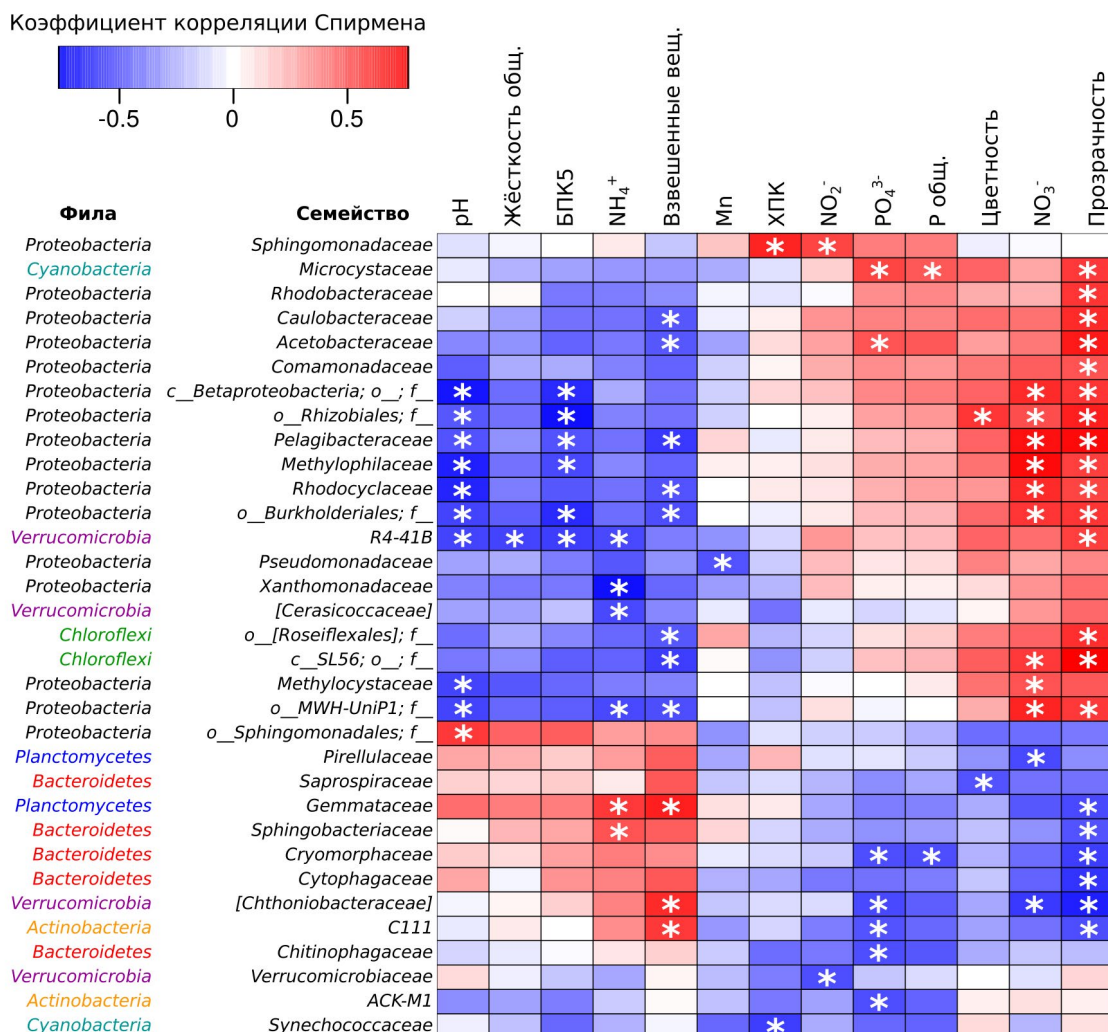


Рис. Корреляции гидрохимических показателей образцов воды и представителей микробиоты на уровне семейств. \* - p-value < 0.05.



## Благодарности

Работа выполнена на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2023-0013).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Corniello A., Guida M., Stellato L. et al. 2022. Hydrochemical, isotopic and microbiota characterization of telese mineral waters (Southern Italy). *Environmental Geochemistry and Health* 44: 1-22. DOI: [10.1007/s10653-021-00806-4](https://doi.org/10.1007/s10653-021-00806-4)

Kim H.J., Jung S.W., Lim D.I. et al. 2016. Effects of temperature and nutrients on changes in genetic diversity of bacterioplankton communities in a semi-closed bay, South Korea. *Marine pollution bulletin* 106: 139-148. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2016.03.015](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.015)

Kim H.S., Lee S.H., Jo H.Y. et al. 2021. Diversity and composition of soil Acidobacteria and Proteobacteria communities as a bacterial indicator of past land-use change from forest to farmland. *Science of the Total Environment* 797: 148944. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.148944](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148944)

Lebedeva E.G., Kharitonova N.A., Chelnokov G.A. 2021. Microbiota and hydrochemistry of thermal groundwaters of the Kuldur Spa (Far East, Russia). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 666:022095. DOI: [10.1088/1755-1315/666/2/022095](https://doi.org/10.1088/1755-1315/666/2/022095)

Lindström E.S., Kamst-Van Agterveld M.P., Zwart G. 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8201-8206. DOI: [10.1128/AEM.71.12.8201-8206.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8201-8206.2005)

Patin N.V., Pratte Z.A., Regensburger M. et al. 2018. Microbiome dynamics in a large artificial seawater aquarium. *Applied and Environmental Microbiology* 84(10): e00179-18. DOI: [10.1128/AEM.00179-18](https://doi.org/10.1128/AEM.00179-18)

Qian H., Lu T., Song H. et al. 2017. Spatial variability of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in Lake Taihu (China). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 99: 380-384. DOI: [10.1007/s00128-017-2149-8](https://doi.org/10.1007/s00128-017-2149-8)

Saneha S., Pattamapitoon T., Bualert S. et al. 2023. Relationship between bacteria and nitrogen dynamics in wastewater treatment oxidation ponds. *Global Journal of Environmental Science and Management* 9(4): 707-718. DOI: [10.22034/gjesm.2023.04.04](https://doi.org/10.22034/gjesm.2023.04.04)

# Assessment of the water quality of Lake Baikal and its tributaries in areas affected by local pollution based on microbiological and hydrochemical data

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Martsinechko A.S., Chebykin E.P., Chebunina N.S., Zakharova Yu.R.\*

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** The water quality of Lake Baikal and its tributaries, influenced by seven different local pollution sources, was assessed in the areas of wastewater discharge from wastewater treatment plants (WWTPs) of the towns of Slyudyanka, Baikalsk, and Severobaikalsk, as well as domestic wastewater discharge from tourist resorts and Maksimikha settlement, runoff of hot springs from thermal baths in Zmeinaya Bay, Baikal seal rookeries, and the tourist center on Tonky Island of the Ushkanyi Islands archipelago in September 2022. The waters of the lake and the Rivers Pokhabikha, Maksimikha, and Tyya using microbiological and hydrochemical analysis methods are assessed as clean II class quality (GOST 17.1.3.07-82), except for the coastal water zone opposite the mouth of the Pokhabikha River, where the water is defined as moderately polluted. The unequal distribution of the values of the self-purification coefficient indicates a high abundance of microflora of allochthonous origin and a low activity of autochthonous microorganisms involved in self-purification processes in the studied areas of the lake. It was found that wastewater discharged by treatment facilities; water at the mouth and surface water of the Baikal in the estuary of the Pohabikha River, water in thermal baths of hot springs in Zmeinaya Bay do not meet the requirements of SanPiN 1.2.3685-21 for the maximum permissible amount of generalized coliform bacteria, *Escherichia coli* and *Enterococcus*. At all control stations in the pelagic zone of Lake Baikal, remote from the studied local polluted sites, water quality indicators did not exceed the safety water standards for surface water bodies in terms of microbiological and hydrochemical parameters.

**Keywords:** Lake Baikal, water quality, organotrophic and psychrophilic bacteria, sanitary-microbiological parameters

**For citation:** Martsinechko A.S., Chebykin E.P., Chebunina N.S., Zakharova Yu.R. Assessment of the water quality of Lake Baikal and its tributaries in areas affected by local pollution based on microbiological and hydrochemical data // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 998-1019. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-998

## 1. Introduction

The waters of Lake Baikal are the object of I and II categories of water use (SanPiN 2.1.3684-21), i.e., they are used as a source of drinking, household water, and water supply for food industry enterprises, as well as for recreational purposes. However, negative changes are known to occur in localized areas of the littoral zone of the lake, such as mass growth of filamentous algae (Timoshkin et al., 2014; 2016), sponge mortality, increased concentrations of phosphates and nitrates, and organotrophic bacteria, including *E. coli* groups (Zemskaya et al., 2019). The reasons for the decrease in the quality of the coastal Baikal waters are increasing recreational impact and the discharge of untreated wastewater from the WWTPs of the settlements located

on the Lake Baikal shore (Drucker et al., 2023).

In recent years, regular microbiological studies have repeatedly revealed higher levels of sanitary-bacteriological parameters in Lake Baikal and its tributaries (Shtykova et al., 2016; Podlesnaya et al., 2022; Suslova et al., 2022; Malnik et al., 2019; 2022). The presented data of sanitary-bacteriological assessment of water quality cover in detail the coastal water zone of South and Middle Baikal (Malnik et al., 2019; Zemskaya et al., 2019), river mouths in the areas of local anthropogenic influence and pelagic stations of standard hydrological transects of the lake water area (Shtykova et al., 2019; Suslova et al., 2019; Drucker et al., 2023). The study of the possible continuous supply of sanitary-indicative bacteria and the preservation of their viability in Lake

\*Corresponding author.

E-mail address: [julia.zakharova@gmail.com](mailto:julia.zakharova@gmail.com) (Y.R. Zakharova)

Received: June 28, 2024; Accepted: July 10, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Baikal, in combination with the determination of other groups of organotrophic microorganisms, is important for assessing the quality of the Baikal water (Elovskaya et al., 2022).

The aim of the work is to determine the number and distribution of microorganisms, including sanitary-indicative ones, and to assess the state of the Lake Baikal self-purification processes in the areas of influence of local pollution sources. In our work, we investigated from 6 to 13 points in each area connected with local pollution, including waste water discharge sites, river areas before and after waste water discharge, river mouths, the littoral zone at different distances from the shore, and the pelagic zone. This sampling scheme enabled to estimate the total number of microorganisms, cultured organotrophic psychrophilic and mesophilic bacteria, as well as to determine the sanitary-indicative bacteria and their distribution from the local pollution sites towards Lake Baikal.

## 2. Materials and methods

Study areas and sampling. On September 5-15, 2022, during the complex Circum-Baikal expedition we explored seven areas of the influence of anthropogenic and natural pollution sources on Lake Baikal: Slyudyanka town (Pokhabikha River, effluent from the WWTP); Baikalsk town (BPPM aerator pond, effluent from the WWTP); Maksimikha settlement (Barguzinsky Bay, tourist resorts), Tonky Island (Nerpa Centre), Tonky Island (seal rookery), Zmeinaya Bay (Chivyrkuisky Bay, hot springs), Severobaikalsk town (Tyya River, waste water from the WWTP) (Fig. 1). Sampling of effluent, river, and surface waters of the littoral zone at 2 m and 50 m from the shore, as well as of background areas of the lake pelagic zone at a distance of 3 km and more from pollution sources, was carried out according to the regulatory documents (GOST 31942-2012, MUK ECSD F 12.15.1-08, GOST 31861-2012). Water samples were collected from the surface water layer (0.5 m) in a pre-sterilized 1.5 L bottle from a boat in rivers, estuaries, and littoral zones of estuaries. Samples were also collected from the pelagic zone at depths of 0, 5, 10, 15, 20, and 25 m (integral sample 0–25 m) using the SBE32 Carousel Water Sampler from aboard the R/V “G.Y. Vereshchagin” (Table 1).

The total microbial abundance (TMA) was quantified by direct counting of preparations stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Porter and Feig, 1980) using an epifluorescence microscope (Axiovert 200 Zeiss, Germany).

Organotrophic bacteria were determined under different culturing conditions. Fish-peptone agar diluted 10-fold (FPA/10) was used to determine the abundance of autochthonous microflora native to a specific water body. The cultures were incubated at 22°C for 72 h (TMC, 22°C) (Gorbenko, 1961). The abundance of allochthonous microflora introduced into the water body as a result of anthropogenic pollution was determined on meat-peptone agar (MPA) after incubation at 37 ± 1°C for 24 h (TMC, 37°C). The self-cleaning coefficient (SC) was calculated as the ratio of the values of

the TMC index determined at temperatures of 22 °C and 37°C. The R2A medium was used for the cultivation of psychrophilic microorganisms (PM) at a temperature of 10 °C for 10 days.

Sanitary-microbiological parameters were determined according to SanPiN 1.2.3685-21. The total (generalized) coliform bacteria (TCB) and *E. coli* were determined using the membrane filtration method on Endo differential diagnostic medium. Similarly, the Enterococcus genus bacteria (EC) were identified on Enterococcus agar with azide medium. The analysis results were made according to GOST 24849-2014.

The physico-chemical parameters of water: pH, temperature (T), electrical conductivity (EC), concentrations of O<sub>2</sub>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> were measured by standard methods according to Wetzel and Likens (2000), Manual for the chemical analysis of terrestrial surface water (2009) in an accredited laboratory for hydrochemistry and atmospheric chemistry, as described earlier (Malnik et al., 2019).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physico-chemical characterization of water in the study areas

In all study areas, water samples were collected in sunny, windless weather at air temperatures ranging from 10°C to 25°C. Water surface temperatures ranged from 6.4-10.1°C in the Pokhabikha, Maksimikha, and Tyya Rivers. In the direction from the river mouths from the coast to the background stations in the pelagic zone, the Baikal surface water was warmed up to 13.6 ± 4.5°C on average, except for the area opposite the mouth of the Pokhabikha River (6.5 - 7.5°C) and in the coastal water to the right from the mouth of the Tyya River (7.7°C). T of effluents sampled from WWTPs in Slyudyanka, Baikalsk, and Severobaikalsk towns was higher (14.2-19.8°C), while 42.8°C (Zm-1) and 39.3°C (Zm-1) were recorded in hot springs of Zmeinaya Bay (Zm-2). The pH values in all river and Baikal samples were found to vary within the slightly alkaline range from 7.63 to 8.67. In contrast, the samples from hot springs demonstrated alkaline values (9.6), while effluents from the wastewater treatment plant in Severobaikalsk town showed a slightly acidic medium (5.24). The maximum values of electrical conductivity (EC) were determined in effluents and hot springs (up to 864 µS/cm). In the water of the Pokhabikha and Maksimikha Rivers, the EC values (240 µS/cm and 156 µS/cm) were higher than the average in the Baikal water (127 µS/cm) and vice versa in the Tyya River water (98 µS/cm) less than in the Baikal water. Dissolved oxygen (O<sub>2</sub>) concentrations in the river and lake water varied within a narrow range of 8.9-12.6 mg/dm<sup>3</sup> (Table 1).

Contents of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in the effluents discharged by centralized and local water disposal systems of settlements or urban districts within the central ecological zone, as well as directly into Lake Baikal, are regulated in accordance with the order of the Ministry of Natural Resources of Russia from February 21, 2020 No. 83 and are classified as “moderately hazardous” harmful substances. The efflu-

Table 1. Description of the sampling site and physicochemical parameters of water in the study areas in September 2022

Station	Sampling site	T, °C	pH	EC, µS/cm	O <sub>2</sub> ,	mg/dm <sup>3</sup>					SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
						NO <sub>3</sub> -	PO <sub>4</sub> 3	NO <sub>2</sub> -1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> -1		
1-Riv100WW	Pokhabikha River (PR), 100 m above discharge of wastewater	6.4	8.27	220.6	11.8	0.030	1.700	0.011	0.046	0.011	0.046	10
1-WW	wastewater discharge tube of the Slyudyanka town	14.2	7.47	863	НД	3.9	0.38	0.170	36	0.170	36	37
1-Riv	mouth of PR	7.6	8.16	240.9	12.2	0.082	1.7	0.029	0.93	0.029	0.93	11
1-1CW	2 m from the shore opposite mouth of PR	6.5	8.11	173.9	12.6	0.020	1.4	0.010	0.22	0.010	0.22	8.1
1-50	50 m from the shore opposite mouth of PR	6.7	8.14	127.6	12.2	0.003	0.54	0.004	0.017	0.004	0.017	6.1
1-3k	3 km from the shore opposite mouth of PR	7.5	7.95	123.8	НД	0.003	0.27	0.004	<0.013	0.004	<0.013	6.0
2-PAin	Pond-Aerator (PA) with wastewater from the Baikalsk city	17.5	7.5	279	НД	0.75	32.9	0.019	0.123	0.019	0.123	18
2-PAout	PA, drain sump	15.8	7.1	266	НД	0.68	24.2	0.15	0.452	0.15	0.452	17
2-1CW	2 m from the shore opposite PA	12.2	7.76	138.4	9.8	<0.003	0.92	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	8.0
2-T	above the wastewater discharge tube from PA	12.2	8.28	123.7	11.1	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	6.5
2-50	50 m from the shore opposite PA	12.2	8.31	123.7	10.0	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	6.6
2-3k	3 km from the shore opposite PA	11.1	8.08	123.4	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	6.1
3-Rivup	Maksimicha River (MR), 780 m above mouth	10.1	7.96	155.7	10.6	0.030	0.25	0.004	<0.013	0.004	<0.013	6.8
3-Riv	mouth of MR	10.1	8.08	163.6	11.0	0.025	0.24	0.003	<0.013	0.003	<0.013	10
3-1 CWRiv	2 m from the shore opposite mouth of MR	14.2	8.07	132.5	9.5	0.006	<0.1	0.003	<0.013	0.003	<0.013	7.1
3-50Riv	50 m from the shore opposite mouth of MR	15.4	8.08	128.8	9.4	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	6.8
3-3k	3 km from the shore opposite mouth of MR	15.1	7.63	128.5	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	6.7
3-12k	12 km from the shore opposite mouth of MR, exit from Barguzin Bay	13.6	7.92	126	НД	<0.003	<0.1	0.008	<0.013	0.008	<0.013	6.3
4-1CW	2 m from the shore opposite Nerpa Center (NC), Tonkiy Island	13.5	8.11	127.9	10.0	0.003	<0.1	0.006	0.028	0.006	0.028	6.3
4-50	50 m from the shore opposite NC	13.7	8.06	126.2	11.5	<0.003	<0.1	0.003	<0.013	0.003	<0.013	6.1
4-50 CWL	270 m from station 4-1 CW	13.3	8.48	126.6	10.9	0.003	<0.1	0.003	<0.013	0.003	<0.013	6.2
4-50L	50 m from station 4-50 CWL	13.3	8.16	126.2	8.9	0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	6.4
4-3k	3 km from the shore opposite NC	13.8	7.99	126.2	НД	0.005	<0.1	0.004	<0.013	0.004	<0.013	6.3
5-1CW	2 m from the shore opposite seal rookery (SR), Tonkiy Island	12.8	8.41	126.1	10.5	0.006	<0.1	0.003	<0.013	0.003	<0.013	5.6
5-50	50 m from station 5-1 CW opposite SR	13.5	8.47	126.3	10.6	0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	5.6
5-3k	3 km from the shore opposite SR	13.2	7.99	124	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	5.6
Zm-1	hot spring 1 (HS1), Zmeinaya Bay	48.2	9.54	571	НД	<0.003	0.15	0.006	0.62	0.006	0.62	121
Zm-2	hot spring 2 (HS2), Zmeinaya Bay	39.3	9.63	864	НД	<0.003	0.10	0.006	0.68	0.006	0.68	166
6-1CW	2 m from the shore opposite HS1	15.6	8.24	141.2	9.0	0.008	<0.1	<0.003	<0.013	<0.003	<0.013	15



Station	Sampling site	T, °C	pH	EC, µS/cm	O <sub>2</sub> ,	mg/dm <sup>3</sup>						SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
						PO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub> -1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> -1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
6-50	50 m from the shore opposite HSI	14.3	8.3	130.7	9.5	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.013	6.8	
6-3k	3 km from the shore opposite HSI	14.9	8.04	126.3	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.013	6.0	
6-16.4k	16 km from the shore opposite HSI, exit Chivirkuisii Bay	14.6	8.08	126.5	НД	<0.003	<0.1	0.010	<0.013	<0.013	6.0	
7-Riv130LA	Tyya River (TR), left branch, 130 m above discharge of wastewater	6.5	7.61	97.5	11.4	<0.003	0.56	<0.003	<0.013	<0.013	9.6	
7-Riv100RA	TR, right branch, 120 m above discharge of wastewater from Severobaikalsk	6.5	7.75	97.5	11.5	<0.003	0.55	<0.003	<0.013	<0.013	9.7	
7-WW	wastewater discharge tube	19.8	5.24	699	НД	5.9	157	0.017	2.9	2.9	34	
7-Riv	650 m above of the mouth TR	6.5	7.7	97.5	12.2	0.011	0.79	0.004	<0.013	<0.013	9.7	
7-260 CWL	2 m from the shore, 260 m to the left of the mouth TR	12.3	8.04	124.4	10.1	<0.003	<0.1	0.005	<0.013	<0.013	6.9	
7-540 CWR	2 m from the shore, 540 m to the right of the mouth TR	7.7	7.68	96	11.1	<0.003	0.46	<0.003	<0.013	<0.013	9.2	
7-200	200 m from the shore opposite mouth of TR	12.5	8.14	122.1	10.3	<0.003	<0.1	0.014	<0.013	<0.013	6.8	
7-6.5k CWL	2 m from the shore, 6.5 km to the left of the mouth TR	13.4	8.67	124.2	10.4	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.013	6.6	
7-3k	3 km from the shore opposite mouth of TR	НД	8.15	125.4	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	<0.013	6.4	
7-Nep CW	2 m from the shore, 1,5 km to the left of the mouth TR, boat station	НД	8.05	148.7	9.0	<0.003	0.23	0.006	<0.013	<0.013	7.9	

**Note:** values exceeding the standards for the content of harmful substances in wastewater discharged (1) directly on Lake Baikal, (2) by centralized and local sources of wastewater disposal of settlements or traditional districts within the central zone of the zone according to the order of the Ministry of Natural Resources of Russia dated February 21, 2020 No. 83: permissible content SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1)5.53 and (2) + 50.0 mg/dm<sup>3</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>(phosphorus) (1)0.01 and (2)0.1 mgP/dm<sup>3</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1)0.57 and (2)9 mg/dm<sup>3</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (1)0.001 and (2)0.2 mg/dm<sup>3</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (1)0.01 and (2)0.4 mg/dm<sup>3</sup>

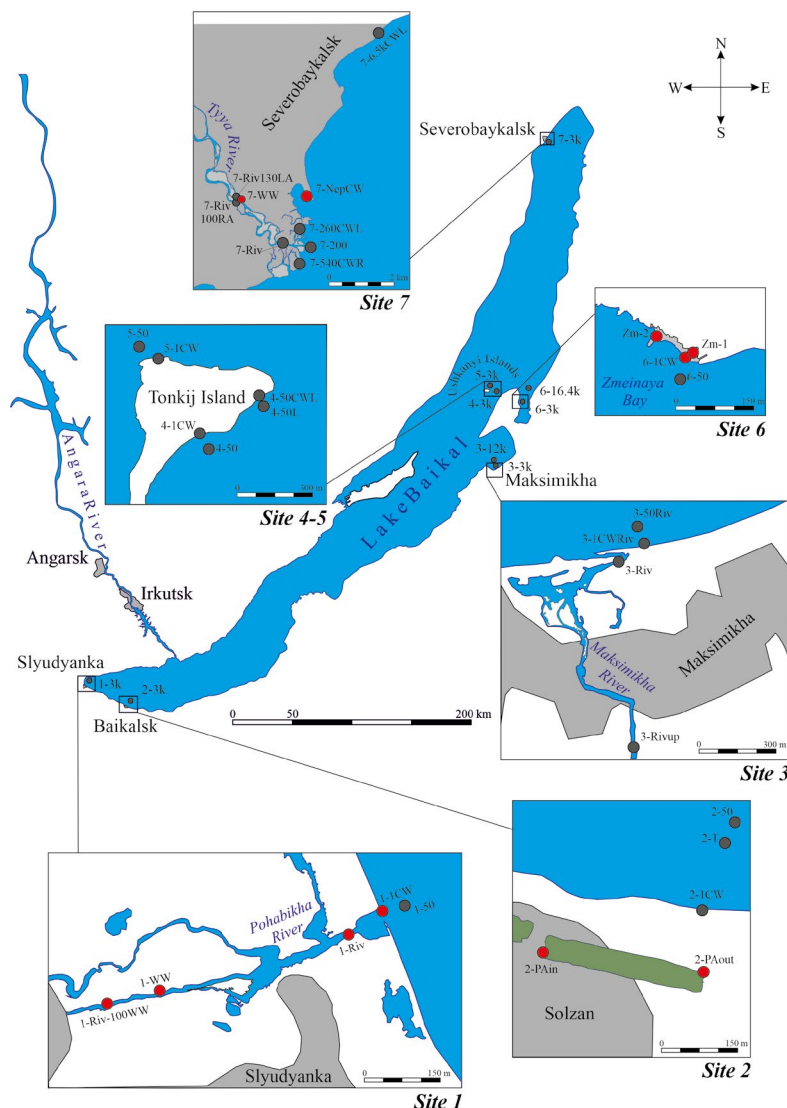
ents from Slyudyanka discharged into the Pokhabikha River exceeded the permissible limits of  $\text{PO}_4^{3-}$  (phosphorus) by 13 times and  $\text{NH}_4^+$  by 90 times. In effluents from Severobaikalsk discharged into the Tyva River, the content of  $\text{PO}_4^{3-}$  (phosphorus) exceeded the permissible standards by 19.7 times,  $\text{NO}_3^-$  by 17.4 times, and  $\text{NH}_4^+$  by 7.3 times. The effluents from Baikalsk, taken from the aeration pond and discharged directly into Lake Baikal after settling in it, also contained high concentrations of harmful substances. The content of  $\text{PO}_4^{3-}$  (phosphorus) exceeded the permissible standards by 23 times,  $\text{SO}_4^{2-}$  by 3 times,  $\text{NO}_3^-$  by 42.5 times,  $\text{NO}_2^-$  by 150 times, and  $\text{NH}_4^+$  by 45 times.

The concentrations of chemical compounds in the rivers and estuaries were higher than in the water of the lakes. The most significant difference was in the content of  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and  $\text{NO}_3^-$ , which varied in the river water 6.8-11 mg/dm<sup>3</sup>, 0.011-0.085 mg/dm<sup>3</sup>, and 1.24-1.7 mg/dm<sup>3</sup>, respectively, and in the lake water 5.6-8.1 mg/dm<sup>3</sup>, 0.003-0.020 mg/dm<sup>3</sup>, and 0.1-1.4 mg/dm<sup>3</sup>, respectively. At the same time, in the lake water, the highest concentrations of nutrients were in samples taken at the river mouths, coastal water (2 m from the shore) opposite the river mouths and hot springs.

The highest concentrations of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  were in the river (0.046 mg/dm<sup>3</sup> and 0.011 mg/dm<sup>3</sup>) and at the mouth of the Pokhabikha River (0.93 mg/dm<sup>3</sup> and 0.029 mg/dm<sup>3</sup>), in the remaining samples did not exceed 0.013 mg/dm<sup>3</sup> and 0.008 mg/dm<sup>3</sup>, respectively (Table 1). The elevated concentrations of nutrients at the mouth of the Pokhabikha River (1-Riv) and the estuarine water zone (1-1CW) may indicate the influence of insufficiently treated effluents on water chemistry.

### 3.2. Distribution of microbial abundance and sanitary-microbiological parameters

The microbiological study of seven districts (Fig., Sites 1–7) with different anthropogenic loads on the Baikal littoral zone revealed a high bacterial abundance and significant excess of sanitary-microbiological parameters in water samples taken directly from pollution sources. These were the effluents discharged by the WWTP from Slyudyanka town into the Pokhabikha River and from Severobaikalsk town into the Tyva River, water in the aerator ponds of Baikalsk town, water in the hot mineral springs of Zmeinaya Bay in Chivyrkuisky Bay (Table 2).



**Fig.** A map-scheme of the sampling sites in the rivers, estuaries, littoral and pelagic zones of Lake Baikal. The black paint represents values of sanitary-microbiological parameters that do not exceed the norm. The red paint represents values of parameters that exceed the norm.

**Table 2.** Abundance of bacteria and sanitary-microbiological indicators in surface water samples in September 2022

Station	TMA × 10 <sup>6</sup> cells/mL	PM	TMC 22 °C	TMC 37 °C	SCC	TCB	EC	E. coli
		CFU/cm <sup>3</sup>				CFU/100 cm <sup>3</sup>		
1Riv100WW	3.2	680	324	52	6.23	268	100	0
1WW	27.6	НД	2208	29024	-	3500	84200	3500
1Riv	1.1	2908	1992	5848	0.34	1350	1650	1350
1-1CW	1.0	2856	1360	790	1.72	976	332	976
1-50	2.1	586	368	6	61.33	83	39	0
1-3k	1.4	25	32	0	32	9	0	0
2PAin	3.7	НД	1146	1400	-	12500	300	0
2PAout	6.3	НД	1258	1070	-	7300	200	0
2-1CW	0.4	103	76	4	19	192	0	0
2T	1.5	18	8	0	8	110	0	0
2-50	1.8	8	13	0	13	65	0	0
2-3k	0.6	5	8	0	8	17	0	0
3-Rivup	НД	НД	1448	58	24.96	64	52	64
3-Riv	0.5	НД	98	2	49	140	0	0
3-1CWRiv	0.6	800	1112	43	25.86	34	0	34
3-50 Riv	0.6	166	808	60	13.46	21	1	0
3-3k	1.0	867	1408	4	352	13	0	0
3-12k	0.7	580	302	114	2.64	78	5	0
4-1CW	0.7	64	55	7	7.85	39	2	0
4-50 CWL	НД	НД	13	7	1.85	100	0	0
4-50	0.7	15	15	5	3	78	0	78
4-50L	НД	НД	5	0	5	108	0	0
4-3k	0.8	7	32	3	10.66	40	0	0
5-1CW	0.6	47	152	21	7.23	86	0	0
5-50	0.6	109	262	118	2.22	12	6	0
5-3k	1.8	42	156	66	2.36	4	0	0
Zm1	0.8	НД	302	127	-	1860	0	1860
Zm2	0.3	НД	2032	114	-	5240	60	5240
6-1CW	1.3	548	792	507	1.56	7	68	7
6-50	0.7	109	248	122	2.03	6	6	6
6-3k	3.0	181	608	240	2.53	17	0	0
6-16.4k	2.4	22	107	38	2.81	1	0	0
7-Riv130LA	0.1	НД	52	7	7.42	24	5	24
7-Riv100RA	0.2	НД	13	2	6.5	37	1	0
7-WW	5.6	НД	51	154	-	4700	0	0
7-Riv	0.3	НД	42	5	8.4	120	0	0
7-260 CWL	0.7	78	456	31	14.70	0	7	0
7-540 CWR	0.4	247	200	7	28.57	0	35	0
7-200	3.6	9	70	1	70	106	2	0
7-6.5kCWL	НД	НД	98	5	19.6	436	1	0
7-3k	1.5	22	92	30	3.06	0	0	0
7-NepCW	1.3	164	285	54	5.27	20	128	0

**Note:** values that exceed the standards SanPiN 1.2.3685-21 are highlighted, TBA - total bacterial abundance, PM - psychrophilic microorganisms, TMC - total microbial count, EC – Enterococcus, TCB - total (generalized) coliform bacteria, SCC - self-cleaning coefficient, dash – no data available.

*Site 1.* TMA ( $3.2 \times 10^6$  cells/mL) was the highest, above the discharge of treated effluents (1-Riv100WW) into the Pokhabikha River among all samples from the Slyudyanka area, and the TMA/TMC 22°C ratio was more than 103, which classifies water according to GOST 17.1.3.07-82 as Class II clean water. The TMA/TMC 22°C ratio usually serves to assess the sanitary condition of water bodies and characterizes the trophic status of the biocoenosis. The value of this ratio in waters rich in labile organic matter is  $10^3$ – $10^2$  in moderately polluted waters of class III and less than  $10^2$  in polluted waters of class IV, V, and VI, whereas in clean water bodies and watercourses of class II it is more than 103 (GOST 17.1.3.07-82). In this case, the self-cleansing coefficient (SC) at the station 1-Riv100WW was 6.23, which corresponds to a completed self-cleansing process with a SC equal to or greater than 4 (MUK 4.2.1884-04). The ratio of quantitative indicators reflecting the total content of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms in 1 ml of tested water (TMC, determined at temperatures of 22 °C and 37 °C, is expressed in the SC, with the help of which it is possible to evaluate the activity and state of self-purification processes of natural water bodies (MUK 4.2.1884-04). In the areas of the domestic effluents pollution, the quantitative values of both groups are similar. The indicator provides additional information on sanitary condition of the water bodies, sources of pollution, and self-purification processes.

In treated effluents from the Slyudyanka WWTP, the TMA was  $27.6 \times 10^6$  cells/mL, and the TMC 22 °C and TMC 37 °C values were the highest (2208 CFU/cm<sup>3</sup> and 29024 CFU/cm<sup>3</sup>) of all the samples tested. The influence of effluents was significantly evident at the mouth of River 1-Riv and in the Baikal estuarine water at 2 m from the shore of 1-1CW. According to the TMA/TMC ratio of 22°C ( $10^2$ ), the water here belongs to the quality category III and is assessed as moderately polluted. Considering the fact that the abundance of allochthonous microflora (TCM 37°C) introduced into the water body was high, the SC values at these stations were low (0.34 and 1.72), indicating a high anthropogenic load. At the same time, when assessing all indicators of microflora abundance at the stations in the littoral zone at a distance of 50 m from the shore (1-50) and control background in the pelagic zone at a distance of 3 km from the coast (1-3k), the water corresponded to the II quality class, and the high SC indicated active processes of self-purification in the lake.

In the area of influence of Slyudyanka town, exceedances of sanitary-microbiological parameters were detected in treated effluents (1-WW), at the mouth of the Pokhabikha River (1-Riv), and in the coastal water of the lake (1-1CW) (Table 2). The study identified the main indicators used to assess the safety of water bodies according to San PiN 1.2.3685-21: generalized coliform bacteria (TCB), *Escherichia coli* (*E. coli*), and enterococci (EC). The recorded high TCB values at the stations 1-WW (3500 CFU/100 cm<sup>3</sup>), 1-Riv (1350 CFU/100 cm<sup>3</sup>), and 1-1CW (976 CFU/100 cm<sup>3</sup>) were 7, 2.7, and 1.9 times higher than the normative values, respectively. The TCB values decreased with

increasing distance from the treated effluent discharge site and did not exceed standards at the stations 1-50 and 1-3k. The recently introduced indicator, effective from 1 January 2022 (SanPin 1.2.3685-21), is the “Generalized coliform bacteria” (TCB) indicator, which replaces the previous indicator for total coliform bacteria. The abbreviation and units of measurement remain the same. The new indicator takes into account not only lactose-positive *Enterobacteriaceae* but also other atypical lactose-negative colonies that produce fermentation of D-glucose to acid and gas formation (Zagainova et al., 2020). The use of this indicator is related to the fact that with increasing anthropogenic load on water bodies, warming of the microclimate, changes in human food behavior, introduction of imported food products, and uncontrolled use of antibiotics, some phenotypic properties of *Enterobacteriaceae*, metallic shine of colonies, and ability to ferment lactose have started to be lost (Trukhina et al., 2022). The determination of two biochemical traits allows for the detection of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, thereby ensuring that their presence is within the permissible limits (not more than 500 CFU/100 cm<sup>3</sup>).

The indices of *E. coli* at the stations 1-WW, 1-Riv, and 1-1CW were 35, 13.5, and 9.7 times higher than the maximum permissible limits, respectively, while they were not detected at the stations 1-50 and 1-3k. For sanitary-microbiological control of water reservoirs, the indicator “Thermotolerant coliform bacteria” is replaced by the indicator “*E. coli*,” which provides better detection of fresh fecal contamination in water reservoirs (SanPin 1.2.3685-21). This is caused by the fact that *Escherichia coli* are able to grow at both 37°C and 44°C and are prevalent in human and animal feces compared to other representatives of thermotolerant coliforms (Zagainova et al., 2020, Trukhina et al., 2022). The indicator of *E. coli* is proposed for all types of surface water bodies and is normalized to no more than 100 CFU/100 cm<sup>3</sup>. The *Enterococci* (EC) numbers were also found to be significantly higher than the permissible limits at the following locations: station 1-Riv100WW (10-fold, 100 CFU/100 cm<sup>3</sup>), 1-WW (842-fold, 84200 CFU/100 cm<sup>3</sup>), 1-Riv (165-fold, 1650 CFU/100 cm<sup>3</sup>), 1-1CW (33.2-fold, 332 CFU/100 cm<sup>3</sup>), and 1-50 (3.9-fold, 39 CFU/100 cm<sup>3</sup>). Although the abundance of enterococci decreased with distance from the discharge site, the undoubtedly very high levels of these microorganisms indicate the presence of fresh fecal pollution and an unfavorable epidemiological situation in the whole study area, with the exception of the pelagic background station. Enterococci are permanent inhabitants of human and animal intestines and are excreted in large quantities into the external environment. Norms for surface water sources and effluents in the places of discharge into water bodies are defined as no more than 100 CFU/100 cm<sup>3</sup>, in recreational areas, no more than 10 CFU/100 cm<sup>3</sup>. The typical morphological and physiological features of enterococci that contribute to their resistance to environmental factors and disinfectants in water treatment were previously demonstrated in studies of representatives of this group isolated from Lake Baikal (Kravchenko, 2009).



Microbiological research in 2021-2023 in the area of wastewater discharge from the Slyudyanka WWTP showed that river water and coastal water areas are under the influence of wastewater and surface runoff, which is characterised by a high percentage of samples that do not meet sanitary-bacteriological requirements (Suslova et al., 2022; Drucker et al., 2023). Analysis of these data indicates inefficient operation of the WWTP, resulting in the release of insufficiently treated wastewater into the natural watercourse and the potential epidemiological danger of water in recreational areas.

**Site 2.** TCM at the littoral and pelagic stations of the lake in the area opposite the effluents discharge from the aeration pond, which is the final stage of the Baikalsk WWTP, varied within  $0.4-1.8 \times 10^6$  cells/mL. The TMA/TCM ratio of 22°C was more than  $10^3$  and the SC was more than 4, which classified the water at all the studied stations as clean water. The treated effluents of the aeration pond exhibited high TMA values of water in the inflow water (2-PAin) of  $3.6 \times 10^6$  CFU/ml and in the outflow (2-PAout) of  $6.3 \times 10^6$  CFU/ml. The TCM values of water at 22 °C and 37°C in the inflow and outflow of the aeration ponds were also high, at 1146 CFU/cm<sup>3</sup> and 1258 CFU/cm<sup>3</sup>, respectively, and 1400 CFU/cm<sup>3</sup> and 1040 CFU/cm<sup>3</sup>, respectively. The sanitary-microbiological parameters in effluents exceeded permissible norms: TCB by 25 and 14.6 times, and EC by 3 and 2 times, respectively. The coastal water area opposite the aeration ponds and the pelagic background station showed TCBs within the permissible limits, with a decrease in abundance from 192 CFU/100 cm<sup>3</sup> at the shore to 17 CFU/100 cm<sup>3</sup> at a distance of 100 meters. *E. coli* was not found in any sample from the area. Our study didn't find any exceedances of sanitary-microbiological parameters in the Baikal water, including the station located above the effluent discharge pipe (2-T) into the lake. However, high values of TCB and EC indicators, determined by us in the effluents of the pond-aerator, as well as those detected earlier in the surface water of the coastal zone of Baikalsk town during sanitary-bacteriological monitoring in 2010-2023 (Drucker et al., 2023), indicate low efficiency of effluent treatment.

**Site 3.** TMA at the stations of the littoral zone of Barguzinsky Bay and the pelagic zone of the lake opposite to the area of tourist bases near Maksimikha settlement varied within  $0.5-1.0 \times 10^6$  cells/mL. The TMA/TCM ratio of 22°C at the stations 3-Riv and 3-12k was more than  $10^3$ , which classifies the water as clean, while at stations 3-1CW Riv. 3-50 and 3-3k, was between  $10^3-10^2$  and classifies the water as moderately polluted. The self-purification coefficient at all stations is above 4, indicating a high potential for natural self-purification. However, at the outflow from Barguzinsky Bay (3-12k), the SC was 2.64, indicating that the self-purification process in this water area of the lake is not yet complete. Sanitary-microbiological parameters did not exceed the normative values at all stations studied, except for water in the Maksimikha River sampled at 780 m above the mouth (3-Rivup), where EC values exceeded the norm by 5.2 times (52 CFU/100 cm<sup>3</sup>). The excessive EC indicator shows the fact of recent

fecal pollution of the river water, which occurs probably when fecal effluents from residential houses in the settlement or during the grazing of livestock get into the water. As it is known, there are more than a dozen recreation centers and guest houses along the Baikal shore near Maksimikha settlement. At the same time, domestic and fecal water is discharged without controlled treatment into the coastal territory. According to Drucker et al. (2023), samples of the coastal sandy sediments were found to be contaminated with bacteria that indicate a potential risk to public health. This contamination level was sufficient to classify the samples as epidemiologically dangerous.

**Sites 4 and 5.** Tonky Island is one of the smaller islands of the Ushkanyi Islands archipelago, where the ecological trail "To the Baikal seal rookery" is located, and excursions are regularly organized during the summer tourist season. To assess the anthropogenic impact on water quality in the coastal and pelagic zones, samples were taken from the eastern side of the island, where the Nerpa information center is located and where ships stop to disembark tourists (Site 4, Fig.). To assess the impact of the Baikal seal activity on the water quality, samples were taken from the western side of the island where the seal rookery is located (Site 5, Fig.). The maximum TMA values ( $1.8 \times 10^6$  cells/mL) were recorded at the station 5-3k, with the remaining samples ranging from  $0.6 \times 10^6$  c/ml to  $0.8 \times 10^6$  cells/mL. The TMA/TCM ratio in all studied samples was more than  $10^3$  and evaluated the water as clean (quality class I-II). However, at several stations it was found that the numerical values of 22°C TMC and 37°C TMC were similar and consequently had low SC values: 4-50 CWL - 1.85, 4-50 - 3, 5-50-2.22, 5-3k-2.36. The presence of allochthonous microorganisms in number close to the number of microorganisms of autochthonous origin is indicative of an increased local input of introduced bacteria into the water and a reduced activity of bacteria naturally inhabiting the lake. Furthermore, no exceedances of sanitary-indicative bacteria were identified, which indicates that tourist activity has not influenced the epidemiological situation in the area of Tonky Island.

**Site 6.** In the coastal waters of Zmeinaya Bay and the pelagic zone of Chivyrkuisky Bay, the highest TMA values were recorded at the stations 6-1CW ( $1.3 \times 10^6$  c/ml), 6-3k ( $3.0 \times 10^6$  cells/mL), and 6-16.4k ( $2.4 \times 10^6$  cells/mL), and the TMA/TMC 22°C ratio was more than  $10^3$ . The SC was below 4 (1.56 - 2.81) at all stations studied, indicating incomplete self-purification processes and local water pollution due to the heavy tourist load in this part of the bay. High levels of TCB (1860 CFU/100 cm<sup>3</sup> and 5240 CFU/100 cm<sup>3</sup>) were found in places where people bathed in thermal baths of hot springs (Zm-1 and Zm-2), which exceeded the permissible standards by 3.72 and 10.48 times, respectively. Also, *E. coli* was found in both thermal baths and exceeded the normative values by 18.6 (Zm-1) and 52.4 (Zm-2) times, and EC by 6 times in Zm-2. In the coastal water (6-1CW) opposite the hot spring (Zm-2), an excess of enterococci of 6.8 times was observed. At a distance of 50 m from the shore (6-50), 3 km (6-3k)

and at the outflow of Chivyrkuisky Bay (6-16.4k), sanitary-indicative bacteria were detected in insignificant amounts or were absent.

Exceedances of permissible values of sanitary-microbiological parameters according to SanPiN 1.2.3685-21 in thermal baths, runoff streams, and at the water's edge at a distance of up to 5 meters were also detected earlier (Suslova et al., 2022, Elovskaya et al., 2022). Obviously, the number of bathers does not correspond to the rate of water renewal in the baths, while the temperature of hot spring water creates favorable conditions for the development of opportunistic coliform bacteria. Given the fact that hot springs are objects of permanent recreational visit, it is necessary to inform tourists about safety measures when bathing.

*Site 7.* TMA in the left (7-Riv130LA) and right (7-Riv100RA) branches of the Tyya River above the effluents discharge from the Severobaikalsk WWTP was minimal and amounted to  $0.1 \times 10^6$  cells/mL and  $0.2 \times 10^6$  cells/mL. River water above the WWTP discharge belongs to the pure I-II class of quality with a TMA/TMC ratio at 22°C greater than  $10^3$  and a SC above 4. In treated effluents from Severobaikalsk (7-WW) WWTP, the TMA was maximum at  $5.6 \times 10^6$  cells/mL. In the mouth of the Tyya River (7-Riv), in coastal water from the mouth (7-260CWL, 7-540CWR, 7-200, 7-NepCW), and in the pelagic zone (7-3k), the TMA ranged from  $0.3 \times 10^6$  c/ml to  $3.6 \times 10^6$  cells/mL. At the stations in the estuary, water quality corresponded to clean water in which autochthonous microflora dominated over allochthonous microflora and self-purification processes were active. The SC here was high and ranged from 8.4 to 70, but at the station 7-3k, it was less than 4, indicating low activity of the natural microbial population in the pelagic zone of this area. In 7-WW, the number of *E. coli* was 4700 CFU/100 cm<sup>3</sup>, which was 9.4 times higher than the normative values; in the other samples of the study area, *E. coli* were found in the amount acceptable by normative documentation or were absent. No *E. coli* representatives were found in any of the samples, except for 7-Riv130LA, in which the number (24 CFU/100 cm<sup>3</sup>) did not exceed the permissible value. EC excess was recorded in coastal water to the right of the river mouth (7-540 CWR) by 3.5 times, and in Neptun Bay (7-NepCW) by 12.8 times. At the other stations, the amount of EC was within the permissible values.

High levels of TCB in 7-WW indicate a potential risk of *Enterobacteriaceae* contamination of the watercourses of the Tyya River, into which inadequately treated effluent from the Severobaikalsk WWTP is discharged. Lactose-positive *Enterobacteriaceae* of fecal origin from the family *Enterobacteriaceae* of the genera *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, the most frequently isolated from environmental objects, are usually etiologically associated with the intestinal infections reported at that time (Trukhina et al., 2022). Non-compliance with the requirements of SanPiN 1.2.3685-21 and exceedance of sanitary-microbiological parameters in waste water and surface water of the mouth water area of the Tyya River were also revealed earlier during microbiological monitoring (Shtykova et al., 2016, Drucker et al., 2023).

### 3.3. Distribution of psychrophilic microorganisms

The abundance of culturable psychrophilic microorganisms (PM) was assessed at 28 stations in the study areas. The highest values were recorded at the Site 1 in the river water and surface water of the littoral estuary water zone (from 586 CFU/cm<sup>3</sup> to 2908 CFU/cm<sup>3</sup>). In general, the number of PMs exceeded that of organotrophic bacteria grown on RPA/10 at 22°C (TMC 22°C) by approximately twofold, with comparable numbers observed in the pelagic zone (1-3k). In the rest of the studied areas, PMs were higher at littoral zone (47-800 CFU/cm<sup>3</sup>) than in the pelagic zone (5-22 CFU/cm<sup>3</sup>), with the exception of 3-3k and 3-12k (867 CFU/cm<sup>3</sup> and 580 CFU/cm<sup>3</sup>). It should also be noted that in the surface water of the estuarine and pelagic zones, the number of PM significantly exceeded the number of mesophilic bacteria (TMC 37°C). Site 6 shows the dominance of mesophiles, which may be related to the favorable temperature regime for the development of this group of microorganisms, which arises due to water runoff from hot springs and warming of the shallow zone of Chivyrkuisky Bay.

Lake Baikal is a habitat for cold-loving microorganisms, which are mostly represented by psychrotolerant forms with a growth optimum of 22°C (Namsaraev et al., 2008; Martsinechko and Zakharova, 2023). Culturable psychrophiles were isolated from water, endemic sponge species, and bottom sediments from different areas of Lake Baikal, and their high abundance and enzymatic activity were shown (Parfenova et al., 2008; 2009; Babich et al., 2021, Martsinechko and Zakharova, 2022). The microbial community of the lake plays a key role in water quality formation, self-purification of the water body, degradation of organic matter, and maintaining the natural chemical status of the aquatic environment (Tulokhonov, 2009). In our study, in samples collected in the area of effluent discharge in the Slyudyanka WWTP, cultivated PMs dominate in the organotrophic community. Thus, PMs are numerous natural microorganisms of a natural water body and can be active participants in the self-purification processes of a water body, which should be taken into account when assessing water quality.

### 4. Conclusion

The water quality of seven areas of Lake Baikal was assessed in September 2022. The results showed that the ratio of TMA/TMC 22°C, which is used to assess the sanitary condition of water bodies, was more than  $10^3$ . According to GOST 17.1.3.07-82, this classification defines the water as a clean water body of class II. The exceptions were water samples taken at the mouth of the Pokhabikha River and in the Baikal water at the mouth water area at a distance of 2 m from the shore, where the water was classified as moderately polluted according to the TMA/TMC 22°C ratio ( $10^2$ ). The excess of natural microorganisms, including psychrotolerant ones, over the number of introduced bacteria at the stations of the Tyya mouths and Maksimikha rivers, the coastal water area of Baikalsk, Maksimikha,

Severobaikalsk, and most pelagic stations indicates the activity of autochthonous microflora. Low self-purification coefficient determined at the stations in the water area of the Pokhabikha River mouth, Tonky Island, Zmeinaya Bay indicates a high load of microflora of allochthonous origin and low intensity of self-purification in these parts of the lake.

A review of effluents discharged by the WWTP of Slyudyanka and Severobaikalsk towns into the surface watercourses, the mouth of the Baikal coast, and the thermal baths of hot springs of Zmeinaya bay revealed that the levels of generalized coliform bacteria, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* do not meet the requirements of SanPiN 1.2.3685-21. Exceedance of normative requirements for enterococci in the river water near Maksimikha settlement, coastal water of Zmeinaya Bay in Chivyrkuisky Bay and Neptun Bay near Severobaikalsk was recorded. At the littoral stations located 50 m from the shore and background stations in the pelagic zone of Lake Baikal at a distance of 3 km or more from the investigated local pollution sites, water quality indicators did not exceed surface water safety standards for microbiological and hydrochemical parameters.

## Acknowledgements

We are grateful to Suslova M. Yu, responsible for the accredited laboratory of aquatic microbiology (LIN SB RAS), for valuable consultations and assistance in the preparation of sanitary-microbiological research. The study was carried out within the State Assignment No. 0279-2021-0008 (121032300186-9)

## Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Babich O., Shevchenko M., Ivanova S. et al. 2021. Antimicrobial potential of microorganisms isolated from the bottom sediments of lake Baikal. *Antibiotics* 10 (8): 927. DOI: [10.3390/antibiotics10080927](https://doi.org/10.3390/antibiotics10080927)
- Drucker V.V., Suslova M.Yu., Nebesnykh Yu.R. et al. 2023. Sanitary-bacteriological monitoring of water quality in Lake Baikal – from single/one-off studies to systematic annual expeditions. *Limnology and Freshwater Biology* 6 (6): 164-179. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-164](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-164)
- Elovskaya I.S., Chernitsyna S.M., Pavlova O.N. et al. 2022. Sanitary-microbiological characteristics of water in the area of the Zmeynyi thermal spring (Northern Baikal, Russia, 2022). *Limnology and Freshwater Biology* 6 (5): 145-155. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-5-145](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-5-145)
- Horbenko Yu.A. 1961. On the most favourable amount of “dry nutrient agar” in media for culturing marine heterotrophic microorganisms. *Microbiology* 30 (1): 168-172.
- GOST 17.1.3.07-82. 1982. Ochrana prirody. Hydrosphere. Pravila kontrolya kachestva vodi vodoyomov i vodotokov. [Nature protection. Hydrosphere. Procedures for quality control of water in reservoirs and stream flows] (in Russian) URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200012472>
- GOST 31942-2012. 2012. Voda pit'yevaya. Otbor prob dlya mikrobiologicheskogo analiza [Drinking water. Sampling for microbiological analysis]. (in Russian) URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200097811>
- GOST 24849-2014. 2014. Voda. Metody sanitarno-bakteriologicheskogo analiza dlya polevykh usloviy [Water. Methods of sanitary-bacteriological analysis for field conditions]. (in Russian) URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115427/>
- GOST 31861-2012. 2012. Voda. Obshchie trebovaniya k otboru prob. [Water. General requirements for sampling]. (in Russian) URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200097520>
- Kravchenko O.S. 2009. Bacteria of the genus *Enterococcus* in Lake Baikal: distribution, species composition, adaptation mechanism. Author's thesis. Cand. (Biology). Ulan-Ude, Russia.
- Malnik V.V., Timoshkin O.A., Suturin A.N. et al. 2019. Anthropogenic changes in hydrochemical and sanitary-microbiological parameters of water quality in tributaries of South Baikal (Listvenichny Bay). *Water resources* 46 (5): 533-543.
- Malnik V.B., Suturin A.H., Gorshkova A.S. et al. 2022. Water quality of the shallow zone of Lake Baikal by sanitary-microbiological parameters. *Geography and natural resources*. 43 (2): 84-93. DOI: [10.15372/GIPR20220209](https://doi.org/10.15372/GIPR20220209)
- Martsinechko A.S., Zakharova Yu.R. 2022. Vertical distribution of psychrophilic and mesophilic microorganisms in the water column of Lake Baikal. Collection of theses from the joint scientific-practical conference of students on “Biotechnology in our life – 2022”: 17-19.
- Martsinechko A.S., Zakharova Yu.R. 2023. Psychrophilic microorganisms in lakes of Eastern Siberia: seasonal dynamics, morphological properties, and enzymatic activity. 3rd All-Russian Conference with International Participation: “Ecology and Geochemical Activity of Microorganisms in Extreme Habitats”: 72-73. DOI: [10.53954/9785604859865](https://doi.org/10.53954/9785604859865)
- MUK 4.2.1884-04. 2004. Sanitarno-mikrobiologicheskii i sanitarno-parazitologicheskii analiz vody poverkhnostnykh vodnykh ob'yektov [Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water in surface water bodies]. (in Russian) URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200039680/>
- MUK ECSD F 12.15.1-08. 2008. Metodicheskie ukazaniya po otboru prob dlya analiza stochnikh vod. [Guidelines for sampling for wastewater analysis]. (in Russian) URL: <https://www.gostrf.com/normadata/1/4293831/4293831616.htm>
- Namsaraev B.B. et al. 2008. Ecology of microorganisms of extreme aquatic ecosystems. Ulan-Ude: BSU Publishing House. 94 p.
- On approval of norms of maximum permissible impacts on the unique ecological system of Lake Baikal and the list of harmful substances, including substances belonging to the categories of especially dangerous, highly dangerous, hazardous, and moderately dangerous for the unique ecological system of Lake Baikal. 2020. Order of the Ministry of Natural Resources and Environment of the Russian Federation No. 83 of February 21, 2020.
- Parfenova V.V., Terkina I.L., Kostornova T.Ya. et al. 2008. Microbial community of freshwater sponges of Lake Baikal. *Izvestia RAS. Biological Series* (4): 435-445.
- Parfenova V.V., Pavlova O.N., Kravchenko O.S. et al. 2009. Study of local anthropogenic influence on horizontal and vertical distribution of microorganisms in the water of Lake Baikal. *Hydrobiological journal* 45 (2): 51-62.
- Podlesnaya G.V., Galachants A.D., Shtykova Yu.R. et al. 2022. Sanitary-microbiological assessment of water quality in Listvenichny Bay during the period of extremely high water level in Lake Baikal. *Geography and natural resources* 5: 163-169. DOI: [10.15372/GIPR20220517](https://doi.org/10.15372/GIPR20220517)
- Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948. DOI: 10.4319/lo.1980.25.5.0943

SanPiN 1.2.3685-21. 2021. Hygienic norms and requirements to ensure the safety and (or) harmlessness of habitat factors for human URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200006938>

Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Drucker V.V. et al. 2019. Microbiological water quality of Lake Baikal: a review. *Limnology and Freshwater Biology* 2: 210-217. DOI: [10.31951/2658-3518-2019-A-2-210](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-2-210)

Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Kostornova T.Ya. et al. 2016. Monitoring of the sanitary-microbiological state of the pelagic zone of Lake Baikal and estuaries of large rivers flowing into it from 2010 to 2015. *Izvestiya Irkutsk State University. Series: Biology. Ecology* 17: 51-62.

Suslova M.Yu., Shtykova Yu.R., Sukhanova et al. 2019. The use of microbiological monitoring to assess the impact of the anthropogenic influence on the ecosystem of Lake Baikal. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 381 (1) DOI: [10.1088/1755-1315/381/1/012088](https://doi.org/10.1088/1755-1315/381/1/012088)

Suslova M.Yu., Podlesnaya G.V., Zimens E.A. et al. 2022. Sanitary-microbiological characteristics of the coastal zone of Lake Baikal during the seasonal change in the lake level in 2022. *Limnology and Freshwater Biology* (6): 1724-1727. DOI: [10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724)

Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Volkova E.A. et al. 2014. Mass development of green filamentous algae of the genera *Spirogyra* and *Stigeoclonium* (Chlorophyta) in the coastal zone of South Baikal. *Hydrobiological Journal* 5:

15-26. DOI: [10.1615/HydrobJ.v51.i1.20](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v51.i1.20)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *Journal of Great Lakes Research* 42 (3): 487-497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Trukhina G.M., Yaroslavtseva M.A., Dmitrieva N.A. 2022. Modern trends of sanitary microbiology in the implementation of sanitary-epidemiological supervision over the safety of water bodies. *Public health and habitat* 30 (10): 16-24. DOI: [10.35627/2219-5238/2022-30-10-16-24](https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-10-16-24)

Tulokhonov A.K. 2009. System approach to nature management in the Baikal region. *Geography and natural resources* 30 (3): 224-228. DOI: [10.1016/j.gnr.2009.09.004](https://doi.org/10.1016/j.gnr.2009.09.004)

Wetzel R., Likens G. 2000. *Limnological Analysis*. New York: Springer, pp. 57-112.

Zagainova A.V., Trukhina G.M., Rakhmanin Yu.A. et al. 2020. Reason for the introduction of “Generalized coliform bacteria” and “*Escherichia coli*” as indicators of fecal contamination into the scheme of sanitary-microbiological control of water quality. *Hygiene and sanitation* 99 (12): 1353-1359. DOI: [10.47470/0016-9900-2020-99-12-1353-1359](https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1353-1359)

Zemskaya T.I., Zakharenko A.S., Rusanov I.I. et al. 2019. Ecology of estuarine water areas of small rivers in South Baikal according to chemical and microbiological studies in spring. *Microbiology* 88 (6): 673-684. DOI: [10.1134/S002636561906020X](https://doi.org/10.1134/S002636561906020X)



# Оценка качества воды озера Байкал и его притоков в местах воздействия локального загрязнения по микробиологическим и гидрохимическим данным



Марциничко А.С., Чебыкин Е.П., Чебунина Н.С., Захарова Ю.Р.\*

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Проведена оценка качества воды озера Байкал и его притоков, находящихся под влиянием семи различных источников локальных загрязнений: в районах сброса сточных вод из канализационных очистных сооружений (КОС) городов Слюдянка, Байкальск, Северобайкальск, а также стока хозяйственно-бытовых вод турбаз и поселка Максимиха, стока вод горячих источников из ванн для купания в бухте Змеиная, лежбищ байкальской нерпы и туристического центра на острове Тонкий архипелага Ушканьи острова в сентябре 2022 г. Воды озера и рек Похабиха, Максимиха и Тья при помощи методов микробиологического и гидрохимического анализа оценены как чистые II класса качества (ГОСТ 17.1.3.07-82), за исключением прибрежной акватории напротив устья реки Похабиха, где вода определена как умеренно загрязненная. Неравномерное распределение значений коэффициента самоочищения свидетельствует о высокой численности микрофлоры аллохтонного происхождения и низкой активности автохтонных микроорганизмов, участвующих в процессах самоочищения в исследуемых районах озера. Установлено, что сбрасываемые очистными сооружениями сточные воды, вода в устье и поверхностная вода Байкала в приустьевой акватории реки Похабиха, вода в купальных ваннах горячих источников б. Змеиная не соответствуют требованиям СанПиН 1.2.3685-21 по предельно допустимому количеству обобщенных колиформных бактерий, *Escherichia coli* и *Enterococcus*. На всех контрольных станциях пелагиали озера Байкал, удаленных от исследованных локальных мест загрязнений, показатели качества воды не превышали нормативы безопасности воды поверхностных водных объектов по микробиологическим и гидрохимическим параметрам.

**Ключевые слова:** озеро Байкал, качество воды, органотрофные и психрофильные бактерии, санитарно-микробиологические показатели

**Для цитирования:** Марциничко А.С., Чебыкин Е.П., Чебунина Н.С., Захарова Ю.Р. Оценка качества воды озера Байкал и его притоков в местах воздействия локального загрязнения по микробиологическим и гидрохимическим данным // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 998-1019. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-998

## 1. Введение

Воды озера Байкал являются объектом I и II категорий водопользования (СанПиН 2.1.3684-21), то есть используются в качестве источника питьевого, хозяйственно-бытового водопользования и водоснабжения предприятий пищевой промышленности, а также в рекреационных целях. Однако, известно, что в локальных участках литоральной зоны озера происходят негативные изменения, как например, массовый рост нитчатых водорослей, (Timoshkin et al., 2014; 2016), гибель губки, повы-

шение концентраций фосфатов и нитратов, численности органотрофных бактерий, в том числе группы кишечной палочки (Земская и др., 2019). Причинами снижения качества прибрежных байкальских вод являются увеличение рекреационной нагрузки и сброс неочищенных сточных вод из КОС, расположенных на берегу Байкала населенных пунктов (Drucker et al., 2023).

В последнее время регулярные микробиологические исследования неоднократно фиксировали повышенные санитарно-бактериологические показатели в озере Байкал и его притоках (Штыкова

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [julia.zakharova@gmail.com](mailto:julia.zakharova@gmail.com) (Ю.Р. Захарова)

**Поступила:** 28 июня 2024; **Принята:** 10 июля 2024;

**Опубликована online:** 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



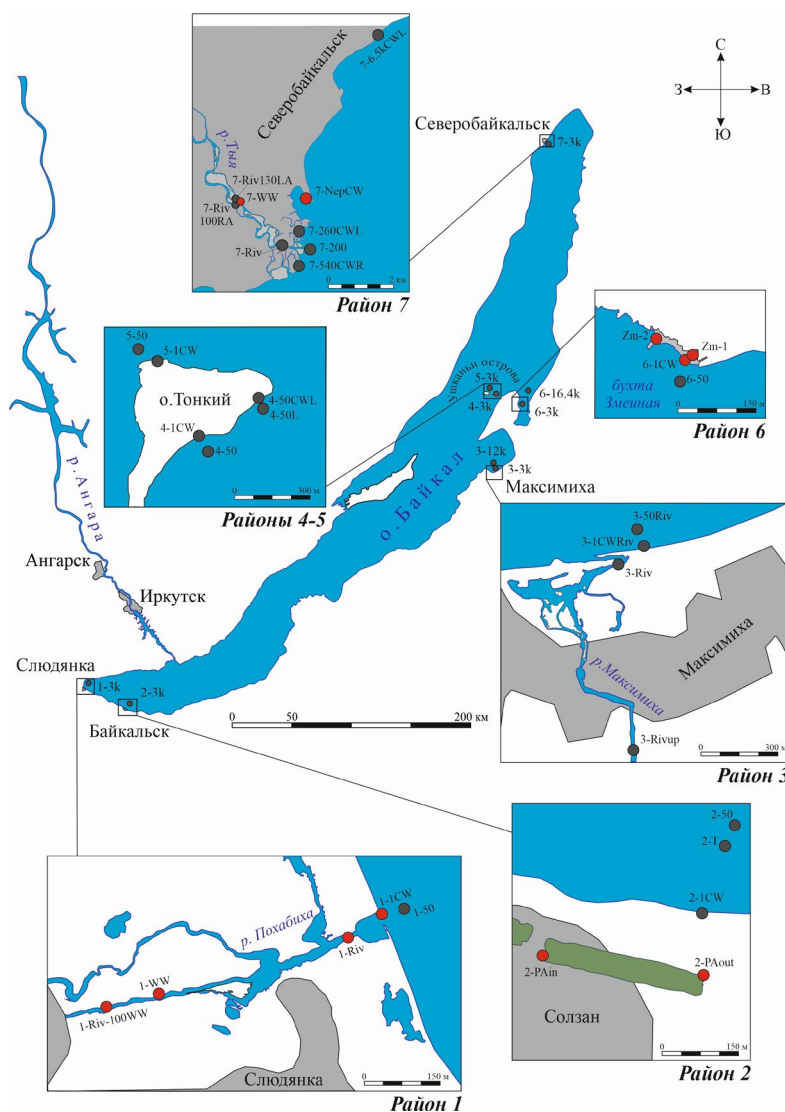
и др., 2016; Подлесная и др., 2022; Suslova et al., 2022; Мальник и др., 2019; 2022; Суслова и др., 2017). Представленные данные санитарно-бактериологической оценки качества воды подробно охватывают прибрежную акваторию Южного и Среднего Байкала (Мальник и др., 2019; Земская и др., 2019), устья рек в районах локального антропогенного влияния и пелагические станции стандартных гидрологических разрезов акватории озера (Shtykova et al., 2019; Suslova et al., 2019; Drucker et al., 2023). Изучение возможного постоянного поступления санитарно-показательных бактерий и сохранения их жизнеспособности в озере Байкал в комплексе с определением других групп органотрофных микроорганизмов важно для оценки качества байкальской воды (Elovskaya et al., 2022).

Цель работы – определить численность и распределение микроорганизмов, в том числе санитарно-показательных и оценить состояние процессов самоочищения озера Байкал в районах влияния источников локальных загрязнений. В нашей работе в каждом районе, связанном с локальным загрязнением, исследовано от 6 до 13 точек, которые включали места выпуска сточных вод, районы рек до и после выпуска сточных вод, устья рек, литоральную

зону на разном расстоянии от берега и пелагическую зону. Такая схема отбора проб позволила провести оценку общей численности микроорганизмов, культивируемых органотрофных психрофильных и мезофильных бактерий, а также определить санитарно-показательные бактерий и их распространение от мест локального загрязнения по направлению к Байкалу.

## 2. Материалы и методы

Районы исследования и отбор проб. В течении комплексной кругобайкальской экспедиции с 05 по 15 сентября 2022 г. исследовали семь районов влияния источников антропогенного и естественного загрязнения на озеро Байкал: г. Слюдянки (р. Похабиха, сточные воды КОС); г. Байкальска (пруд-аэратор БЦБК, сточные воды КОС); п. Максимиха (Баргузинский залив, турбазы), о. Тонкий (Нерпа-центр), о. Тонкий (лежбище нерп), б. Змеиная (Чивыркуйский залив, термальные источники), г. Северобайкальска (р. Тья, сточные воды КОС) (Рис.). Отбор проб сточных, речных и поверхностных вод литорали на расстоянии 2 м и 50 м от берега, а также фоновые участки пелагиали озера на



**Рис.** Карта-схема районов отбора проб в реках, устьях рек, литорали и пелагиали озера Байкал Черная заливка – значения санитарно-микробиологических показателей не превышают норматив, красная заливка – значения показателей превышают норматив.

расстоянии 3 км и более от источников загрязнений осуществляли согласно нормативным документам (ГОСТ 31942-2012, МУК ПНД Ф 12.15.1-08, ГОСТ 31861-2012). Пробы воды отбирали в реках, устьях рек и приустьевых участках литорали с поверхностного слоя воды (0,5 м) в предварительно стерилизованную 1,5 л бутылку с лодки, а в пелагической зоне с глубин 0, 5, 10, 15, 20, 25 м (интегральная проба 0–25 м) с помощью пробоотборника SBE32 Carousel Water Sampler с борта НИС «Г.Ю. Верещагин». Всего проанализировано 210 образцов воды, отобранных на 42 станциях отбора проб (Таблица 1).

Общую численность микроорганизмов (ОЧМ) учитывали методом прямого счета препаратов, окрашенных DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Porter and Feig, 1980), с использованием эпифлуоресцентного микроскопа (Axiovert 200 Zeiss, Германия).

Органотрофные бактерии определяли при разных условиях культивирования. Рыбо-пептонный агар, разбавленный в 10 раз (РПА/10) использовали для определения численности автохтонной микрофлоры, естественной для данного водоема, посеы инкубировали при 22°C в течение 72 ч (ОМЧ, 22°C) (Горбенко, 1961). На мясо-пептонном агаре (МПА) после инкубации при  $37 \pm 1$  °C в течение 24 ч. определяли численность аллохтонной микрофлоры, привнесенной в водоем в результате антропогенного загрязнения (ОМЧ, 37°C). Коэффициент самоочищения (КС) определяли по соотношению значений показателя ОМЧ, определённых при температурах 22°C и 37°C. Среду R2A использовали для культивирования психрофильных микроорганизмов (ПМ) при T 10°C в течение 10 суток.

Санитарно-микробиологические показатели определяли в соответствии СанПиН 1.2.3685-21. Обобщенные колиформные бактерии (ОКБ), *E. coli*, определяли методом мембранной фильтрации на дифференциально-диагностической среде Эндо, бактерии рода *Enterococcus* (ЭК) на агаризованной азидной среде Энтерококкагар. Анализ результатов проводили согласно ГОСТ 24849-2014.

Физико-химические параметры воды: pH, температура (Т), электропроводность (ЕС), концентрации  $O_2$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  были измерены стандартными методами согласно Wetzel and Likens (2000), Руководству по химическому анализу поверхностных вод суши (2009) в аккредитованной лаборатории гидрохимии и химии атмосферы, как описано ранее (Мальник и др., 2019).

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Физико-химическая характеристика воды в районах исследования

Во всех районах исследования пробы воды были отобраны с солнечную безветренную погоду при T воздуха от 10°C до 25°C. T поверхности воды колебалась в пределах 6.4 – 10.1°C в реках Похабиха, Максимиха и Тья. По направлению от устьев рек от берега до фоновых станций в пелагиали поверхностная вода Байкала была прогрета в среднем до  $13.6 \pm 4.5$  °C, кроме района напротив устья реки Похабиха

(6.5 – 7.5°C) и в прибрежной воде правее от устья реки Тья (7.7°C). T сточных вод, отобранных из КОС городов Слюдянка, Байкальск и Северобайкальск, была более высокой (14.2 – 19.8°C), в горячих источниках бухты Змеиная зафиксировано 42.8°C (Zm-1) и 39,3°C (Zm-2). Значения pH во всех речных и байкальских образцах варьировали в слабощелочном диапазоне от 7.63 до 8.67, в горячих источниках были щелочные показатели (9.6), в сточных водах из КОС города Северобайкальск зафиксирована слабокислая среда (5.24). Максимальные значения электропроводности (ЕС) определены в сточных водах и горячих источниках (до 864 мкСм/см). В воде рек Похабиха и Максимиха значения ЕС (240 мкСм/см и 156 мкСм/см) были выше чем в среднем в байкальской воде (127 мкСм/см) и наоборот в воде реки Тья (98 мкСм/см) меньше чем в байкальской. Концентрации растворенного кислорода ( $O_2$ ) в речной и озерной воде варьировали в узком диапазоне 8.9 – 12.6 мг/дм<sup>3</sup> (Таблица 1).

Содержание  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  и  $NH_4^+$  в сточных водах, сбрасываемых централизованными и локальными системами водоотведения поселений или городских округов в пределах центральной экологической зоны, а также непосредственно в озеро Байкал нормируются согласно приказа Минприроды России от 21.02.2020 № 83 и отнесены к категории «умеренно опасных» вредных веществ. В сточных водах от города Слюдянка, сбрасываемых в реку Похабиха выявлено превышение допустимых нормативов содержания  $PO_4^{3-}$  (по фосфору) в 13 раз,  $NH_4^+$  в 90 раз. В сточных водах от города Северобайкальск, сбрасываемых в реку Тья содержание  $PO_4^{3-}$  (по фосфору) превышало допустимые нормативы в 19.7 раза,  $NO_3^-$  в 17.4 раза,  $NH_4^+$  в 7.3 раза. Сточные воды от города Байкальск, отобранные из пруда-аэротатора и после отстаивания в нем сбрасываемые непосредственно в озеро Байкал так же содержали высокие концентрации вредных веществ. Содержание  $PO_4^{3-}$  (по фосфору) превышало допустимый норматив в 23 раза,  $SO_4^{2-}$  в 3 раза,  $NO_3^-$  в 42.5 раз,  $NO_2^-$  в 150 раз и  $NH_4^+$  в 45 раз.

Концентрации химических компонентов в реках и устьях рек были выше чем в озерной воде. Наиболее была выражена разница в содержании  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$ , величина которых варьировала в речной воде 6.8-11 мг/дм<sup>3</sup>, 0.011-0.085 мг/дм<sup>3</sup>, 1.24-1.7 мг/дм<sup>3</sup> соответственно и в озерной 5.6-8.1 мг/дм<sup>3</sup>, 0.003-0.020 мг/дм<sup>3</sup>, 0.1-1.4 мг/дм<sup>3</sup> соответственно. При этом в озерной воде наибольшие концентрации биогенных элементов были в образцах, отобранных в устьях рек, прибрежной воде (2 м от берега) напротив устьев рек, и горячих источников. Наибольшие концентрации  $NH_4^+$  и  $NO_2^-$  в реке (0.046 мг/дм<sup>3</sup> и 0.011 мг/дм<sup>3</sup>) и устье реки Похабиха (0.93 мг/дм<sup>3</sup> и 0.029 мг/дм<sup>3</sup>), в остальных образцах не превышали 0.013 мг/дм<sup>3</sup> и 0.008 мг/дм<sup>3</sup>, соответственно (Таблица 1). Повышенные концентрации биогенных элементов в устье реки Похабиха (1-Riv) и приустьевой акватории (1-1CW) могут свидетельствовать о влиянии недостаточно очищенных сточных вод на химический состав воды.

Таблица 1. Описание места отбора проб и физико-химические показатели воды на участках исследований в сентябре 2022 г.

Станция	Описание станции	Т, °С	pH	ЕС, мкСм/см	O <sub>2</sub>	мг/дм <sup>3</sup>						SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
						PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
1-Riv100WW	Река Похабиха (РП), в 100 м выше места сброса сточных вод	6.4	8.27	220.6	11.8	0.030	1.700	0.011	0.046	10		
1-WW	Труба сброса сточных вод города Слюдянка	14.2	7.47	863	НД	3.9	0.38	0.170	36	37		
1-Riv	р. Похабиха, устье	7.6	8.16	240.9	12.2	0.082	1.7	0.029	0.93	11		
1-1CW	2 м от берега напротив устья РП	6.5	8.11	173.9	12.6	0.020	1.4	0.010	0.22	8.1		
1-50	50 м от берега напротив устья РП	6.7	8.14	127.6	12.2	0.003	0.54	0.004	0.017	6.1		
1-3k	3 км от берега напротив устья РП	7.5	7.95	123.8	НД	0.003	0.27	0.004	<0.013	6.0		
2-PAin	Пруд- Аэрагор (ПА) со сточными водами из города Байкальск	17.5	7.5	279	НД	0.75	32.9	0.019	0.123	18		
2-PAout	ПА, сливной колодец	15.8	7.1	266	НД	0.68	24.2	0.15	0.452	17		
2-1CW	2 м от берега напротив ПА	12.2	7.76	138.4	9.8	<0.003	0.92	<0.003	<0.013	8.0		
2-Г	вода над трубой сброса из ПА	12.2	8.28	123.7	11.1	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.5		
2-50	50 м от берега напротив ПА	12.2	8.31	123.7	10.0	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.6		
2-3k	3 км м от берега напротив ПА	11.1	8.08	123.4	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.1		
3-Rivup	р. Максимиха (РМ), 780 м выше устья	10.1	7.96	155.7	10.6	0.030	0.25	0.004	<0.013	6.8		
3-Riv	устье РМ	10.1	8.08	163.6	11.0	0.025	0.24	0.003	<0.013	10		
3-1 CWRiv	2 м от берега напротив устья РМ	14.2	8.07	132.5	9.5	0.006	<0.1	0.003	<0.013	7.1		
3-50Riv	50 м от берега напротив устья РМ	15.4	8.08	128.8	9.4	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.8		
3-3k	3 км от берега напротив устья РМ	15.1	7.63	128.5	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.7		
3-12k	12 км от берега напротив устья РМ, выход из Баргузинского залива	13.6	7.92	126	НД	<0.003	<0.1	0.008	<0.013	6.3		
4-1CW	2 м от берега напротив Нерпа-центра (НЦ), остров Тонкий	13.5	8.11	127.9	10.0	0.003	<0.1	0.006	0.028	6.3		
4-50	50 м от берега напротив НЦ	13.7	8.06	126.2	11.5	<0.003	<0.1	0.003	<0.013	6.1		
4-50 CWL	270 м от 4-1 CW	13.3	8.48	126.6	10.9	0.003	<0.1	0.003	<0.013	6.2		
4-50L	50 м от станции 4-50 CWL	13.3	8.16	126.2	8.9	0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.4		
4-3k	3 км от берега напротив НЦ	13.8	7.99	126.2	НД	0.005	<0.1	0.004	<0.013	6.3		
5-1CW	2 м от берега напротив лежбища нерпы (ЛН), остров Тонкий	12.8	8.41	126.1	10.5	0.006	<0.1	0.003	<0.013	5.6		
5-50	50 м от станции 5-1 CW напротив ЛН	13.5	8.47	126.3	10.6	0.003	<0.1	<0.003	<0.013	5.6		
5-3k	3 км от берега напротив ЛН	13.2	7.99	124	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	5.6		
Zm-1	горячий источник 1 (ГИ1), бухта Змеиная	48.2	9.54	571	НД	<0.003	0.15	0.006	0.62	121		
Zm-2	горячий источник 2 (ГИ2), бухта Змеиная	39.3	9.63	864	НД	<0.003	0.10	0.006	0.68	166		



Станция	Описание станции	Т, °С	pH	ЕС, мкСм/см	O <sub>2</sub>	мг/дм <sup>3</sup>				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
						PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		
6-1CW	2 м от берега напротив ГИ1	15.6	8.24	141.2	9.0	0.008	<0.1	<0.003	<0.013	15	
6-50	50 м от берега напротив ГИ1	14.3	8.3	130.7	9.5	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.8	
6-3к	3 км от берега напротив ГИ1	14.9	8.04	126.3	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.0	
6-16.4к	16 км от берега напротив ГИ1, выход из Чивыркуйского залива	14.6	8.08	126.5	НД	<0.003	<0.1	0.010	<0.013	6.0	
7-Riv130LA	р. Тья (РТ), левый рукав, 130 м выше сброса сточных вод	6.5	7.61	97.5	11.4	<0.003	0.56	<0.003	<0.013	9.6	
7-Riv100RA	РТ, правый рукав, 120 м выше сброса сточных вод	6.5	7.75	97.5	11.5	<0.003	0.55	<0.003	<0.013	9.7	
7-WW	Труба сброса сточных вод города Северобайкальск	19.8	5.24	699	НД	<b>5.9</b>	<b>157</b>	<b>0.017</b>	<b>2.9</b>	<b>34</b>	
7-Riv	650 м выше устья РТ	6.5	7.7	97.5	12.2	0.011	0.79	0.004	<0.013	9.7	
7-260 CWL	2 м от берега, 260 м слева от устья РТ	12.3	8.04	124.4	10.1	<0.003	<0.1	0.005	<0.013	6.9	
7-540 CWR	2 м от берега, 540 м справа от устья РТ	7.7	7.68	96	11.1	<0.003	0.46	<0.003	<0.013	9.2	
7-200	200 м от берега напротив устья РТ	12.5	8.14	122.1	10.3	<0.003	<0.1	0.014	<0.013	6.8	
7-6.5к CWL	2 м от берега, 6.5 км слева от устья РТ	13.4	8.67	124.2	10.4	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.6	
7-3к	3 км от берега напротив устья РТ	НД	8.15	125.4	НД	<0.003	<0.1	<0.003	<0.013	6.4	
7-Ner CW	2 м от берега, 1,5 км to слева от устья РТ, лодочная станция	НД	8.05	148.7	9.0	<0.003	0.23	0.006	<0.013	7.9	

**Примечание:** выделены значения, превышающие нормативы содержания вредных веществ в сточных водах, сбрасываемых (1) непосредственно в озеро Байкал, (2) централизованными и локальными системами водоотведения поселений или городских округов в пределах центральной экологической зоны согласно приказа Минприроды России от 21.02.2020 № 83: допустимое содержание SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1)5.53 и (2) + 50.0 мг/дм<sup>3</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>(по фосфору)(1)0.01 и (2)0.1 мгР/дм<sup>3</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1)0.57 и (2)9 мг/дм<sup>3</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (1)0.001 и (2)0.2 мг/дм<sup>3</sup> и NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(1)0.01 и (2)0.4 мг/дм<sup>3</sup>

### 3.2. Распределение численности микроорганизмов и санитарно-микробиологических показателей

В результате микробиологического исследования семи районов (Рис., Районы 1–7) с различной антропогенной нагрузкой на литораль Байкала выявлена высокая численность бактерий и значительное превышение нормативов санитарно-микробиологических показателей в пробах воды отобранных непосредственно из самих источников загрязнения. Это были сточные воды, выпускаемые КОС от города Слюдянка в реку Похабиха и от города Северобайкальск в реку Тья, вода в прудах-аэратах города Байкальск, вода в горячих минеральных источниках бухты Змеиная в Чивыркуйском заливе (Таблица 2).

Район 1. ОЧМ ( $3.2 \times 10^6$  кл/мл) была максимальной выше выпуска очищенных сточных вод (1-Riv100WW) в реку Похабиха среди всех образцов из района г. Слюдянка, а соотношение ОЧМ/ОМЧ 22°C было более  $10^3$ , которое классифицирует воду согласно ГОСТ 17.1.3.07-82 как чистый водоем II класса. Соотношение ОЧМ/ОМЧ 22°C обычно служит для оценки санитарного состояния водоемов и характеризует трофическое статус биоценоза. Величина этого соотношения в водах, богатых лабильным органическим веществом, составляет  $10^3$ – $10^2$  в умеренно-загрязненных III класса и менее  $10^2$  в загрязненных IV, V, VI класса качества водах, тогда как в чистых водоемах и водотоках II класса оно составляет более  $10^3$  (ГОСТ 17.1.3.07-82). При этом коэффициент самоочищения (КС) на станции 1-Riv100WW был 6.23, что соответствует завершённому процессу самоочищения при КС равном или более 4 (МУК 4.2.1884-04). Соотношение количественных показателей, отражающих общее содержание мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды (ОМЧ, определённых при температурах 22 °C и 37 °C выражается в КС, с помощью которого можно оценить активность и состояние процессов самоочищения природных водоёмов (МУК 4.2.1884-04). В местах загрязнения хозяйственно-бытовыми сточными водами численные значения обеих групп близки. Показатель позволяет получать дополнительную информацию о санитарном состоянии водоемов, источниках загрязнения, процессах самоочищения.

В очищенных сточных водах КОС г. Слюдянка ОЧМ составила  $27.6 \times 10^6$  кл/мл, а значения ОМЧ 22 °C и ОМЧ 37 °C были максимальными (2208 КОЕ/см<sup>3</sup> и 29024 КОЕ/см<sup>3</sup>) из всех исследованных образцов. Влияние сточных вод было существенно заметно в устье реки 1-Riv и в байкальской воде приустьевой акватории на расстоянии 2 м от берега 1-1CW. По соотношению ОЧМ/ОМЧ 22°C ( $10^2$ ) вода здесь относится к III категории качества и оценивается как умеренно загрязненная. Учитывая тот факт, что численность аллохтонной микрофлоры (ОМЧ 37°C), привнесённой в водоем была высокой, поэтому значения КС на этих станциях были низ-

кие 0.34 и 1.72, что указывает на высокую антропогенную нагрузку. При этом при оценке всех показателей численности микрофлоры на станциях в литорали на расстоянии 50 м от берега (1-50) и контрольной фоновой в пелагиали на расстоянии 3 км от берега (1-3к) вода соответствовала II классу качества, а высокий КС свидетельствовал об активных процессах самоочищения в озере.

В районе влияния г. Слюдянка превышение санитарно-микробиологических показателей обнаружено в очищенных сточных водах (1-WW), в устье реки Похабиха (1-Riv) и прибрежной воде озера (1-1CW) (Table 2). В исследовании были определены основные индикаторные показатели, используемые для оценки безопасности водных объектов согласно Сан ПиН 1.2.3685-21: обобщенные колиформные бактерии (ОКБ), *Escherichia coli* (*E. coli*), энтерококки (ЕС). Зафиксированные высокие значения ОКБ и на станциях 1-WW (3500 КОЕ/100 см<sup>3</sup>), 1-Riv (1350 КОЕ/100 см<sup>3</sup>), 1-1CW (976 КОЕ/100 см<sup>3</sup>) превышали нормативные показатели в 7, 2.7, 1.9 раз соответственно. Значения ОКБ снижались по мере удаления от места выпуска очищенных сточных вод и не превышало нормативы на станциях 1-50 и 1-3к. Недавно введенный с 1 января 2022 г (СанПиН 1.2.3685-21) показатель «Обобщенные колиформные бактерии» вместо общих колиформных бактерий с сохранением аббревиатуры ОКБ и прежними единицами измерений, учитывает не только лактозоположительные энтеробактерии, но и другие атипичные лактозаотрицательные колонии, производящие ферментацию D-глюкозы до кислоты и образования газа (Загайнова и др., 2020). Использование этого показателя связано с тем, что с нарастанием антропогенной нагрузки на водоемы, потеплением микроклимата, изменением пищевого поведения людей, ввозом импортных пищевых продуктов и бесконтрольным применением антибиотиков начали утрачиваться некоторые фенотипические свойства энтеробактерий, металлический блеск колоний и способность ферментировать лактозу (Трухина и др., 2022). Определение по двум биохимическим признакам дает возможность выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, гарантируя их присутствие в пределах допустимых нормативов (не более 500 КОЕ/100 см<sup>3</sup>).

Показатели *E. coli* на станциях 1-WW, 1-Riv, 1-1CW превышали предельно допустимые нормы в 35, 13.5, 9.7 раз, соответственно, при этом они не были обнаружены на станциях 1-50 и 1-3к. Для санитарно-микробиологического контроля воды водоемов взамен показателя «Термотолерантные колиформные бактерии» принят показатель *E. coli*, который лучше обеспечивает определение свежего фекального загрязнения в воде водоемов (СанПиН 1.2.3685-21). Это связано с тем, что кишечные палочки способны расти как при 37 °C, так и при 44 °C и преобладают в фекалиях человека и животных по сравнению с другими представителями термотолерантных колиформ (Zagainova et al., 2020, Трухина и др., 2022). Показатель *E. coli* предложен для всех видов поверхностных водных объектов и

**Таблица 2.** Содержание бактерий и санитарно-микробиологические показатели в пробах поверхностных вод в сентябре 2022 г.

Станция	ОЧМ, × 10 <sup>6</sup> кл/мл	ПФ	ОМЧ 22 °С	ОМЧ 37 °С	КС	ОКБ	ЭК	E. coli
1Riv100WW	3.2	680	324	52	6.23	268	100	0
1WW	27.6	НД	2208	29024	-	3500	84200	3500
1Riv	1.1	2908	1992	5848	0.34	1350	1650	1350
1-1CW	1.0	2856	1360	790	1.72	976	332	976
1-50	2.1	586	368	6	61.33	83	39	0
1-3k	1.4	25	32	0	32	9	0	0
2PAin	3.7	НД	1146	1400	-	12500	300	0
2PAout	6.3	НД	1258	1070	-	7300	200	0
2-1CW	0.4	103	76	4	19	192	0	0
2Т	1.5	18	8	0	8	110	0	0
2-50	1.8	8	13	0	13	65	0	0
2-3k	0.6	5	8	0	8	17	0	0
3-Rivup	НД	НД	1448	58	24.96	64	52	64
3-Riv	0.5	НД	98	2	49	140	0	0
3-1CWRiv	0.6	800	1112	43	25.86	34	0	34
3-50 Riv	0.6	166	808	60	13.46	21	1	0
3-3k	1.0	867	1408	4	352	13	0	0
3-12k	0.7	580	302	114	2.64	78	5	0
4-1CW	0.7	64	55	7	7.85	39	2	0
4-50 CWL	НД	НД	13	7	1.85	100	0	0
4-50	0.7	15	15	5	3	78	0	78
4-50L	НД	НД	5	0	5	108	0	0
4-3k	0.8	7	32	3	10.66	40	0	0
5-1CW	0.6	47	152	21	7.23	86	0	0
5-50	0.6	109	262	118	2.22	12	6	0
5-3k	1.8	42	156	66	2.36	4	0	0
Zm1	0.8	НД	302	127	-	1860	0	1860
Zm2	0.3	НД	2032	114	-	5240	60	5240
6-1CW	1.3	548	792	507	1.56	7	68	7
6-50	0.7	109	248	122	2.03	6	6	6
6-3k	3.0	181	608	240	2.53	17	0	0
6-16.4k	2.4	22	107	38	2.81	1	0	0
7-Riv130LA	0.1	НД	52	7	7.42	24	5	24
7-Riv100RA	0.2	НД	13	2	6.5	37	1	0
7-WW	5.6	НД	51	154	-	4700	0	0
7-Riv	0.3	НД	42	5	8.4	120	0	0
7-260 CWL	0.7	78	456	31	14.70	0	7	0
7-540 CWR	0.4	247	200	7	28.57	0	35	0
7-200	3.6	9	70	1	70	106	2	0
7-6.5kCWL	НД	НД	98	5	19.6	436	1	0
7-3k	1.5	22	92	30	3.06	0	0	0
7-НерсCW	1.3	164	285	54	5.27	20	128	0

**Примечание:** выделены значения, превышающие нормативы согласно СанПиН 1.2.3685-21, ОЧМ – общая численность микроорганизмов, ПФ – психрофильные микроорганизмы, ОМЧ – общее микробное число, ЭК – Enterococcus, ОКБ – общие колиформные бактерии, КС – коэффициент самоочищения, прочерк – данные отсутствуют.

нормируется не более 100 КОЕ/100 см<sup>3</sup>. Количество энтерококков (ЭК) также значительно превышало допустимые нормы на станции 1-Riv100WW в 10 раз (100 CFU/100 см<sup>3</sup>), 1-WW в 842 раза (84200 КОЕ/100 см<sup>3</sup>), 1-Riv в 165 раз (1650 КОЕ/100 см<sup>3</sup>), 1-1CW в 33.2 раза (332 КОЕ/100 см<sup>3</sup>), 1-50 в 3.9 раза (39 КОЕ/100 см<sup>3</sup>). Несмотря на то, что численность энтерококков уменьшалась по мере удаления от места выпуска сточных вод, несомненно очень высокие показатели этих индикаторных микроорганизмов свидетельствуют о наличии свежего фекального загрязнения и неблагоприятной эпидемиологической обстановке на всем участке исследования, за исключение фоновой станции пелагиали. Энтерококки являются постоянными обитателями кишечника человека и животных и в большом количестве выделяются во внешнюю среду. Нормативы, для воды источников поверхностных водоемов и сточной воды в местах выпуска в водоемы определены не более 100 КОЕ/100 см<sup>3</sup>, в зонах рекреации не более 10 КОЕ/100 см<sup>3</sup>. Характерные морфологические и физиологические особенности энтерококков к устойчивости воздействия факторов окружающей среды и некоторым дезинфектантам при водоподготовке, были ранее показаны в исследованиях представителей этой группы, изолированных из озера Байкал (Кравченко, 2009).

Микробиологические исследования в 2021-2023 гг. в районе выпуска сточных вод из КОС г. Слюдянка показали, что речная вода и прибрежная акватория находятся под воздействием сточных вод и поверхностного стока, что характеризуется высоким процентом проб, не соответствующих санитарно-бактериологическим требованиям (Suslova et al., 2022; Drucker et al., 2023). Анализ этих данных свидетельствует о неэффективной работе КОС, приводящей к выпуску недостаточно очищенных сточных вод в природный водоток и потенциальной эпидемиологической опасности воды в зонах рекреации.

**Район 2.** ОЧМ на станциях литорали и пелагиали озера в районе напротив выпуска сточных вод из пруда-аэратора, являющимся заключительным этапом КОС г. Байкальска варьировала в пределах 0.4 - 1.8 × 10<sup>6</sup> кл/мл. Соотношение ОЧМ/ОМЧ 22°C было более 10<sup>3</sup> и КС более 4, что классифицирует воду на всех исследуемых станциях как чистую. В очищенных сточных водах пруда-аэратора были определены высокие значения ОЧМ в воде на входе (2-PAin) 3.6 × 10<sup>6</sup> кл/мл и на выходе (2-PAout) 6.3 × 10<sup>6</sup> кл/мл. Значения ОМЧ 22 °C и ОМЧ 37 °C в воде прудов-аэраторов на входе и выходе так же были высокими (1146 КОЕ/см<sup>3</sup> и 1258 КОЕ/см<sup>3</sup>) и (1400 КОЕ/см<sup>3</sup> и 1040 КОЕ/см<sup>3</sup>) соответственно. Санитарно-микробиологические показатели в сточных водах превышали допустимые нормативы: ОКБ в 25 и 14.6 раз, а ЕС в 3 и 2 раза, соответственно. В воде прибрежной акватории напротив прудов-аэраторов и фоновой станции пелагиали ОКБ присутствовали в пределах допустимых нормативов и их численность снижалась по мере удаления от берега от 192 КОЕ/100 см<sup>3</sup> до 17 КОЕ/100 см<sup>3</sup>. *E. coli* не была обнаружена ни в одном образце этого района.

В нашем исследовании не было выявлено превышения санитарно-микробиологических показателей в байкальской воде, в том числе и на станции находящейся над трубой выпуска сточных вод (2-T) в озеро. Однако высокие значения показателей ОКБ и ЭК, определенные нами сточных водах пруда-аэратора, а также выявленные ранее в поверхностной воде прибрежной зоны г Байкальска при проведении санитарно-бактериологического мониторинга в 2010–2023 гг. (Drucker et al., 2023) указывают на низкую эффективность очистки сточных вод.

**Район 3.** ОЧМ на станциях литорали Баргузинского залива и пелагиали озера напротив района расположения туристических баз возле п. Максимиха варьировала в пределах 0.5 - 1.0 × 10<sup>6</sup> кл/мл. Соотношение ОЧМ/ОМЧ 22°C на станциях 3-Riv и 3-12k было более 10<sup>3</sup>, что классифицирует воду как чистую, а на станциях 3-1CW Riv. 3-50 и 3-3k, было в пределах 10<sup>3</sup>-10<sup>2</sup> и оценивает воду как умеренно загрязненную. Коэффициент самоочищения на всех станциях более 4 и свидетельствует о высоком потенциале воды к естественному самоочищению. Однако на выходе из Баргузинского залива (3-12k) КС составил 2.64, что указывает на незавершенный процесс самоочищения в этой акватории озера. Санитарно-микробиологические показатели не превышали нормативные значения на всех исследуемых станциях за исключением воды в реке Максимиха, отобранной на 780 м выше устья (3-Rivup), где значения ЭК превышали норматив в 5.2 раза (52 КОЕ/100 см<sup>3</sup>). Превышенный показатель ЭК указывает на факт свежего фекального загрязнения речной воды, которое происходит вероятно при попадании в воду фекальных стоков от жилых домов поселка или при выпасе домашнего скота. Как известно, вдоль побережья Байкала вблизи п. Максимиха существует более десятка баз отдыха и гостевых домов. При этом сток вод хозяйственно-бытового и фекального происхождения осуществляется без контролируемой очистки на территорию побережья. По данным Drucker et al. (2023) образцы прибрежных песчаных отложений контаминированы санитарно-показательными бактериями, что позволило отнести их по степени загрязненности к эпидемиологически опасным.

**Районы 4 и 5.** Остров Тонкий является одним из малых островов архипелага Ушканьи острова, где находится экологическая тропа «К лежбищу байкальской нерпы» и здесь регулярно проводятся экскурсии в летний туристический сезон. Для оценки антропогенного влияния на качество воды в прибрежной части и в пелагиали отобраны пробы с восточной стороны острова, где находится информационный «Нерпа центр» и останавливаются корабли для высадки туристов (Район 4, Рис.). Для оценки влияния жизнедеятельности байкальской нерпы на качество воды отобраны пробы с западной стороны острова, где находится лежбище нерп (Район 5, Рис.). Максимальные значения ОЧМ (1.8 × 10<sup>6</sup> кл/мл) зафиксированы на станции 5-3k, в остальных пробах от 0.6 × 10<sup>6</sup> кл/мл до 0.8 × 10<sup>6</sup> кл/мл. Соотношение ОЧМ/ОМЧ во всех исследуемых



пробах было более  $10^3$  и оценивает воду как чистую (I-II класс качества). Однако на нескольких станциях выявлено, что численные значения ОМЧ 22 °C и ОМЧ 37 °C были близки и соответственно были низкие значения КС: 4-50 CWL - 1.85, 4-50 - 3, 5-50 - 2.22, 5-3k - 2.36. Наличие аллохтонных микроорганизмов по численности близких с численностью микроорганизмов автохтонного происхождения служит признаком повышенного локального поступления в воду привнесенных бактерий и пониженной активности бактерий естественно обитающих в озере. При этом превышений санитарно-показательных бактерий не выявлено, что указывает на отсутствие влияния туристической деятельности на эпидемиологическую обстановку в районе острова Тонкий.

**Район 6.** В прибрежной воде бухты Змеиная и пелагиали Чивыркуйского залива наибольшие значения ОЧМ зафиксированы на станциях 6-1CW ( $1.3 \times 10^6$  кл/мл), 6-3k ( $3.0 \times 10^6$  кл/мл) и 6-16.4k ( $2.4 \times 10^6$  кл/мл), соотношение ОЧМ/ОМЧ 22°C было более  $10^3$ . На всех исследуемых станциях КС был ниже 4 (1.56 - 2.81), что свидетельствует о незавершенных процессах самоочищения и локального загрязнения воды вследствие большой туристической нагрузки этой акватории залива. В местах массового купания людей в купальных ваннах горячих источников (Zm-1 и Zm-2) зафиксированы высокие значения ОКБ (1860 КОЕ/100 см<sup>3</sup> и 5240 КОЕ/100 см<sup>3</sup>), что превышает допустимые нормативы в 3.72 и 10.48 раз соответственно. Также *E. coli* обнаружена в обоих купальных ваннах и превышает нормативные показатели в 18.6 (Zm-1) и 52.4 (Zm-2) раза, а количество ЭК в 6 раз в Zm-2. В прибрежной воде (6-1CW) напротив горячего источника (Zm-2) отмечено превышение энтерококков в 6.8 раз. На расстоянии от берега 50 м (6-50), 3 км (6-3k) и на выходе из Чивыркуйского залива (6-16.4k) санитарно-показательные бактерии выявлены в незначительных количествах, либо отсутствовали.

Превышения допустимых значений санитарно-микробиологических показателей согласно СанПиН 1.2.3685-21 в ваннах для купания, ручья стока и в урзе воды на расстоянии до 5 метров также были выявлены ранее (Suslova et al., 2022, Elovskaya et al., 2022). Очевидно, что количество купающихся не соответствует скорости обновления воды в ваннах, при этом температура воды горячих источников создает благоприятные условия для развития условно-патогенных колиформных бактерий. В связи с тем, что горячие источники являются объектами постоянного рекреационного посещения, необходимо информировать туристов о мерах безопасности при купании.

**Район 7.** ОЧМ в левом (7-Riv130LA) и правом (7-Riv100RA) рукаве р. Тья выше сброса сточных вод от КОС г. Северобайкальска была минимальной и составила  $0.1 \times 10^6$  кл/мл и  $0.2 \times 10^6$  кл/мл. Речная вода выше сброса КОС относится к чистой I-II класса качества при соотношении ОЧМ/ОМЧ 22°C более  $10^3$  и КС выше 4. В очищенных сточных водах КОС г. Северобайкальск (7-WW) ОЧМ

была максимальной и составила  $5.6 \times 10^6$  кл/мл. В устье реки Тья (7-Riv), в прибрежной воде от устья (7-260CWL, 7-540CWR, 7-200, 7-NerCW) а также в пелагиали (7-3k) ОЧМ варьировала от  $0.3 \times 10^6$  кл/мл до  $3.6 \times 10^6$  кл/мл. На станциях приустьевой акватории вода по качеству соответствовала чистой в которой автохтонная микрофлора доминировала над аллохтонной и активны процессы самоочищения. КС здесь был высоким и варьировал от 8.4 до 70, но при этом на станции 7-3k был менее 4, что указывает на низкую активность естественной микробной популяции в пелагиали этого района. Значения ОКБ в 7-WW составили 4700 КОЕ/100 см<sup>3</sup>, что превышало нормативные показатели в 9.4 раза, в остальных образцах исследуемого района ОКБ обнаружены в допустимом нормативной документацией количестве или отсутствовали. Во всех образцах представители *E. coli* не были обнаружены, кроме 7-Riv130LA в котором количество (24 КОЕ/100 см<sup>3</sup>) не превышало допустимое значение. Превышение ЭК зафиксировано в прибрежной воде справа от устья реки (7-540 CWR) в 3.5 раза и залива Нептун (7-NerCW) в 12,8 раз, на остальных станциях количество ЭК было в пределах допустимых значений.

Высокие значения показателя ОКБ в 7-WW свидетельствуют о потенциальной опасности заражения энтеробактериями водотоков реки Тья в которые выпускают недостаточно очищенные сточные воды от КОС г. Северобайкальск. Лактозопозитивные энтеробактерии фекального происхождения из семейства *Enterobacteriaceae* родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, наиболее часто выделяющиеся из объектов внешней среды, обычно этиологически сопряжены с регистрируемыми на тот период кишечными инфекциями (Трухина и др., 2022). Несоответствие требованиям СанПиН 1.2.3685-21 и превышение санитарно-микробиологических показателей в сточных водах и поверхностной воде приустьевой акватории реки Тья также были выявлены ранее при проведении микробиологического мониторинга (Shtykova et al., 2016, Drucker et al., 2023).

### 3.3. Распределение психрофильных микроорганизмов

Проведена оценка численности культивируемых психрофильных микроорганизмов (ПМ) на 28 станциях исследуемых районов. Наибольшие значения были зафиксированы на станциях Site 1 в речной воде и поверхностной воде приустьевой акватории литорали (от 586 КОЕ/см<sup>3</sup> до 2908 КОЕ/см<sup>3</sup>). В целом количество ПМ превышало количество органотрофных бактерий, выросших на РПА/10 при 22°C (ТМС 22°C) примерно в два раза, а в пелагиали (1-3k) их количество было сопоставимо. В остальных исследуемых районах на прибрежных станциях литорали количество ПМ было больше (47 - 800 КОЕ/см<sup>3</sup>) чем в пелагиали (5-22 КОЕ/см<sup>3</sup>), за исключением 3-3k и 3-12k (867 КОЕ/см<sup>3</sup> и 580 КОЕ/см<sup>3</sup>). Так же следует отметить, что в поверхностной

воде приустьевых акваторий и пелагиали количество ПМ значительно превышало количество мезофильных бактерий (ТМС 37°C). В районе б показано доминирование мезофилов, что может быть связано с благоприятным температурным режимом для развития этой группы микроорганизмов, который возникает вследствие стока воды из горячих источников и прогрева мелководной части Чивыркуйского залива.

Озеро Байкал, является местообитанием холодолюбивых микроорганизмов, которые, в большинстве своем, представлены психротолерантными формами с оптимумом роста 22 °C (Namsaraev et al., 2008, Марцинечко и Захарова, 2023). Культивируемые психрофилы были выделены из воды, эндемичных видов губки, донных осадков из разных районов Байкала, показана их высокая численность и ферментативная активность (Парфенова и др., 2008; 2009; Vabich et al., 2021, Марцинечко и Захарова, 2022). Микробное сообщество озера играет ключевую роль в формировании качества воды, самоочищении водоема, деструкции органического вещества и в поддержании естественного химического статуса водной среды (Tulokhonov, 2009). В нашем исследовании в образцах, отобранных в районе сброса сточных вод в КОС г. Слюдянка, культивируемые ПМ доминируют в органотрофном сообществе. Таким образом, ПМ являются многочисленными естественными микроорганизмами природного водоема и могут быть активными участниками процессов самоочищения водоема, что необходимо учитывать при оценке качества воды.

#### 4. Заключение

При оценке качества воды семи районов акватории озера Байкал в сентябре 2022 года в зонах локального загрязнения, показано что соотношение ОЧМ/ТМС 22°C, которое служит для оценки санитарного состояния водоемов, было более  $10^3$  и классифицирует воду согласно ГОСТ 17.1.3.07-82 как чистый водоем II класса. Исключение составили образцы воды, отобранные в устье реки Похабиха и в байкальской воде приустьевой акватории на расстоянии 2 м от берега, где по соотношению ОЧМ/ТМС 22°C ( $10^2$ ) вода была отнесена к III категории качества как умеренно загрязненная. Превышение численности естественных микроорганизмов водоема, в том числе и психротолерантных, над численностью привнесенных бактерий на станциях в устьях рек Тья и Максимиха, прибрежной акватории г. Байкальск, п. Максимиха, г. Северобайкальск и большинстве пелагических станций указывает на активность автохтонной микрофлоры. Низкий коэффициент самоочищения, определенный на станциях акватории устья реки Похабиха, о. Тонкий, б. Змеиная свидетельствует о высокой нагрузке микрофлорой аллохтонного происхождения и низкой интенсивности самоочищения на данных участках озера.

Установлено, что сточные воды, выпускаемые КОС городов Слюдянка, Байкальск,

Северобайкальск в поверхностные водотоки, вода в устье и поверхностная вода побережья Байкала в приустьевой акватории реки Похабиха, вода в купальных ваннах горячих источников б. Змеиная не соответствуют требованиям СанПиН 1.2.3685-21 по предельно допустимому количеству обобщенных колиформных бактерий, *Escherichia coli* и *Enterococcus*. Зафиксировано превышение нормативных требований по энтерококкам в речной воде в районе п. Максимиха, прибрежной воде бухты Змеиная в Чивыркуйском заливе и залива Нептун в районе г. Северобайкальск. На станциях литорали, расположенных в 50 м от берега и фоновых станциях в пелагиали озера Байкал на расстоянии 3 км и более от исследованных мест локальных загрязнений, показатели качества воды не превышали нормативы безопасности воды поверхностных водных объектов по микробиологическим и гидрохимическим параметрам.

#### Благодарности

Выражаем благодарность Суловой М.Ю., ответственной за деятельность аккредитованной лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН., за ценные консультации и помощь в подготовке санитарно-микробиологических исследований. Работа выполнена в рамках государственного задания 0279-2021-0008 (121032300186-9)

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### Список литературы

- Горбенко Ю.А. 1961. О наиболее благоприятном количестве «сухого питательного агара» в средах для культивирования морских гетеротрофных микроорганизмов. *Микробиология* 30 (1): 168-172.
- ГОСТ 17.1.3.07-82. 1982. Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200012472>
- ГОСТ 31942-2012. 2012. Вода питьевая. Отбор проб для микробиологического анализа URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200097811>
- ГОСТ 24849-2014. 2014. Вода. Способ санитарно-бактериологического анализа для полевых условий URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200115427/>
- ГОСТ 31861-2012. 2012. Вода. Общие требования к отбору проб. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200097520>
- Загайнова А.В., Трухина Г.М., Рахманин Ю.А. и др. 2020. Обоснование введения в схему санитарно-микробиологического контроля качества воды показателей «Генерализованные колиформные бактерии» и «*Escherichia coli*» как показателей фекальной загрязненности. *Гигиена и санитария* 99 (12): 1353-1359. DOI: [10.47470/0016-9900-2020-99-12-1353-1359](https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1353-1359)
- Земская Т.И., Захаренко А.С., Русанов И.И. и др. 2019. Экология приустьевых акваторий малых рек Южного Байкала по данным химических и микробиологических исследований в весенний период. *Микробиология* 88 (6): 673-684. DOI: [10.1134/S002636561906020X](https://doi.org/10.1134/S002636561906020X)

Кравченко О.С. 2009. Бактерии рода *Enterococcus* в озере Байкал: распределение, видовой состав, механизм адаптации. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Улан-Удэ, Россия.

Мальник В.В., Тимошкин О.А., Сутурин А.Н. и др. 2019. Антропогенные изменения гидрохимических и санитарно-микробиологических показателей качества воды в притоках Южного Байкала (зал. Лиственничный). *Водные ресурсы* 46 (5): 533–543.

Мальник В.В., Сутурин А.Н., Горшкова А.С. и др. 2022. Качество воды мелководной зоны озера Байкал по санитарно-микробиологическим показателям. *География и природные ресурсы*. 43 (2): 84-93. DOI: [10.15372/GIPR20220209](https://doi.org/10.15372/GIPR20220209)

Марцинченко А.С., Захарова Ю.П. 2022. Вертикальное распределение психрофильных и мезофильных микроорганизмов водной толщи озера Байкал. Сборник тезисов совместной научно-практической конференции студентов «Биотехнология в нашей жизни – 2022»: 17-19.

Марцинченко А.С., Захарова Ю.П. 2023. Психрофильные микроорганизмы в озерах Восточной Сибири: сезонная динамика, морфологические свойства, ферментативная активность. 3-я Всероссийская конференция с международным участием «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний»: 72-73. DOI: [10.53954/9785604859865](https://doi.org/10.53954/9785604859865)

МУК 4.2.1884-04. 2004. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200039680/>

МУК ПНД Ф 12.15.1-08. 2008. Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод URL: <https://www.gostrf.com/normadata/1/4293831/4293831616.htm>

Об утверждении нормативов предельно допустимых воздействий на уникальную экологическую систему озера Байкал и перечня вредных веществ, в том числе веществ, относящихся к категориям особо опасных, высокоопасных, опасных и умеренно опасных для уникальной экологической системы озера Байкал. 2020. Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ от 21 февраля 2020 г. № 83

Парфенова В.В., Теркина И.Л., Косторнова Т.Я. и др. 2008. Микробное сообщество пресноводных губок озера Байкал. *Известия РАН. Серия биологическая*. (4): 435-445.

Парфенова В.В., Павлова О.Н., Кравченко О.С. и др. 2009. Изучение локального антропогенного влияния на горизонтальное и вертикальное распределение микроорганизмов в воде оз. Байкал. *Гидробиологический журнал* 45 (2): 51-62.

Подлесная Г.В., Галачанц А.Д., Штыкова Ю.Р. и др. 2022. Санитарно-микробиологическая оценка качества воды в заливе Лиственничный в период экстремально высокого уровня воды в озере Байкал. *География и природные ресурсы* 5: 163-169. DOI: [10.15372/GIPR20220517](https://doi.org/10.15372/GIPR20220517)

Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. 2009. В: Боевой Л.В. (Ред.), Ч. 1. Ростов-на-Дону: НОК, 1150 с.

СанПиН 1.2.3685-21. 2021. Гигиенические нормы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200006938/>

Суслова М.Ю., Пестунова О.С., Парфенова В.В. 2017. Оценка качества вод р. Селенги и ее дельты

по санитарно-микробиологическим показателям. *Гидробиологический журнал* 53 (1): 74–84.

Трухина Г.М., Ярославцева М.А., Дмитриева Н.А. 2022. Современные тенденции санитарной микробиологии в реализации санитарно-эпидемиологического надзора за безопасностью водных объектов. *Здоровье населения и среда обитания* 30 (10): 16-24. DOI: [10.35627/2219-5238/2022-30-10-16-24](https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-10-16-24)

Штыкова Ю.Р., Суслова М.Ю., Косторнова Т.Я. и др. 2016. Мониторинг санитарно-микробиологического состояния пелагиали озера Байкал и устьев впадающих в него крупных рек с 2010 по 2015 г. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология* 17: 51-62.

Babich O., Shevchenko M., Ivanova S. et al. 2021. Antimicrobial potential of microorganisms isolated from the bottom sediments of lake Baikal. *Antibiotics* 10 (8): 927. DOI: [10.3390/antibiotics10080927](https://doi.org/10.3390/antibiotics10080927)

Drucker V.V., Suslova M.Yu., Nebesnykh Yu.R. et al. 2023. Sanitary-bacteriological monitoring of water quality in Lake Baikal – from single/one-off studies to systematic annual expeditions. *Limnology and Freshwater Biology* 6 (6): 164-179. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-164](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-164)

Elovskaya I.S., Chernitsyna S.M., Pavlova O.N. et al. 2022. Sanitary-microbiological characteristics of water in the area of the Zmeinyy thermal spring (Northern Baikal, Russia, 2022). *Limnology and Freshwater Biology* 6 (5): 145-155. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-5-145](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-5-145)

Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943–948. DOI: 10.4319/lo.1980.25.5.0943

Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Drucker V.V. et al. 2019. Microbiological water quality of Lake Baikal: a review. *Limnology and Freshwater Biology* 2: 210-217. DOI: [10.31951/2658-3518-2019-A-2-210](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-2-210)

Suslova M.Yu., Shtykova Yu.R., Sukhanova et al. 2019. The use of microbiological monitoring to assess the impact of the anthropogenic influence on the ecosystem of Lake Baikal. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 381 (1). DOI: [10.1088/1755-1315/381/1/012088](https://doi.org/10.1088/1755-1315/381/1/012088)

Suslova M.Yu., Podlesnaya G.V., Zimens E.A. et al. 2022. Sanitary-microbiological characteristics of the coastal zone of Lake Baikal during the seasonal change in the lake level in 2022. *Limnology and Freshwater Biology* (6): 1724-1727. DOI: [10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724)

Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Volkova E.A. et al. 2014. Mass development of green filamentous algae of the genera *Spirogyra* and *Stigeoclonium* (Chlorophyta) in the coastal zone of Southern Baikal. *Hydrobiological Journal* 5: 15-26. DOI: [10.1615/HydrobJ.v51.i1.20](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v51.i1.20)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *Journal of Great Lakes Research* 42 (3): 487-497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Tulokhonov A.K. 2009. System approach to nature management in the Baikal region. *Geography and natural resources* 30 (3): 224-228. DOI: [10.1016/j.gnr.2009.09.004](https://doi.org/10.1016/j.gnr.2009.09.004)

Wetzel R., Likens G. 2000. *Limnological Analysis*. New York: Springer, pp. 57–112.

# Investigation of *Tychonema* sp. tropism to the sponge body in the experiment of co-cultivation of cyanobacteria with primmorphs

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Naidanova Y.A.\* , Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Khanaev I.V., Belykh O.I.

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Mass disease of endemic sponges accompanied by the growth of cyanobacterial biofilms on their bodies has been registered in recent years in Lake Baikal. These biofilms are formed by the cyanobacterium *Tychonema* sp., which grows on various types of substrates in the littoral zone and is often found on sponges. The aim of the study was to conduct an experiment on co-cultivation of *Tychonema* sp. with *Baikalospongia* sp. primmorphs to test the hypothesis about the tropism of Baikal cyanobacterium to the body of sponges. In the experiment, gradual fouling of the primmorphs with cyanobacterium filaments, destruction of their structure and death of sponge cells were registered. In the control without addition of cyanobacteria, the primmorphs remained alive during the whole time of the experiment.

**Keywords:** sponge disease, Lake Baikal, benthic cyanobacteria

**For citation:** Naidanova Y.A., Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Khanaev I.V., Belykh O.I. Investigation of *Tychonema* sp. tropism to the sponge body in the experiment of co-cultivation of cyanobacteria with primmorphs // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1020-1025. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1020

## 1. Introduction

Cyanobacteria are the most ancient photosynthetic organisms on Earth, with an age of about 3.5 billion years (Schopf, 1993). During the evolution of the biosphere, cyanobacteria not only created the conditions necessary for the origin and life of eukaryotes – an oxygen atmosphere –but also were the ancestors of plant chloroplasts (Demoulin et al., 2019). The ability of cyanobacteria to adapt to a wide variety of environmental conditions, including extreme ones, has allowed them to capture almost all ecological niches. Benthic cyanobacteria form biofilms or bushy fouling on the bottom of water bodies, and can synthesize a variety of toxins dangerous to humans and animals (Quiblier et al., 2013). Cyanobacterial biofilms growing on sponges and corals cause disease and death of these marine animals (Rützler, 1988; Ford et al., 2018).

In Lake Baikal, benthic cyanobacteria are very diverse and recently their abundance has increased dramatically. They have started to use endemic sponges as a substrate, causing their destruction and death (Sorokovikova et al., 2020). Among the species that settle on sponges, the cyanobacterium *Tychonema* sp. stands out. Its bright red biofilms have long attracted the attention of researchers (Timoshkin et al., 2016).

The aim of this work is to conduct an experiment

on co-cultivation of cyanobacterium with *Baikalospongia* sp. primmorphs and to test the hypothesis about the tropism of Baikal *Tychonema* sp. to the sponge body.

## 2. Materials and methods

For the experiment we used the strain *Tychonema* sp. BBK16 from the collection of cyanobacterial cultures of the Laboratory of Aquatic Microbiology, LIN SB RAS, and the encrusting sponge *Baikalospongia* sp. raised by a diver from a depth of 5 m near Bolshiye Koty settlement and delivered to the laboratory in a container with Baikal water. Primmorphs were obtained using a mechanical dissociation method (Lavrov and Kosevich, 2014). Sponge cell suspension in Petri dishes with Baikal water was placed in a refrigerator (7°C) with a white fluorescent lamp and 24-hour illumination. The cups were visually inspected daily, and as soon as the primmorphs were formed, microscopic examination and photography were performed using an Axio Imager light microscope (Carl Zeiss, Germany). The number and size of the primmorphs were determined on microphotographs using the Image-Pro Plus program.

Pieces of biofilm of *Tychonema* sp. BBK16 of 3 mm<sup>2</sup> and 1 ml of Z-8 medium (Rippka, 1988) were added into the experimental dishes with primmorphs,

\*Corresponding author.

E-mail address: [naydanovay@bk.ru](mailto:naydanovay@bk.ru) (Y.A. Naidanova)

**Received:** August 01, 2024; **Accepted:** August 12, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





while only Z-8 medium was added to the control dish with primmorphs. During the experiment, microscopic examination and photographing of the samples were carried out.

### 3. Results and discussion

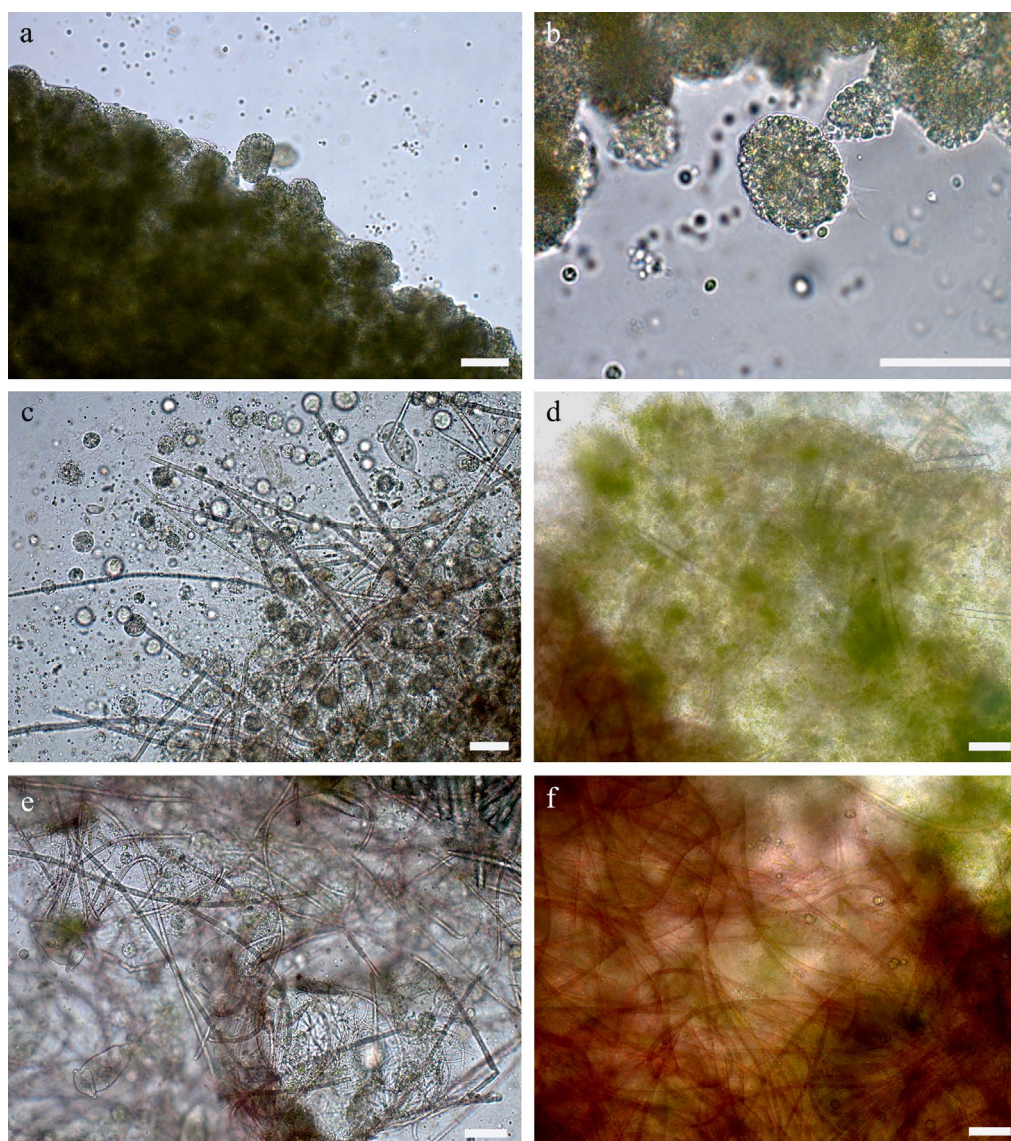
Reaggregation of sponge cells into primmorphs was noted on the 7<sup>th</sup> day of the experiment. In dish #1 297 primmorphs were formed, in dish #2 – 171, in dish #3 – 166. The average size of the primmorphs was 355  $\mu\text{m}$ . *Tychonema* sp. biofilm was broken into fragments using a micropipette and added to Petri dishes #2 and #3 one fragment each.

On the 21<sup>st</sup> day of the experiment, the cyanobacterium *Tychonema* sp. attached to the primmorphs and the bottom of the Petri dishes, forming a visible biofilm. Microscopy of the samples showed complete intact primmorphs and sponge cells in the control (Fig. a-b). In the experimental dishes, the filaments of cyanobacteria braided and permeated the primmorphs,

destroying their globular structure and in places forming a thick biofilm (Fig. c-d).

On the 43<sup>rd</sup> day of the experiment, death of the primmorphs and overgrowth of the cyanobacterial biofilm were observed (Fig. e-f). The number of primmorphs not colonized by *Tychonema* cyanobacterium was 1-3 pcs, i.e. more than 99% of the primmorphs died. In the control dish the primmorphs retained bright green coloration and dense globular structure.

Thus, we visually confirmed the earlier hypothesis about the tropism of this cyanobacterium to the sponge body (Sorokovikova et al., 2020). Unlike other known species of the genus *Tychonema* (Komárek and Anagnostidis, 2005), *Tychonema* sp. BBK16 from Lake Baikal has creeping motility and actively occupies the surrounding environment. According to recent data, the disease of endemic Baikal sponges associated with the formation of *Tychonema* biofilms on their bodies was in the second place after the disease in the form of tissue necrosis (Maikova et al., 2023). The formation of biofilms on sponges indicates the invasive or



**Fig.** Light microscopy of the experiment on co-cultivation of *Tychonema* sp. and *Baikalospongia* sp. primmorphs. Control: a – edge of the primmorph, b – sponge cells and small globular cells of the symbiont green alga. Experiment: c – day 21, cyanobacterial filaments permeate the primmorph, destroying its structure, sponge cells separated from the primmorph are shown; d – a part of the primmorph with a thick biofilm (bottom left corner) and with separate *Tychonema* filaments; e, f – day 43, primmorph globules are destroyed, sponge cells are absent and replaced by *Tychonema* biofilm. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ .

harmful nature of the impact of cyanobacteria on animals. It was shown that biofilms of *Tychonema* sp. can cause serious damages – lesions on the body of sponges (Sorokovikova et al., 2020).

Presumably, the reason for the high tropism of *Tychonema* sp. BBK16 to sponges is the ability of this cyanobacterium to mixotrophy, which allows it to utilize organic substances released during the decomposition of the sponge body. Investigation of the genome of *Tychonema* sp. BBK16 revealed the presence of a number of mixotrophy genes: the *aapJQMP* locus encoding the amino acid transport system, the *PhnECD* locus encoding the phosphonate transport system, *glnQ*, a gene encoding the glutamine transport system, an ATP-binding protein, and homologs of the *proV* and *proW* genes encoding transporters involved in dimethylsulfoniopropionate (DMSP) uptake (Evseev et al., 2023). The ability to assimilate organic nutrients is associated with transporters required for the uptake of organic compounds (Muñoz-Marín et al., 2020). The uptake of sugars by cyanobacteria has been shown experimentally to be associated with the presence of GlcH permease, a high-affinity glucose transporter (Moreno-Cabezuelo et al., 2019), and GlcP permease (Zhang et al., 1989). Genes for these glucose transporters were found in the genome of *Tychonema* sp. BBK16, supporting its ability to assimilate sugars from the environment (Evseev et al., 2023).

#### 4. Conclusions

In the experiment of culturing *Tychonema* sp. BBK16 with *Baikalospongia* sp. primmorphs, the tropism of the cyanobacterium to the sponge body was confirmed and the gradual destruction of the structure of the primmorphs and the death of sponge cells due to filament fouling by the cyanobacterium were recorded.

#### Acknowledgements

The work was carried out on the basis of “Experimental freshwater aquarium complex of Baikal hydrobionts” LIN SB RAS with the financial support of the state task № 0279-2021-0015. The authors are grateful to the crew of R/V “Titov” for their assistance in sampling.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

Demoulin C.F., Lara Y.J., Cornet L. et al. 2019. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free*

radical biology and medicine 140: 206-223. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007)

Evseev P., Tikhonova I., Krasnopeev A. et al. 2023. *Tychonema* sp. BBK16 characterisation: Lifestyle, phylogeny and related phages. *Viruses* 15: 442. DOI: [10.3390/v15020442](https://doi.org/10.3390/v15020442)

Ford A.K., Bejarano S., Nugues M.M. et al. 2018. Reefs under siege – the rise, putative drivers, and consequences of benthic cyanobacterial mats. *Frontiers in Marine Science* 5. DOI: [10.3389/fmars.2018.00018](https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00018)

Komárek J., Anagnostidis K. 2005. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bd. 19 (2). Cyanoprokaryota 2. Teil/Part 2: Oscillatoriales. München, Germany: Springer. 759 p.

Lavrov A., Kosevich I. 2014. Sponge cell reaggregation: mechanisms and dynamics of the process. *Russian Journal of Developmental Biology* 45: 205-223. DOI: [10.1134/S1062360414040067](https://doi.org/10.1134/S1062360414040067)

Maikova O.O., Bukshuk N.A., Kravtsova L.S. et al. 2023. Sponge Fauna of Lake Baikal in the Monitoring System: Six Years of Observations. *Contemporary Problems of Ecology* 16: 8–18. DOI: [10.1134/S1995425523010043](https://doi.org/10.1134/S1995425523010043)

Moreno-Cabezuelo J.Á., López-Lozano A., Díez J. et al. 2019. Differential expression of the glucose transporter gene *glcH* in response to glucose and light in marine picocyanobacteria. *PeerJ* 6: e6248. DOI: [10.7717/peerj.6248](https://doi.org/10.7717/peerj.6248)

Muñoz-Marín M.C., Gómez-Baena G., López-Lozano A. et al. 2020. Mixotrophy in marine picocyanobacteria: use of organic compounds by *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *The ISME journal* 14: 1065-1073. DOI: [10.1038/s41396-020-0603-9](https://doi.org/10.1038/s41396-020-0603-9)

Quiblier C., Wood S., Echenique-Subiabre I. et al. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 47: 5464-5479. DOI: [10.1016/j.watres.2013.06.042](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.042)

Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27. DOI: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)

Rützler K. 1988. Mangrove sponge disease induced by cyanobacterial symbionts: failure of a primitive immune system? *Diseases of Aquatic Organisms* 5: 143-149

Schopf J.W. 1993. Microfossils of the early Archean apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640-646. DOI: [10.1126/science.260.5108.640](https://doi.org/10.1126/science.260.5108.640)

Sorokovikova E., Belykh O., Krasnopeev A. et al. 2020. First data on cyanobacterial biodiversity in benthic biofilms during mass mortality of endemic sponges in Lake Baikal. *Journal of Great Lakes Research* 46: 75-84. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.10.017](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.10.017)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *Journal of Great Lakes Research* 42: 487–497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Zhang C.C., Durand M.C., Jeanjean R. et al. 1989. Molecular and genetical analysis of the fructose-glucose transport system in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology* 3: 1221-1229



# Исследование тропности *Tychoneta* sp. к телу губки в эксперименте по совместному культивированию цианобактерии с примморфами

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Найданова Я.А.\* , Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Ханаев И.В., Белых О.И.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Массовая гибель эндемичных губок, сопровождаемая ростом на их телах цианобактериальных биопленок, регистрируется в последние годы в оз. Байкал. Эти биопленки формирует цианобактерия *Tychoneta* sp., которая развивается на различных типах субстратов в прибрежной зоне и часто встречается на губках. Целью исследования было провести эксперимент по совместному культивированию *Tychoneta* sp. с примморфами *Baikalospongia* sp. для проверки гипотезы о тропности байкальской цианобактерии к телу губок. В эксперименте зарегистрировано постепенное обрастание примморфов нитями цианобактерии, разрушение их структуры и гибель клеток губки. В контроле без добавления цианобактерии примморфы все время эксперимента оставались живыми.

**Ключевые слова:** заболевание губок, озеро Байкал, бентосные цианобактерии

Для цитирования: Найданова Я.А., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Ханаев И.В., Белых О.И. Исследование тропности *Tychoneta* sp. к телу губки в эксперименте по совместному культивированию цианобактерии с примморфами // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1020-1025. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1020

## 1. Введение

Цианобактерии – древнейшие фотосинтезирующие организмы на Земле, их возраст насчитывает около 3.5 млрд лет (Schopf, 1993). В процессе эволюции биосферы цианобактерии не только создали условия, необходимые для возникновения и жизни эукариот – кислородную атмосферу, но также явились предками хлоропластов растений (Demoulin et al., 2019). Способность цианобактерий адаптироваться к самым разным условиям среды, в том числе и экстремальным, позволила им захватить практически все экологические ниши. Бентосные цианобактерии образуют биопленки или кустистые обрастания на дне водоемов, могут синтезировать разнообразные токсины, опасные для человека и животных (Quiblier et al., 2013). Цианобактериальные биопленки, выросшие на губках и кораллах, вызывают болезни и гибель этих морских животных (Rützler, 1988; Ford et al., 2018).

В озере Байкал бентосные цианобактерии очень разнообразны, а в последнее время их численность резко возросла. Они стали использоваться в качестве субстрата эндемичные губки, вызывая их разрушение и гибель (Sorokovikova et al., 2020). Среди видов, поселяющихся на губках, выделяется

цианобактерия *Tychoneta* sp. Ее ярко-красные биопленки давно привлекли внимание исследователей (Timoshkin et al., 2016).

Цель работы – провести эксперимент по совместному культивированию цианобактерии с примморфами *Baikalospongia* sp. и проверить гипотезу о тропности байкальской *Tychoneta* sp. к телу губок.

## 2. Материалы и методы

Для эксперимента использовали штамм *Tychoneta* sp. ВВК16 из коллекции культур цианобактерий лаборатории водной микробиологии ЛИИ СО РАН и корковую губку *Baikalospongia* sp., поднятую водолазом с глубины 5 м вблизи пос. Большие Коты и доставленную в лабораторию в контейнере с байкальской водой. Примморфы были получены с использованием механического метода диссоциации (Lavrov and Kosevich, 2014). Суспензию клеток губки в чашках Петри с байкальской водой помещали в холодильник (7°C) с белой люминесцентной лампой и круглосуточным освещением. Ежедневно проводили визуальный осмотр чашек, как только образовались примморфы проводили микроскопи-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [naydanova\\_y@bk.ru](mailto:naydanova_y@bk.ru) (Я.А. Найданова)

Поступила: 01 августа 2024; Принята: 12 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024



ческое исследование и фотографирование с использованием светового микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия). Количество и размер примморфов определяли на микрофотографиях с помощью программы Image-Pro Plus.

В экспериментальные чашки с примморфами добавили кусочки биопленки *Tychoneta* sp. BVK16 размером 3 мм<sup>2</sup> и 1 мл среды Z-8 (Rippka, 1988), в контрольную чашку с примморфами добавили только среду Z-8. В ходе эксперимента проводили микроскопическое исследование и фотографирование образцов.

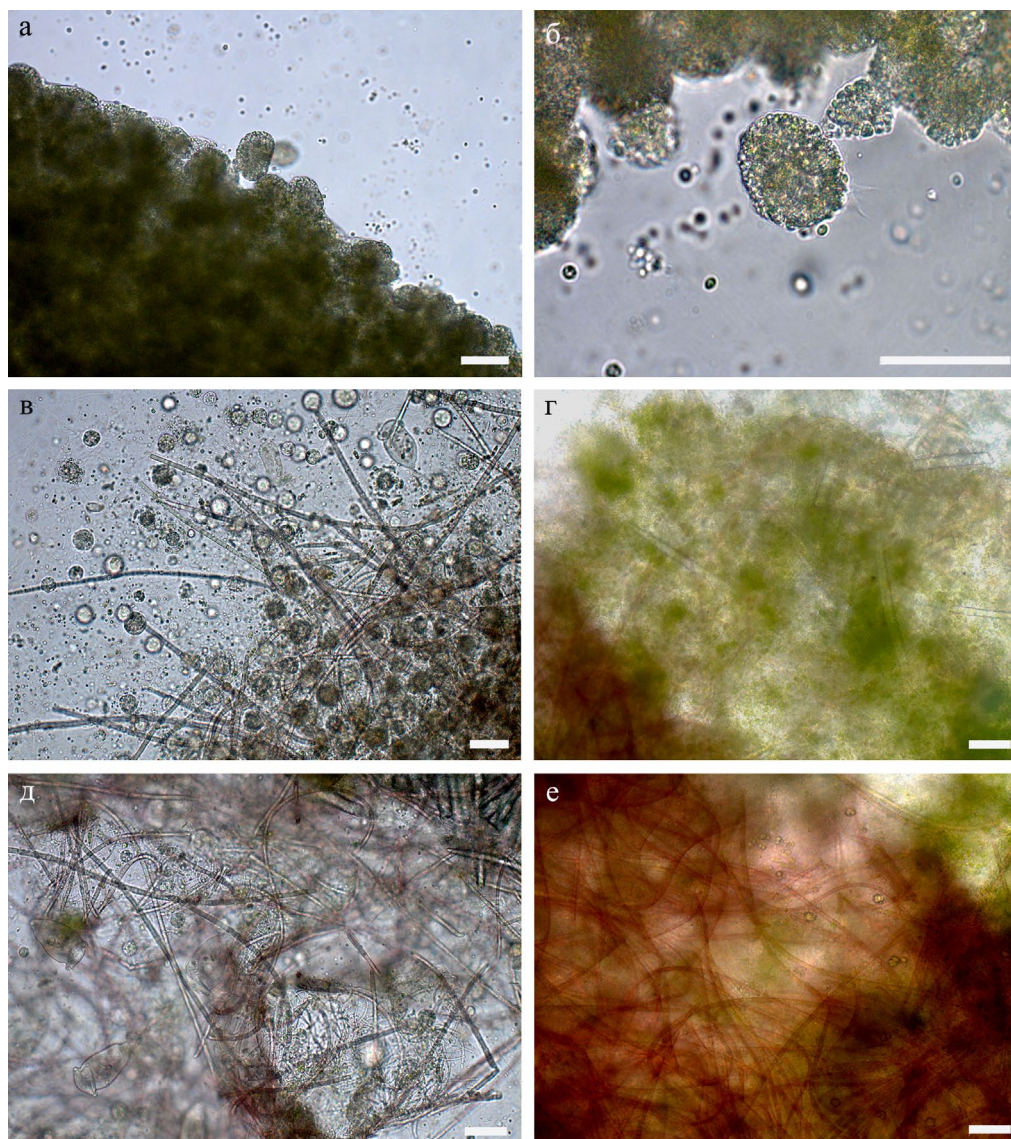
### 3. Результаты и обсуждение

Реагрегация клеток губки в примморфы была отмечена на 7-й день эксперимента. В чашке №1 сформировалось 297 примморфов, в чашке № 2 – 171, в чашке № 3 – 166. Средний размер прим-

морфов составил 355 мкм. Биопленку *Tychoneta* sp. с помощью пипетки разбили на фрагменты и добавили в чашки Петри № 2 и № 3 по одному фрагменту.

На 21-й день эксперимента цианобактерия *Tychoneta* sp. прикрепилась к примморфам и дну чашек Петри, образовав видимую биопленку. Микроскопия образцов показала полную сохранность примморфов и клеток губки в контроле (Рис. а-б). В экспериментальных чашках нити цианобактерии оплетали и пронизывали примморфы, разрушая их глобулярную структуру, и, местами образуя сплошную биопленку (Рис. в-г).

На 43-й день эксперимента отмечали гибель примморфов и разрастание биопленки (Рис. д-е). Количество примморфов, не колонизированных цианобактерией, составило 1-3 шт., т.е. более 99% примморфов погибли. В контрольной чашке примморфы сохраняли ярко-зеленую окраску и плотную шаровидную структуру.



**Рис.** Световая микроскопия эксперимента по совместному культивированию *Tychoneta* sp. и примморфов *Baikalospongia* sp. Контроль: а – край примморфа, б – клетки губки и мелкие шаровидные клетки симбионтной зеленой водоросли. Эксперимент: в – 21 день, нити цианобактерии пронизывают примморф, разрушая его структуру, видны отделившиеся от примморфа клетки губки; г – участок примморфа со сплошной биопленкой (левый нижний угол) и с отдельными нитями *Tychoneta*; д, е – 43 день, глобулы примморфов разрушены, клетки губки отсутствуют и заместились на биопленку *Tychoneta*. Масштабная линейка 50 мкм.



Таким образом мы наглядно подтвердили высказанное ранее предположение о тропности данной цианобактерии к телу губки (Sorokovikova et al., 2020). В отличие от других известных видов рода *Tychonema* (Komárek and Anagnostidis, 2005), *Tychonema* sp. ВВК16 из оз. Байкал обладает ползающей подвижностью и активно осваивает окружающее пространство. По последним данным, заболевание эндемичных байкальских губок, связанное с формированием на их телах биопленок *Tychonema*, находилось на втором месте после заболевания в виде некроза тканей (Maikova et al., 2023). Формирование биопленок на губках свидетельствует об инвазивном или негативном характере воздействия цианобактерий на животных. Показано, что биопленки *Tychonema* sp. способны провоцировать возникновение серьезных повреждений – язв на теле губок (Sorokovikova et al., 2020).

Предположительно, причиной высокого тропизма *Tychonema* sp. ВВК16 к губкам является способность данной цианобактерии к миксотрофии, позволяющая использовать органические вещества, высвобождающиеся при разрушении тела губки. Исследование генома *Tychonema* sp. ВВК16 выявило наличие целого ряда генов миксотрофии: локус *aarJQMP*, кодирующий систему транспорта аминокислот, локус *PhnECD*, кодирующий систему транспорта фосфонатов, *glnQ* – ген, кодирующий систему транспорта глутамина, АТФ-связывающий белок и гомологи генов *proV* и *proW*, кодирующих транспортеры, участвующие в захвате диметилсульфониопропионата (ДМСП) (Evseev et al., 2023). Способность усваивать органические питательные вещества связана с транспортерами, необходимыми для поглощения органических соединений (Muñoz-Marín et al., 2020). Экспериментально было показано, что поглощение сахаров цианобактериями связано с присутствием пермеазы GlcH, высокоаффинного переносчика глюкозы (Moreno-Cabezuelo et al., 2019), и пермеазы GlcP (Zhang et al., 1989). Гены данных переносчиков глюкозы были обнаружены в геноме *Tychonema* sp. ВВК16, подтверждая ее способность усваивать сахара из окружающей среды (Evseev et al., 2023).

#### 4. Выводы

В эксперименте по культивированию *Tychonema* sp. ВВК16 с примморфами *Baikalospongia* sp. был подтвержден тропизм цианобактерии к телу губки и зарегистрированы постепенное разрушение структуры примморфов и гибель клеток губки вследствие обрастания нитями цианобактерии.

#### Благодарности

Работа проводилась на базе «Экспериментального пресноводного аквариумного комплекса байкальских гидробионтов» ЛИН СО РАН при финансовой поддержке гос. задания № 0279-2021-0015. Авторы выражают благодарность экипажу НИС «Титов» за помощь в отборе проб.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Demoulin C.F., Lara Y.J., Cornet L. et al. 2019. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free radical biology and medicine* 140: 206-223. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007)
- Evseev P., Tikhonova I., Krasnopeev A. et al. 2023. *Tychonema* sp. ВВК16 characterisation: Lifestyle, phylogeny and related phages. *Viruses* 15: 442. DOI: [10.3390/v15020442](https://doi.org/10.3390/v15020442)
- Ford A.K., Bejarano S., Nugues M.M. et al. 2018. Reefs under Siege—the rise, putative drivers, and consequences of benthic cyanobacterial mats. *Frontiers in Marine Science* 5. DOI: [10.3389/fmars.2018.00018](https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00018)
- Komárek J., Anagnostidis K. 2005. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bd. 19 (2). Cyanoprokaryota 2. Teil/Part 2: Oscillatoriales. München: Springer. 759 p.
- Lavrov A., Kosevich I. 2014. Sponge cell reaggregation: mechanisms and dynamics of the process. *Russian Journal of Developmental Biology* 45: 205-223. DOI: [10.1134/S1062360414040067](https://doi.org/10.1134/S1062360414040067)
- Maikova O.O., Bukshuk N.A., Kravtsova L.S. et al. 2023. Sponge fauna of Lake Baikal in the monitoring system: six years of observations. *Contemporary Problems of Ecology* 16: 8–18. DOI: [10.1134/S1995425523010043](https://doi.org/10.1134/S1995425523010043)
- Moreno-Cabezuelo J.Á., López-Lozano A., Díez J. et al. 2019. Differential expression of the glucose transporter gene *glcH* in response to glucose and light in marine picocyanobacteria. *PeerJ* 6: e6248. DOI: [10.7717/peerj.6248](https://doi.org/10.7717/peerj.6248)
- Muñoz-Marín M.C., Gómez-Baena G., López-Lozano A. et al. 2020. Mixotrophy in marine picocyanobacteria: use of organic compounds by *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *The ISME journal* 14: 1065-1073. DOI: [10.1038/s41396-020-0603-9](https://doi.org/10.1038/s41396-020-0603-9)
- Quiblier C., Wood S., Echenique-Subiabre I. et al. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 47: 5464-5479. DOI: [10.1016/j.watres.2013.06.042](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.042)
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27. DOI: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)
- Rützler K. 1988. Mangrove sponge disease induced by cyanobacterial symbionts: failure of a primitive immune system? *Diseases of Aquatic Organisms* 5: 143-149
- Schopf J.W. 1993. Microfossils of the early archaean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640-646. DOI: [10.1126/science.260.5108.640](https://doi.org/10.1126/science.260.5108.640)
- Sorokovikova E., Belykh O., Krasnopeev A. et al. 2020. First data on cyanobacterial biodiversity in benthic biofilms during mass mortality of endemic sponges in Lake Baikal. *Journal of Great Lakes Research* 46: 75-84. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.10.017](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.10.017)
- Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *Journal of Great Lakes Research* 42: 487–497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)
- Zhang C.C., Durand M.C., Jeanjean R. et al. 1989. Molecular and genetical analysis of the fructose-glucose transport system in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology* 3: 1221-1229.

# Molecular-genetic features of ascomycetous yeast *Kluyveromyces* from aquatic ecosystems



Naumova E.S.\*, Tuaeva A.Yu., Lyutova L.V.

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123098 Russia

**ABSTRACT.** Using genetic hybridization and phylogenetic analyses, the genetic relationship of terrestrial and aquatic species of the ascomycetous yeast genus *Kluyveromyces* was investigated. The results obtained allow us to conclude that aquatic (*K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, and *K. siamensis*) and terrestrial (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri*, *K. wickerhamii*) species belong to different genetic genera.

**Keywords:** species of the genus *Kluyveromyces*, interspecies hybridization, genetic genus, biological species, phylogenetic analysis

**For citation:** Naumova E.S., Tuaeva A.Yu., Lyutova L.V. Molecular-genetic features of ascomycetous yeast *Kluyveromyces* from aquatic ecosystems // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1026-1031. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1026

## 1. Introduction

The genus *Kluyveromyces* includes eight species: terrestrial *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* and *K. wickerhamii*, as well as aquatic *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* and *K. siamensis* (Lachance, 2011; Freitas et al., 2020). Terrestrial species are cosmopolitan and are found in different regions of the world, while aquatic species have a limited habitat and are isolated primarily from mangrove forests in Taiwan, China, Thailand and Brazil, as well as from seawater in the United States. We have previously shown that the terrestrial species *K. lactis* and *K. marxianus* have a common system of mating types and can be crossed (Naumov and Naumova, 2002; Naumova et al., 2004). Aquatic species have not been studied using genetic methods. The purpose of this work was to study interspecific hybridization of terrestrial and aquatic species of the genus *Kluyveromyces*.

## 2. Materials and methods

We investigated the type cultures of the species *K. lactis* CBS 683 (cheese, UK), *K. dobzhanskii* CBS 2104, (*Drosophila pseudoobscura*, USA), *K. marxianus* CBS 712 (Europe), *K. wickerhamii* CBS 2745 (*Drosophila* sp., USA), *K. aestuarii* CBS 4438 (estuary, USA), *K. nonfermentans* CBS 8778 (seawater, Japan) and *K. siamensis* CBS 10860 (mangrove water, Thailand). In addition,

natural strains of *K. lactis* UCDFST 71-45 and CBS 6169, isolated from a swamp in Louisiana (USA) were also used (Naumova et al., 2004). Conditions for yeast cultivation, nutrient media, and primers used for amplification of the D1/D2 domain of 26S rDNA, ITS region, translation elongation factor EF-1 $\alpha$ , and the *ACT1* gene were published previously (Lyutova et al., 2022). The polymerase chain reaction was carried out using a Bio-Rad DNA amplifier (USA). The nucleotide sequence of two-strand PCR products was determined by direct sequencing using the Sanger method on an Applied Biosystems 3730 automatic sequencer (USA). A search for similarities with known nucleotide sequences of the corresponding genes and rDNA was carried out using the BLAST program in GenBank. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor joining method in the MEGA 7 software.

## 3. Results and discussion

To study the genetic relationship of terrestrial and aquatic species of *Kluyveromyces*, a selective hybridization method developed in our laboratory was used (Naumov and Naumova, 2002). Auxotrophic mutations were induced in *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, and *K. wickerhamii* strains using UV irradiation. *K. lactis* strain CBS 683, marked by the *lys1* mutation, was used as a terrestrial tester. This strain is also able to grow on maltose. Additionally, an aux-

\*Corresponding author.

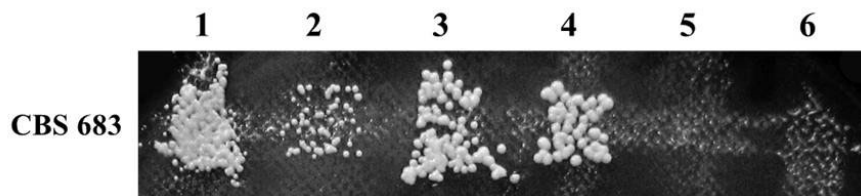
E-mail address: [lenna.naumova@yahoo.com](mailto:lenna.naumova@yahoo.com) (E.S. Naumova)

Received: June 01, 2024; Accepted: June 15, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





**Fig.1.** Hybridization of auxotrophic mutants of *Kluyveromyces* species in accordance with prototrophic growth on minimal medium at the sites of intersection of parental strains. Yeast replica: 1 – *K. lactis* UCDFST 71-45 (*ade4*); 2 – *K. dobzhanskii* CBS 2104 (*ura3*); 3 – *K. marxianus* CBS 712 (*trp2*); 4 – *K. wickerhamii* CBS 2745 (*ura3*); 5 – *K. aestuarii* CBS 4438 (*mal*); 6 – *K. siamensis* CBS 10860 (*mal*). The auxotrophic mutants used are given in parentheses. *K. lactis* type strain CBS 683 (*lys1*) was used as a tester.

otrophic mutant of the aquatic strain *K. lactis* UCDFST 71-45 *ade4* was employed. Strains of *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, and *K. wickerhamii* were marked by *ura3*, *trp2*, and *ura3* auxotrophic mutations, respectively. For genetic hybridization, we used prototrophic cultures of *K. aestuarii* and *K. siamensis*, which do not utilize maltose and, accordingly, cannot grow on a minimal medium with maltose.

Interspecific hybrids were obtained on minimal maltose medium (Fig. 1). Hybrids were recorded only between the terrestrial species *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* and *K. wickerhamii* (Fig. 1, lanes 1–4). On the other hand, *K. aestuarii* and *K. siamensis* did not form hybrids with the *K. lactis* CBS 683 *lys1* tester (lanes 5 and 6).

To establish the phylogenetic relationship of the strains studied, we conducted a comparative analysis of the nucleotide sequences of the D1/D2 domain, ITS region, *EF-1α* and *ACT1* genes, which are universal molecular markers for yeast DNA barcoding (Fig. 2).

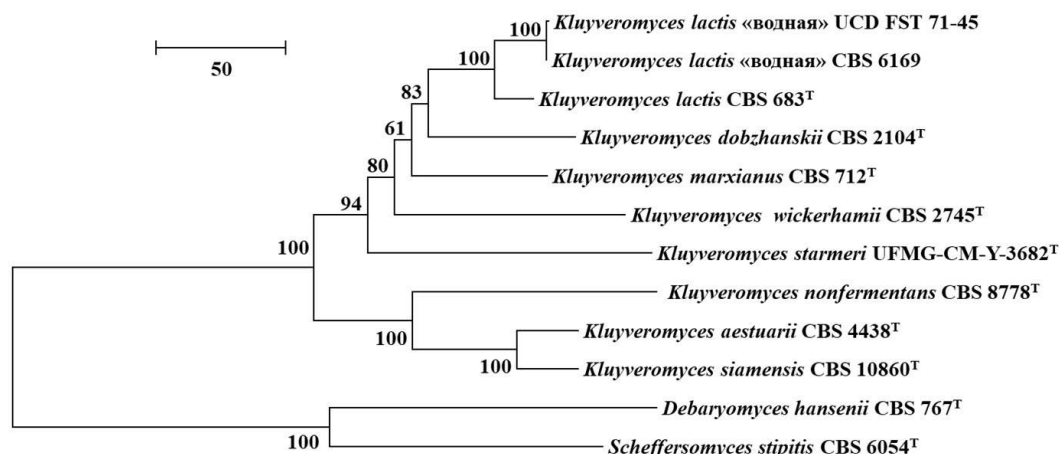
On the phylogenetic tree, the eight species of the genus *Kluyveromyces* formed a separate cluster with 100% bootstrap support, which, in turn, is divided into two subclusters. The first includes the terrestrial species *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* and *K. starmeri*. Strains UCDFST 71-45 and CBS 6169 differed significantly from the type culture CBS 683 in the nucleotide sequences of the ITS region (7

substitutions), as well as the *EF-1α* (4) and *ACT1* (13) genes. Although the UCDFST 71-45 × CBS 683 hybrid had low ascospore viability (6%), meiotic segregation of control markers was regular. On the other hand, hybrids between the CBS 683 tester and the type cultures of *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* and *K. wickerhamii* were completely sterile.

The second subcluster consists of aquatic species *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* and *K. siamensis*, which did not form hybrids with the type culture *K. lactis* CBS 683.

#### 4. Conclusion

The results of genetic hybridization and phylogenetic analyses indicate that aquatic and terrestrial *Kluyveromyces* species belong to different genetic genera. Species of the same genetic genus of ascomycetous fungi have a common system of mating types that allows them to cross in any combination (Naumov, 1979). Genetic genera include biological species that have postzygotic isolation and form nonviable meiotic products (ascospores) of hybrids with each other. According to the results, the strains isolated from a swamp in Louisiana represent a divergent population of the yeast *K. lactis*.



**Fig.2.** Multigene phylogenetic analysis of the genetic relationship of terrestrial and aquatic species of the genus *Kluyveromyces*. Bootstrap values > 50% are given. The tree is scaled to the number of substitutions. The type cultures of *Debaryomyces hansenii* CBS 767 and *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 were used as outgroup. T, type culture.

## Acknowledgements

The study was carried out in the frame of the state assignment of the National Research Center “Kurchatov Institute”.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

Freitas L.F.D., Batista T.M., Santos A.R.O. et al. 2020. Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses. *Yeast* 37: 1–13. DOI: [10.1002/yea.3528](https://doi.org/10.1002/yea.3528)

Lachance M.-A. 2011. *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In: C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: pp. 471–482.

Lyutova L.V., Naumov G.I., Shnyreva A.V. et al. 2022. Intraspecific polymorphism of the yeast *Kluyveromyces lactis*: genetic populations. *Microbiology* 91: 421–431. DOI: [10.1134/S0026261722300191](https://doi.org/10.1134/S0026261722300191)

Naumov G.I. 1979. Genetic concept of genus in fungi. *Doklady Biological Sciences* 241: 345–347.

Naumov G.I., Naumova E.S. 2002. Five new combinations in the yeast genus *Zygofabospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. *FEMS Yeast Research* 2: 39–46. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x)

Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. 2004. Molecular-genetic differentiation on the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research* 5: 263–269. DOI: [10.1016/j.femsyr.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.08.006)



# Молекулярно-генетические особенности аскомицетовых дрожжей *Kluveromyces* из водных экосистем



Наумова Е.С.\*, Туаева А.Ю., Лютова Л.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

**АННОТАЦИЯ.** С помощью гибридологического и филогенетического анализов изучено генетическое родство наземных и водных видов аскомицетового рода дрожжей *Kluveromyces*. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что водные (*K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, и *K. siamensis*) и наземные (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri*, *K. wickerhamii*) виды относятся к разным генетическим родам.

**Ключевые слова:** виды рода *Kluveromyces*, межвидовая гибридизация, генетический род, биологические виды, филогенетический анализ

Для цитирования: Наумова Е.С., Туаева А.Ю., Лютова Л.В. Молекулярно-генетические особенности аскомицетовых дрожжей *Kluveromyces* из водных экосистем // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1026-1031. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1026

## 1. Введение

Род *Kluveromyces* включает восемь видов: наземные *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* и *K. wickerhamii*, а также водные *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis* (Lachance, 2011; Freitas et al., 2020). Наземные виды космополитны и встречаются в разных регионах мира, тогда как водные виды имеют ограниченный ареал обитания и выделяются преимущественно из мангровых зарослей на Тайване, в Китае, Тайланде и Бразилии, а также из морской воды в США. Ранее нами было показано, что наземные виды *K. lactis* и *K. marxianus* имеют общую систему типов спаривания и могут скрещиваться между (Naumov and Naumova, 2002; Naumova et al., 2004). Водные виды генетическими методами не изучались. Целью данной работы было изучение межвидовой гибридизации наземных и водных видов рода *Kluveromyces*.

## 2. Материалы и методы

Объектом исследования служили типовые культуры видов *K. lactis* CBS 683 (сыр, Великобритания), *K. dobzhanskii* CBS 2104, (*Drosophila pseudoobscura*, США), *K. marxianus* CBS 712 (Европа), *K. wickerhamii* CBS 2745 (*Drosophila* sp., США), *K. aestuarii* CBS 4438 (эстуарий, США), *K. nonfermentans*

CBS 8778 (морская вода, Япония) и *K. siamensis* CBS 10860 (вода мангрового леса, Тайланд). Помимо типовой культуры *K. lactis*, были также использованы природные штаммы UCDFST 71-45 и CBS 6169, выделенные из болота в Луизиане (США) (Naumova et al., 2004). Условия культивирования дрожжей, питательные среды и использованные для амплификации домена D1/D2 26S рДНК, ITS-участка, фактора элонгации трансляции EF-1 $\alpha$  и гена *ACT1* праймеры опубликованы ранее (Лютова и др., 2022). Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Нуклеотидную последовательность ПЦР-продуктов по двум цепям определяли прямым секвенированием по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями соответствующих генов и рДНК проводили с помощью программы BLAST в GenBank. Филогенетические деревья строили методом объединения соседей в программе MEGA 7.

## 3. Результаты и обсуждение

Для изучения генетического родства наземных и водных видов *Kluveromyces* был применен разработанный в нашей лаборатории селективный метод гибридизации (Naumov and Naumova, 2002).

\*Автор для переписки.

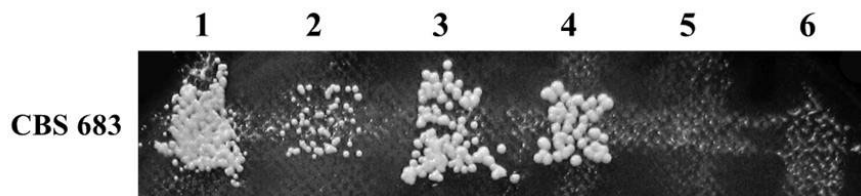
Адрес e-mail: [lena\\_naumova@yahoo.com](mailto:lena_naumova@yahoo.com) (Е.С. Наумова)

Поступила: 01 июня 2024; Принята: 15 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





**Рис.1.** Гибридизация ауксотрофных мутантов видов рода *Kluyveromyces* согласно прототрофному росту на минимальной среде с мальтозой в местах пересечения родительских штаммов. Отпечатки дрожжей: 1 – *K. lactis* UCDFST 71-45 (*ade4*); 2 – *K. dobzhanskii* CBS 2104 (*ura3*); 3 – *K. marxianus* CBS 712 (*trp2*); 4 – *K. wickerhamii* CBS 2745 (*ura3*); 5 – *K. aestuarii* CBS 4438 (*mal*); 6 – *K. siamensis* CBS 10860 (*mal*). В скобках приводятся использованные ауксотрофные мутанты. Типовая культура *K. lactis* CBS 683 (*lys1*) была использована в качестве тестера.

С помощью УФ-облучения у штаммов *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* были индуцированы ауксотрофные мутации. Штамм *K. lactis* CBS 683, маркированный мутацией *lys1*, был использован в качестве наземного тестера. Этот штамм также способен расти на мальтозе. Дополнительно был использован ауксотрофный мутант водного штамма *K. lactis* UCDFST 71-45 *ade4*. Штаммы *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, и *K. wickerhamii* были маркированы ауксотрофными мутациями, соответственно, *ura3*, *trp2* и *ura3*. Для гибридизации были использованы прототрофные культуры дрожжей *K. aestuarii* и *K. siamensis*, которые не утилизируют мальтозу и, соответственно, не могут расти на минимальной среде с мальтозой.

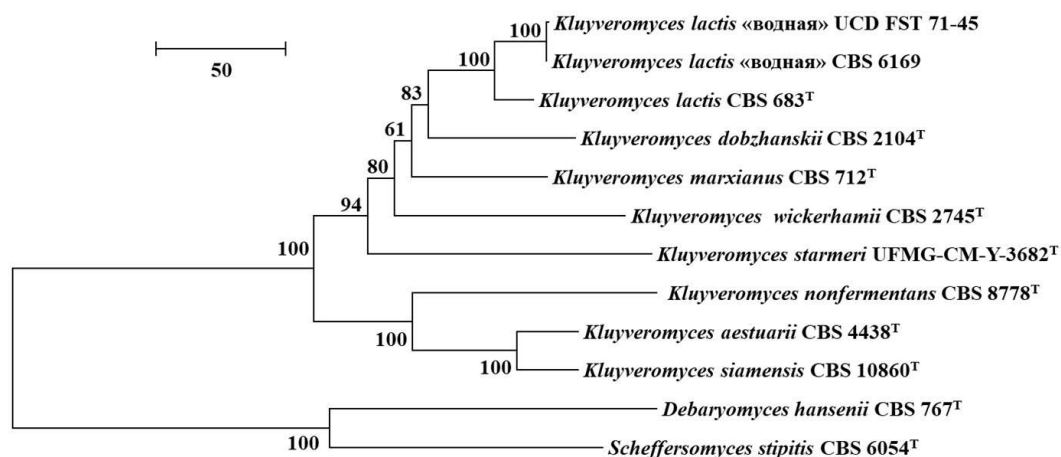
Межвидовые гибриды получали на минимальной мальтозной среде (Рис. 1). Гибриды были зарегистрированы только между наземными видами *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* (Рис. 1, дорожки 1–4). С другой стороны, дрожжи *K. aestuarii* и *K. siamensis* не образовывали гибридов с тестером *K. lactis* CBS 683 *lys1* (дорожки 5 и 6).

Для установления филогенетического родства изученных штаммов мы провели сравнитель-

ный анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2, ITS-участка, генов *EF-1a* и *ACT1*, которые являются универсальными молекулярными маркерами для баркодинга ДНК дрожжей (Рис. 2).

На филогенетическом древе виды рода *Kluyveromyces* со 100%-ной достоверностью сформировали отдельный кластер, который, в свою очередь, разделен на два субкластера. Первый включает наземные виды *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* и *K. starmeri*. Штаммы UCDFST 71-45 и CBS 6169 существенно отличались от типовой культуры CBS 683 по нуклеотидным последовательностям ITS-участка (7 замен), а также генов *EF-1a* (4) и *ACT1* (13). Несмотря на то, что гибрид UCDFST 71-45 × CBS 683 имел низкую выживаемость аскоспор (6%), мейотическая сегрегация контрольных маркеров была регулярной. С другой стороны, гибриды между тестером CBS 683 и типовыми культурами *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* были полностью стерильными.

Второй субкластер сформировали водные виды *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis*, которые не скрещивались с типовой культурой *K. lactis* CBS 683.



**Рис.2.** Мультигенный филогенетический анализ генетического родства наземных и водных видов рода *Kluyveromyces*. Приводятся значения бутстрепа >50%. Древо масштабировано по количеству нуклеотидных замен. В качестве внешней группы использовали типовые культуры *Debaromyces hansenii* CBS 767 и *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054. Т – типовая культура.

#### 4. Заключение

Результаты гибридологического и филогенетического анализов указывают на то, что водные и наземные виды *Kluyveromyces* относятся к разным генетическим родам. Виды одного генетического рода аскомицетовых грибов обладают общей системой типов спаривания, позволяющей им скрещиваться в любой комбинации (Наумов, 1978). Генетические роды включают биологические виды, которые обладают постзиготической изоляцией и образуют между собой нежизнеспособные продукты мейоза (аскоспоры) гибридов. Согласно полученным результатам, выделенные из болота в Луизиане штаммы представляют собой дивергентную популяцию дрожжей *K. lactis*.

#### Благодарности

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Лютова Л.В., Наумов Г.И., Шнырёва А.В. и др. 2022. Внутривидовой полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции. *Микробиология* 91: 480–491. DOI: [10.31857/S002636562230019X](https://doi.org/10.31857/S002636562230019X)
- Наумов Г.И. 1978. Генетическая концепция рода у грибов. *Доклады Академии наук СССР* 241: 952–954.
- Freitas L.F.D., Batista T.M., Santos A.R.O. et al. 2020. Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses. *Yeast* 37: 1–13. DOI: [10.1002/yea.3528](https://doi.org/10.1002/yea.3528)
- Lachance M.-A. 2011. *Kluyveromyces van der Walt* (1971). In: C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: pp. 471–482.
- Naumov G.I., Naumova E.S. 2002. Five new combinations in the yeast genus *Zygothospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. *FEMS Yeast Research* 2: 39–46. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x)
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. 2004. Molecular-genetic differentiation on the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research* 5: 263–269. DOI: [10.1016/j.femsyr.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.08.006)

# Antagonistic properties of actinomycetes in bottom sediments of a Mongolian river



Norovsuren J.<sup>1\*</sup>, Dorjgotov D.<sup>2</sup>, Lipko I.A.<sup>3</sup>, Burmaa Z.<sup>4</sup>, Bolormaa Ts.<sup>2</sup>, Myagmar G.<sup>1</sup>, Bayarmaa D.<sup>1</sup>, Byambasuren M.<sup>5</sup>, Ariunaa S.<sup>5</sup>, Uranchimeg A.<sup>5</sup>, Gantuyaa M.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> The Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences, Mongolia

<sup>2</sup> Institute of Geography and Geoecology, Mongolian Academy of Sciences, Mongolia

<sup>3</sup> Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

<sup>4</sup> Western regional branch of National University of Mongolia, Mongolia

<sup>5</sup> Institute of Plant Protection Research, Mongolia

**ABSTRACT.** The first actinomycetes of the genus *Streptomyces* are found in the bottom sediments of the Chono Kharaikh River in Mongolia. The isolated strains of streptomycetes are representatives of the *Cinereus* section of the *Achromogenes* series and the *Imperfectus* section. The isolated actinomycetes showed antibacterial and antifungal activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* and phytopathogenic fungi *Cladosporium* sp.

**Keywords:** actinomycetes, bottom sediments, Chono Kharaikh River

**For citation:** Norovsuren J., Dorjgotov D., Lipko I.A., Burmaa Z., Bolormaa Ts., Myagmar G., Bayarmaa D., Byambasuren M., Ariunaa S., Uranchimeg A., Gantuyaa M. Antagonistic properties of actinomycetes in bottom sediments of a Mongolian river // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1032-1034. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1032

## 1. Introduction

The abundance of terrestrial actinomycetes and their role in many biological processes is well known from various reviews. However, there are few studies on the diversity of actinomycetes in freshwater bodies, especially in rivers. Lake and river environments represent a largely untapped source of new microorganism isolation. According to the work of Terkina I.A., actinomycetes of the genera *Streptomyces* and *Micromonospora* were isolated for the first time from the water, bottom sediments and sponges of Lake Baikal - oligocarbo-philic, constant components with enzymatic and antibiotic activity (Terkina, 2004). The diversity of freshwater actinomycetes and how adaptation to lake and river environments affects the production of secondary metabolites will allow a better understanding of the potential usefulness of these bacteria as a source of useful products for biotechnology. Actinomycetes have been the most studied, where they make a significant contribution to the turnover of complex biopolymers such as lignocellulose, hemicellulose, pectin, keratin and chitin (Veiga et al., 1983; Williams et al., 1984).

Actinomycetes are widespread in various habitats in Mongolia, not only in the soil, but in the rhizo-

sphere of plants, in herbaceous plants, and there are also endophytic actinomycetes (Norovsuren, 2009; Norovsuren, 2018; Norovsuren, 2020; Liu et al., 2022). The first microbiological study of the Khuvsugul area soils was carried out in 1975. The distribution of actinomycetes was found in all soils from 22 to 235 m, their numbers ranged from 50 to 350 cells/g of raw silt (Putyanina, 1977). Actinomycetes from the bottom sediments of Lake Sangiin Dalai Nuur and Khara-Uus Nuur have been studied since 2018 in Mongolia (Norovsuren, 2020; Oyunsuren et al., 2020). In this regard, the aim of the work was to isolate actinomycetes from the bottom sediments of the Chono Kharaikh river (Mongolia) and to search for highly active and promising strains for biotechnology.

## 2. Materials and methods

The studies used soil samples from the bottom sediments of the Chono Kharaikh River (Khovd aimag, Mongolia). The samples were dried at room temperature for 7 days. For the isolation and differential counting of actinomycetes, the traditional method of surface seeding was used on the following media: casein-glyc-

\*Corresponding author.

E-mail address: [norovsurenj@mas.ac.mn](mailto:norovsurenj@mas.ac.mn) (J. Norovsuren)

**Received:** August 01, 2024; **Accepted:** August 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





erol agar, medium with sodium propionate, and HVA (humus-vitamin agar) (Zenova, 2000; Hayakawa and Nonomura, 1984). To limit the growth of gram-negative bacteria and fungi, nystatin (50 µg/ml), nalidixic acid (1.5 µg/ml), and vitamin B complex were added to the selective media. Before sowing, the samples of bottom sediment soils were heated at 120°C for 1 hour. The cultures were incubated for 2-4 weeks at 28°C. For the isolation of actinomycetes in pure culture and further cultivation, Gauze 1; ISP 2 and ISP 3 media were usually used (Gauze et al., 1983; Shirling and Gottlieb, 1966). Identification of the isolated actinomycete strains was carried out according to the identification manual of Bergey (1997), using morphological indicators, as well as chemotaxonomic features: the presence of LL- or meso isomers of diaminopimelic acids and differentiating sugars in whole-cell hydrolysates (Hasegawa et al., 1983). The series of the streptomycete section were determined according to the identification manual of Gauze (Gauze et al., 1983). Antagonistic properties were determined using the agar block method (Netrusov et al., 2005). The diameter of the growth inhibition zone of test organisms was measured (mm). The following test organisms were used: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and including the phytopathogenic fungus *Cladosporium* sp. from tomato leaves.

### 3. Results and discussion

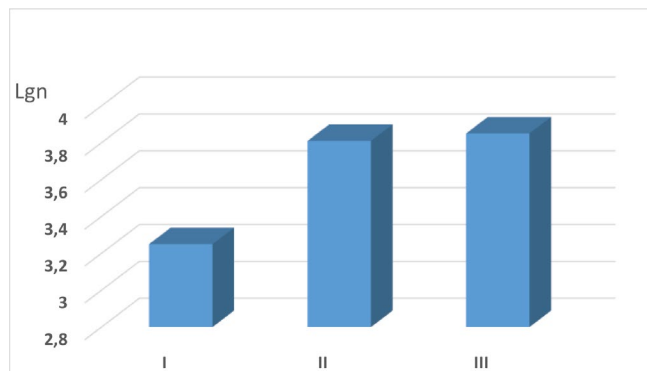
The river environment is a rich source of actinomycetes and can produce a wide range of biologically active secondary metabolites. In this study, we used 3 nutrient media, including 2 selective isolation media. *Streptomyces* were isolated from the first time from the bottom sediments of the Chono Kharaiikh River. The number of actinomycetes growing on a selective medium with sodium propionate fluctuated within  $6.6 \times 10^3$  CFU/g, on humus-vitamin agar is from  $7.2 \times 10^3$  CFU/g and on casein-glycerol medium -  $1.8 \times 10^3$  CFU/g (Fig.).

The search for antibiotic-producing actinomycetes from lake and river bottom sediments became the main focus of this study. Further development of drugs based on the isolated substances is expected. A total of 80 actinomycete strains were isolated from three nutrient media. They belonged to the *Streptomyces* genus includes sections *Cinereus*, *Achromogenes* series, and *Imperfectus* sections.

The isolated strains inhibited the growth of the following microorganisms: *Bacillus subtilis* (8-13 mm), *Staphylococcus aureus* (8-15mm), *Aspergillus niger* (9-15mm) and *Cladosporium* sp (13-15mm). No antagonistic effect was observed against *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*.

### 4. Conclusions

The Streptomycetes isolated from bottom sediments the Chono Kharaiikh River showed antibacterial and antifungal activity against *Bacillus subtilis*,



**Fig.** Total number of actinomycetes (Lgn). Media: I - casein glycerol medium; II - with sodium propionate medium; III - HVA - Humus-Vitamin Agar medium

*Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* and *Cladosporium* sp. The actinomycete strains could serve as a resource for the development of new antibiotic drugs.

### Acknowledgements

The work was supported by the project of the Coordination Department for the Development and Implementation of Scientific and Technical Policy, and Innovation Development of Mongolia 2022/174 (SHUTBIKHKHZG -2022/174).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Bergey's manual of systematic bacteriology. 1997. In: Holt J., Krieg M., Smith P. (Eds.), Moscow: Mir. 799 p. (in Russian)
- Gauze G.F., Preobrazhenskaya T.P., Sveshnikova M.A. et al. 1983. Manual of actinomycetes [Opredelitel' aktinomytsetov]. Moscow: Nauka. (in Russian)
- Hasegawa T., Takizawa M., Tanida S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. The Journal of General and Applied Microbiology 29: 319–322.
- Hayakawa M., Nonomura H. 1984. HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. Abstracts of papers presented at the annual meeting of the Actinomycetologists. Osaka. p. 6.
- Liu S.-W., Norovsuren J., Nikandrova A.A. et al. 2022. Exploring the diversity and antibacterial potentiality of cultivable Actinobacteria from the soil of the saxaul forest in Southern Gobi desert in Mongolia. Microorganisms 10: 989. DOI: [10.3390/microorganisms10050989](https://doi.org/10.3390/microorganisms10050989)
- Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. et al. 2005. Manual of microbiology. [Praktikum po mikrobiologii]. In: Netrusov A.I. (Ed.), Moscow: Academia. 608 p. (in Russian)
- Norovsuren J. 2009. Patterns of geographical distribution of actinomycetes in soils of Mongolia [Zakonomernosti geograficheskogo rasprostraneniya aktinomytsetov v pochvakh Mongolii]. Moscow: MTAA– Moscow State Agrarian University named after K.A. Timiryazev. (in Russian)
- Norovsuren J. 2018. Antagonism of endophytic actinomycetes. [Antagonizm endofitnikh aktinomytsetov]. Ekaterinburg pp. 32-34. (in Russian)

Norovsuren J. 2020. Actinomycetes isolated from different habitats. [Aktinomytsety vydelenie iz raznykh mest obitaniya]. Moscow: MTAA– Moscow State Agrarian University named after K.A. Timiryazev. (in Russian)

Oyunsuren U., Buyanzayaa G., Norovsuren J. 2020. Ecophysiology and antibiotic activity of actinomycetes of the genus *Streptomyces* sp. [Ekofiziologiya i antibioticheskaya aktivnost' aktinomytsetov roda *Streptomyces* sp.]. Moscow: MTAA– Moscow State Agrarian University named after K.A. Timiryazev. (in Russian)

Putyanina T.N. 1977. The microflora of the soils of Lake Khubsugul. Natural conditions and resources of the Prikhubsugulya (MNR). [Mikroflora gruntov ozera Khubsugul. Prirodnie uslovia i resursi Prikhubsugulia (MNR). Proceedings of the Soviet–Mongol complex Khubsugul expedition. 5. Irkutsk-Ulaanbaator. pp. 136 – 140. (in Russian)

Shirling E.B., Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 313 – 340.

Terkina I.A. 2004. Actinomycetes of genera *Streptomyces* and *Micromonospora* in the microbial community of lake Baikal. [Aktinomytsety roda *Streptomyces* i *Micromonospora* v mikrobnom soobtshestve ozera Baikal. Abstract of dissertation. Cand. Sc. (Biology) Irkutsk. (in Russian)

Veiga M., Esparis A., Fabregas J. 1983. Isolation of cellulolytic actinomycetes from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 286 – 287.

Williams S.T., Lanning S., Wellington E.M.H. 1984. *Ecology of Actinomycetes*. p. 481–528.

Zenova G.M. 2000. Soil actinomycetes from rare genera. [Pochvennie aktinomytsety redkikh rodov]. Moscow: MSU. (in Russian) p. 81

# Comparative characterization of anaerobic oil oxidation processes by microbial communities of sediments from natural oil seeps in Lake Baikal (Gorevoy Utes, Bolshaya Zelenovskaya)

Pavlova O.N.\*, Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Bukin S.V., Ivanov V.G., Khabuyev A.V., Pogodaeva T.V., Smirnova D.K., Gorshkov A.G., Zemskaya T.I.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** The comparative characterization of oil biodegradation processes under anaerobic conditions during the cultivation of microbial communities of sediments from two sites of oil seeps is given. The microbial community of sediments from the Bolshaya Zelenovskaya River oil seep, functioning under the conditions of long-term exposure to hydrocarbons, is focused more on the processes of anaerobic oxidation of oil in comparison with the microbial communities of sediments from the oil seep located near Cape Gorevoy Utes. This is evidenced by the high level of hydrocarbon biodegradation in both surface and deep sediments, regardless of the electron acceptors present in the medium. Oil degradation in enrichment cultures was accompanied by the formation of hydrocarbon gases (methane and ethane). The highest concentration of methane formed was found in the experiment with sediments from Cape Gorevoy Utes. Ethane generation, on the contrary, was more typical of the cultivation of communities from sediments of the Bolshaya Zelenovskaya River. Microbial communities functioning under anaerobic conditions in sediments at the sites of oil seeps are no less important in the processes of self-purification of the lake from oil “pollution” than aerobic microbial communities of the water column and surface sediments.

**Keywords:** anaerobic oxidation of oil, Lake Baikal, sediments, microbial community

**For citation:** Pavlova O.N., Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Bukin S.V., Ivanov V.G., Khabuyev A.V., Pogodaeva T.V., Smirnova D.K., Gorshkov A.G., Zemskaya T.I. Comparative characterization of anaerobic oil oxidation processes by microbial communities of sediments from natural oil seeps in Lake Baikal (Gorevoy Utes, Bolshaya Zelenovskaya) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1035-1049. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1035

## 1. Introduction

Lake Baikal, located in the southern part of Eastern Siberia, is the largest natural freshwater reservoir and is of tectonic origin. It is known as one of the three freshwater lakes in the world, in line with the rifted deep-water Lake Tanganyika and shallow-water Lake Chapala, which are also characterized by natural oil seeps (Simoneit et al., 2000; Zárate-del Valle et al., 2006). Nowadays, there are two areas of natural oil seepages in Lake Baikal: one of them is located near the mouth of the Bolshaya Zelenovskaya River (BZ) and has been known since the XVIII century; the other is located near Cape Gorevoy Utes (GU) (discovered in 2005) (Kontorovich et al., 2007; Khlystov et al., 2007) (Fig. 1).

Despite the constant oil emission (up to 4 t/year), low temperatures, and a long period of complete replacement of Lake Baikal waters by inflows (about 400 years) (Weiss et al., 1991), oil seepages are localized in restricted sites. The area of lake surface showing oil slicks near Cape Gorevoy Utes has not changed over the period 2005 to present and is approximately 1 km<sup>2</sup>. The permanence of the area of oil “pollution” indicates the mechanisms of self-purification of the lake ecosystem, the main contribution to which is made by aerobic hydrocarbon-oxidizing microorganisms (Pavlova et al., 2008; Pavlova et al., 2012; Pavlova et al., 2020; Gorshkov et al., 2020). It is obvious that aerobic processes of oil hydrocarbon oxidation are dominant in the oxygenated water column and in the surface sediments with high O<sub>2</sub> content.

\*Corresponding author.

E-mail address: [pavlova@lin.irk.ru](mailto:pavlova@lin.irk.ru) (O.N. Pavlova)

**Received:** July 08, 2024; **Accepted:** July 29, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



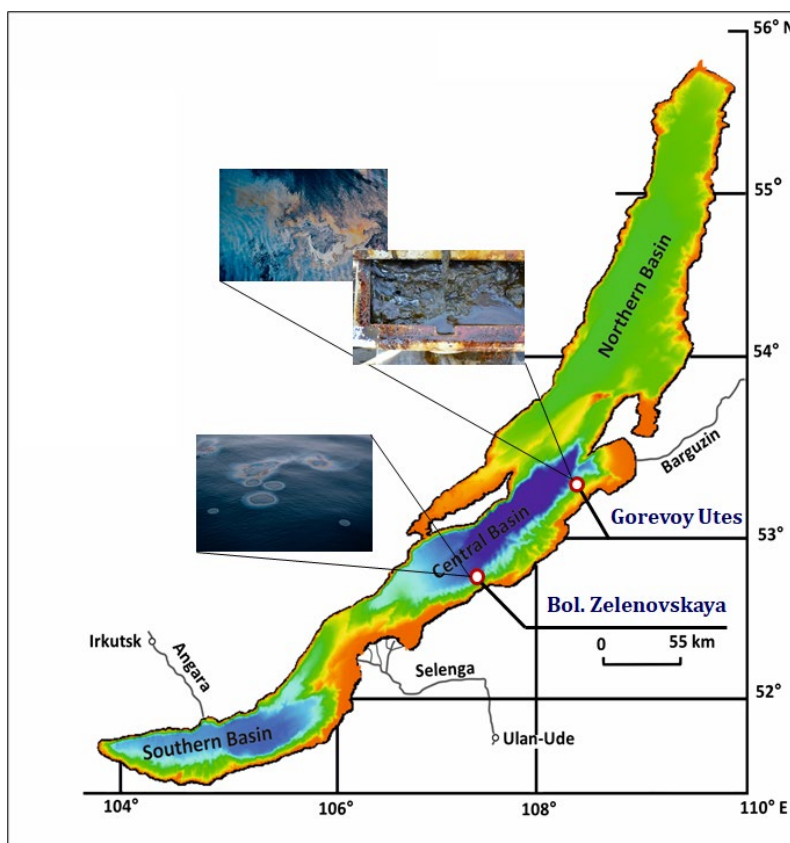


Fig.1. Map-scheme of the location of the oil seeps in Lake Baikal

On the other hand, if the oil remains in sediments for a long time, anaerobic processes of hydrocarbon biodegradation may occur, resulting in the appearance of deeply biodegraded oil on the water surface (as observed in the area of the Bolshaya Zelenovskaya River). These processes may be common or different in the two areas of oil seepages in Lake Baikal, as the areas differ in the time of functioning, thermobaric conditions, geological structure, and oil composition at the present stage (Khlystov et al., 2022).

## 2. Materials and methods

Two gravity cores of sediment were collected for the study: from the hydrocarbon discharge zone near Cape Gorevoy Utes (10 km from the shore, depth of the water column is 890 m), St. 5, GC. 3, and at the mouth of the Bolshaya Zelenovskaya River (1.4 km from the shore, depth of the water column is 320 m), St. 4, GC. 6. Two samples were taken from each core (Table). Without oxygen, oil hydrocarbons can be oxidized by microorganisms using electron acceptors, and  $\text{Fe}^{3+}$  (Zhang et al., 2019). To obtain enrichment cultures, samples of sediments were aseptically collected from the central part of the core and immediately placed in 116-mL flasks containing 50 mL of sterile anaerobic mineral medium, oil, and various electron acceptors. Oil conversion was assessed by the loss of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) after one year of cultivation compared to control samples not containing sediments (Pavlova et al., 2022; Pavlova et al., 2024).

## 3. Results and discussion

As a result of these studies, the conversion of *n*-alkanes and PAH was found to be more efficient in the experiment with sediments sampled at the site of the BZ oil seep than at the GU oil-methane seep. In the experiment of the GU sediments, the decrease in *n*-alkanes was either insignificant or their concentration decreased by 1.2-fold, while the concentration of polycyclic hydrocarbons decreased by 1.1-1.4-fold (Pavlova et al., 2022). While in the experiment of the BZ sediments, the concentration of *n*-alkanes decreased 1.2-2 times, and PAH by 2.2-2.8 times (Pavlova et al., 2024).

The presence of different electron acceptors had an effect on *n*-alkanes degradation processes occurring only in enriched cultures containing surface sediments and was less significant for processes occurring in cultures containing deep sediments. Both *n*-alkanes and PAH are degraded in surface sediments, while in deep sediments mainly polycyclic aromatic hydrocarbons were biodegraded. The addition of electron acceptors had little or no effect on the reduction of PAH in the experiment with both GU and BZ sediments.

The results of the experiments correlate with geochemical data on the composition of organic matter and selected biomarker compounds in sediments from the two oil seepage. Sediments of GU are enriched in organic matter, which is biodegraded to a different extent than that of BZ, depending on the depth of occurrence. Group composition of bitumoids and increase in productivity index indicate that oil saturation of the GU sediments is continuously in progress. Moreover, the presence of naphthenic hump, high level of *n*-al-



**Table.** Legend keys of enrichment cultures obtained and cultivation conditions

Sampling site	Sediment sampling depth, cm /legend	Electron acceptor				Reference
		H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub>			Fe <sup>3+</sup>	
Gorevoy Utes (GU)	St. 5, GC. 3, 10–30 / (GUI)	GUI_HCO <sub>3</sub>	GUII_HCO <sub>3</sub>			Pavlova et al., 2022
	St. 5, GC. 3, 100–120 / (GUII)	GUI_SO <sub>4</sub>	GUII_SO <sub>4</sub>			
Bolshaya Zelenovskaya (BZ)	St. 4, GC. 6, 30–50 cm / K1_BZ	K1_HCO <sub>3</sub>	K1_SO <sub>4</sub>	K1_NO <sub>3</sub>	K1_Fe	Pavlova et al., 2024
	St. 4, GC. 6, 250–270 cm / K2_BZ	K2_HCO <sub>3</sub>	K2_SO <sub>4</sub>	K2_NO <sub>3</sub>	K2_Fe	

kanes maturity (CPI ≤ 2), decrease in PAH concentration, decrease in n-C<sub>35</sub>-n-C<sub>39</sub> with depth in GU samples indicate that biodegradation processes are taking place (Morgunova et al., 2022). In the BZ sediments, the concentration of organic matter is much lower, *n*-alkanes and isoprenoids are absent, and bitumoids are dominated by asphaltic-resinous components (up to 94 %) (Khlystov et al., 2022; Kostyreva et al., 2022; Morgunova et al., 2022).

The oil content is also influenced by geological processes at two sites of oil seeps. As a result of oil fractionation in the upper layers of sediments and the formation of kerogenic structures on the lake bed in the GU area, a fraction enriched in *n*-alkanes (Khlystov et al., 2009; Gorshkov et al., 2020) enters the lake waters, which is very efficiently oxidized by microorganisms under aerobic conditions in the water column. A partial loss of low molecular weight alkanes as a result of oil fractionation and conservation of high molecular weight alkanes, as well as high concentrations of polycyclic hydrocarbons (terpanes, PAH), contribute to the development of a microbial community aimed at biodegradation of aromatic compounds under anaerobic conditions, as evidenced by a significant decrease in their concentration in the oil composition during the 18 years since the discovery of the oil seepage (Gorshkov et al., 2020).

In the longer existing BZ area, oil has a long pathway from its source of generation and accumulates for long periods in sediments, where active anaerobic biodegradation of both *n*-alkanes and PAH takes place. The long distance travelled by the oil from the source and its long-term accumulation in sediment layers is evidenced by the perylene content in the bitumen (a stable end product of organic matter transformations in sediments), which is two orders of magnitude higher than in the oil sampled in the area of the GU oil seep (Khlystov et al., 2022).

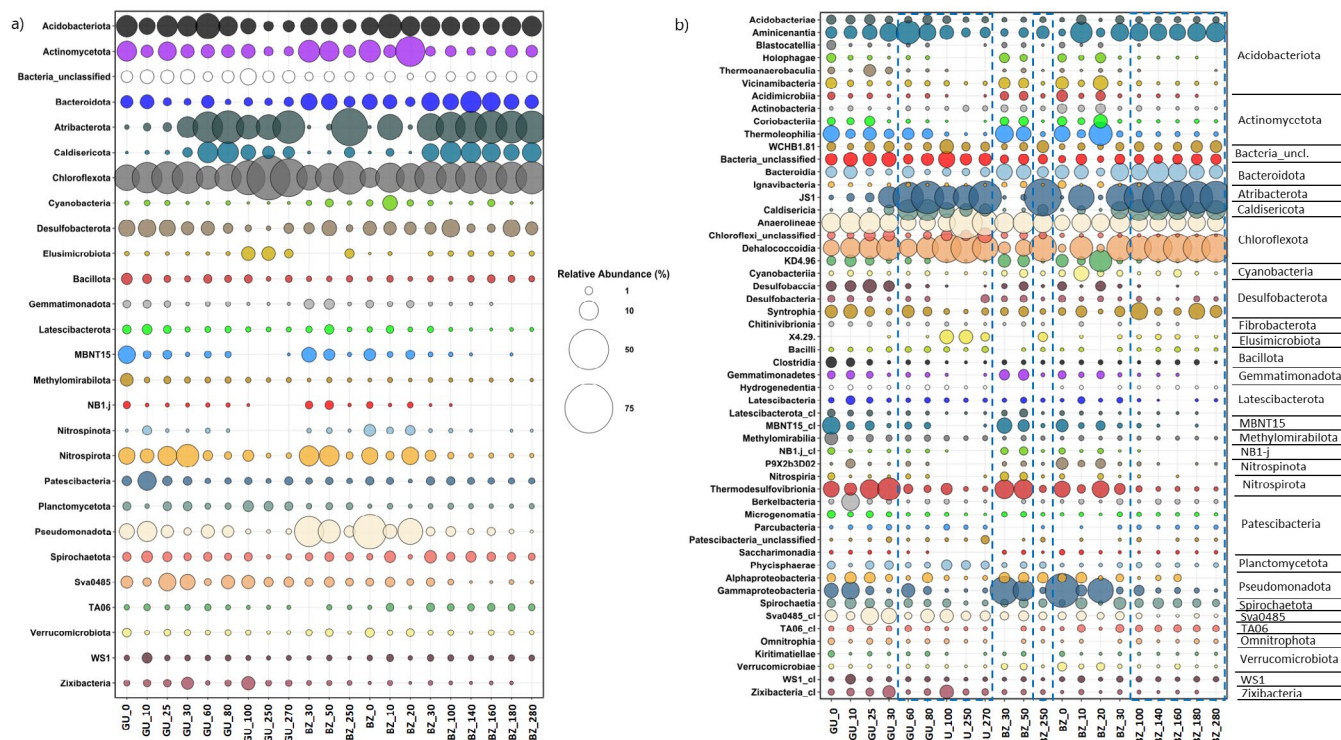
Oil degradation was accompanied by the formation of hydrocarbon gases (methane and ethane). In the BZ and GU sediment experiments, the maximum concentration of methane formed was 2.4 mmol/L (54 mL/L) and 32.54 mmol/L (728 mL/L), respectively. The range of methane concentrations in sediments of Lake Baikal is from a few mcl/l to 20 ml/l (Zemskaya et al., 2008; Pogodaeva et al., 2017). Thus, the values of the concentration of methane formed during oil biodegradation under experimental conditions are highly significant, especially in the case of samples from the GU oil seep. In contrast, ethane generation was more characteristic in cultured communities from BZ sedi-

ments, where C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> concentration increased 2.3-7 times after one year of cultivation compared to the beginning of the experiment.

Analysis of the structure of microbial communities in the surface and deep sediments from the GU and BZ oil seeps revealed the dominance of representatives of nine phyla of the domain *Bacteria*: *Chloroflexota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Nitrospirota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota* and *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Caldisericota* and five of the domain *Archaea*: *Thermoproteota*, *Halobacterota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota*, and *Ca. Hadarchaeota*. Compared to sediments from methane seeps and mud volcanoes, the composition of the microbial communities is mostly similar at the phylum level and differs significantly at the family level (Zemskaya et al., 2024, in press).

The dominant phylum *Chloroflexota* was represented by the families *Anaerolineaceae* and the non-classified *Dehalococcoidia*; the share of families within the phylum varied with depth (Fig. 2). Microorganisms belonging to these families have been found in a wide range of anaerobic habitats, including sediments, hot springs, anaerobic reactors, and hydrocarbon-contaminated ecotopes, where they are capable of syntrophic oxidation of hydrocarbons (*Anaerolineaceae*) to form methane with the participation of methanogenic archaea, reductive dechlorination of chlorinated hydrocarbons, and organohalogen respiration (*Dehalococcoidia*) (Liang et al., 2015; Löffler et al., 2015).

The phylum *Actinomycetota* is mainly represented by OTU belonging to the families OPB<sub>41</sub> (*Coriobacteriia*), the chemoorganoheterotrophic *Gaiellaceae*, and WCHB1-81 (*Thermoleophilia*). Most of the phylotypes associated with OPB<sub>41</sub> were found in oil-bearing, sedimentary, and subsurface environments. Analysis of the metabolism of cultured representatives of OPB<sub>41</sub> showed that the microorganisms are anaerobic lithotrophs using thiosulphate, elemental sulphur, or Fe (III) as electron acceptors (Khomyakova et al., 2022). The phylum *Acidobacteriota* consisted mainly of representatives of the families *Aminicenantales* and *Vicinamibacteraceae* – chemoorganoheterotrophs fermenting carbohydrates and protein substrates under anaerobic and aerobic conditions, respectively (Kadnikov et al., 2019; Dedysh and Yilmaz, 2018). *Aminicenantales* have been shown to be most abundant in hydrocarbon-exposed environments, followed by marine habitats (especially hydrothermal vents) and freshwater habitats (Farag et al., 2014). The phylum *Bacteroidota* is represented by the family *Bacteroidetes\_vadinHA17*, proteolytic bacteria that ferment carbohydrates to form volatile fatty



**Fig.2.** The relative share of Bacteria 16S rRNA gene fragment sequences represented at the phylum (a) and family (b) levels in libraries from sediments of the GU and BZ oil seeps. Listed taxa representing > 1% in at least one of the libraries

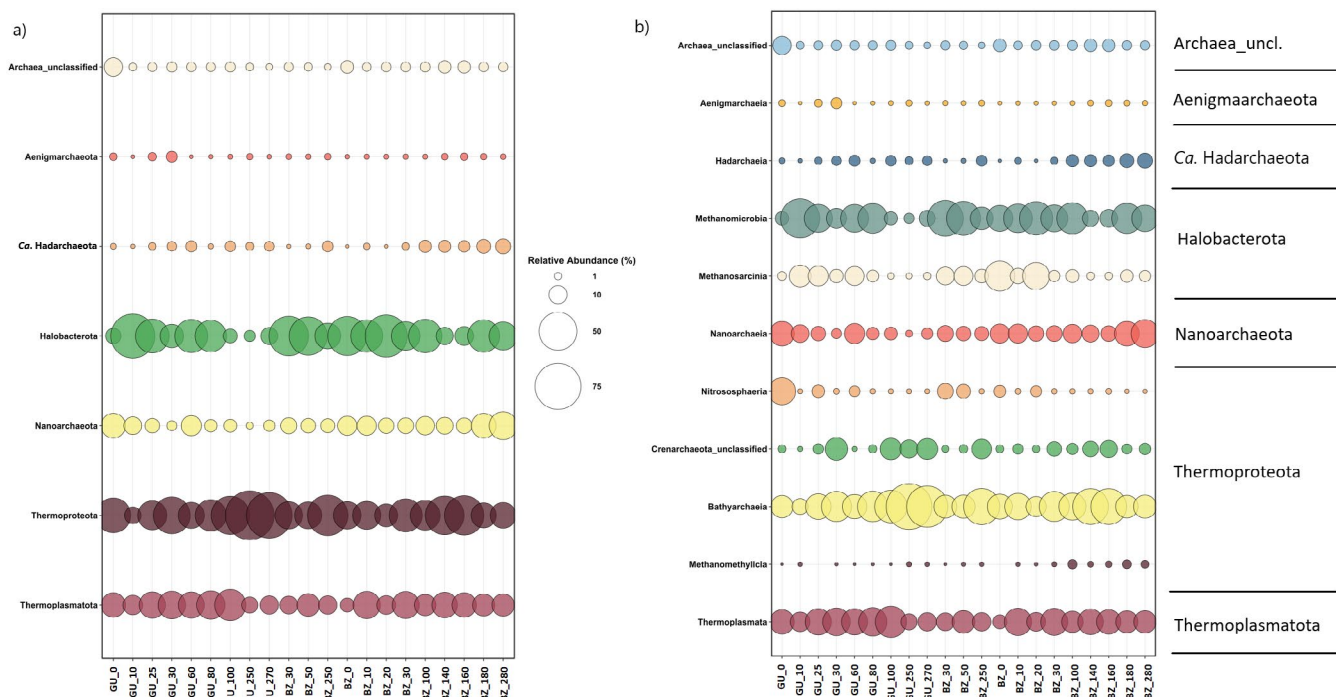
acids (Kampmann et al., 2012). OTU related to the phylum *Desulfobacterota* belonged to anaerobic bacteria oxidizing short-chain fatty acids (*Syntrophaceae*, *Smithellaceae*) or acetate (*Desulfobaccaceae*) in syntrophic interaction with methanogenic archaea (Galushko and Kuever, 2019).

The representatives of the phylum *Nitrospirota*, *Pseudomonadota*, *Patescibacteria*, MBNT15, and *Verrucomicrobiota* were mainly revealed in the surface sediments and are characterized as chemoorganoheterotrophs oxidizing peptides, amino acids, fatty acids and simple sugars by aerobic and anaerobic respiration.

At the same time, *Atribacterota* and *Caldisericota* were revealed in deep sediments. Representatives of *Atribacterota* are most commonly found in geothermal systems, oil reservoirs, anaerobic marine sediments and methane seeps (Mori et al., 2009; Carr et al., 2015; Nobu et al., 2016). Metabolic reconstructions of *Atribacterota* genomes have now shown that bacteria can not only ferment carbohydrates via glycolysis to produce hydrogen, acetate and ethanol, but can also ferment short-chain *n*-alkanes to fatty acids, which are then consumed by secondary degraders. The oxidation of *n*-alkanes is controlled by a complete set of genes that mediate the attachment of fumarate to hydrocarbons (FAE, fumarate-adding enzymes) (Liu et al., 2019). Thermophilic obligate anaerobic heterotrophs that reduce sulphur compounds and belong to the phylum *Caldisericota* were also among the dominant taxa in the deep sediments. Sequences belonging to this phylum are currently being identified in hydrothermal systems, hydrocarbon contaminated aquifers, soda lakes, bioreactors, etc. (Mori et al., 2009). Phylogenetic analysis based on the comparison of the concatenated amino acid sequences of 120 conserved proteins

showed that the *Caldisericota* phylum, together with *Coprothermobacterota*, *Dictyoglomota*, *Thermotogota*, and *Thermodesulfobiota*, forms an ancient clade whose ancestor may have been a thermophilic, strictly anaerobic, motile, hydrogen-dependent, mixotrophic bacterium similar in metabolism to the last universal common ancestor (LUCA) (Leng et al., 2023). Also in deep sediments, sequences of representatives of the phylum *Zixibacteria* and *Elusimicrobiota*, which usually account for less than 1% of microbial communities and are representatives of the “rare biosphere” or “microbial dark matter”, were found in significant amounts (up to 4.7%) (Pascoal et al., 2021). Based on the reconstruction of the genomes of these bacteria, it is shown that they possess enzymatic metabolism, and magnetotaxis are involved in iron and sulphur cycling (Castelle et al., 2013; Uzun et al., 2023).

The *Archaea* domain in the oil seeps sediments was represented by the same dominant taxa at the phylum level as in the mud volcano sediments, only the share of microorganisms from different systematic groups varied (Zemskaya et al., 2024). This pattern was established earlier, when studying microbial diversity in sediments of Lake Baikal associated with oil and gas discharge (Zemskaya et al., 2015). The *Thermoproteota* phylum was abundant in sediments in the zone of oil seepages (Fig. 3). The dominant OTU belonged to the *Bathyarchaeia* (up to 60% of all sequences) and to the unclassified *Crenarchaeota*. Based on metabolic reconstructions of *Bathyarchaeia* genomes, it has now been shown that microorganisms can not only ferment carbohydrates, but also oxidize short-chain *n*-alkanes and aromatic compounds to fatty acids, which are then consumed by secondary degraders (Zhou et al., 2018; Dong et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021).



**Fig.3.** The relative share of Archaea 16S rRNA gene fragment sequences represented at the phylum (a) and class (b) levels in libraries from sediments of the GU and BZ oil seeps. Taxa representing > 1% in at least one of the libraries are listed

The *Halobacterota* phylum is represented by families of hydrogenotrophic archaea (*Methanomicrobiaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanoperedenaceae*, and *Methanosacetaceae*). Aerobic archaea of the family *Nitrosopumilaceae* have been identified in the surface and subsurface sediments, carrying out chemolithoautotrophic growth through ammonia oxidation and CO<sub>2</sub>-fixation (Qin et al., 2016). The phylum *Nanoarchaeota* consisted mainly of OTU belonging to the families GW2011\_GWC1\_47\_15 and Woese archaeales fa, archaea identified in a wide range of habitats, including oil reservoirs and sulphur springs. They are part of a consortium with bacteria where bacteria are involved in carbon cycling and archaea are involved in nitrogen fixation, denitrification and sulphate reduction under anaerobic conditions (Liu et al., 2021; Köhler et al., 2023). The myxotrophic *Thermoplasmatota* were represented by Marine Benthic Group D and DHVEG-1 fa, and the unidentified *Thermoplasmata*.

Only in their deep sediment samples were revealed sequences assigned to thermophilic *Ca. Hadarchaeota*. Archaea were first discovered in a gold mine in South Africa at a depth of about 3 km. They were also found in methane cold seep sediments containing gas hydrates (Takai et al., 2001; Mara et al., 2023). According to the genome reconstructions of *Ca. Hadarchaeota* has genes related to carbon fixation via the Wood-Ljungdahl pathway, methanogenesis and alkane metabolism (Hua et al., 2019; Baker et al., 2016; Wang et al., 2019).

Thus, metabarcoding studies of sediments from oil seeps (BZ and GU) revealed a complex composition of microbial communities consisting of bacteria and archaea specialized in the degradation processes of a wide range of substrates (organic carbon and oil hydrocarbons), as well as the presence in microorganisms of genes encoding the synthesis of enzymes for the aer-

obic degradation of hydrocarbons and biosurfactants (Pavlova et al., 2010; Lomakina et al., 2014; Likhoshway et al., 2014). The microbial community of sediments of the GU is mostly represented by sequences of microorganisms found in thermal springs of Yellowstone Park, sediments of mud volcanoes, and hydrocarbon-contaminated environments geographically very distant from Lake Baikal, as well as sequences of representatives of the “rare biosphere” – *Elusimicrobiota*, *Zixibacteria*, and *Ca. Hadarchaeota*. Representatives of these taxa are also found in the deep sediments of the BZ, but in smaller amounts. The main difference in the taxonomic composition of the microbial communities was observed between the subsurface and deep sediments (Pavlova et al., 2022; Pavlova et al., 2024).

#### 4. Conclusions

The microbial community of sediments of the Bolshaya Zelenovskaya oil seep, functioning under conditions of long-term exposure to hydrocarbons, is more focused on the processes of anaerobic oxidation of oil in comparison with the microbial communities of sediments of the oil seep located near Cape Gorevoy Utes. This is demonstrated by the high level of biodegradation of PAH in both surface and deep sediments, regardless of the electron acceptors present in the medium. And *n*-alkanes, the degradation rate of which was higher in enrichment cultures with BZ sediments than with GU.

Microbial communities functioning under anaerobic conditions in sediments in areas of oil seepages are no less important link in the processes of self-purification of the lake from oil “pollution”. This is evidenced by the high hydrocarbon-oxidizing capacity of microorganisms, which carry out anaerobic biodegradation of oil components (up to 65%) in the low-tem-



perature conditions of Lake Baikal. As in other oil reservoirs, hydrocarbon conversion is accompanied by the formation of hydrocarbon gases (methane and ethane). Bacteria (*Bacillota*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexota*, *Actinomyceota*, *Desulfobacterota*) and archaea (*Halobacteriota*, *Bathyarchaeia*), which oxidize syntrophically oil hydrocarbons, may be the key participants in the anaerobic degradation of oil hydrocarbons in sediments of Lake Baikal.

## Acknowledgements

The study is carried out within the State Assignment No. 0279-2021-0006 (121032300223-1). Studies of *n*-alkanes and PAH decrease under experimental conditions were carried out on the basis of the instrumental center of collective use of physical and chemical ultramicroanalysis of LIN SB RAS. The sequencing of the amplicon libraries was carried out at the Core Centrum “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” in ARRIAM. All resource-intensive operations were carried out using the Akademik V.M. Matrosov high-productivity sector, of the Irkutsk Supercomputer Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences.

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

- Baker B.J., Saw J.H., Lind A.E. et al. 2016. Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface Archaea, Hadesarchaea. *Nature Microbiology* 1: 16002. DOI: [10.1038/nmicrobiol.2016.2](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.2)
- Carr S.A., Orcutt B.N., Mandernack K.W. et al. 2015. Abundant Atribacteria in deep marine sediment from the Adélie Basin, Antarctica. *Frontiers in microbiology* 6: 872. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00872](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00872)
- Castelle C.J., Hug L.A., Wrighton K.C. et al. 2013. Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nature Communications* 4:1 DOI: [10.1038/ncomms3120](https://doi.org/10.1038/ncomms3120)
- Dedysh S.N., Yilmaz P. 2018. Refining the taxonomic structure of the phylum *Acidobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68(12): 3796–3806. DOI: [10.1099/ijsem.0.003062](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003062)
- Dong X., Greening C., Rattray J.E. et al. 2019. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments. *Nature Communications* 10(1): 1816. DOI: [10.1038/s41467-019-09747-0](https://doi.org/10.1038/s41467-019-09747-0)
- Farag I.F., Davis J.P., Youssef N.H. et al. 2014. Global patterns of abundance, diversity and community structure of the *Aminicenantes* (Candidate Phylum OP8). *PLoS ONE* 9(3): e92139. DOI: [10.1371/journal.pone.0092139](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092139)
- Galushko A., Kuever J. 2019. *Desulfobacca*. In: Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: [10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2)
- Gorshkov A., Pavlova O., Khlystov O. et al. 2020. Fractioning of petroleum hydrocarbons from seeped oil as a

factor of purity preservation of water in Lake Baikal (Russia). *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 115–122. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.10.010](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.10.010)

Hua Z.-S., Wang Y.-L., Evans P.N. et al. 2019. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring *Archaea*. *Nature Communications* 10(1). DOI: [10.1038/s41467-019-12574-y](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12574-y)

Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V. et al. 2019. Genome of the candidate phylum *Aminicenantes* bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. *Extremophiles* 23(2): 189–200. DOI: [10.1007/s00792-018-01073-5](https://doi.org/10.1007/s00792-018-01073-5)

Kampmann K., Ratering S., Kramer I. et al. 2012. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 78(7): 2106–2119. DOI: [10.1128/aem.06394-11](https://doi.org/10.1128/aem.06394-11)

Khlystov O.M., Gorshkov A.G., Egorov A.V. et al. 2007. Oil in the Lake of world heritage. *Doklady Earth Sciences* 415: 682–685. DOI: [10.1134/S1028334X07050042](https://doi.org/10.1134/S1028334X07050042) (In Russian)

Khlystov O.M., Zemskaya T.I., Sitnikova T.Ya. et al. 2009. Bottom bituminous constructions and biota inhabiting them according to investigation of Lake Baikal with the Mir submersible. *Doklady Earth Sciences* 429(1): 1333–1336. DOI: [10.1134/S1028334X09080200](https://doi.org/10.1134/S1028334X09080200) (In Russian)

Khlystov O.M., Izosimova O.N., Hachikubo A. et al. 2022. A new oil and gas seep in Lake Baikal. *Petroleum Chemistry* 62: 475–481. DOI: [10.1134/S096554412205005X](https://doi.org/10.1134/S096554412205005X) (In Russian)

Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y. et al. 2022. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales*. *Frontiers in Microbiology* 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1047580](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1047580)

Köhler J.M., Ehrhardt L., Günther P.M. 2023. Archaeal and extremophilic bacteria from different archaeological excavation sites. *International Journal of Molecular Sciences* 24(6): 5519. DOI: [10.3390/ijms24065519](https://doi.org/10.3390/ijms24065519)

Kontorovich A.E., Kashirtsev V.A., Moskvina V.I. et al. 2007. Petroleum potential of Baikal deposits. *Russian Geology and Geophysics* 48(12): 1046–1053. DOI: [10.1016/j.rgg.2007.11.004](https://doi.org/10.1016/j.rgg.2007.11.004) (In Russian)

Kostyreva E.A., Kashircev V.A., Pavlova O.N. et al. 2022. Chloroform extracts of bottom sediments in the region Central Baikal. *InterExpoGeoSiberia* 2(1): 200–203. (In Russian)

Leng H., Wang Y., Zhao W. et al. 2023. Identification of a deep-branching thermophilic clade sheds light on early bacterial evolution. *Nature Communications* 14(1) DOI: [10.1038/s41467-023-39960-x](https://doi.org/10.1038/s41467-023-39960-x)

Liang B., Wang L.-Y., Mbadinga S.M. et al. 2015. *Anaerolineaceae* and *Methanosaeta* turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *AMB Express* 5(1). DOI: [10.1186/s13568-015-0117-4](https://doi.org/10.1186/s13568-015-0117-4)

Likhoshvay A., Lomakina A., Grachev M. 2014. The complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* from Lake Baikal. *SpringerPlus* 3(1). DOI: [10.1186/2193-1801-3-621](https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-621)

Liu Y.-F., Qi Z.-Z., Shou L.-B. et al. 2019. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum ‘Atribacteria’ (JS1) inferred from genomics. *The ISME Journal* 13(9): 2377–2390. DOI: [10.1038/s41396-019-0448-2](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0448-2)

Liu X., Wang Y., Gu J.-D. 2021. Ecological distribution and potential roles of *Woesearchaeota* in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19: 794–800. DOI: [10.1016/j.csbj.2021.01.013](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.013)

Löffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M. et al. 2015. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halo-



gen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(Pt\_6): 2015–2015. DOI: [10.1099/ij.s.0.000308](https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000308)

Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V. et al. 2014. Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal. *Microbiology* 83(3): 278–287. DOI: [10.1134/S0026261714030126](https://doi.org/10.1134/S0026261714030126) (In Russian)

Mara P., Geller-McGrath D., Edgcomb V. et al. 2023. Metagenomic profiles of archaea and bacteria within thermal and geochemical gradients of the Guaymas Basin deep subsurface. *Nature Communication* 14: 7768. DOI: [10.1038/s41467-023-43296-x](https://doi.org/10.1038/s41467-023-43296-x)

Morgunova I., Semenov P., Kursheva A. et al. 2022. Molecular indicators of sources and biodegradation of organic matter in sediments of fluid discharge zones of Lake Baikal. *Geosciences* 12(2): 72. DOI: [10.3390/geosciences12020072](https://doi.org/10.3390/geosciences12020072)

Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y. et al. 2009. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(11): 2894–2898. DOI: [10.1099/ij.s.0.010033-0](https://doi.org/10.1099/ij.s.0.010033-0)

Nobu M.K., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K. et al. 2016. Phylogeny and physiology of candidate phylum “Atribacteria” (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *The ISME Journal* 10(2): 273–286. DOI: [10.1038/ismej.2015.97](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.97)

Pascoal F., Costa R., Magalhães C. 2021. The microbial rare biosphere: current concepts, methods and ecological principles. *FEMS Microbiology Ecology* 97(1). DOI: [10.1093/femsec/fiaa227](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa227)

Pavlova O.N., Zemskaya T.I., Gorshkov A.G. et al. 2008. Comparative characterization of microbial communities in two regions of natural oil seepage in Lake Baikal. *Biology Bulletin* 35: 287–293. DOI: [10.1134/S1062359008030096](https://doi.org/10.1134/S1062359008030096) (In Russian)

Pavlova O.N., Lomakina A.V., Likhoshvay A. et al. 2010. Microbial communities in areas of natural oil seeps on Lake Baikal. *Advances in Life Sciences* 2: 169–172. (In Russian)

Pavlova O.N., Lomakina A.V., Gorshkov A.G. et al. 2012. Microbial communities and their ability to oxidize n-alkanes in the area of release of gas- and oil-containing fluids in Mid-Baikal (Cape Gorevoi Utes). *Biology Bulletin* 39: 458–463. DOI: [10.1134/S1062359012050123](https://doi.org/10.1134/S1062359012050123) (In Russian)

Pavlova O.N., Izosimova O.N., Gorshkov A.G. et al. 2020. Current state of deep oil seepage near Cape Gorevoi Utes (Central Baikal). *Russian Geology and Geophysics* 61(9): 1007–1014. DOI: [10.15372/rgg2019180](https://doi.org/10.15372/rgg2019180)

Pavlova O.N., Izosimova O.N., Chernitsyna S.M. et al. 2022. Anaerobic oxidation of petroleum hydrocarbons in enrichment cultures from sediments of the Gorevoy Utes natural oil seep under methanogenic and sulfate-reducing conditions. *Microbial Ecology* 83: 899–915. DOI: [10.1007/s00248-021-01802-y](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01802-y)

Pavlova O.N., Bukin S.V., Izosimova O.N. et al. 2024. Anaerobic oxidation of oil by microbial communities of bottom sediments of a natural oil seepage site (Bolshaya Zelenovskaya, Middle Baikal). *Microbiology* 93(5): 563–575.

Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M. et al. 2017. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments. *Journal of Great Lakes Research*. 43: 1030–1043. DOI: [10.1016/j.jglr.2017.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.09.003)

Qin W., Martens-Habbena W., Kobelt J.N. et al. 2016. *Candidatus Nitrosopumilaceae*. In: Trujillo M.E., Dedysch S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. (Eds.). *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: [10.1002/9781118960608.fbm00262](https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00262)

Simoneit B.R.T., Aboul-Kassim T.A.T., Tiercelin J.J. 2000. Hydrothermal petroleum from lacustrine sedimentary organic matter in the East African Rift. *Applied Geochemistry* 15(3): 355–368. DOI: [10.1016/s0883-2927\(99\)00044-x](https://doi.org/10.1016/s0883-2927(99)00044-x)

Takai K., Moser D.P., DeFlaun M. et al. 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African Gold Mines. *Applied and Environmental Microbiology* 67(12): 5750–5760. DOI: [10.1128/aem.67.21.5750-5760.2001](https://doi.org/10.1128/aem.67.21.5750-5760.2001)

Uzun M., Koziyeva V., Dziuba M. et al. 2023. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil. *The ISME Journal* 17(2): 204–214. DOI: [10.1038/s41396-022-01339-z](https://doi.org/10.1038/s41396-022-01339-z)

Wang Y., Wegener G., Hou J. et al. 2019. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of Archaea. *Nature Microbiology* 4(4): 595–602. DOI: [10.1038/s41564-019-0364-2](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0364-2)

Weiss R.F., Carmack E.C., Koropalov V.M. 1991. Deep-water renewal and biological production in Lake Baikal *Nature* 349(6311): 665–669. DOI: [10.1038/349665a0](https://doi.org/10.1038/349665a0)

Zárate-del Valle P.F., Rushdi A.I., Simoneit B.R.T. 2006. Hydrothermal petroleum of Lake Chapala, Citala Rift, western Mexico: Bitumen compositions from source sediments and application of hydrous pyrolysis. *Applied Geochemistry* 21(4): 701–712. DOI: [10.1016/j.apgeochem.2006.01.002](https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.01.002)

Zemskaya T., Lomakina A., Mamaeva E. et al. 2015. Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge. *Aquatic Microbial Ecology* 76(2): 95–109. DOI: [10.3354/ame01773](https://doi.org/10.3354/ame01773)

Zhang K., Hu Z., Zeng F.F. et al. 2019. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and changes in microbial community structure in sediment under nitrate-, ferric-, sulfate-reducing and methanogenic conditions. *Journal of Environmental Management* 249: 109425. DOI: [10.1016/j.jenvman.2019.109425](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109425)

Zhang C., Meckenstock R.U., Weng S. et al. 2021. Marine sediments harbor diverse archaea and bacteria with potentials for anaerobic hydrocarbon degradation via fumarate addition. *FEMS Microbiology Ecology* 97(5) DOI: [10.1093/femsec/fiab045](https://doi.org/10.1093/femsec/fiab045)

Zhou Z., Pan J., Wang F. et al. 2018. *Bathyarchaeota*: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments. *FEMS Microbiology Reviews* 42(5): 639–655. DOI: [10.1093/femsre/fuy023](https://doi.org/10.1093/femsre/fuy023)

# Сравнительная характеристика процессов анаэробного окисления нефти микробными сообществами донных осадков районов естественных нефтепроявлений оз. Байкал (Горевой Утес, Большая Зеленовская)

Оригинальная статья  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Павлова О.Н.\*, Изосимова О.Н., Черницына С.М., Букин С.В.,  
Иванов В.Г., Хабуев А.В., Погодаева Т.В., Смирнова Д.К.,  
Горшков А.Г., Земская Т.И.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Приведена сравнительная характеристика процессов биodeградации нефти в анаэробных условиях при культивировании микробных сообществ донных осадков двух районов нефтепроявлений. Микробное сообщество донных осадков из района нефтепроявления Большая Зеленовская, функционирующее в условиях длительного воздействия углеводородов, более ориентировано на процессы анаэробного окисления нефти в сравнении с микробными сообществами из осадков нефтепроявления, расположенного у м. Горевой Утес. Об этом свидетельствует высокая степень биodeградации углеводородов, как в поверхностных, так и глубинных осадках, в независимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. Дeградация нефти в накопительных культурах сопровождалась образованием углеводородных газов (метана и этана). Максимальная концентрация образовавшегося метана выявлена в эксперименте с осадками из Горевоего Утеса. Генерация этана, напротив, была более характерна при культивировании сообществ из отложений Большой Зеленовской. Микробные сообщества, функционирующие в анаэробных условиях в донных осадках в районах нефтепроявлений, являются не менее важным звеном в процессах самоочищения озера от нефтяного «загрязнения», чем аэробные микробные сообщества водной толщи и поверхностных отложений.

**Ключевые слова:** анаэробное окисление нефти, оз. Байкал, донные осадки, микробное сообщество

Для цитирования: Павлова О.Н., Изосимова О.Н., Черницына С.М., Букин С.В., Иванов В.Г., Хабуев А.В., Погодаева Т.В., Смирнова Д.К., Горшков А.Г., Земская Т.И. Сравнительная характеристика процессов анаэробного окисления нефти микробными сообществами донных осадков районов естественных нефтепроявлений оз. Байкал (Горевой Утес, Большая Зеленовская) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1035-1049. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1035

## 1. Введение

Озеро Байкал, расположенное в южной части Восточной Сибири, является крупнейшим естественным резервуаром пресной воды и имеет тектоническое происхождение. Оно известно как одно из трех пресноводных озер в мире, наряду с рифтовым глубоководным озером Танганьика и мелководным озером Чапала, которые также характеризуются естественными выходами нефти (Simoneit et al., 2000; Zárate-del Valle et al., 2006). В настоящее время в оз. Байкал установлены два района естественных нефтепроявлений: один из них находится у устья р.

Большая Зеленовская (БЗ) и известен с XVIII века, второй расположен у м. Горевой Утес (ГУ) (открыт в 2005 г.) (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007) (Рис. 1).

Несмотря на постоянную эмиссию нефти (до 4 т/год), низкие температуры, а также длительный период полного замещения вод Байкала притоками (около 400 лет) (Weiss et al., 1991), выходы нефти локализованы на ограниченных участках. Площадь водной поверхности озера, на которой проявляются нефтяные пятна у м. Горевой Утес не изменилась за период с 2005 г. по настоящее время и составляет около 1 км<sup>2</sup>. Постоянство площади нефтя-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [pavlova@lin.irk.ru](mailto:pavlova@lin.irk.ru) (О.Н. Павлова)

Поступила: 08 июля 2024; Принята: 29 июля 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



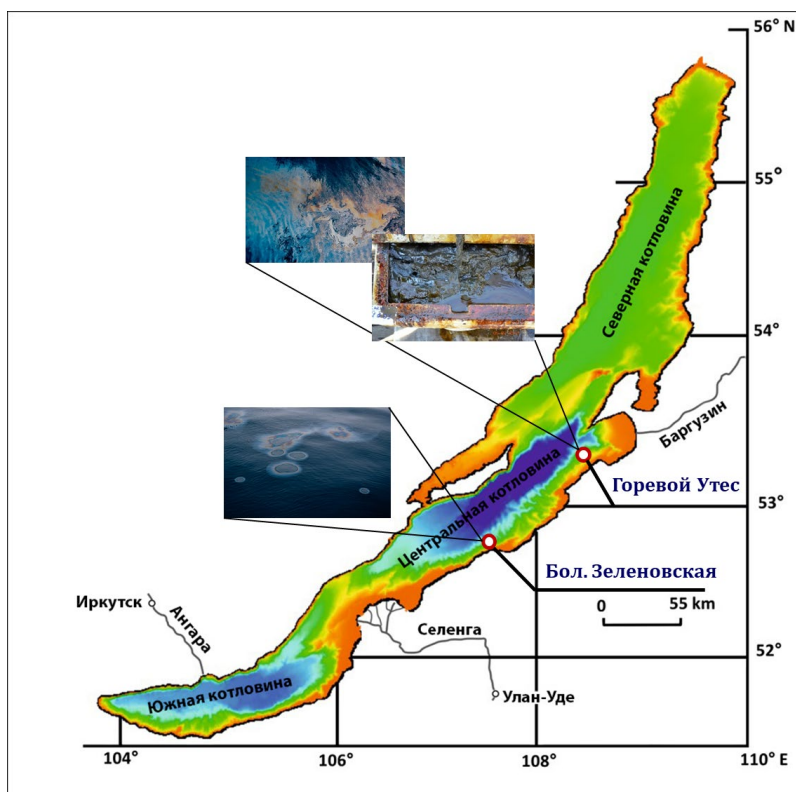


Рис.1. Карта-схема расположения районов нефтепроявления в оз. Байкал

ного «загрязнения» свидетельствует о механизмах самоочищения экосистемы озера, основной вклад в которые вносят аэробные углеводородокисляющие микроорганизмы (Павлова и др., 2008; Павлова и др., 2012; Павлова и др., 2020; Gorshkov et al., 2020). Очевидно, что в водной толще, насыщенной кислородом, и в поверхностных донных осадках с высоким содержанием  $O_2$  доминируют аэробные процессы окисления углеводородов нефти.

С другой стороны, при длительном нахождении нефти в донных осадках, в них могут происходить анаэробные процессы биodeградации углеводородов, которые обуславливают появление уже глубоко биodeградированной нефти на водной поверхности (как это наблюдается в районе Большой Зеленевской). Эти процессы могут иметь общность или различия в двух районах нефтепроявлений в оз. Байкал, так как районы различаются временем функционирования, термобарическими условиями, геологическим строением и составом нефти на современном этапе (Хлыстов и др., 2022).

## 2. Материалы и методы

Для исследования отобраны два керна донных осадков: из зоны разгрузки углеводородов у м. Горевой Утес (10 км от берега, глубина водной толщи 890 м) – St. 5, GC. 3 и у устья р. Большая Зеленевская (1.4 км от берега, глубина водной толщи 320 м) – St. 4, GC. 6. Из каждого керна отобраны по два образца (Таблица). В отсутствие кислорода нефтяные углеводороды могут окисляться микроорганизмами при использовании в качестве акцепторов электронов, и  $Fe^{3+}$  (Zhang et al., 2019).

Для получения накопительных культур, образцы донных осадков асептически отбирали из центральной части керна и сразу помещали во флаконы объемом 116 мл, содержащие 50 мл стерильной анаэробной минеральной среды, нефть и различные акцепторы электронов. Конверсию нефти оценивали по убыли *n*-алканов и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) по истечении одного года культивирования в сравнении с контрольными пробами, не содержащих донные осадки (Pavlova et al., 2022; Pavlova et al., 2024).

## 3. Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что конверсия *n*-алканов и ПАУ проходила эффективнее в эксперименте с осадками, отобранными в районе нефтепроявления БЗ, чем в нефте-метановом сипе ГУ. В эксперименте с осадками ГУ, убыль *n*-алканов либо была незначительной, либо их концентрация снижалась в 1.2 раза, концентрация полициклических углеводородов – в 1.1–1.4 раза (Pavlova et al., 2022). В то время как в эксперименте с осадками БЗ, концентрация *n*-алканов снизилась в 1.2–2 раза, ПАУ в 2.2–2.8 раз (Pavlova et al., 2024).

Присутствие различных акцепторов электронов оказывало влияние на процессы деградации *n*-алканов, происходящие только в накопительных культурах, содержащих поверхностные осадки, и менее значимо для процессов, происходящих в культурах, содержащие глубинные осадки. В поверхностных осадках происходит деградация как *n*-алканов, так и ПАУ, в глубинных – биodeградации

**Таблица.** Условные обозначения полученных накопительных культур и условия культивирования

Район отбора проб	Глубина отбора проб донных осадков, см / условное обозначение	Акцептор электронов				Ссылка
		H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub>			Fe <sup>3+</sup>	
Горевой Утес (ГУ)	St. 5, GC. 3, 10–30 / (GUI)	GUI_HCO <sub>3</sub>	GUI_HCO <sub>3</sub>			Pavlova et al., 2022
	St. 5, GC. 3, 100–120 / (GUII)	GUI_SO <sub>4</sub>	GUII_SO <sub>4</sub>			
Большая Зеленовская (БЗ)	St. 4, GC. 6, 30–50 см / K1_БЗ	K1_HCO <sub>3</sub>	K1_SO <sub>4</sub>	K1_NO <sub>3</sub>	K1_Fe	Pavlova et al., 2024
	St. 4, GC. 6, 250–270 см / K2_БЗ	K2_HCO <sub>3</sub>	K2_SO <sub>4</sub>	K2_NO <sub>3</sub>	K2_Fe	

подвергались, в основном, полициклические ароматические углеводороды. Добавление акцепторов электронов практически не влияло на убыль ПАУ в эксперименте как с осадками ГУ, так и осадками БЗ.

Результаты экспериментов коррелируют с геохимическими данными по составу органического вещества и отдельных биомаркерных соединений в осадках двух районов нефтепроявлений. Осадки ГУ обогащены органическим веществом, которое биодеградировано в разной степени в зависимости от глубины залегания в сравнении с БЗ. Групповой состав битумоидов, повышенный индекс продуктивности свидетельствуют о том, что нефтенасыщение осадков ГУ происходит постоянно. При этом, присутствие нефтеносного горба, высокий уровень зрелости *n*-алканов (CPI ≤ 2), снижение концентрации ПАУ, снижение *n*-C<sub>35</sub>–*n*-C<sub>39</sub> с глубиной в образцах ГУ указывают на происходящие процессы биодеградации (Morgunova et al., 2022). В осадках БЗ концентрация органического вещества значительно ниже, отсутствуют *n*-алканы и изопреноиды, в составе битумоидов доминируют асфальтово-смолистые компоненты (до 94 %) (Хлыстов и др., 2022; Костырева и др., 2022; Morgunova et al., 2022).

На состав нефти также влияют геологические процессы в двух районах выходов нефти. В результате фракционирования нефти в верхних слоях донных отложений и образования битумных построек на дне озера в районе ГУ, в воды озера поступает фракция, обогащенная *n*-алканами (Хлыстов и др., 2009; Gorshkov et al., 2020), которая весьма эффективно окисляется микроорганизмами в аэробных условиях в водной толще. Частичная потеря низкомолекулярных алканов в результате фракционирования нефти и сохранение высокомолекулярных, а также высокие значения концентрации полициклических углеводородов (терпаны, ПАУ) способствуют развитию микробного сообщества, нацеленного на биодеградацию ароматических соединений в анаэробных условиях, о чем свидетельствует значительное снижение их концентрации в составе нефти в течение 18 лет с момента открытия нефтепроявления (Gorshkov et al., 2020).

В более длительно существующем районе БЗ, нефть имеет продолжительный путь прохождения от источника ее генерации и длительно накапливается в донных отложениях, где и происходит активная анаэробная биодеградация как *n*-алканов, так и ПАУ. О длительном пути, пройденном нефтью от источника, так и о ее длительном накоплении

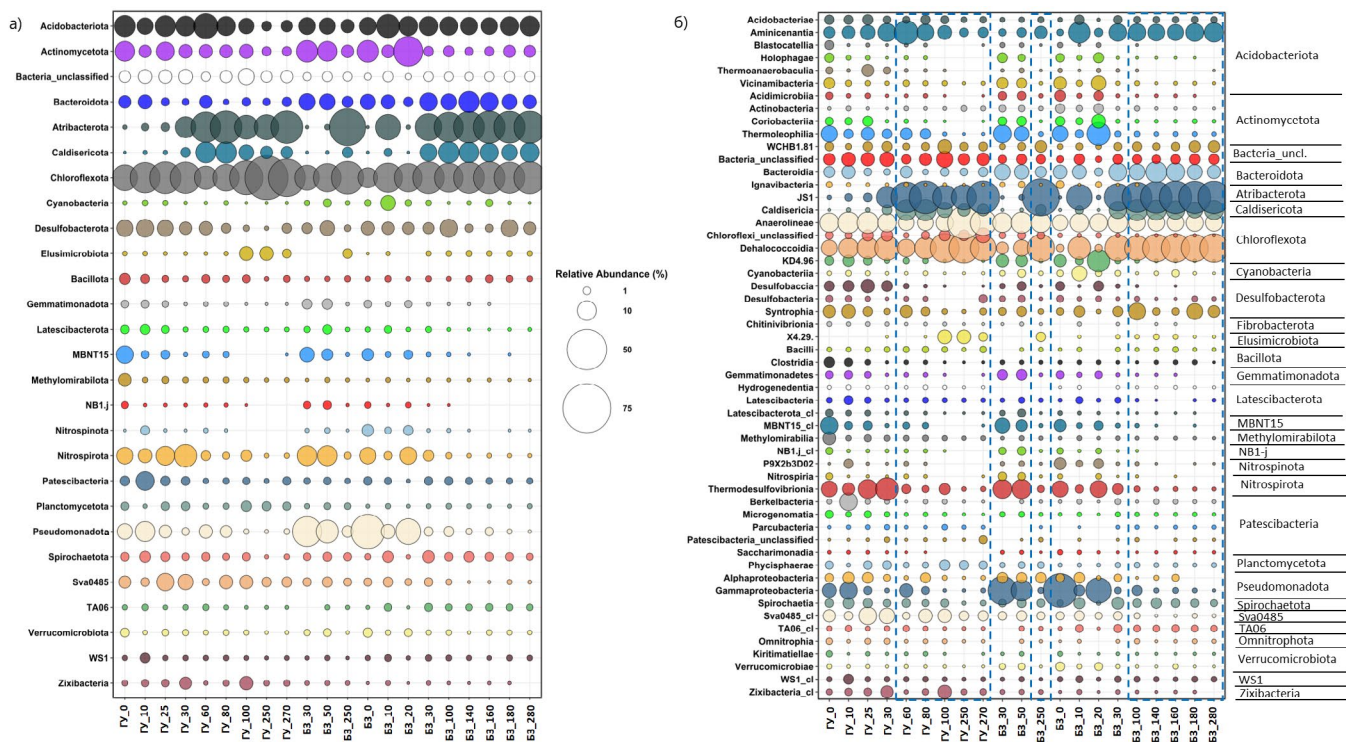
в слоях осадков свидетельствует содержание перилена в битуме (стабильного конечного продукта превращений органического вещества в донных отложениях) – на два порядка величины выше, чем в нефти, взятой в районе нефтепроявления ГУ (Хлыстов и др., 2022).

Деградация нефти сопровождалась образованием углеводородных газов (метана и этана). В эксперименте с осадками БЗ и ГУ максимальная концентрация образовавшегося метана составила 2.4 ммоль/л (54 мл/л) и 32.54 ммоль/л (728 мл/л), соответственно. Диапазон концентрации метана в донных осадках оз. Байкал составляет от нескольких мкл/л до 20 мл/л (Земская и др., 2008; Pogodaeva et al., 2017). Таким образом, значения концентрации образуемого метана при биодеградации нефти в условиях эксперимента, являются весьма значимыми, особенно в случае с образцами из нефтепроявления ГУ. Генерация этана, напротив, была более характерна при культивировании сообществ из отложений БЗ, где концентрация C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> после года культивирования увеличилась в 2.3–7 раз в сравнении с началом эксперимента.

Анализ структуры микробных сообществ в поверхностных и глубинных донных осадках из районов нефтепроявлений ГУ и БЗ выявил доминирование представителей девяти филумов домена *Bacteria*: *Chloroflexota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Nitrospirota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota* и *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Caldisericota* и пяти домена *Archaea*: *Thermoproteota*, *Halobacterota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Nadarchaeota*. Состав микробных сообществ, в основном, является схожим на уровне филумов, в сравнении с осадками из метановых сипов, грязевых вулканов, и значительно различался на уровне семейств (Zemskaya et al., 2024, в печати).

Доминирующий филум *Chloroflexota* был представлен семействами *Anaerolineaceae* и неклассифицируемыми *Dehalococcoidia*, доля семейств внутри филума меняется с глубиной (Рис. 2). Микроорганизмы, отнесенные к этим семействам, обнаружены в широком диапазоне анаэробных сред обитания, включая донные отложения, горячие источники, анаэробные реакторы, экотопы, загрязненные углеводородами, где они способны осуществлять синтрофное окисление углеводородов (*Anaerolineaceae*) с образованием метана при участии метаногенных архей или восстановительное дехлорирование хлорированных углеводородов





**Рис.2.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК Bacteria, представленных на уровне филумов (а) и семейств (б) в библиотеках из донных осадков районов нефтепроявлений ГУ и БЗ. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек

и галогенорганическое дыхание (*Dehalococcoidia*) (Liang et al., 2015; Löffler et al., 2015).

Филум *Actinomycetota*, в основном, представлен ОТЕ, принадлежащим семействам ОРВ<sub>41</sub> (*Coriobacteriia*) и хеморганогетеротрофным *Gaiellaceae* и WCHNB1-81 (*Thermoleophilia*). Большинство фило типов, связанных с ОРВ<sub>41</sub>, были обнаружены в нефтеносных, осадочных и подповерхностных средах. Анализ метаболизма культивируемых представителей ОРВ<sub>41</sub> показал, что микроорганизмы являются анаэробными литотрофами, использующими тиосульфат, элементарную серу, либо Fe(III) в качестве акцептора электронов (Khomyakova et al., 2022). Филум *Acidobacteriota* состоял, в основном из представителей семейств *Aminicenantales* и *Vicinatibacteraceae* – хемоорганогетеротрофов, ферментирующих углеводы и белковые субстраты в анаэробных и аэробных условиях, соответственно (Kadnikov et al., 2019; Dedysh and Yilmaz, 2018). Показано, что *Aminicenantales* наиболее часто выявляются в средах, подверженных воздействию углеводов, за ними следуют морские среды обитания (особенно гидротермальные источники) и пресноводные (Farag et al., 2014). Филум *Bacteroidota* представлен семейством *Bacteroidetes\_vadinHA17*, протеолитическими бактериями, ферментирующими углеводы с образованием летучих жирных кислот (Kampmann et al., 2012). ОТЕ, отнесенные к филуму *Desulfobacterota* принадлежали анаэробным бактериям, окисляющим короткоцепочечные жирные кислоты (*Syntrophaceae*, *Smithellaceae*), либо ацетат (*Desulfobaccaceae*) в синтрофном взаимодействии с метаногенными археями (Galushko and Kuever, 2019).

Представители филумов *Nitrospirota*, *Pseudomonadota*, *Patescibacteria*, MBNT15 и *Verrucomicrobiota* выявлены, в основном, в поверхностных осадках и характеризуются как хемоорганогетеротрофы, окисляющие пептиды, аминокислоты, жирные кислоты и простые сахара посредством аэробного и анаэробного дыхания.

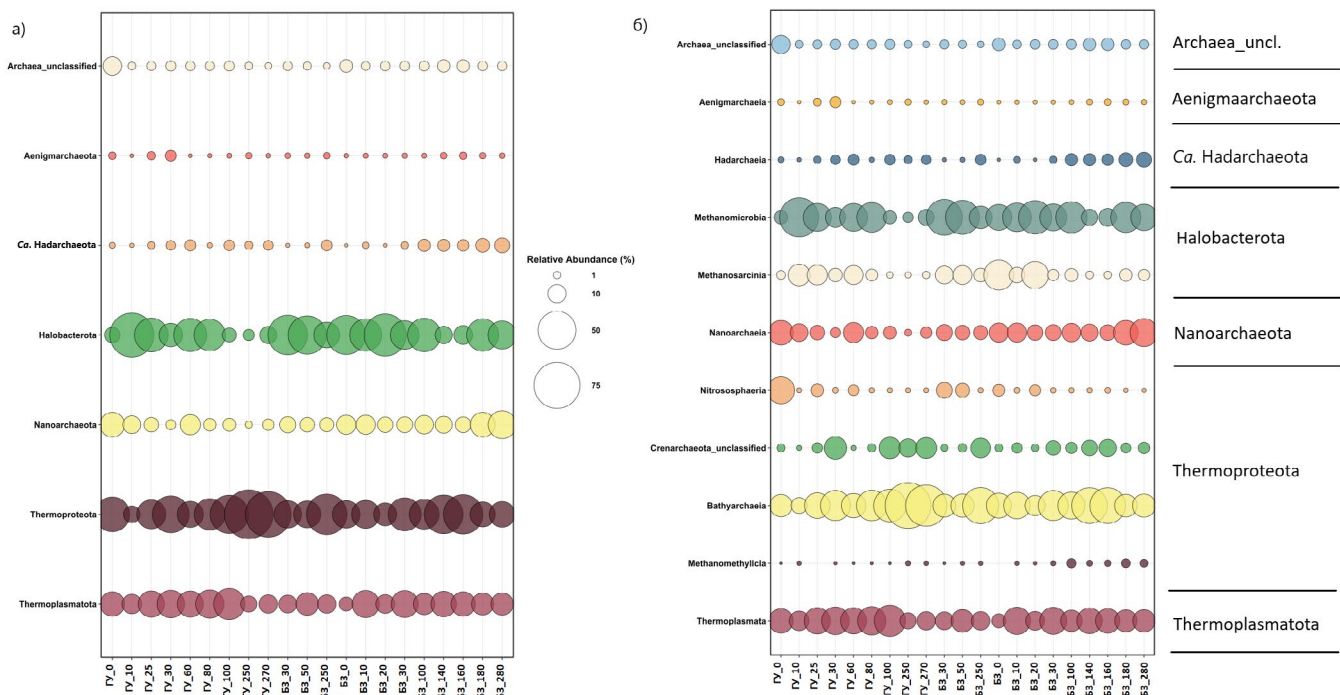
В то время как *Atribacterota* и *Caldisericota* – в глубинных. Представители *Atribacterota* наиболее часто встречаются в геотермальных системах, нефтяных резервуарах, анаэробных морских отложениях и метановых сипах (Mori et al., 2009; Carr et al., 2015; Nobu et al., 2016). В настоящее время, на основе метаболической реконструкции геномов *Atribacterota* показано, что бактерии могут осуществлять не только ферментацию углеводов с образованием водорода, ацетата и этанола в результате гликолиза, но и ферментировать короткоцепочечные n-алканы в жирные кислоты, которые затем потребляются вторичными деструкторами. Окисление n-алканов происходит при помощи полного набора генов, опосредующих присоединение фумарата к углеводородам (FAE, fumarate-adding enzymes) (Liu et al., 2019). Термофильные облигатные анаэробные гетеротрофы, восстанавливающие соединения серы и отнесенные к филуму *Caldisericota* также входили в число доминирующих таксонов в глубинных осадках. В настоящее время, последовательности, принадлежащие этому филуму, выявляются в гидротермальных системах, водоносных горизонтах, загрязненных углеводородами, содовых озерах, биореакторах и т.д. (Mori et al., 2009). Филогенетический анализ, основанный на сравнении конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 консерватив-

ных белков, показал что филум *Caldisericota* наряду с *Coprothermobacterota*, *Dictyoglomota*, *Thermotogota*, and *Thermodesulfobiota* образуют древнюю кладу, предком которой могла быть термофильная, строго анаэробная, подвижная, водородзависимая, миксотрофная бактерия по метаболизму схожая с последним универсальным общим предком (last universal common ancestor, LUCA) (Leng et al., 2023). Также в глубинных осадках, в значимых количествах (до 4.7%) обнаружены последовательности представителей филумов *Zixibacteria* и *Elusimicrobiota*, которые обычно составляют менее 1% в микробных сообществах и являются представителями «редкой биосферы» или «микробной темной материи» (Pascoal et al., 2021). Основываясь на реконструкции геномов этих бактерий показано, что они обладают ферментативным метаболизмом, магнитотаксисом и участвуют в круговороте железа и серы (Castelle et al., 2013; Uzun et al., 2023).

Домен *Archaea* в донных осадках из районов нефтепроявления был представлен теми же доминирующими таксонами на уровне филума, что и в донных осадках грязевых вулканов, варьировало лишь процентное содержание микроорганизмов различных систематических групп (Zemskaya et al., 2024). Такая закономерность была установлена и ранее, при изучении микробного разнообразия в донных осадках оз. Байкал, ассоциированных с разгрузкой нефти и газа (Zemskaya et al., 2015). Филум *Thermoproteota* был самым многочисленным в донных осадках из районов нефтепроявлений (Рис. 3). Доминирующие ОТЕ, относились к *Bathyarchaeia* (до 60% от всех последовательностей) и неклассифицируемым *Crenarchaeota*. В настоящее время на основе метаболической реконструкции геномов *Bathyarchaeia* показано, что микроорганизмы

могут осуществлять не только ферментацию углеводов, но и окислять короткоцепочечные н-алканы и ароматические соединения до жирных кислот, которые затем потребляются вторичными деструкторами (Zhou et al., 2018; Dong et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021). Филум *Halobacterota* представлен семействами гидрогенотрофных архей (*Methanomicrobiaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanoperedenaceae* и *Methanosacetaceae*). В поверхностных и подповерхностных осадках выявлены аэробные археи семейства *Nitrosopumilaceae*, осуществляющие хемолитоавтотрофный рост за счет окисления аммиака и фиксации CO<sub>2</sub> (Qin et al., 2016). Филум *Nanoarchaeota* состоял, в основном, из ОТЕ, отнесенных к семействам GW2011\_GWC1\_47\_15 и *Woesearchaeales\_fa* – археями, выявленными в самых различных средах обитания, среди которых нефтяные резервуары и серные источники. Они являются частью консорциума с бактериями, где бактерии участвуют в круговороте углерода, а археи – в фиксации азота, денитрификации и восстановлении сульфата в анаэробных условиях (Liu et al., 2021; Köhler et al., 2023). Миксотрофные *Thermoplasmata* были представлены *Marine\_Benthic\_Group\_D\_and\_DHVEG-1\_fa*, а также неидентифицированными *Thermoplasmata*.

Только в образцах их глубинных осадков выявлены последовательности, отнесенные к термофильным *Ca. Hadarchaeota*. Археи впервые были обнаружены на золотом руднике в Южной Африке на глубине около 3 км, а также в донных осадках метановых холодных сипов, содержащие газовые гидраты (Takai et al., 2001; Mara et al., 2023). Согласно данным реконструкций генома *Ca. Hadarchaeota* обладает генами, связанными с путем фиксации углерода через путь Вуда-Льюнгаля,



**Рис.3.** Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК Archaea, представленных на уровне филумов (а) и классов (б) в библиотеках из донных осадков районов нефтепроявлений ГУ и БЗ. Перечислены таксоны, составляющие > 1% хотя бы в одной из библиотек

метаногенезом и метаболизмом алканов (Hua et al., 2019; Baker et al., 2016; Wang et al., 2019).

Таким образом, проведенные метабаркодинговые исследования донных осадков из районов нефтепроявлений (БЗ и ГУ), выявили сложный состав микробных сообществ, состоящих из бактерий и архей, специализирующихся на процессах разложения широкого спектра субстратов (органического углерода и нефтяных углеводородов), а также наличие у микроорганизмов генов, кодирующих синтез ферментов аэробной деградации углеводородов и биосурфактантов (Павлова и др., 2010; Ломакина и др., 2014; Likhoshvay et al., 2014). Микробное сообщество донных осадков ГУ в большей части представлено последовательностями микроорганизмов, выявляемых в термальных источниках Йеллоустонского парка, осадках грязевых вулканов и загрязненных углеводородами сред, географически весьма отдаленных от оз. Байкал, а также последовательностями представителей «редкой биосферы» – *Elusimicrobiota*, *Zixibacteria* и *Ca. Nadarchaeota*. В глубинных осадках БЗ представители этих таксонов также присутствуют, но в меньшей доле. Основное различие в таксономическом составе микробных сообществ наблюдалось между подповерхностными и глубинными осадками (Pavlova et al., 2022; Pavlova et al., 2024).

#### 4. Выводы

Микробное сообщество донных осадков из района нефтепроявления Большая Зеленая, функционирующее в условиях более длительного воздействия углеводородов, более ориентировано на процессы анаэробного окисления нефти в сравнении с микробными сообществами из донных осадков нефтепроявления, расположенного у м. Горевой Утес. О чем свидетельствует высокая степень биодеградации ПАУ, как в поверхностных, так и глубинных осадках, в независимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. А также *n*-алканов, процент деградации которых был более значим в накопительных культурах с осадками БЗ, чем ГУ.

Микробные сообщества, функционирующие в анаэробных условиях в донных осадках в районах нефтепроявлений, являются не менее важным звеном в процессах самоочищения озера от нефтяного «загрязнения». Об этом свидетельствует высокая углеводородоокисляющая способность микроорганизмов, осуществляющих анаэробную биодеградацию компонентов нефти (до 65%) в низкотемпературных условиях оз. Байкал. Как и в других нефтяных резервуарах, конверсия углеводородов сопровождается образованием углеводородных газов (метан и этан). Ключевыми участниками анаэробной деградации углеводородов нефти в донных осадках оз. Байкал могут быть синтрофно окисляющие углеводороды нефти бактерии (*Bacillota*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexota*, *Actinomyceota*, *Desulfobacterota*) и архей (*Halobacteriota*, *Bathyarchaeia*).

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках темы гос. задания № 0279-2021-0006 (121032300223-1). Исследования убыли *n*-алканов и ПАУ в экспериментальных условиях проведены на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ»). Секвенирование библиотек ампликонов выполнено в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Все ресурсоемкие операции выполнены с использованием высокопроизводительного кластера «Академик В.М. Матросов» центра коллективного пользования «Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН».

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Земская Т.И., Хлыстов О.М., Егоров А.В. и др. 2008. Комплексные исследования проявлений газовых гидратов в осадках озера Байкал. В: Заварзин Г.А., Кудеяров В.Н. (Ред.). Изменение окружающей среды и климата. Процессы в биосфере: изменения почвенно-растительного покрова и территориальных вод РФ, круговорот веществ под влиянием глобальных изменений климата и катастрофических процессов (с. 125–152). Москва: ИФХ и БПП РАН.
- Конторович А.Э., Каширцев В.А., Москвин В.И. и др. 2007. Нефтегазоносность отложений оз. Байкал. Геология и геофизика 48 (12): 1346–1356.
- Костырева Е.А., Каширцев В.А., Павлова О.Н. и др. 2022. Геохимия битумоидов донных осадков в районе Среднего Байкала. Сборник материалов Международной научной конференции Интерэкспо ГЕО-Сибирь 2(1): 200–203.
- Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Морозов И.В. и др. 2014. Микробные сообщества зоны разгрузки газонетесодержащих флюидов ультрапресного озера Байкал. Микробиология 83(3): 355–365.
- Павлова О.Н., Земская Т.И., Горшков А.Г. и др. 2008. Сравнительная характеристика микробных сообществ двух районов естественных нефтепроявлений озера Байкал. Известия Российской академии наук. Серия биологическая 3: 333–340.
- Павлова О.Н., Ломакина А.В., Лихошвай А.В. и др. 2010. Микробные сообщества в районах естественных выходов нефти на озере Байкал. Успехи наук о жизни 2: 169–172.
- Павлова О.Н., Ломакина А.В., Горшков А.Г. и др. 2012. Микробные сообщества и их способность окислять *n*-алканы в районе разгрузки газо-нефесодержащих флюидов в Среднем Байкале (мыс Горевой утес). Известия Российской академии наук. Серия биологическая 5: 540–545.
- Павлова О.Н., Изосимова О.Н., Горшков А.Г. и др. 2020. Современное состояние глубоководного выхода нефти у мыса Горевой утес (Средний Байкал). Геология и геофизика 61(9): 1231–1240.
- Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В. и др. 2007. Нефть в озере мирового наследия. Доклады академии наук 414: 656–659.



- Хлыстов О.М., Земская Т.И., Ситникова Т.Я. и др. 2009. Донные битумные постройки и населяющая их биота по данным обследования озера Байкал. Доклады академии наук 428: 682–685.
- Хлыстов О.М., Изосимова О.Н., Хатикубо А. и др. 2022. Новый нефтегазовый сип озера Байкал. Нефтехимия 62: 328–335.
- Baker B.J., Saw J.H., Lind A.E. et al. 2016. Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface *Archaea*, *Hadesarchaea*. *Nature Microbiology* 1: 16002. DOI: [10.1038/nmicrobiol.2016.2](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.2)
- Carr S.A., Orcutt B.N., Mandernack K.W. et al. 2015. Abundant *Atribacteria* in deep marine sediment from the Adélie Basin, Antarctica. *Frontiers in microbiology* 6: 872. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00872](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00872)
- Castelle C.J., Hug L.A., Wrighton K.C. et al. 2013. Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nature Communications* 4:1 DOI: [10.1038/ncomms3120](https://doi.org/10.1038/ncomms3120)
- Dedysh S.N., Yilmaz P. 2018. Refining the taxonomic structure of the phylum *Acidobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68(12): 3796–3806. DOI: [10.1099/ijsem.0.003062](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003062)
- Dong X., Greening C., Rattray J.E. et al. 2019. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments. *Nature Communications* 10(1): 1816. DOI: [10.1038/s41467-019-09747-0](https://doi.org/10.1038/s41467-019-09747-0)
- Farag I.F., Davis J.P., Youssef N.H. et al. 2014. Global patterns of abundance, diversity and community structure of the *Aminicenantes* (Candidate Phylum OP8). *PLoS ONE* 9(3): e92139. DOI: [10.1371/journal.pone.0092139](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092139)
- Galushko A., Kuever J. 2019. *Desulfobacca*. In: Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: [10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2)
- Gorshkov A., Pavlova O., Khlystov O. et al. 2020. Fractioning of petroleum hydrocarbons from seeped oil as a factor of purity preservation of water in Lake Baikal (Russia). *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 115–122. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.10.010](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.10.010)
- Hua Z.-S., Wang Y.-L., Evans P.N. et al. 2019. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring *Archaea*. *Nature Communications* 10(1). DOI: [10.1038/s41467-019-12574-y](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12574-y)
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V. et al. 2019. Genome of the candidate phylum *Aminicenantes* bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. *Extremophiles* 23(2): 189–200. DOI: [10.1007/s00792-018-01073-5](https://doi.org/10.1007/s00792-018-01073-5)
- Kampmann K., Ratering S., Kramer I. et al. 2012. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 78(7): 2106–2119. DOI: [10.1128/aem.06394-11](https://doi.org/10.1128/aem.06394-11)
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y. et al. 2022. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales*. *Frontiers in Microbiology* 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1047580](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1047580)
- Köhler J.M., Ehrhardt L., Günther P.M. 2023. Archaeal and extremophilic bacteria from different archaeological excavation sites. *International Journal of Molecular Sciences* 24(6): 5519. DOI: [10.3390/ijms24065519](https://doi.org/10.3390/ijms24065519)
- Leng H., Wang Y., Zhao W. et al. 2023. Identification of a deep-branching thermophilic clade sheds light on early bacterial evolution. *Nature Communications* 14(1). DOI: [10.1038/s41467-023-39960-x](https://doi.org/10.1038/s41467-023-39960-x)
- Liang B., Wang L.-Y., Mbadinga S.M. et al. 2015. *Anaerolineaceae* and *Methanosaeta* turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *AMB Express* 5(1). DOI: [10.1186/s13568-015-0117-4](https://doi.org/10.1186/s13568-015-0117-4)
- Likhoshvay A., Lomakina A., Grachev M. 2014. The complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* from Lake Baikal. *SpringerPlus* 3(1). DOI: [10.1186/2193-1801-3-621](https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-621)
- Liu Y.-F., Qi Z.-Z., Shou L.-B. et al. 2019. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum 'Atribacteria' (JS1) inferred from genomics. *The ISME Journal* 13(9): 2377–2390. DOI: [10.1038/s41396-019-0448-2](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0448-2)
- Liu X., Wang Y., Gu J.-D. 2021. Ecological distribution and potential roles of *Woesearchaeota* in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19: 794–800. DOI: [10.1016/j.csbj.2021.01.013](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.013)
- Löffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M. et al. 2015. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(Pt.6): 2015–2015. DOI: [10.1099/ijms.0.000308](https://doi.org/10.1099/ijms.0.000308)
- Mara P., Geller-McGrath D., Edgcomb V. et al. 2023. Metagenomic profiles of archaea and bacteria within thermal and geochemical gradients of the Guaymas Basin deep subsurface. *Nature Communication* 14: 7768. DOI: [10.1038/s41467-023-43296-x](https://doi.org/10.1038/s41467-023-43296-x)
- Morgunova I., Semenov P., Kursheva A. et al. 2022. Molecular indicators of sources and biodegradation of organic matter in sediments of fluid discharge zones of Lake Baikal. *Geosciences* 12(2): 72. DOI: [10.3390/geosciences12020072](https://doi.org/10.3390/geosciences12020072)
- Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y. et al. 2009. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(11): 2894–2898. DOI: [10.1099/ijms.0.010033-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.010033-0)
- Nobu M.K., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K. et al. 2016. Phylogeny and physiology of candidate phylum "Atribacteria" (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *The ISME Journal* 10(2): 273–286. DOI: [10.1038/ismej.2015.97](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.97)
- Pascoal F., Costa R., Magalhães C. 2021. The microbial rare biosphere: current concepts, methods and ecological principles. *FEMS Microbiology Ecology* 97(1). DOI: [10.1093/femsec/fiaa227](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa227)
- Pavlova O.N., Izosimova O.N., Chernitsyna S.M. et al. 2022. Anaerobic oxidation of petroleum hydrocarbons in enrichment cultures from sediments of the Gorevoy Utes natural oil seep under methanogenic and sulfate-reducing conditions. *Microbial Ecology* 83: 899–915. DOI: [10.1007/s00248-021-01802-y](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01802-y)
- Pavlova O.N., Bukin S.V., Izosimova O.N. et al. 2024. Anaerobic oxidation of oil by microbial communities of bottom sediments of a natural oil seepage site (Bolshaya Zelenovskaya, Middle Baikal). *Microbiology* 93(5): 563–575.
- Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M. et al. 2017. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments. *Journal of Great Lakes Research*. 43: 1030–1043. DOI: [10.1016/j.jglr.2017.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.09.003)
- Qin W., Martens-Habbena W., Kobelt J.N. et al. 2016. *Candidatus Nitrosopumilaceae*. In: Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman



W.B. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: [10.1002/9781118960608.fbm00262](https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00262)

Simoneit B.R.T., Aboul-Kassim T.A.T., Tiercelin J.J. 2000. Hydrothermal petroleum from lacustrine sedimentary organic matter in the East African Rift. *Applied Geochemistry* 15(3): 355–368. DOI: [10.1016/s0883-2927\(99\)00044-x](https://doi.org/10.1016/s0883-2927(99)00044-x)

Takai K., Moser D.P., DeFlaun M. et al. 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African Gold Mines. *Applied and Environmental Microbiology* 67(12): 5750–5760. DOI: [10.1128/aem.67.12.5750-5760.2001](https://doi.org/10.1128/aem.67.12.5750-5760.2001)

Uzun M., Koziyeva V., Dziuba M. et al. 2023. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil. *The ISME Journal* 17(2): 204–214. DOI: [10.1038/s41396-022-01339-z](https://doi.org/10.1038/s41396-022-01339-z)

Wang Y., Wegener G., Hou J. et al. 2019. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of Archaea. *Nature Microbiology* 4(4): 595–602. DOI: [10.1038/s41564-019-0364-2](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0364-2)

Weiss R.F., Carmack E.C., Koropalov V.M. 1991. Deep-water renewal and biological production in Lake Baikal. *Nature* 349(6311): 665–669. DOI: [10.1038/349665a0](https://doi.org/10.1038/349665a0)

Zárate-del Valle P.F., Rushdi A.I., Simoneit B.R.T. 2006. Hydrothermal petroleum of Lake Chapala, Citala Rift, western

Mexico: Bitumen compositions from source sediments and application of hydrous pyrolysis. *Applied Geochemistry* 21(4): 701–712. DOI: [10.1016/j.apgeochem.2006.01.002](https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.01.002)

Zemskaya T., Lomakina A., Mamaeva E. et al. 2015. Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge. *Aquatic Microbial Ecology* 76(2): 95–109. DOI: [10.3354/ame01773](https://doi.org/10.3354/ame01773)

Zhang K., Hu Z., Zeng F.F. et al. 2019. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and changes in microbial community structure in sediment under nitrate-, ferric-, sulfate-reducing and methanogenic conditions. *Journal of Environmental Management* 249: 109425. DOI: [10.1016/j.jenvman.2019.109425](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109425)

Zhang C., Meckenstock R.U., Weng S. et al. 2021. Marine sediments harbor diverse archaea and bacteria with potentials for anaerobic hydrocarbon degradation via fumarate addition. *FEMS Microbiology Ecology* 97(5) DOI: [10.1093/femsec/fiab045](https://doi.org/10.1093/femsec/fiab045)

Zhou Z., Pan J., Wang F. et al. 2018. *Bathyarchaeota*: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments. *FEMS Microbiology Reviews* 42(5): 639–655. DOI: [10.1093/femsre/fuy023](https://doi.org/10.1093/femsre/fuy023)

# Search for putative complete and near-complete genomes of DNA-containing viruses in metagenomes obtained from the Lake Baikal

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYPotapov S.A.<sup>1\*</sup>, Tupikin A.E.<sup>2</sup>, Tikhonova I.V.<sup>1</sup>, Zhuchenko N.A.<sup>1</sup>, Belykh O.I.<sup>1</sup><sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya St., 3, Irkutsk, 664033, Russia<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS), Ac. Lavrentieva ave., 8, Novosibirsk, 630090, Russia

**ABSTRACT.** The paper presents the analysis of putatively complete and near-complete genomes of bacteriophages extracted from metagenomic data obtained from DNA samples isolated from Lake Baikal water using modern bioinformatic programs. A total of 73 sequences with lengths ranging from 13.8 kb to 163.7 kb belonging to phages of the Caudoviricetes class were identified. Two contigs belonging putatively to cyanophages with lengths of 36.8 kb and 163.7 kb were detected, and in the latter one an ORF with a length of 159 amino acid residues similar to the small heat shock protein (Hsp20) was identified. Analysis of the amino acid sequences identified in the assembled bacteriophage genomes using the PHROG database revealed that 27.5% of them have an unknown function, while the majority of those with similarity to known ones (23.7%) belong to the category “DNA, RNA and nucleotide metabolism”. A number of accessory metabolic genes (AMGs) were also detected in the assembled genomes: *nadM*, *cysC*, *cobS*, *galE*, *cobT*, etc. Most of the sequences with similarity to sequences from the IMG/VR database (89.6%) corresponded to sequences obtained from freshwater bodies.

**Keywords:** metagenomics, bacteriophages, high-throughput sequencing, Lake Baikal, complete genome

**For citation:** Potapov S.A., Tupikin A.E., Tikhonova I.V., Zhuchenko N.A., Belykh O.I. Search for putative complete and near-complete genomes of DNA-containing viruses in metagenomes obtained from the Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1050-1065. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1050

## 1. Introduction

Currently, metagenomics provides an opportunity to analyze the diversity of viruses in different habitats, particularly in marine and freshwater ecosystems. Virus diversity is extremely high, but only a small fraction of viruses is represented by complete genomes (Paez-Espino et al., 2016).

The assembly of viral genomes from metagenomes is a challenging task (Smits et al., 2014). The identification of viral genomes from metagenomes is negatively affected by several factors, such as contamination by non-viral sequences (Roux et al., 2013), prophages may be flanked by regions belonging to the host, and the presence of many short sequences obtained during assembly. Short contigs are often discarded, and only those longer than 5-10 kb are included in the analysis (Gregory et al., 2019). The lack of universal marker genes and the large variability in viral genome lengths also contribute to the difficulty in virus identification. Circular genomes can be identified by the presence of

terminal repeats, and the genome can also be determined by covering the known virus genome (homology search), but due to the small number of cultured viruses and the huge diversity of viruses, this approach currently has limitations.

Nevertheless, due to the difficulty of culturing viruses, the metagenomic approach has probably become the key approach to date, as evidenced by recent work (Gregory et al., 2019; Castro-Nallar et al., 2023), as well as the increase in the number of publicly available viral genomes (fragments) assembled from metagenomic data, from 84 in 2010 to 775,000 in 2018 (Roux et al., 2021). For example, the number of viral sequences from all oceans, including the Arctic Ocean, was recently increased 12-fold. The study identified 5 ecological zones whose formation was primarily driven by temperature (Gregory et al., 2019). A global study of viromes from freshwater ecosystems based on 380 publicly available viral metagenomes enabled the recovery of 549 complete high-quality genomes. The abundance study showed that less than 0.2% of viral contigs occur

\*Corresponding author.

E-mail address: [poet1988@list.ru](mailto:poet1988@list.ru) (S.A. Potapov)

**Received:** July 29, 2024; **Accepted:** August 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



in all biomes studied, i.e. the total pool of contigs is minimal. It is concluded that each water body has a separate virome specific to it. It is shown that 41.4% of viral contigs from freshwater ecosystems are not identified by taxonomy, while the rest mainly belong to tailed phages (Elbeheri and Deng, 2022).

The first assembled complete genomes of bacteriophages from Lake Baikal MD8 *Pseudomonas aeruginosa* (*Siphoviridae*) and *P. aeruginosa* PaBG (*Myoviridae*) were obtained by cultivation (Sykilinda et al., 2014; Drucker et al., 2015). Previously, the complete genome of the phage Baikal-20-5m-C28 with a length of 166 kb was assembled from metagenomic data obtained on Lake Baikal, whose host is presumably *Polynucleobacter* spp. (Cabello-Yeves et al., 2018). In addition, 16 putative complete genomes of virophages belonging to the three families *Burtonviroviridae*, *Dishuiviroviridae*, and *Omnilimnoviroviridae* (Potapov and Belykh, 2023) and near-complete genomes of RNA-containing viruses obtained from mollusks (Butina et al., 2023) and the water column (Potapov et al., 2023) were identified.

The aim of this work is to obtain high-quality (i.e., with high confidence) sequences of complete DNA genomes of viruses from metagenomic data obtained from Lake Baikal, annotation of protein sequences, and taxonomic identification of the recovered genomes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling, DNA extraction and sequencing

Water samples for analysis were collected from Lake Baikal in its three basins (Southern, Central, Northern), as well as in the Maloye More Strait (Table 1).

Samples were collected from depths of 0 to 50 m (BVP1-8) and 0 to 15 m (RVP4-6) using Niskin bathometers and mixed to obtain an integrated sample, totaling 20 liters per sample. Water samples were sequentially filtered through 0.4 µm and 0.2 µm pore size filters

(Sartorius, Germany) to remove detritus, zoo-, phyto- and bacterioplankton. Concentration was then carried out by ultrafiltration in tangential flow with a cutoff of 50 kDa using VivaFlow 200 (Sartorius, Germany) and Vivaspin 15 ultracentrifuge tubes (Sartorius, Germany). This resulted in 100 µl of concentrate per sample. To purify free viral particles from foreign DNA, the sample was treated with DNAase (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The reaction was stopped by adding 50 mM EDTA and incubated at 65°C for 10 min. DNA was extracted using the phenol-chloroform method. DNA concentration was measured on a Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). Libraries were prepared and sequenced using Illumina MiSeq (Illumina, USA) and MGISEQ 2000 (MGI Tech Co., Ltd., PRC) at the “Genomics Core Facility” (ICBFM SB RAS, Novosibirsk, Russia).

### 2.2. Bioinformatics analysis

The raw reads were analyzed in FastQC v. 0.12.1 (Andrews, 2010). Adapter removal as well as quality filtering was performed in Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Removal of ribosomal DNA contaminants was performed using SortMeRNA v. 4.3.6 (Kopylova et al., 2012), and Bowtie2 v. 2.4.4 was used to remove human sequences (Langmead and Salzberg, 2012) by mapping reads to a known genome (GRCh38\_noalt\_as). Combined assembly was performed by combining all samples (“cross-assembly”) to achieve longer contigs and increase the number of viral contigs (Bukin et al., 2023), using metaSPAdes v. 4.0.0 (Nurk et al., 2017) with the additional parameter -k 21, 33, 55, 77. Viral sequence extraction was performed using VirSorter2 v. 2.2.4 (Guo et al., 2021) with a score parameter > 0.9, minimum contigs length of 5 kb. The reads were then mapped to the resulting contigs putatively belonging to viruses using Bowtie2, coverage was calculated by the program SAMtools v. 1.13 (Li et al., 2009). Only contigs with coverage depth more than 5 were taken for further analysis. Using the program COBRA v. 1.2.3 (Chen and

**Table 1.** Water samples collected for virome analysis.

Labeling	Sampling date	Sampling site	Project number in the SRA	Reference
BVP1	22.03.18	7 km from Listvyanka settlement	PRJNA1006167	(Potapov and Belykh, 2023)
BVP2	8.06.18	3 km from Listvyanka settlement		
BVP3	31.05.18	3 km from Turka settlement		
BVP4	4.06.18	3 km from Elokhin Cape		
BVP5	5.08.18	central station Maloye More Strait		
BVP6	27.09.18	central station Listvyanka settlement – Tankhoy settlement		
BVP7	25.09.18	central station Ukhan Cape – Tonkiy Cape		
BVP8	23.09.18	central station Elokhin Cape – Davsha settlement		
RVP4_DNA	29.07.22	central station Listvyanka settlement – Tankhoy settlement	Not deposited	–
RVP5_DNA	07.08.22	central station Ukhan Cape – Tonkiy Cape		
RVP6_DNA	02.08.22	central station Elokhin Cape – Davsha settlement		

Banfield, 2024), we joined the assembled sequences and achieved higher accuracy by increasing the length and completeness of contigs. The contigs were then checked using the program CheckV v. 1.0.3 (Nayfach et al., 2021). Further, only direct terminal repeats (DTR) were used to identify complete genomes, as this is the most established approach. In addition, parameters such as AAI-based completeness > 90%, confidence\_level - high were taken into account. Similar sequences were clustered at the 95% identity level (ANI) using clustering scripts from the CheckV program.

Taxonomic identification of viral genomes was performed using geNomad v. 1.8.0 (Camargo et al., 2023b), Diamond v. 2.1.8.162 with e-value parameters -  $10^{-5}$ , bit score  $\geq 50$ , more sensitive and BlastN v. 2.12.0+ (e-value -  $10^{-5}$ ) using the amino acid and nucleotide database of viral genomes RefSeq v. 222. Functional analysis of translated ORFs from contigs was performed applying PHROG v. 4 (Terzian et al., 2021) and VOG v. 219 databases applying HHMER v. 3.2.1 (Eddy, 2011). The IMG/VR v. 4 database (Camargo et al., 2023a) was used to search for similar proteins from uncultured viruses. We also used the automatic phage annotation program VIBRANT v. 1.2.1 (Kieft et al., 2020) to search for auxiliary metabolic genes (AMGs). A proteomic tree was constructed using the on-line service VipTree v. 4.0 (Nishimura et al., 2017).

### 3. Results

The results of stepwise processing are presented in Table 2. A total of 8288 sequences belonging to viruses were identified from the obtained mix assembly after processing in the VirSorter2 program, which was 39.6% of all assembled contigs of more than 5 kb.

After processing 8033 sequences in COBRA, 49.1% of the sequences managed to increase their length by an average of 37.6%. Quality control of viral contigs in CheckV determined that 73 sequences belonged to high quality over 90% with DTR. At the same time, 60 sequences belonged to complete genomes, and 13 sequences were characterized as near-complete (extend partial group, COBRA). The length of these putative complete and near-complete virus genomes ranged from 13871 to 163727 nucleotides (Supplementary

**Table 2.** Number of reads/contigs after each processing step.

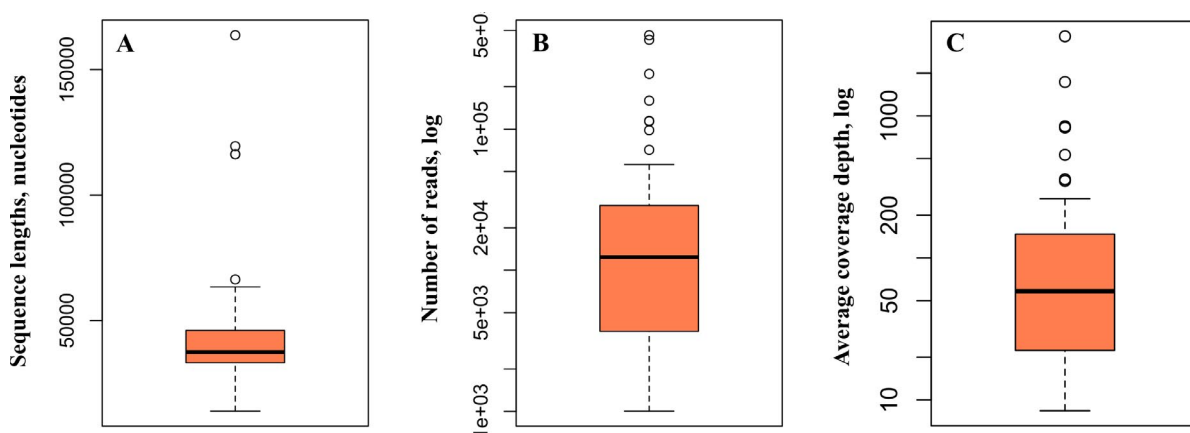
Processing stage	Pair of reads/contigs
1. Raw reads	176329692
2. Trimmomatic	152536284
3. SortMeRNA	151248958
4. Deletion of human sequences	149200074
5. metaSPAdes, contigs of more than 5 thousand nucleotides	20929
6. VirSorter2, contigs of more than 5 thousand nucleotides	8288
7. Bowtie2, SAMtools, coverage depth more than 5	8033
8. COBRA	3191
9. CheckV	73

material). The number of ORFs ranged from 20 to 216. The statistical information is presented in Figure 1.

Taxonomic identification based on geNomad (virus\_score > 0.96) showed that all genomes belonged to the class Caudoviricetes, with 4 sequences (NODE\_7814, NODE\_610, NODE\_598, NODE\_665) identified up to the family *Autographiviridae*. It is worth noting that we also identified virophages that were discovered earlier, but we did not include them in this paper because they were described in detail in (Potapov and Belykh, 2023).

Functional analysis using the PHROG database revealed that the category “DNA, RNA, and nucleotide metabolism” was the most represented (23.7%); in addition, 27.5% of amino acid sequences had an unknown function (Fig. 2). Structural proteins accounted for 38.3% (categories “Capsid and Packaging”, “Tail”, and “Connector”). A large terminase subunit was detected in all bacteriophage genomes by PHROG and VOG databases.

In the genome of NODE\_40, presumably belonging to a cyanophage, an ORF of 159 amino acid residues in length similar to a small heat shock protein (Hsp20, YP\_009134378) was detected. In addition, genes related to microbial resistance to oxidative stress, such as



**Fig.1.** Statistical information of 73 phage sequences. A - range of sequence lengths, nucleotide bases, B - number of reads per genome, C - average depth of genome coverage.



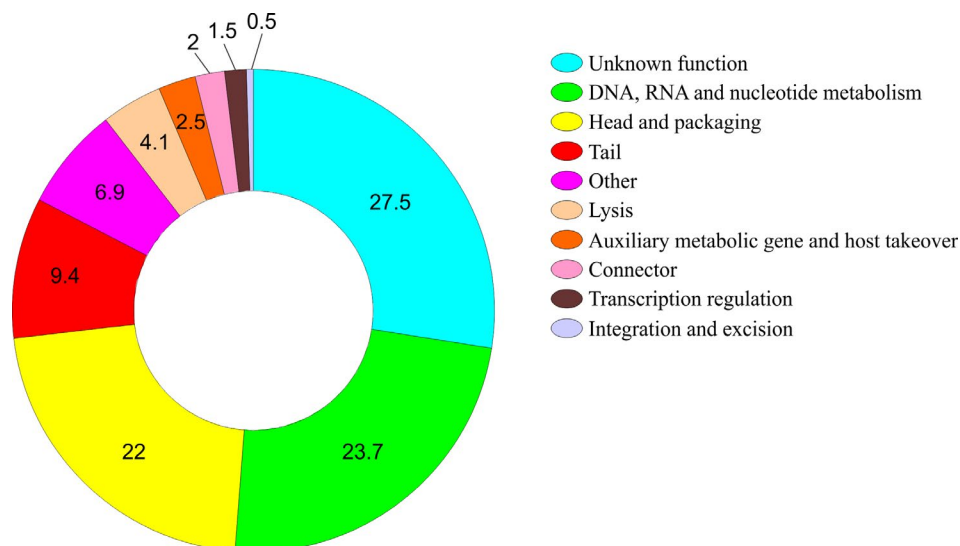


Fig.2. Functional analysis of amino acid sequences of 73 phages. Share is given in percentages.

NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) and *nadM* (bifunctional NMN adenylyltransferase/nudix hydrolase) were identified in this genome. NODE\_334 included the *cysC* gene, which is involved in the assimilatory reduction of sulfate. The *cobS* (NODE\_4873, NODE\_40, NODE\_506), *cobT* (NODE\_4873) genes are involved in cobalamin biosynthesis. *PurA* (adenylosuccinate synthase) and *purB* (adenylosuccinate lyase) are found in NODE\_996 - involved in purine metabolism. Other AMG were also detected: *rfbC*, DNMT1, *galE*, *lpxA*, TSTA3, *pimC*.

Six sequences contained integrase (NODE\_506, NODE\_926, NODE\_7814, NODE\_610, NODE\_598, NODE\_660), with similarities ranging from 28.2% to 39%.

Out of the 4266 ORFs, 4108 (96.3%) had similarities to uncultured virus representatives from the IMG/VR database. Of these, 89.6% corresponded to representatives derived from freshwater ecosystems, with the majority (78.8%) derived from lakes, 16.5% from rivers, and 2.5% from ponds. Only 3.2% of the 4108 ORFs were of marine origin. The rest belonged to representatives obtained from other sources (soil, wastewater, etc.).

According to the RefSeq database, 126 ORFs were similar to phages recently isolated on the basis of the *Flavobacterium* strains from the Baltic Sea (Nilsson et al., 2020; Hoetzing et al., 2021). Sequence identity at the amino acid level ranged from 21.5 to 87%. Fifty-four ORFs are similar to *Nonlabens* phage (isolates P12024S and P12024L), whose host is the bacterium *Persicivirga* sp. IMCC12024 isolated from the coastal water of the Yellow Sea (Republic of Korea). The amino acid sequence similarity ranged from 22.4 to 68.8 %.

ORFs (203 sequences) similar to proteins of 63 different cyanophages at the amino acid level had similarities ranging from 22.1 to 81.3%, while the lowest e-value (0) was observed with the major capsid protein (YP\_004421726) of *Synechococcus* phage S-CBS3 (62.4% similarity, 99.9% coverage) and DNA polymerase (YP\_010669768) of *Synechococcus* phage S-SCSM1 (55.7% similarity, 99.6% coverage).

*Synechococcus* phage S-CBS3 was isolated from a strain of *Synechococcus* sp. CB0202 (isolation source is Chesapeake Bay), *Synechococcus* phage S-SCSM1 was isolated from *Synechococcus* sp. strain WH 7803 (isolation source is South China Sea). The two sequences NODE\_40 (163.7 kb, 216 ORF) and NODE\_1081 (36.8 kb, 49 ORF) had 50 and 23 ORFs, respectively, similar to cyanophages from the RefSeq database, indicating with high probability that they belong to cyanophages. Other sequences with similar proteins to cyanophages, but with a smaller number per genome, are difficult to identify due to the lack of known cyanophages in databases.

Seventy-five amino acid sequences were similar to different *Ralstonia* phage isolates (NC\_047946, NC\_047888, NC\_030948 etc.), with similarities at the amino acid level ranging from 25.6 to 75.1%.

Overall, based on the blastp results from the RefSeq database, only 34.7% of ORFs were similar to known proteins. In addition, 80.8% of the sequences similar to proteins from the database showed less than 50% similarity to known proteins, which may indicate the discovery of new phages representing the so-called viral dark matter pool. This is also supported by the low percentage of similarity with known viruses from the RefSeq nucleotide database of complete genomes, such that the maximum similarity and coverage was registered with *Ralstonia* phage RsoP1EGY (13% similarity, 67.4% coverage), *Synechococcus* phage S-CBS3 (25% similarity, 70% coverage), and *Ralstonia* phage RsoP1EGY (18% similarity, 69.6% coverage).

The representation analysis based on TPM (transcripts per kilobase million) showed that 32 sequences (42.5%) were present in all samples. NODE\_923 was detected only in sample BVP5 (Maloye More Strait). Two sequences were assembled only from the 2022 reads (NODE\_996, NODE\_660). Eight sequences were missing from summer 2018 (BVP5, BVP6, BVP7, BVP8) (NODE\_598, NODE\_660, NODE\_547, NODE\_996, NODE\_5829, NODE\_506, NODE\_665, NODE\_1217). This type of analysis can indicate both the prevalence of phages in the lake across all basins and seasons and

the uniqueness and replication of phages at particular time intervals.

The proteomic tree built on the basis of our assembled genomes shows both formed clusters and individual branches, with the formed clusters containing the closest relatives according to the RefSeq database. This type of analysis also allows us to identify putative hosts, for example, the presence of the closest relative in a cluster for which the host is known and which contains our assembled genomes. Thus, we found 4 phyla of potential hosts Pseudomonodota, Bacteroidota, Cyanobacteriota and Bacillota (Fig. 3).

#### 4. Discussion

In this study, we were able to identify 60 putatively complete and 13 nearly complete phage genomes (vMAG, viral metagenome-assembled genome) belonging to the class Caudoviricetes from the metagenomes of freshwater Lake Baikal.

Due to the mosaic nature of phage genomes, as well as their lack in databases, there is a nontrivial task of determining the closest relative at the species, genus, and even family level arises. It should be noted that we used strict virus identification conditions when using the VirSorter2 program: *max\_score* > 0.9 - high confidence, *CheckV*: *confidence\_level* - high, *aai\_completeness* more than 90%, *checkv\_quality* - complete, presence of DTR, *contamination* - 0, etc., as this is the optimal option for obtaining high-quality complete genomes.

A number of auxiliary metabolic genes have been discovered in phage genomes. Changes in productivity at the ecosystem level occur through horizontal transfer of ecologically important genes and expression of virus-encoded AMGs (Hurwitz and U'Ren, 2016). These genes are expressed during infection, increasing and redirecting energy and resources to virus production (Thompson et al., 2011; Hurwitz and U'Ren, 2016; Smet et al., 2016; Howard-Varona et al., 2018). The identified AMGs demonstrate the involvement of viruses in biogeochemical reactions. The *cobS* are involved in cobalamin biosynthesis and may support deoxynucleotide synthesis. The *cysC* gene is involved in the assimilatory reduction of sulfate. The presence of phages with this gene in freshwater ecosystems may influence the sulfur cycle through the process of assimilatory sulfate reduction. Respiratory complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) uses the energy released by electron transfer from NADH to quinone to pump protons through the plasma membrane (Walker, 1992). The bioavailability of this complex can be altered by the expression of viral auxiliary metabolic genes involved in NAD + biosynthesis (NAMPT, *nadM*). Recently, these genes have been found in contigs assigned to Caudoviricetes derived from the mouse intestine (Ishola et al., 2024) as well as in earthworm intestinal phages (Xia et al., 2023). The *galE* gene encoding UDP-glucose-4-epimerase mediates the conversion of UDP-galactose and UDP-glucose in galactose metabolism and probably allows the virus to participate in carbohydrate metabolism (Heyerhoff et al., 2022). In general, AMGs in

phages and their role are still poorly understood, but their importance in phage survival is beyond doubt.

A small heat shock protein (sHSP) was found in the NODE\_40 sequence, which is thought to belong to a cyanophage. It was previously shown to be present in some cyanophages (marine and freshwater) that infect the unicellular cyanobacteria *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Dreher et al., 2011; Maaroufi and Tanguay, 2013). Cyanophages have been shown to have acquired the sHSP gene from a class A bacterial ancestor by lateral gene transfer (Maaroufi and Tanguay, 2013).

Detection of assembled phage genomes from Lake Baikal in different seasons and years demonstrates that half of them is constantly present in the time intervals we observed. Inversely, some of them are detected only at a certain time and place. Monthly sampling throughout the year and sequencing will help us to understand how many phages are present in a given season, which we will continue to study.

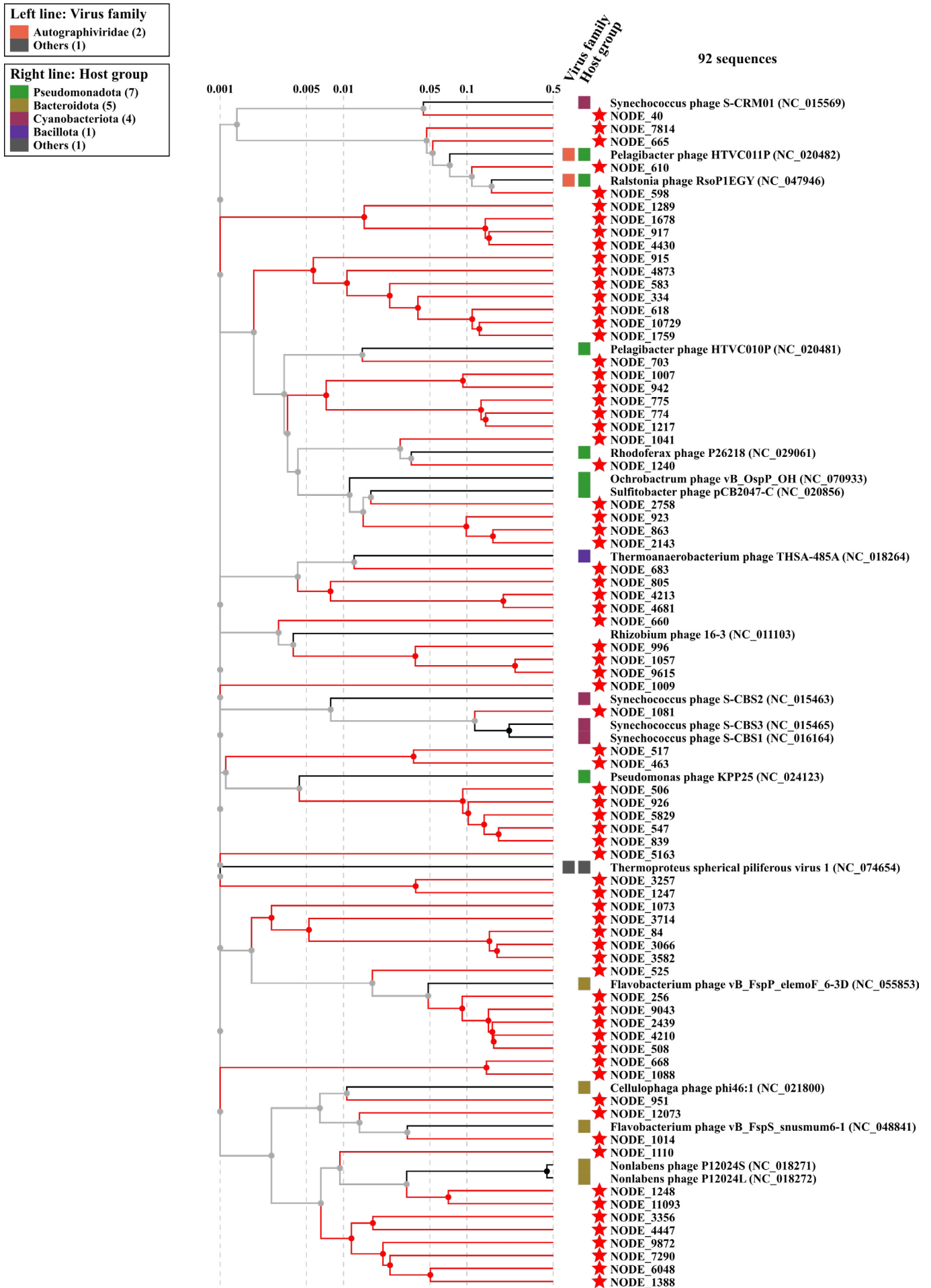
Compliance with sample preparation requirements to obtain high-quality virus genomes from metagenomic data, such as deliverance from bacterial and eukaryotic DNA, pre-filtering and using DNase, and sequencing with the highest possible read depth in order to get enough reads out of the total number of reads to assemble virus genomes is essential. Besides, attention should be paid to the timely updating of databases in the analysis, as the growth of new known sequences may reveal additional new viruses. In addition, the emergence of new programs simplifies the analysis and also enables to identify new sequences.

#### 5. Conclusions

Bioinformatic analysis of data obtained from sequenced water DNA samples from Lake Baikal (metagenomes of the fraction less than 0.2  $\mu\text{m}$ ) was used to recover 60 complete and 13 near-complete genomes of bacteriophages. Taxonomic analysis showed low similarity of the obtained genomes with the available virus genomes in the RefSeq database. Two genomes, putatively belonging to cyanophages, with lengths of 36.8 kb (NODE\_1081) and 163.7 kb (NODE\_40), were discovered; a small heat shock protein (sHSP) was identified in NODE\_40. A number of auxiliary metabolic genes in the genomes of the obtained phages were identified: *nadM*, *cysC*, *cobS*, *galE*, *cobT*, etc. It was shown that half of the assembled phage genomes were present in all seasons and in all three basins and the M. More Strait, while the rest were detected only at a certain time and location.

#### 6. Funding

The work was carried out within the State Assignment of LIN SB RAS No. 0279-2021-0015 “Studies of viral and bacterial communities as a basis for stable functioning of freshwater ecosystems and effective response under anthropogenic impact”.



**Fig.3.** Proteomic tree based on comparison of translated nucleotide sequences of genomes (tBLASTx) with their closest relatives identified using VipTree. Asterisk indicates sequences from this study. Colored squares indicate affiliation with a known reference taxon and its host.

## Acknowledgements

The English version of the paper was prepared by Nadezhda Shvedova. The authors are grateful to the crew of R/V “G. Titov” for their assistance in sampling.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Electronic resource]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–2120. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)
- Bukin Y.S., Bondaryuk A.N., Butina T.V. 2023. Performance Analysis of Cross-Assembly of Metatranscriptomic Datasets in Viral Community Studies. *Mathematical Biology & Bioinformatics* 18(2): 418–433. DOI: [10.17537/2023.18.418](https://doi.org/10.17537/2023.18.418)
- Butina T.V., Zemskaia T.I., Bondaryuk A.N. et al. 2023. Viral Diversity in Samples of Freshwater Gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda: Benedictiidae) Revealed by Total RNA-Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 17022. DOI: [10.3390/ijms242317022](https://doi.org/10.3390/ijms242317022)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaia T.I., Rosselli R. et al. 2018. Genomes of novel microbial lineages assembled from the sub-ice waters of Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology* 84(1): e02132-17. DOI: [10.1128/AEM.02132-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02132-17)
- Camargo A.P., Nayfach S., Chen I.-M.A. et al. 2023. IMG/VR v4: an expanded database of uncultivated virus genomes within a framework of extensive functional, taxonomic, and ecological metadata. *Nucleic Acids Res* 51(D1): 733–743. DOI: [10.1093/nar/gkac1037](https://doi.org/10.1093/nar/gkac1037)
- Camargo A.P., Roux S., Schulz F. et al. 2023. Identification of mobile genetic elements with geNomad. *Nature Biotechnology* DOI: [10.1038/s41587-023-01953-y](https://doi.org/10.1038/s41587-023-01953-y)
- Castro-Nallar E., Berríos-Farías V., Díez B. et al. 2023. Seasonal and Spatially Distributed Viral Metagenomes from Comau Fjord (42°S), Patagonia. *Microbiology Resource Announcements* 12(4): 12:e00082-23. DOI: [10.1128/mra.00082-23](https://doi.org/10.1128/mra.00082-23)
- Chen L., Banfield J.F. 2024. COBRA improves the completeness and contiguity of viral genomes assembled from metagenomes. *Nature Microbiology* 9(3): 737–750. DOI: [10.1038/s41564-023-01598-2](https://doi.org/10.1038/s41564-023-01598-2)
- Dreher T.W., Brown N., Bozarth C.S. et al. 2011. A freshwater cyanophage whose genome indicates close relationships to photosynthetic marine cyanomyophages. *Environmental Microbiology* 13(7): 1858–1874. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02502.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02502.x)
- Drucker V.V., Bondar A.A., Gorshkova A.S. et al. 2015. Search and studies of autochthonous bacteriophages in different biotopes of Lake Baikal. *Contemporary Problems of Ecology* 12: 143-154. DOI: [10.1134/S1995425519020045](https://doi.org/10.1134/S1995425519020045) (in Russian)
- Eddy S.R. 2011. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology* 7(10): e1002195. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002195](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195)
- Elbehery A.H.A., Deng L. 2022. Insights into the global freshwater virome. *Frontiers Microbiology* 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.953500](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953500)
- Gregory A.C., Zayed A.A., Conceição-Neto N. et al. 2019. Marine DNA viral macro- and microdiversity from pole to pole. *Cell* 177(5): 1109-1123.e14. DOI: [10.1016/j.cell.2019.03.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.040)
- Guo J., Bolduc B., Zayed A.A. et al. 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* 9(1): 1–13. DOI: [10.1186/s40168-020-00990-y](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00990-y)
- Heyerhoff B., Engelen B., Bunse C. 2022. Auxiliary Metabolic Gene Functions in Pelagic and Benthic Viruses of the Baltic Sea. *Frontiers in Microbiology* 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.863620](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863620)
- Hoetzing M., Nilsson E., Arabi R. et al. 2021. Dynamics of Baltic Sea phages driven by environmental changes. *Environmental Microbiology* 23(8): 4576–4594. DOI: [10.1111/1462-2920.15651](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15651)
- Howard-Varona C., Hargreaves K.R., Solonenko N.E. et al. 2018. Multiple mechanisms drive phage infection efficiency in nearly identical hosts. *ISME J* 12(6): 1605–1618. DOI: [10.1038/s41396-018-0099-8](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0099-8)
- Hurwitz B.L., U'Ren J.M. 2016. Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 31: 161–168. DOI: [10.1016/j.mib.2016.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.002)
- Ishola O.A., Kublik S., Durai Raj A.C. et al. 2024. Comparative Metagenomic Analysis of Bacteriophages and Prophages in Gnotobiotic Mouse Models. *Microorganisms* 12(2): 255. DOI: [10.3390/microorganisms12020255](https://doi.org/10.3390/microorganisms12020255)
- Kieft K., Zhou Z., Anantharaman K. 2020. VIBRANT: Automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of virome function from genomic sequences. *Microbiome* 8 (90) DOI: [10.1186/s40168-020-00867-0](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00867-0)
- Kopylova E., Noé L., Touzet H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28(24): 3211–3217. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts611](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611)
- Langmead B., Salzberg S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature Methods* 9(4): 357–359. DOI: [10.1038/nmeth.1923](https://doi.org/10.1038/nmeth.1923)
- Li H., Handsaker B., Wysoker A. et al. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16): 2078–2079. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp352](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352)
- Maaroufi H., Tanguay R.M. 2013. Analysis and Phylogeny of Small Heat Shock Proteins from Marine Viruses and Their Cyanobacteria Host. *PLoS One* 8(11): e81207. DOI: [10.1371/journal.pone.0081207](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081207)
- Nayfach S., Camargo A.P., Schulz F. et al. 2021. CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nature Biotechnology* 39(5): 578–585. DOI: [10.1038/s41587-020-00774-7](https://doi.org/10.1038/s41587-020-00774-7)
- Nilsson E., Bayfield O.W., Lundin D. et al. 2020. Diversity and Host Interactions among Virulent and Temperate Baltic Sea Flavobacterium Phages. *Viruses* 12(2): 158. DOI: [10.3390/v12020158](https://doi.org/10.3390/v12020158)
- Nishimura Y., Yoshida T., Kuronishi M. et al. 2017. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics* 33(15): 2379–2380. DOI: [10.1093/bioinformatics/btx157](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx157)
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A. et al. 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research* 27(5): 824–834. DOI: [10.1101/gr.213959.116](https://doi.org/10.1101/gr.213959.116)
- Paez-Espino D., Eloie-Fadrosh E.A., Pavlopoulos G.A. et al. 2016. Uncovering Earth's virome. *Nature* 536(7617): 425–430. DOI: [10.1038/nature19094](https://doi.org/10.1038/nature19094)
- Potapov S., Gorshkova A., Krasnopeev A. et al. 2023. RNA-Seq virus fraction in Lake Baikal and treated wastewaters. *International Journal of Molecular Sciences* 24(15): 12049. DOI: [10.3390/ijms241512049](https://doi.org/10.3390/ijms241512049)
- Potapov S.A., Belykh O.I. 2023. Virophages Found in Viromes from Lake Baikal. *Biomolecules* 13(12): 1773. DOI: [10.3390/biom13121773](https://doi.org/10.3390/biom13121773)
- Roux S., Krupovic M., Debros D. et al. 2013. Assessment of viral community functional potential from viral metagenomes may be hampered by contamination with cellular



sequences. *Open Biology* 3(12): 130160. DOI: [10.1098/rsob.130160](https://doi.org/10.1098/rsob.130160)

Roux S., Matthijssens J., Dutilh B.E. 2021. Metagenomics in Virology. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp. 133–140. DOI: [10.1016/B978-0-12-809633-8.20957-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20957-6)

Smet J.De., Zimmermann M., Kogadeeva M. et al. 2016. High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 10(8): 1823–1835. DOI: [10.1038/ismej.2016.3](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.3)

Smits S.L., Bodewes R., Ruiz-Gonzalez A. 2014. et al. Assembly of viral genomes from metagenomes. *Frontiers in Microbiology* 5. DOI: [10.3389/fmicb.2014.00714](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00714)

Sykilinda N.N., Bondar A.A., Gorshkova A.S. et al. 2014. Complete Genome Sequence of the Novel Giant *Pseudomonas* Phage PaBG. *Genome Announcements* 2(1): e00929-13. DOI: [10.1128/genomeA.00929-13](https://doi.org/10.1128/genomeA.00929-13)

Terzian P., Olo Ndela E., Galiez C. et al. 2021. PHROG: families of prokaryotic virus proteins clustered using remote homology. *NAR Genomics and Bioinformatics* 3(3): lqab067. DOI: [10.1093/nargab/lqab067](https://doi.org/10.1093/nargab/lqab067)

Thompson L.R., Zeng Q., Kelly L. et al. 2011. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(39): E757-E764. DOI: [10.1073/pnas.1102164108](https://doi.org/10.1073/pnas.1102164108)

Walker J.E. 1992. The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly Reviews of Biophysics* 25(3): 253–324

Xia R., Sun M., Balcázar J.L. et al. 2023. Benzo[a]pyrene stress impacts adaptive strategies and ecological functions of earthworm intestinal viromes. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 17(7): 1004–1014. DOI: [10.1038/s41396-023-01408-x](https://doi.org/10.1038/s41396-023-01408-x)

# Поиск предполагаемых полных и почти полных геномов ДНК-содержащих вирусов в метагеномах, полученных из оз. Байкал

Оригинальная статья

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYПотапов С.А.<sup>1\*</sup>, Тупикин А.Е.<sup>2</sup>, Тихонова И.В.<sup>1</sup>, Жученко Н.А.<sup>1</sup>, Белых О.И.<sup>1</sup><sup>1</sup>Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской Академии Наук, пр. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В работе представлен анализ предположительно полных и почти полных геномов бактериофагов, извлечённых из метагеномных данных, полученных из образцов ДНК, выделенной из воды оз. Байкал с применением современных биоинформатических программ. Всего было выявлено 73 последовательности длиной от 13,8 тыс. до 163,7 тыс. оснований, принадлежащие фагам класса Caudoviricetes. Обнаружены два контига, принадлежащие предположительно цианофагам длиной 36,8 тыс. и 163,7 тыс. нуклеотидов, причём в последнем идентифицирована ORF длиной 159 аминокислотных остатков сходная с малым белком теплового шока (Hsp20). Анализ идентифицированных в собранных геномах бактериофагов аминокислотных последовательностей по базе данных PHROG выявил, что 27,5% из них имеют неизвестную функцию, в то время как большая часть из имеющих сходство с известными (23,7%) принадлежит категории «ДНК, РНК и нуклеотидный метаболизм». Также в собранных геномах обнаружен ряд вспомогательных метаболических генов (AMG): *nadM*, *cysC*, *cobS*, *galE*, *cobT* и др. Большая часть последовательностей, имеющих сходство с последовательностями из базы данных IMG/VR (89,6%) соответствовала последовательностям, полученным из пресноводных водоёмов.

**Ключевые слова:** метагеномика, бактериофаги, высокопроизводительное секвенирование, оз. Байкал, полный геном

Для цитирования: Потапов С.А., Тупикин А.Е., Тихонова И.В., Жученко Н.А., Белых О.И. Поиск предполагаемых полных и почти полных геномов ДНК-содержащих вирусов в метагеномах, полученных из оз. Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1050-1065. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1050

## 1. Введение

В настоящее время метагеномика предоставляет возможность анализировать разнообразие вирусов в различных средах обитания, в частности, в морских и пресноводных экосистемах. Разнообразие вирусов чрезвычайно высоко, однако только небольшая их часть представлена полными геномами (Paez-Espino et al., 2016).

Сборка вирусных геномов из метагеномов является сложной задачей (Smits et al., 2014). На идентификацию вирусных геномов из метагеномов негативно влияют несколько факторов, например, загрязнение невирусными последовательностями, присутствующими в пуле первоначальных данных (Roux et al., 2013), наличие множества коротких последовательностей, полученных при сборке,

кроме того, профаги могут быть фланкированы областями, принадлежащими хозяину. При анализе короткие контиги (менее 5-10 тыс. нуклеотидов) чаще всего отбрасывают (Gregory et al., 2019). Сложность в идентификации вирусов так же заключается в отсутствие универсальных маркерных генов и большой вариабельностью длин вирусных геномов. Кольцевые геномы могут быть идентифицированы по наличию терминальных повторов. Вирусный геном также может быть определён путём покрытия ридями известного генома вируса (поиск гомологии), однако ввиду малого количества культивированных вирусов и огромного разнообразия вирусов такой подход в настоящее время имеет ограничения.

Тем не менее из-за сложности культивирования вирусов метагеномный подход на сегодняш-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [poet1988@list.ru](mailto:poet1988@list.ru) (С.А. Потапов)

Поступила: 29 июля 2024; Принята: 14 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



ний день вероятно стал ключевым, о чём свидетельствуют недавние работы (Gregory et al., 2019; Castro-Nallar et al., 2023), а так же рост количества общедоступных вирусных геномов (фрагментов), собранных из метагеномных данных, с 84 в 2010 г. до 775 тыс. в 2018 г. (Roux et al., 2021). Например, недавно удалось расширить в 12 раз количество вирусных последовательностей из всех океанов, включая Северный Ледовитый океан. В исследовании выявлено 5 экологических зон, формирование которых было обусловлено, в первую очередь, температурой (Gregory et al., 2019). Глобальное исследование виромов из пресноводных экосистем на основе 380 общедоступных вирусных метагеномов позволило восстановить 549 полных высококачественных геномов. Изучение обилия показало, что менее 0,2% вирусных контигов встречаются во всех исследованных биомах, т.е. общий пул контигов минимален. Сделано заключение, что каждый водоём имеет отдельный виром, специфичный для него. Показано, что 41,4% вирусных контигов из пресноводных экосистем не идентифицируются по таксономии, в то время как остальные в основном принадлежат хвостатым фагам (Elbeheri and Deng, 2022).

Первые расшифрованные полные геномы бактериофагов из оз. Байкал MD8 *Pseudomonas aeruginosa* (*Siphoviridae*) и *P. aeruginosa* PaBG (*Myoviridae*), получены методом культивирования (Sykilinda et al., 2014; Drucker et al., 2015). При анализе же метагеномных данных из оз. Байкал ранее удалось собрать полный геном фага Baikal-20-5m-C28 длиной 166 тыс. нк., хозяином которого предположительно является *Polynucleobacter* spp. (Cabello-Yeves et al., 2018). Кроме этого, выявлено 16 предполагаемых полных геномов вирофагов, принадлежащие трём семействам *Burtonviriviridae*, *Dishuiviriviridae*, *Omnilimnoviriviridae* (Potapov and Belykh, 2023) и почти полные геномы РНК-содержащих вирусов, полученные из моллюсков (Butina et al., 2023) и водной толщи (Potapov et al., 2023).

Целью работы является получение качественных (т.е. с высокой степенью достоверности) последовательностей полных геномов ДНК вирусов из метагеномных данных, полученных из оз. Байкал, аннотация белковых последовательностей и таксономическая идентификация восстановленных геномов.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Отбор образцов, экстракция ДНК и секвенирование

Образцы воды для анализа отобраны из оз. Байкал в трёх его котловинах (Южной, Средней, Северной), а также в проливе Малое Море (Таблица 1).

Отбор проб проводили с глубин от 0 до 50 м (BVP1-8) и от 0 до 15 м (RVP4-6), используя батометры Нискина и смешивали для получения интегральной пробы, всего 20 литров на один образец. Образцы воды последовательно фильтровали через фильтры с размером пор 0,4 мкм и 0,2 мкм (Sartorius, ФРГ) для удаления детрита, зоо-, фито- и бактериопланктона. Далее проводили концентрирование, с помощью ультрафильтрации в тангенциальном потоке с номинальным отсечением по молекулярной массе 50кДа, применяя VivaFlow 200 (Sartorius, ФРГ) и ультрацентрифужные пробирки Vivaspin 15 (Sartorius, ФРГ). Таким образом получали 100 мкл концентрата на образец. Для очистки свободных вирусных частиц от чужеродной ДНК проводили обработку пробы ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, MA, США). Реакцию останавливали добавлением 50 mM EDTA и выдерживали при 65°C 10 минут. Экстрагировали ДНК с помощью фенол-хлороформного метода. Концентрацию ДНК измеряли на Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Подготовка библиотек и их секвенирование на Illumina MiSeq (Illumina, США) и MGISEQ 2000 (MGI Tech Co., Ltd, КНР) выполнены в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск, Россия).

Таблица 1. Образцы воды, отобранные для анализа виромов.

Маркировка	Дата отбора	Место отбора	Номер проекта в SRA	Ссылка
BVP1	22.03.18	7 км от п. Листвянка	PRJNA1006167	(Potapov and Belykh, 2023)
BVP2	8.06.18	3 км от п. Листвянка		
BVP3	31.05.18	3 км от п. Турка		
BVP4	4.06.18	3 км от м. Елохин		
BVP5	5.08.18	ц. ст. пролив Малое Море		
BVP6	27.09.18	ц. ст. п. Листвянка – п. Танхой		
BVP7	25.09.18	ц. ст. м. Ухан – м. Тонкий		
BVP8	23.09.18	ц. ст. м. Елохин – п. Давша		
RVP4_DNA	29.07.22	ц. ст. п. Листвянка – п. Танхой	Не депонированы	-
RVP5_DNA	07.08.22	ц. ст. м. Ухан – м. Тонкий		
RVP6_DNA	02.08.22	ц. ст. м. Елохин – п. Давша		

## 2.2. Биоинформатический анализ

Полученные первоначальные прочтения анализировали в FastQC v. 0.12.1 (Andrews, 2010). Удаление адаптеров, а также фильтрацию по качеству проводили в Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Удаление загрязнений рибосомной ДНК выполняли, используя SortMeRNA v. 4.3.6 (Kopylova et al., 2012); последовательности, принадлежащие человеку, удаляли с помощью программы Bowtie2 v. 2.4.4 (Langmead and Salzberg, 2012), путём картирования ридов на известный геном (GRCh38\_noalt\_as). Комбинированную сборку осуществляли путём объединения всех образцов («cross-assembly») для получения более длинных контигов и увеличения количества вирусных контигов (Bukin et al., 2023), используя metaSPAdes v. 4.0.0 (Nurk et al., 2017) с дополнительным параметром -k 21, 33, 55, 77. Извлечение вирусных последовательностей проводили с помощью VirSorter2 v. 2.2.4 (Guo et al., 2021) с параметром score > 0,9 и минимальной длине контигов 5000 нк. Затем риды картировали на полученные контиги, предположительно принадлежащие вирусам, с помощью Bowtie2, покрытие считали программой SAMtools v. 1.13 (Li et al., 2009). В дальнейший анализ брали только контиги с глубиной покрытия более 5. Используя программу COBRA v. 1.2.3 (Chen and Banfield, 2024), соединяли собранные последовательности и добивались более высокой точности, посредством увеличения длины и полноты контигов. Далее контиги проверяли с помощью программы CheckV v. 1.0.3 (Nayfach et al., 2021). В дальнейшем использованы исключительно прямые терминальные повторы (direct terminal repeat, DTR) для идентификации полных геномов, поскольку это наиболее устойчивый подход. Кроме того, учитывали такие параметры как AAI-based completeness > 90%, confidence\_level – high. Сходные последовательности сгруппированы на уровне 95% идентичности (ANI), используя скрипты для кластеризации из программы CheckV.

Таксономическую идентификацию вирусных геномов выполняли, применяя geNomad v. 1.8.0 (Camargo et al., 2023b), Diamond v. 2.1.8.162 с параметрами e-value –  $10^{-5}$ , bit score  $\geq 50$ , more sensitive и BlastN v. 2.12.0+ (e-value –  $10^{-5}$ ), используя аминокислотную и нуклеотидную базы данных вирусных геномов RefSeq v. 222. Функциональный анализ транслированных ORFs из контигов выполнен, применяя базы данных PHROG v. 4 (Terzian et al., 2021) и VOG v. 219 применяя HHMER v. 3.2.1 (Eddy, 2011). База данных IMG/VR v. 4 (Camargo et al., 2023a) использована для поиска схожих белков из некультивированных вирусов. Также использована программа автоматической аннотации фагов VIBRANT v. 1.2.1 (Kieft et al., 2020) для поиска вспомогательных метаболических генов (auxiliary metabolic gene, AMG). Протеомное дерево строили, используя on-line сервис VipTree v. 4.0 (Nishimura et al., 2017).

Таблица 2. Количество прочтений/контигов после каждого этапа обработки.

Этап обработки	Пар прочтений/контигов
1. Исходных прочтений	176329692
2. Trimmomatic	152536284
3. SortMeRNA	151248958
4. Удаление последовательностей человека	149200074
5. metaSPAdes, контигов более 5 тыс. нуклеотидов	20929
6. VirSorter2, контигов более 5 тыс. нуклеотидов	8288
7. Bowtie2, SAMtools, глубина чтения более 5	8033
8. COBRA	3191
9. CheckV	73

## 3. Результаты

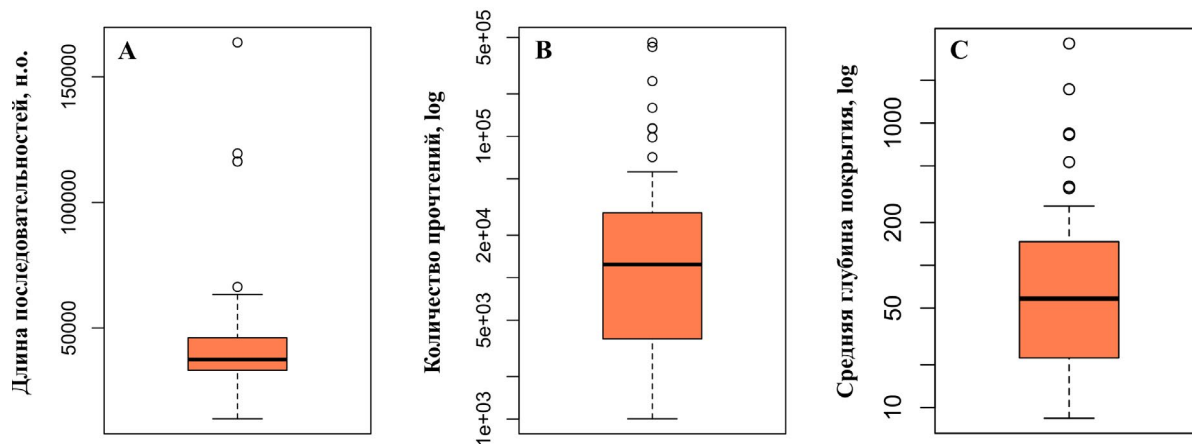
Результаты поэтапной обработки представлены в Таблице 2. Всего из полученной микс-сборки после обработки в программе VirSorter2 выявлено 8288 последовательностей, принадлежащих вирусам, что составило 39,6% от всех собранных контигов более 5000 нуклеотидов.

После обработки 8033 последовательностей в программе COBRA, 49,1% последовательностям удалось увеличить длину в среднем на 37,6%. Контроль качества вирусных контигов в CheckV определил, что к высококачественным контигам (high quality > 90%) с DTR принадлежало 73 последовательности. При этом 60 последовательностей принадлежат полным геномам, а 13 последовательностей характеризуются как почти полные (группа extend partial, COBRA). Длина этих предполагаемых полных и почти полных геномов вирусов варьировала от 13871 до 163727 нуклеотидов (дополнительный материал). Количество ORFs было в диапазоне от 20 до 216. Статистическая информация представлена на рисунке 1.

Таксономическая идентификация вирусных геномов на основе geNomad (virus\_score > 0,96) показала, что все геномы принадлежали классу Caudoviricetes, при этом до семейства *Autographiviridae* geNomad определено 4 последовательности (NODE\_7814, NODE\_610, NODE\_598, NODE\_665). Стоит отметить, что мы идентифицировали также вирофаги, которые обнаружили ранее, но в этой статье их не рассматриваем (исключены на этапе CheckV) т.к. они были подробно описаны в статье (Potarov and Belykh, 2023).

Функциональный анализ, проведённый по базе PHROG, выявил, что категория «ДНК, РНК и нуклеотидный метаболизм» наиболее представлена (23,7%), кроме того, 27,5% аминокислотных последовательностей имели неизвестную функцию (Рис. 2). Структурные белки составили 38,3% (категории





**Рис.1.** Статистическая информация о 73 последовательностях фагов. А – диапазон длин последовательностей, нуклеотидных оснований, В – количество прочтений на геном, С – средняя глубина покрытия геномов.

«Капсид и упаковка», «Хвост», «Коннектор»). Во всех геномах бактериофагов по базам данных PHROG и VOG обнаружена большая субъединица терминазы.

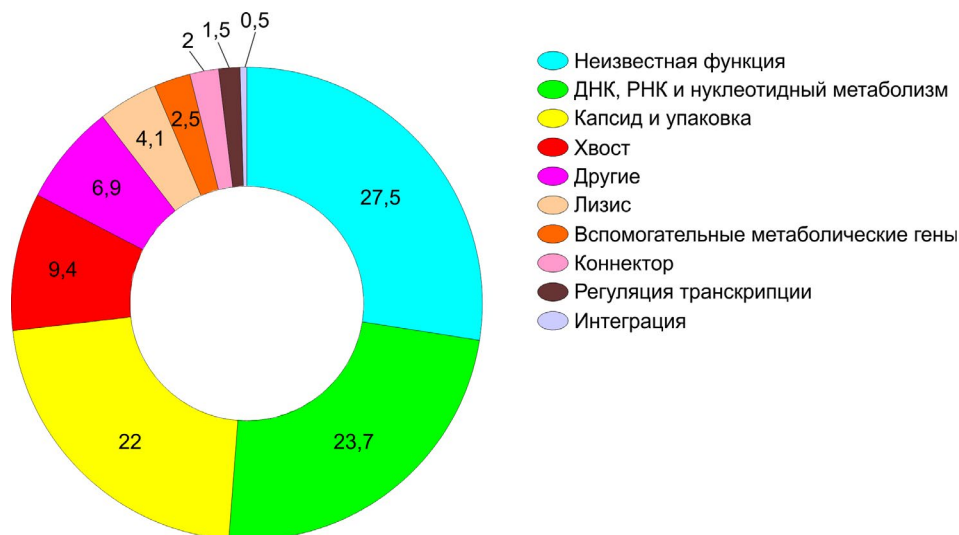
В геноме NODE\_40, предположительно принадлежащего цианофагу, выявлена ORF длиной 159 аминокислотных остатков сходная с малым белком теплового шока (Hsp20, YP\_009134378). Кроме того, в этом геноме выявлены гены, связанные с устойчивостью микроорганизмов к окислительному стрессу, такие как NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) и *nadM* (bifunctional NMN adenylyltransferase/nudix hydrolase). NODE\_334 включал ген *cysC*, который вовлечен в ассимиляционное восстановление сульфата. Гены *cobS* (NODE\_4873, NODE\_40, NODE\_506), *cobT* (NODE\_4873) участвуют в биосинтезе кобаламина. *PurA* (adenylosuccinate synthase) и *purB* (adenylosuccinate lyase), обнаруженные в NODE\_996 участвуют в пуриновом метаболизме. Так же выявлены другие вспомогательные метаболические гены: *rfbC*, DNMT1, *galE*, *lpxA*, TSTA3, *pimC*.

Шесть последовательностей имели в составе интегразу (NODE\_506, NODE\_926, NODE\_7814, NODE\_610, NODE\_598, NODE\_660), сходство аминокислотных последовательностей варьировало от 28,2 до 39%.

Из 4266 ORFs 4108 (96,3%) имели сходство с некультивированными представителями вирусов из базы данных IMG/VR. Из них 89,6% соответствовали представителям, полученным из пресноводных экосистем, при этом большая часть из них (78,8%) получена из озёр, 16,5% из рек, 2,5% из прудов. Только 3,2% из 4108 ORFs были морского происхождения. Остальные принадлежали представителям, полученным из других источников (почва, сточные воды и др.).

По базе данных RefSeq 126 ORFs имели сходство с фагами, недавно выделенными на штаммах *Flavobacterium* из Балтийского моря (Nilsson et al., 2020; Hoetzing et al., 2021). Идентичность последовательностей на аминокислотном уровне варьировала от 21,5 до 87%. 54 ORFs сходны с *Nonlabens phage* (изоляты P12024S и P12024L), хозяином которых является бактерия *Persicivirga* sp. IMCC12024, изолированная из прибрежной воды Жёлтого моря (Южная Корея). Сходство белковых последовательностей варьировало от 22,4 до 68,8 %.

Из выявленных рамок считывания 203 последовательности были сходны с белками 63 различных цианофагов на аминокислотном уровне и имели сходство от 22,1 до 81,3%, при этом наименьшее значение e-value (0) отмечено с основным капсид-



**Рис.2.** Функциональный анализ аминокислотных последовательностей 73 выявленных фагов. Доли категорий приведены в процентах.

ным белком (YP\_004421726) *Synechococcus* phage S-CBS3 (сходство – 62,4%, покрытие – 99,9%) и ДНК полимеразой (YP\_010669768) *Synechococcus* phage S-SCSM1 (сходство – 55,7%, покрытие – 99,6%). *Synechococcus* phage S-CBS3 выделен из штамма *Synechococcus* sp. CB0202 (источник изоляции – Чесапикский залив), *Synechococcus* phage S-SCSM1 изолирован из штамма *Synechococcus* sp. WH 7803 (источник изоляции Южно-Китайское море). Две последовательности NODE\_40 (163,7 тыс. нукл., 216 ORF) и NODE\_1081 (36,8 тыс. нукл., 49 ORF) имели 50 и 23 ORF, сходных с таковыми цианофагов из базы данных RefSeq, что говорит с большой долей вероятности об их принадлежности к цианофагам. Другие последовательности, имеющие сходные белки с цианофагами, но с меньшим количеством на геном сложно определить вследствие недостатка известных цианофагов в базах данных.

75 аминокислотных последовательностей выявленных фагов были сходны с различными изолятами *Ralstonia* phage (NC\_047946, NC\_047888, NC\_030948 и др.), при этом сходство на аминокислотном уровне варьировало от 25,6 до 75,1%.

В целом, основываясь на результатах blastp по базе данных RefSeq можно заключить, что только 34,7% ORFs имели сходство с известными белками. Помимо этого, 80,8% последовательностей из имеющих сходство с белками из базы данных показывали сходство менее 50% с известными, что может указывать на обнаружение новых фагов, представляющих так называемый пул темной вирусной материи (viral dark matter). В поддержку этого так же свидетельствует низкий процент сходства с известными вирусами из нуклеотидной базы полных геномов RefSeq, так максимальное сходство и покрытие зафиксировано с *Ralstonia* phage RsoP1EGY (сходство – 13%, покрытие – 67,4%), *Synechococcus* phage S-CBS3 (сходство – 25%, покрытие – 70%), *Ralstonia* phage RsoP1EGY (сходство – 18%, покрытие – 69,6%).

Анализ представленности на основе TPM (transcripts per kilobase million) показал, что 32 последовательности (42,5 %) присутствуют во всех образцах. NODE\_923 выявлен только в образце BVP5 (пролив Малое Море). Две последовательности собраны только из прочтений 2022 г. (NODE\_996, NODE\_660). В летний период 2018 г. (BVP5, BVP6, BVP7, BVP8) отсутствовали 8 последовательностей (NODE\_598, NODE\_660, NODE\_547, NODE\_996, NODE\_5829, NODE\_506, NODE\_665, NODE\_1217). Этот вид анализа может свидетельствовать как о распространённости фагов в озере во всех котловинах и сезоны, так и об уникальности и репликации фагов в отдельные временные промежутки.

Протеомное дерево, построенное на основе собранных нами геномов, демонстрирует как сформированные кластеры, так и отдельные ветви, при этом сформированные кластеры содержат ближайших родственников по базе данных RefSeq. Данный тип анализа так же позволяет выявить предполагаемых хозяев, например, наличие ближайшего родственника в кластере, для которого известен хозяин

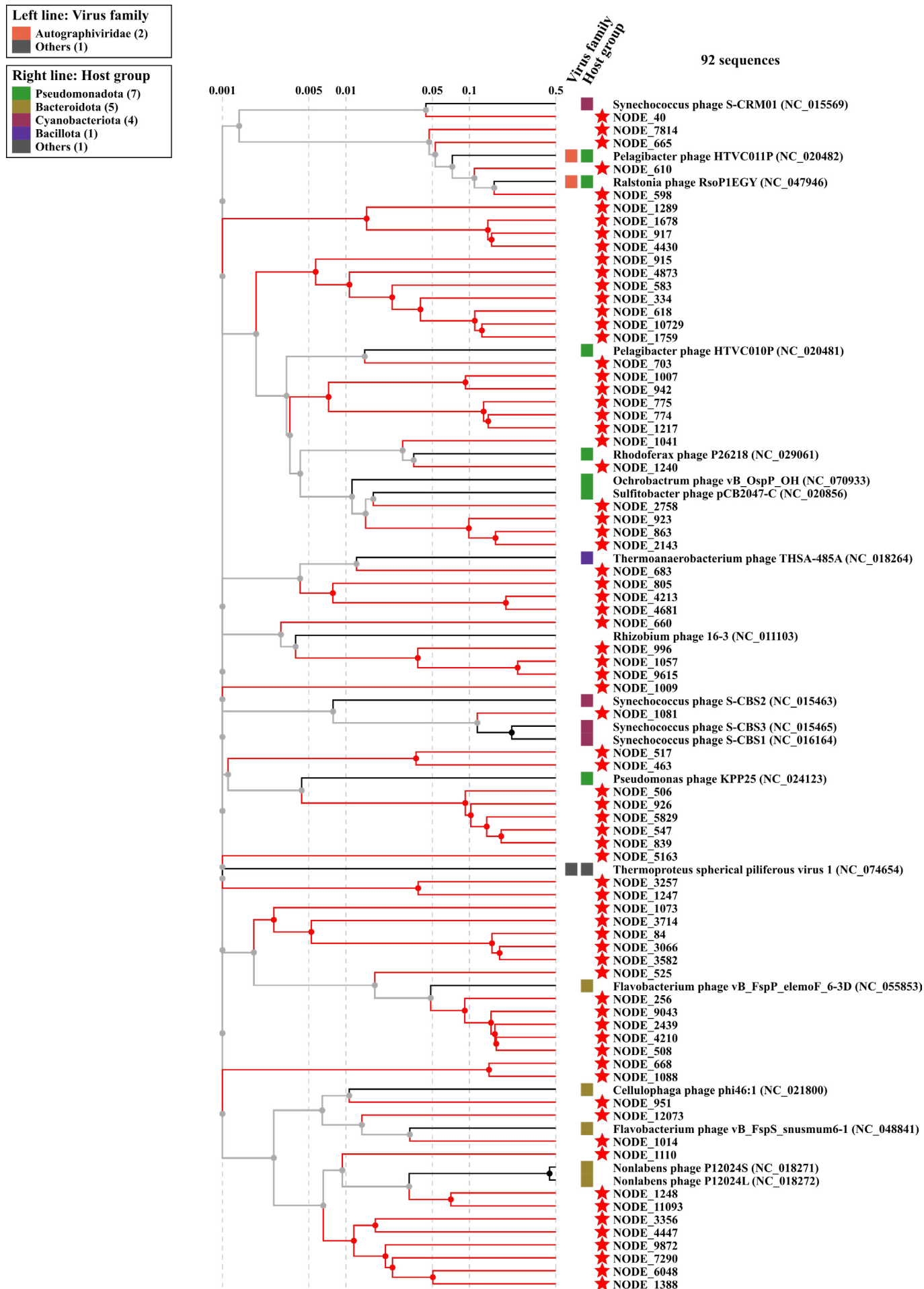
и содержащего собранные нами геномы. Таким образом обнаружены 4 филы потенциальных хозяев Pseudomonadata, Bacteroidota, Cyanobacteriota и Bacillota (Рис. 3).

#### 4. Обсуждение

В данной работе нам удалось выявить 60 предположительно полных и 13 почти полных геномов фагов (vMAG, viral metagenome-assembled genome), принадлежащих классу Caudoviricetes из метаженомов пресноводного оз. Байкал.

Из-за мозаичности фаговых геномов, а также недостатке их в базах данных, возникает нетривиальная задача определения ближайшего родственника на видовом, родовом уровне и даже на уровне семейства. Следует отметить, что мы использовали строгие условия идентификации вирусов при использовании программы VirSorter2: max\_score > 0,9 – высокая достоверность, CheckV: confidence\_level – high, aai\_completeness более 90%, checkv\_quality – complete, наличие DTR, contamination – 0 и др. т.к. это оптимальный вариант для получения высококачественных полных геномов.

В геномах фагов обнаружен ряд вспомогательных метаболических генов. Изменение продуктивности на уровне экосистемы происходит посредством горизонтального переноса экологически важных генов и экспрессии кодируемых вирусами AMG (Hurwitz and U'Ren, 2016). Эти гены экспрессируются во время инфекции, увеличивая и перенаправляя энергию и ресурсы на производство вируса (Thompson et al., 2011; Hurwitz and U'Ren, 2016; Smet et al., 2016; Howard-Varona et al., 2018). Выявленные вспомогательные гены демонстрируют участие вирусов в биогеохимических реакциях. Так, *cobS* участвует в биосинтезе кобаламина и может поддерживать синтез дезоксирибонуклеотидов. Ген *cusC* вовлечен в ассимиляционное восстановление сульфата. Присутствие фагов с этим геном в пресноводных экосистемах, может влиять на цикл серы через процесс ассимиляционной сульфатредукции. Дыхательный комплекс I (NADH: убихинон оксидоредуктаза) использует энергию, высвобождаемую при переносе электронов с NADH на хинон для перекачки протонов через плазматическую мембрану (Walker, 1992). Биодоступность этого комплекса может быть изменена посредством экспрессии вирусных вспомогательных метаболических генов, участвующих в биосинтезе NAD<sup>+</sup> (NAMPT, *nadM*). Недавно эти гены обнаружены в контигах, полученных из кишечника мышей, отнесенных к Caudoviricetes (Ishola et al., 2024), а также в фагах кишечника дождевых червей (Xia et al., 2023). Ген *galE*, кодирующий UDP-глюкозо-4-эпимеразу, опосредует преобразование UDP-галактозы и UDP-глюкозы в метаболизме галактозы, и вероятно, позволяет вирусу участвовать в метаболизме углеводов (Heyerhoff et al., 2022). В целом AMGs в фагах и их роль до сих пор остаются малоизученными, но их важность в выживании фагов не вызывает сомнений.



**Рис.3.** Протеомное дерево, построенное на основе сравнения транслированных нуклеотидных последовательностей геномов (tBLASTx) с ближайшими родственниками, идентифицированных с помощью VipTree. Звездочкой отмечены последовательности из этого исследования. Цветные квадраты означают принадлежность к известному таксону референса и его хозяина.

В последовательности NODE\_40, предположительно принадлежащей цианофагу, обнаружен малый белок теплового шока (sHSP). Ранее показано, что он присутствует у некоторых цианофагов (морских и пресноводных), которые инфицируют одноклеточные цианобактерии *Synechococcus* и *Prochlorococcus* (Dreher et al., 2011; Maaroufi and Tanguay, 2013). Показано, что цианофаги приобрели ген, кодирующий sHSP, от бактериального предка класса А с помощью латерального переноса генов (Maaroufi and Tanguay, 2013).

Обнаружение собранных фаговых геномов из оз. Байкал в различные сезоны и годы демонстрирует, что половина из них постоянно присутствует в те временные отрезки, что мы наблюдали. И наоборот, часть из них обнаружена только в определённое время и определённом месте. Пониманию присутствия фагов в те или иные сезоны поможет ежемесячный отбор образцов в течение года и их секвенирование, что является целью нашего дальнейшего исследования.

Соблюдение требований пробоподготовки образцов для получения качественных геномов вирусов из метагеномных данных, в частности, избавления от бактериальной и эукариотической ДНК, предфильтрация и использование ДНКазы, а также секвенирование с максимально возможной глубиной чтения является необходимым условием. Данные этапы позволяют из общего количества чтений получить достаточное количество для сборки геномов вирусов. Кроме того, следует уделять внимание своевременному обновлению баз данных в анализе, т.к. рост количества известных последовательностей может способствовать выявлению и идентификации большего количества новых вирусов. Помимо этого, появление и использование новых программ упрощает анализ, а также повышает вероятность идентификации выявленных последовательностей.

## 5. Выводы

Используя биоинформатический анализ данных, полученных из секвенированных образцов ДНК воды из оз. Байкал (метагеномов фракции менее 0,2 мкм) восстановлены 60 полных и 13 почти полных геномов бактериофагов. Таксономический анализ показал низкое сходство полученных геномов с имеющимися геномами вирусов в базе данных RefSeq. Обнаружено два генома, предположительно принадлежащие цианофагам, длиной 36,8 тыс. (NODE\_1081) и 163,7 тыс. (NODE\_40) нуклеотидов, в последнем идентифицирован малый белок теплового шока (sHSP). Выявлен ряд вспомогательных метаболических генов в геномах полученных фагов: *nadM*, *cysC*, *cobS*, *galE*, *cobT* и др. Показано, что половина собранных геномов фагов присутствовала во все сезоны и во всех трёх котловинах и проливе М. Море, остальные обнаружены только в определённое время и в определённом месте.

## 6. Финансирование

Работа выполнена в рамках темы госзадания ЛИН СО РАН № 0279-2021-0015 «Исследования вирусных и бактериальных сообществ как основы стабильного функционирования пресноводных экосистем и эффективного ответа в условиях антропогенного воздействия».

## Благодарности

Авторы благодарят команду НИС «Г. Титов» за помощь в отборе образцов.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–2120. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)
- Bukin Y.S., Bondaryuk A.N., Butina T.V. 2023. Performance Analysis of Cross-Assembly of Metatranscriptomic Datasets in Viral Community Studies. *Mathematical Biology & Bioinformatics* 18(2): 418–433. DOI: [10.17537/2023.18.418](https://doi.org/10.17537/2023.18.418)
- Butina T.V., Zemskaya T.I., Bondaryuk A.N. et al. 2023. Viral Diversity in Samples of Freshwater Gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda: Benedictiidae) Revealed by Total RNA-Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 17022. DOI: [10.3390/ijms242317022](https://doi.org/10.3390/ijms242317022)
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Rosselli R. et al. 2018. Genomes of novel microbial lineages assembled from the sub-ice waters of Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology* 84(1): e02132-17. DOI: [10.1128/AEM.02132-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02132-17)
- Camargo A.P., Nayfach S., Chen I.-M.A. et al. 2023. IMG/VR v4: an expanded database of uncultivated virus genomes within a framework of extensive functional, taxonomic, and ecological metadata. *Nucleic Acids Res* 51(D1): 733–743. DOI: [10.1093/nar/gkac1037](https://doi.org/10.1093/nar/gkac1037)
- Camargo A.P., Roux S., Schulz F. et al. 2023. Identification of mobile genetic elements with geNomad. *Nature Biotechnology* DOI: [10.1038/s41587-023-01953-y](https://doi.org/10.1038/s41587-023-01953-y)
- Castro-Nallar E., Berríos-Farías V., Díez B. et al. 2023. Seasonal and Spatially Distributed Viral Metagenomes from Comau Fjord (42°S), Patagonia. *Microbiology Resource Announcements* 12(4): 12:e00082-23. DOI: [10.1128/mra.00082-23](https://doi.org/10.1128/mra.00082-23)
- Chen L., Banfield J.F. 2024. COBRA improves the completeness and contiguity of viral genomes assembled from metagenomes. *Nature Microbiology* 9(3): 737–750. DOI: [10.1038/s41564-023-01598-2](https://doi.org/10.1038/s41564-023-01598-2)
- Dreher T.W., Brown N., Bozarth C.S. et al. 2011. A freshwater cyanophage whose genome indicates close relationships to photosynthetic marine cyanomyophages. *Environmental Microbiology* 13(7): 1858–1874. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02502.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02502.x)
- Drucker V.V., Bondar A.A., Gorshkova A.S. et al. 2015. Search and studies of autochthonous bacteriophages in different biotopes of Lake Baikal. *Contemporary Problems of*



Ecology 12: 143-154. DOI: [10.1134/S1995425519020045](https://doi.org/10.1134/S1995425519020045) (in Russian)

Eddy S.R. 2011. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology* 7(10): e1002195. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002195](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195)

Elbehery A.H.A., Deng L. 2022. Insights into the global freshwater virome. *Frontiers Microbiology* 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.953500](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953500)

Gregory A.C., Zayed A.A., Conceição-Neto N. et al. 2019. Marine DNA viral macro- and microdiversity from pole to pole. *Cell* 177(5): 1109-1123.e14. DOI: [10.1016/j.cell.2019.03.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.040)

Guo J., Bolduc B., Zayed A.A. et al. 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* 9(1): 1–13. DOI: [10.1186/s40168-020-00990-y](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00990-y)

Heyerhoff B., Engelen B., Bunse C. 2022. Auxiliary Metabolic Gene Functions in Pelagic and Benthic Viruses of the Baltic Sea. *Frontiers in Microbiology* 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.863620](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863620)

Hoetzing M., Nilsson E., Arabi R. et al. 2021. Dynamics of Baltic Sea phages driven by environmental changes. *Environmental Microbiology* 23(8): 4576–4594. DOI: [10.1111/1462-2920.15651](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15651)

Howard-Varona C., Hargreaves K.R., Solonenko N.E. et al. 2018. Multiple mechanisms drive phage infection efficiency in nearly identical hosts. *ISME J* 12(6): 1605–1618. DOI: [10.1038/s41396-018-0099-8](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0099-8)

Hurwitz B.L., U'Ren J.M. 2016. Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 31: 161–168. DOI: [10.1016/j.mib.2016.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.002)

Ishola O.A., Kublik S., Durai Raj A.C. et al. 2024. Comparative Metagenomic Analysis of Bacteriophages and Prophages in Gnotobiotic Mouse Models. *Microorganisms* 12(2): 255. DOI: [10.3390/microorganisms12020255](https://doi.org/10.3390/microorganisms12020255)

Kieft K., Zhou Z., Anantharaman K. 2020. VIBRANT: Automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of virome function from genomic sequences. *Microbiome* 8 (90) DOI: [10.1186/s40168-020-00867-0](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00867-0)

Kopylova E., Noé L., Touzet H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28(24): 3211–3217. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts611](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611)

Langmead B., Salzberg S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature Methods* 9(4): 357–359. DOI: [10.1038/nmeth.1923](https://doi.org/10.1038/nmeth.1923)

Li H., Handsaker B., Wysoker A. et al. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16): 2078–2079. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp352](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352)

Maaroufi H., Tanguay R.M. 2013. Analysis and Phylogeny of Small Heat Shock Proteins from Marine Viruses and Their Cyanobacteria Host. *PLoS One* 8(11): e81207. DOI: [10.1371/journal.pone.0081207](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081207)

Nayfach S., Camargo A.P., Schulz F. et al. 2021. CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nature Biotechnology* 39(5): 578–585. DOI: [10.1038/s41587-020-00774-7](https://doi.org/10.1038/s41587-020-00774-7)

Nilsson E., Bayfield O.W., Lundin D. et al. 2020. Diversity and Host Interactions among Virulent and Temperate Baltic Sea Flavobacterium Phages. *Viruses* 12(2): 158. DOI: [10.3390/v12020158](https://doi.org/10.3390/v12020158)

Nishimura Y., Yoshida T., Kuronishi M. et al. 2017. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics* 33(15): 2379–2380. DOI: [10.1093/bioinformatics/btx157](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx157)

Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A. et al. 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research* 27(5): 824–834. DOI: [10.1101/gr.213959.116](https://doi.org/10.1101/gr.213959.116)

Paez-Espino D., Eloë-Fadrosh E.A., Pavlopoulos G.A. et al. 2016. Uncovering Earth's virome. *Nature* 536(7617): 425–430. DOI: [10.1038/nature19094](https://doi.org/10.1038/nature19094)

Potapov S., Gorshkova A., Krasnopeev A. et al. 2023. RNA-Seq virus fraction in Lake Baikal and treated wastewaters. *International Journal of Molecular Sciences* 24(15): 12049. DOI: [10.3390/ijms241512049](https://doi.org/10.3390/ijms241512049)

Potapov S.A., Belykh O.I. 2023. Virophages Found in Viromes from Lake Baikal. *Biomolecules* 13(12): 1773. DOI: [10.3390/biom13121773](https://doi.org/10.3390/biom13121773)

Roux S., Krupovic M., Debroas D. et al. 2013. Assessment of viral community functional potential from viral metagenomes may be hampered by contamination with cellular sequences. *Open Biology* 3(12): 130160. DOI: [10.1098/rsob.130160](https://doi.org/10.1098/rsob.130160)

Roux S., Matthijnssens J., Dutilh B.E. 2021. Metagenomics in Virology. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp. 133–140. DOI: [10.1016/B978-0-12-809633-8.20957-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20957-6)

Smet J.De., Zimmermann M., Kogadeeva M. et al. 2016. High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 10(8): 1823–1835. DOI: [10.1038/ismej.2016.3](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.3)

Smits S.L., Bodewes R., Ruiz-Gonzalez A. 2014. et al. Assembly of viral genomes from metagenomes. *Frontiers in Microbiology* 5. DOI: [10.3389/fmicb.2014.00714](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00714)

Sykilinda N.N., Bondar A.A., Gorshkova A.S. et al. 2014. Complete Genome Sequence of the Novel Giant *Pseudomonas* Phage PaBG. *Genome Announcements* 2(1): e00929-13. DOI: [10.1128/genomeA.00929-13](https://doi.org/10.1128/genomeA.00929-13)

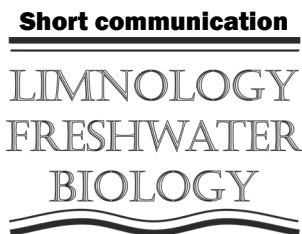
Terzian P., Olo Ndela E., Galiez C. et al. 2021. PHROG: families of prokaryotic virus proteins clustered using remote homology. *NAR Genomics and Bioinformatics* 3(3): lqab067. DOI: [10.1093/nargab/lqab067](https://doi.org/10.1093/nargab/lqab067)

Thompson L.R., Zeng Q., Kelly L. et al. 2011. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(39): E757-E764. DOI: [10.1073/pnas.1102164108](https://doi.org/10.1073/pnas.1102164108)

Walker J.E. 1992. The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly Reviews of Biophysics* 25(3): 253–324

Xia R., Sun M., Balcázar J.L. et al. 2023. Benzo[a]pyrene stress impacts adaptive strategies and ecological functions of earthworm intestinal viromes. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 17(7): 1004–1014. DOI: [10.1038/s41396-023-01408-x](https://doi.org/10.1038/s41396-023-01408-x)

# Potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated water by alkane-oxidizing actinobacteria



Romanova V.A.\* , Kupriyanova O.V., Grigoryeva T.V., Laikov A.V.

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** Water pollution with oil and its components is common in oil-producing and industrialized countries of the world. High molecular weight alkanes, constituting significant portion of oil, exist in a solid state at room temperature and exhibit resistance to decomposition when released into the environment. Bioremediation is the most promising technology for cleaning up hydrocarbon-contaminated aquatic ecosystems because of its environmental safety and economic efficiency. This article presents data on the potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated objects by the alkane-oxidizing bacterium *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2. Strain PS2 was isolated from petrochemical waste and showed a significant increase to  $10^7$  CFU/ml when cultivated on a mineral medium with solid paraffin as the sole source of carbon and energy. It was found that strain PS2 has high adhesion to liquid and solid alkanes, compared to cells grown in a medium with sucrose. The degree of decomposition of solid paraffin was evaluated using gas chromatography/mass spectrometry. The results indicated that strain PS2 metabolizes alkanes with a chain length of C20-C31 in 7 days with varying efficiencies. The findings of this study demonstrate the potential of the *T. tyrosinosolvans* PS2 strain for the bioremediation of sites contaminated with complex mixtures of hydrocarbons.

**Keywords:** bioremediation, alkane-oxidizing bacteria, actinobacteria, alkanes, gas chromatography, solid paraffin

**For citation:** Romanova V.A., Kupriyanova O.V., Grigoryeva T.V., Laikov A.V. Potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated water by alkane-oxidizing actinobacteria // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1066-1071. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1066

## 1. Introduction

Oil spills into aquatic environment resulting from disruptions in the functioning of oil production, transportation and refining facilities causes significant environmental damage (Chen et al., 2017; Deegan et al., 2019). All groups of living organisms are adversely affected, including the flora and fauna of aquatic ecosystem. Additionally, changes in the microbial community are observed, leading to a disruption of its trophic function and the disintegration of biogeochemical cycles (Zaki et al., 2015).

Alkanes are a significant component of oil (Alonso-Gutierrez et al., 2011). Low molecular weight alkanes, which are liquid under standard state conditions, can be subject to abiotic transformation and biological degradation by a wide range of microorganisms (Rojo, 2009), whereas high molecular weight paraffins pose a more serious problem. These compounds are solid under standard state conditions, and can accumulate in aquatic organisms and lead to chronic pollution (Sakthipriya et al., 2016).

In the event of contamination of water bodies' extensive surface areas with oil and hydrocarbons, the most economically viable remediation method is bioremediation (Li et al., 2020; Xu et al., 2022). This technology is based on the ability of microorganisms to transform and mineralize a wide range of organic pollutants, which provides them with energy and carbon (Rojo, 2009). The extensive metabolic capabilities of microorganisms make it possible to create biological products that are effective under the most challenging conditions, including low temperatures, high osmotic pressure, and contamination with heavy metals.

*Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 strain was isolated from petrochemical waste (Romanova et al., 2019) and demonstrated its ability to utilize medium-chain alkanes (Romanova et al., 2022). The aim of this study is to assess the potential of the isolated strain for the utilization of solid alkanes in combination with other biotechnologically valuable properties, such as alterations in cell hydrophobicity.

\*Corresponding author.

E-mail address: [avonamora-94@mail.ru](mailto:avonamora-94@mail.ru) (V.A. Romanova)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Cultivation of the *T. tyrosinosolvens* PS2 strain under different conditions

Strain PS2 was cultivated on liquid mineral salts medium (MS) for 7 days (g/l: 1.0 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.25 –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3.0 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4.5 –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Phale et al., 1995)) supplemented with the various carbon sources: sucrose (10 g/l), hexadecane (4% vol.) or solid paraffin (10 g/l). The initial inoculation of strain cells was  $10^6$  CFU/ml. The number of cells in the suspension was determined by serial dilutions on LB medium (g/l: 10 – tryptone; 5 – yeast extract; 5 – NaCl; 20 – agar-agar).

### 2.2. Assessment of *T. tyrosinosolvens* PS2 strain cell adhesion to hydrocarbons

To determine the adhesion of bacteria to hydrocarbons, the cells of the strain were centrifuged and washed twice with MS medium. The next step involved combining equal volumes of the cell suspension with an OD=1 with hexadecane. Then this mixture was shaken for 60 seconds and incubated to separate into two phases for 30 minutes. Following the separation process, the optical density of the hexadecane phase was measured at a wavelength of  $\lambda = 400$  nm using an xMark spectrophotometer (Bio-Rad, USA) (Zhang and Miller, 1994; Sotirova et al., 2009).

### 2.3. Evaluation of hydrocarbons degradation by GC-MS

The biodegradation of solid paraffin by PS2 strain was analyzed using an Agilent Technologies 7890B GC System gas chromatograph (USA) combined with a mass selective detector (GC-MS) after extraction with hexane. For the analysis, an HP-5MS capillary quartz column (length 30 m, diameter 0.25 mm, phase film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) with a chemically grafted phase of 5%-diphenyl-95%-dimethylpolysiloxane was employed. The GC-MS conditions were as follows: chromatograph evaporator temperature – 280°C; detector interface temperature – 280°C; carrier gas – helium, constant flow mode – 1.0 ml/min. A mass calibration was conducted automatically in the Autotune mode using perfluorotributylamine (99.8%, Agilent Technologies) as a standard.

## 3. Results and discussion

The *T. tyrosinosolvens* strain PS2 demonstrated significant growth when cultivated with various carbon sources. The final cell concentration was  $10^8$  CFU/ml in the medium with the addition of sucrose,  $10^7$  CFU/ml in hexadecane, and  $10^7$  CFU/ml in solid paraffin. The strain was able to utilize hexadecane, which was reduced by 3.39 mg/ml in 8 days (Romanova et al., 2022). Furthermore, when cultivated on a medium with hexadecane, an increase in emulsifying activity and a decrease in the surface tension of the culture liquid

were observed, which indicates the ability of the strain to produce biological surfactants (biosurfactants).

When the strain was cultivated on a liquid mineral medium with hexadecane or with solid paraffin, cell adhesion to the hydrophobic substrate increased by 2.2-2.5 times compared to cells grown on a medium with sucrose. The high adhesion of cells to a hydrophobic substrate and the ability to produce biosurfactants enhance the efficiency of bioremediation of reservoirs contaminated with floating hydrocarbons and oils, since cells together with biosurfactants are concentrated in the contaminated zone (the surface film) and are not distributed throughout the entire thickness of water reservoir (Vaccari et al., 2017).

The results of gas chromatography indicated that alkanes with chain lengths ranging from C25 to C28 constituted a significant proportion of the composition of solid paraffin. However, when cultivated on a liquid mineral medium with solid paraffin was found that PS2 strain predominantly utilized alkanes with chain lengths C20 ( $61 \pm 4\%$ ), C21 ( $40 \pm 4\%$ ), C22 ( $25 \pm 5\%$ ) and C23 ( $14 \pm 4\%$ ) in 7 days. At the same time, the content of alkanes with a chain length of C24-C31 also decreased significantly, but to a lesser extent (from 6% to 13%) (Fig.). Probably solid alkanes with a low chain length are more actively metabolized due to their greater bioavailability in an aqueous culture medium. This is due to the fact that substances of this class are known to become more hydrophobic with increasing carbon chain length (Naether et al., 2013).

## 4. Conclusion

The *T. tyrosinosolvens* PS2 strain is able to metabolize a wide range of solid alkane mixture components, adapting to a new substrate by increasing the degree of lipophilicity of its surface, which facilitates for better contact with the hydrocarbon molecule.

Thus, the strain under investigation can be used in the remediation of contaminated aquatic ecosystems without the necessity of utilizing specialized floating sorbents or the introduction of additional biosurfactants.

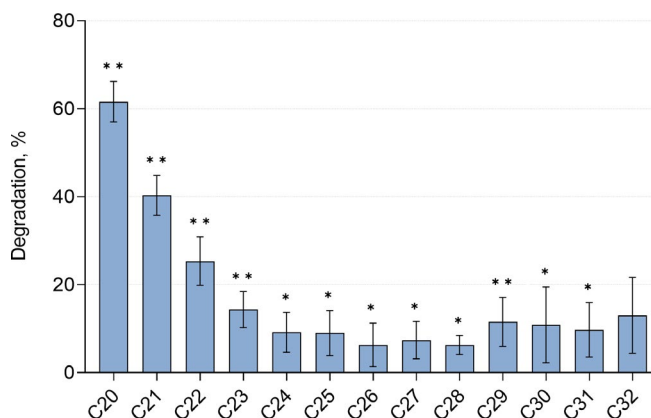


Fig. Biodegradation of solid paraffin by *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2 strain compared to control. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$

## 5. Funding

This research was funded by the subsidy allocated to the Kazan Federal University for the state research assignment (№ FZSM-2023-0013) and the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Alonso-Gutiérrez J., Teramoto M., Yamazoe A. et al. 2011. Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of applied microbiology* 111(4): 800–810. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x)
- Chen W., Li J., Sun X. et al. 2017. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 118: 110–118. DOI: [10.1016/j.ibiod.2017.01.029](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.029)
- Delegan Y.A., Valentovich L.N., Shafieva S.M. et al. 2019. Characterization and genomic analysis of highly efficient thermotolerant oil-degrading bacterium *Gordonia* sp. 1D. *Folia Microbiologica* 64: 41–48. DOI: [10.1007/s12223-018-0623-2](https://doi.org/10.1007/s12223-018-0623-2)
- Li Y.P., Pan J.C., Ma Y.L. 2020. Elucidation of multiple alkane hydroxylase systems in biodegradation of crude oil n-alkane pollution by *Pseudomonas aeruginosa* DN1. *Journal of applied microbiology* 128(1): 151–160. DOI: [10.1111/jam.14470](https://doi.org/10.1111/jam.14470)
- Naether D.J., Slawtschew S., Stasik S. et al. 2013. Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach. *Applied and environmental microbiology* 79(14): 4282–4293. DOI: [10.1128/AEM.00694-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00694-13)
- Phale P.S., Mahajan M.C., Vaidyanathan C.S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. *Archives of microbiology* 163: 42–47. DOI: [10.1007/BF00262202](https://doi.org/10.1007/BF00262202)
- Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11: 2477–2490. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x)
- Romanova V.A., Boulygina E.A., Siniagina M.N. et al. 2019. Draft genome sequence of a medium- and long-chain n-alkane-degrading bacterium, *Tsukamurella tyrosinosolvens* strain PS2, with two genetic systems for alkane degradation. *Microbiology Resource Announcement* 8: e00218-e219. DOI: [10.1128/MRA.00218-19](https://doi.org/10.1128/MRA.00218-19)
- Romanova V., Markelova M., Boulygina E. et al. 2022. Significance of both alkB and P450 alkane-degrading systems in *Tsukamurella tyrosinosolvens*: proteomic evidence. *Applied microbiology and biotechnology* 106(8): 3153–3171. DOI: [10.1007/s00253-022-11906-1](https://doi.org/10.1007/s00253-022-11906-1)
- Sakthipriya N., Doble M., Sangwai J.S. 2016. Influence of thermophilic *Bacillus subtilis* YB7 on the biodegradation of long chain paraffinic hydrocarbons (C 16 H 34 to C 36 H 74). *RSC Advances* 6: 82541–82552. DOI: [10.1039/C6RA18774A](https://doi.org/10.1039/C6RA18774A)
- Sotirova A., Spasova D., Vasileva-Tonkova E. et al. 2009. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research* 164(3): 297–303. DOI: [10.1016/j.micres.2007.01.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005)
- Vaccari L., Molaei M., Niepa T.H.R. et al. 2017. Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science* 247: 561–572. DOI: [10.1016/j.cis.2017.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.016)
- Xu H.X., Tang Y.Q., Nie Y. et al. 2022. Comparative transcriptome analysis reveals different adaptation mechanisms for degradation of very long-chain and normal long-chain alkanes in *Dietzia* sp. DQ12-45-1b. *Environmental microbiology* 24(4): 1932–1945. DOI: [10.1111/1462-2920.15928](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15928)
- Zaki M.S., Mohammad A.M.N., Abbas H.H.H. 2015. Bioremediation of petroleum contaminants in aquatic environments (Review Article). *Life Science Journal* 12(5): 109-121.
- Zhang Y., Miller R.M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2101-2106.



# Потенциал биоремедиации загрязненных углеводородами водоемов представителем алкан-окисляющих актинобактерий



Романова В.А.\*, Куприянова О.В., Григорьева Т.В., Лайков А.В.

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Загрязнение водоемов нефтью и ее компонентами распространено в нефтедобывающих и промышленно развитых странах мира. Высокомолекулярные алканы находятся в твердом состоянии при комнатной температуре, составляют значительную часть нефти и проявляют устойчивость к разложению при попадании в окружающую среду. Биоремедиация является наиболее перспективной технологией очистки водных экосистем, загрязненных углеводородами, вследствие своей экологической безопасности и экономической эффективности. В данной статье приводятся данные о потенциале биоремедиации загрязненных углеводородами объектов алкан-окисляющей бактерией *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2. Штамм PS2 выделен из нефтехимических отходов как деструктор алканов и показал значительный рост до  $10^7$  КОЕ/мл при культивировании на минеральной среде с твердым парафином в качестве единственного источника углерода и энергии. Было установлено, что штамм PS2 имеет высокую адгезию к жидким и твердым алканам, по сравнению с клетками, выращенными на среде с сахарозой. Оценена степень разложения твердого парафина с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии и обнаружено, что штамм PS2 метаболизирует алканы с длиной цепи C20-C31 за 7 суток с различной эффективностью. Результаты этого исследования расширяют сферу применения штамма *T. tyrosinosolvens* PS2 для биоремедиации объектов, загрязненных сложными смесями углеводородов.

**Ключевые слова:** биоремедиация, алкан-окисляющие бактерии, актинобактерии, алканы, газовая хроматография, твердый парафин

Для цитирования: Романова В.А., Куприянова О.В., Григорьева Т.В., Лайков А.В. Потенциал биоремедиации загрязненных углеводородами водоемов представителем алкан-окисляющих актинобактерий // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1066-1071. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-1066](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-1066)

## 1. Введение

Выбросы нефти в водоемы, происходящие в результате нарушения функционирования предприятий и инфраструктуры по добыче, транспортировки и переработки нефти, приводят к серьезному экологическому ущербу (Chen et al., 2017; Deegan et al., 2019). Вред получают все группы живых организмов, включая флору и фауну водоемов, а также наблюдаются изменения в микробном сообществе, приводящие к нарушению его трофической функции и дезинтеграции биогеохимических циклов (Zaki et al., 2015).

Значительной компонентной частью нефти являются алканы (Alonso-Gutierrez et al., 2011). И если низкомолекулярные алканы, жидкие в стандартных условиях, могут подвергаться абиотиче-

ской трансформации и биологической деградации широким спектром микроорганизмов (Rojo, 2009), то высокомолекулярные парафины представляют более серьезную проблему. Твердые при стандартных условиях, данные соединения могут накапливаться в водных организмах и приводить к хроническому загрязнению (Sakthipriya et al., 2016).

В условиях загрязнения больших площадей поверхности водоемов нефтью и углеводородами наиболее экономически обоснованным способом очистки является биоремедиация (Li et al., 2020; Xu et al., 2022). Данная технология основана на способности микроорганизмов трансформировать и минерализовывать широкий спектр органических поллютантов, удовлетворяя таким образом свои потребности в энергии и углероде (Rojo, 2009). Широкие метаболические возможности микроор-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [avonamora-94@mail.ru](mailto:avonamora-94@mail.ru) (В.А. Романова)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



ганизмов позволяют создавать биопрепараты, действенные в самых неблагоприятных условиях – от низких температур до высокого осмотического давления и сопутствующего загрязнения тяжелыми металлами.

Из нефтехимических отходов нами выделен штамм *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 (Romanova et al., 2019), и продемонстрирована его способность к утилизации алканов со средней длиной цепи (Romanova et al., 2022). Целью настоящей работы являлась оценка потенциала выделенного штамма к утилизации твердых алканов в совокупности с иными биотехнологически ценными свойствами, таким как изменение гидрофобности клеток.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Культивирование штамма *T. tyrosinosolvans* PS2 в разных условиях

Штамм PS2 выращивали на жидкой минеральной среде MS в течение 7 суток (г/л: 1.0 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.25 –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3.0 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4.5 –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Phale et al., 1995)) с добавлением различных источников углерода: сахарозы (10 г/л), гексадекан (4% об.) или твердый парафин (10 г/л). Начальный засев клеток штамма составлял  $10^6$  КОЕ/мл. Количество клеток в суспензии определяли высевом серийных разведений на среду LB (г/л: 10 – триптон; 5 – дрожжевой экстракт; 5 – NaCl; 20 – агар-агар).

### 2.2. Оценка адгезии клеток штамма *T. tyrosinosolvans* PS2 к углеводородам

Для определения бактериальной адгезии к углеводородам, клетки штамма центрифугировали и промывали два раза средой MS. Далее смешивали равные объемы суспензии клеток с OD = 1 с гексадеканом, встряхивали в течение 60 сек, оставляли для разделения фаз на 30 мин. После разделения измеряли оптическую плотность гексадекановой фазы при длине волны  $\lambda = 400$  нм с помощью спектрофотометра xMark (Bio-Rad, США) (Zhang and Miller, 1994; Sotirova et al., 2009).

### 2.3. Определение убыли углеводородов методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии

Биодеградацию твердого парафина штаммом PS2 анализировали с помощью газового хроматографа «Agilent Technologies 7890B GC System» (США), совмещенного с масс-селективным детектором (ГХ-МС) после экстракции гексаном. Для анализа использовалась капиллярная кварцевая колонка HP-5MS (длина 30 м, диаметр 0.25 мм, толщина пленки фазы 0.25 мкм) с химически привитой фазой 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан. Условия проведения ГХ-МС были следующими: температура испарителя хроматографа - 280°C; температура интерфейса детектора - 280°C; газ-носитель

– гелий, режим постоянного потока – 1.0 мл/мин. Калибровка по массе осуществлялась автоматически в режиме «Автонастройка», используя перфтортрибутиламин (99.8%, Agilent Technologies) в качестве стандарта.

## 3. Результаты и обсуждение

Штамм *T. tyrosinosolvans* PS2 показал значительный рост при культивировании с разными источниками углерода. На среде с добавлением сахарозы конечная концентрация клеток составляла  $10^8$  КОЕ/мл, для гексадекана –  $10^7$  КОЕ/мл, для твердого парафина –  $10^7$  КОЕ/мл. Штамм способен утилизировать гексадекан, снижая концентрацию на 3.39 мг/мл за 8 дней (Romanova et al., 2022). Также, при культивировании на среде с гексадеканом наблюдали увеличение эмульгирующей активности и снижение поверхностного натяжения культуральной жидкости, что свидетельствует о способности штамма продуцировать биологические поверхностно-активные вещества (биоПАВ).

При культивировании штамма на жидкой минеральной среде как с гексадеканом, так и с твердым парафином адгезия клеток к гидрофобному субстрату увеличивалась в 2.2-2.5 раз, по сравнению с клетками, выращенными на среде с сахарозой. Высокая адгезия клеток к гидрофобному субстрату и способность к продукции биоПАВ повышает эффективность биоремедиации загрязненных всплывающими углеводородами и маслами водоемов, поскольку клетки вместе с синтезированными биоПАВ концентрируются в загрязненной зоне - поверхностной пленке, и не распределяются по всей толще водоема (Vaccari et al., 2017).

По результатам газовой хроматографии было обнаружено, что алканы с длиной цепи от C25 до C28 вносят значительный вклад в состав твердого парафина. Однако, при культивировании на жидкой минеральной среде с твердым парафином, штамм PS2 утилизировал преимущественно алканы с длиной цепи C20 ( $61 \pm 4\%$ ), C21 ( $40 \pm 4\%$ ), C22 ( $25 \pm 5\%$ ) и C23 ( $14 \pm 4\%$ ) за 7 суток. При этом содержание алканов с длиной цепи C24-C31 также достоверно снижалось, но в меньшей степени (от 6% до 13%) (Рис.). Вероятно, твердые алканы с низкой длиной

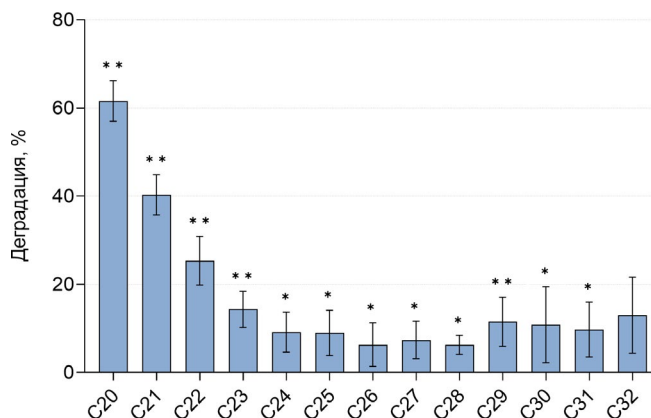


Рис. Биодеградация твердого парафина штаммом *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 по сравнению с контролем. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$

цепи активнее метаболизируются вследствие их большей биодоступности в водной среде культивирования, поскольку известно, что вещества данного класса становятся более гидрофобными с увеличением длины углеродной цепи (Naether et al., 2013).

#### 4. Заключение

Штамм *T. tyrosinosolvans* PS2 способен метаболизировать широкий спектр компонентов смеси твердых алканов, адаптируясь к новому субстрату путем увеличения степени липофильности своей поверхности для лучшего контакта с углеводородной молекулой.

Таким образом, исследуемый штамм может быть использован в очистке загрязненных водоемов без применения специальных всплывающих сорбентов и без внесения дополнительных биоПАВ.

#### 5. Финансирование

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Приоритет-2030) и в рамках выполнения проекта № FZSM-2023-0013 государственного задания КФУ.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

Alonso-Gutiérrez J., Teramoto M., Yamazoe A. et al. 2011. Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. HOB, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of applied microbiology* 111(4): 800–810. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x)

Chen W., Li J., Sun X. et al. 2017. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 118: 110–118. DOI: [10.1016/j.ibiod.2017.01.029](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.029)

Delegan Y.A., Valentovich L.N., Shafieva S.M. et al. 2019. Characterization and genomic analysis of highly efficient thermotolerant oil-degrading bacterium *Gordonia* sp. 1D. *Folia Microbiologica* 64: 41–48. DOI: [10.1007/s12223-018-0623-2](https://doi.org/10.1007/s12223-018-0623-2)

Li Y.P., Pan J.C., Ma Y.L. 2020. Elucidation of multiple alkane hydroxylase systems in biodegradation of crude oil n-alkane pollution by *Pseudomonas aeruginosa* DN1. *Journal of applied microbiology* 128(1): 151–160. DOI: [10.1111/jam.14470](https://doi.org/10.1111/jam.14470)

Naether D.J., Slawtschew S., Stasik S. et al. 2013. Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach. *Applied and environmental microbiology* 79(14): 4282–4293. DOI: [10.1128/AEM.00694-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00694-13)

Phale P.S., Mahajan M.C., Vaidyanathan C.S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. *Archives of microbiology* 163: 42–47. DOI: [10.1007/BF00262202](https://doi.org/10.1007/BF00262202)

Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11: 2477–2490. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x)

Romanova V.A., Boulygina E.A., Siniagina M.N. et al. 2019. Draft genome sequence of a medium- and long-chain n-alkane-degrading bacterium, *Tsukamurella tyrosinosolvans* strain PS2, with two genetic systems for alkane degradation. *Microbiology Resource Announcement* 8: e00218-e219. DOI: [10.1128/MRA.00218-19](https://doi.org/10.1128/MRA.00218-19)

Romanova V., Markelova M., Boulygina E. et al. 2022. Significance of both alkB and P450 alkane-degrading systems in *Tsukamurella tyrosinosolvans*: proteomic evidence. *Applied microbiology and biotechnology* 106(8): 3153–3171. DOI: [10.1007/s00253-022-11906-1](https://doi.org/10.1007/s00253-022-11906-1)

Sakthipriya N., Doble M., Sangwai J.S. 2016. Influence of thermophilic *Bacillus subtilis* YB7 on the biodegradation of long chain paraffinic hydrocarbons (C 16 H 34 to C 36 H 74). *RSC Advances* 6: 82541–82552. DOI: [10.1039/C6RA18774A](https://doi.org/10.1039/C6RA18774A)

Sotirova A., Spasova D., Vasileva-Tonkova E. et al. 2009. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research* 164(3): 297–303. DOI: [10.1016/j.micres.2007.01.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005)

Vaccari L., Molaei M., Niepa T.H.R. et al. 2017. Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science* 247: 561–572. DOI: [10.1016/j.cis.2017.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.016)

Xu H.X., Tang Y.Q., Nie Y. et al. 2022. Comparative transcriptome analysis reveals different adaptation mechanisms for degradation of very long-chain and normal long-chain alkanes in *Dietzia* sp. DQ12-45-1b. *Environmental Microbiology* 24(4): 1932–1945. DOI: [10.1111/1462-2920.15928](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15928)

Zaki M.S., Mohammad A.M.N., Abbas H.H.H. 2015. Bioremediation of petroleum contaminants in aquatic environments (Review Article). *Life Science Journal* 12(5): 109-121.

Zhang Y., Miller R.M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2101-2106.

# Search for bacteria capable of biodegradation of microcystins in Lake Baikal using molecular-biological technologies

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Rymareva E.A.<sup>1\*</sup>, Tikhonova I.V.<sup>1</sup>, Sorokovikova E.G.<sup>1</sup>, Kan G.V.<sup>1</sup>, Suslova M. Yu.<sup>1</sup>, Potapov S.A.<sup>1</sup>, Krasnopeev A.Yu.<sup>1</sup>, Gutnik D.I.<sup>1</sup>, Gorshkova A.S.<sup>1</sup>, Lipko I.A.<sup>1</sup>, Gladkikh A.S.<sup>2</sup>, Belykh O.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Pasteur St. Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology Rospotrebnadzor, St. Petersburg, Russia

**ABSTRACT.** In aquatic ecosystems, biodegradation of microcystins is the main route of elimination and detoxification. In this study, we discuss the ability of bacterioplankton of lakes Baikal, Doroninskoye, Gusinoye to degrade cyclic microcystin molecule. PCR analysis showed the absence of the key enzyme microcystinase *mlrA* for *mlr*-pathway. At the same time, metagenomic analysis of a community of the toxic cyanobacterium *Tychonema sp.* BBK16 revealed the presence of the *mlrC* gene responsible for cleavage of microcystin molecule linear residues. In addition, all bacteria-symbionts of cyanobacteria contain glutathione transferases - enzymes involved in nonspecific degradation of lipophilic toxic substances, which also include microcystins.

**Keywords:** bacterioplankton, cyanobacteria, microcystin, PCR, high-throughput sequencing

**For citation:** Rymareva E.A., Tikhonova I.V., Sorokovikova E.G., Kan G.V., Suslova M.Yu., Potapov S.A., Krasnopeev A.Yu., Gutnik D.I., Gorshkova A.S., Lipko I.A., Gladkikh A.S., Belykh O.I. Search for bacteria capable of biodegradation of microcystins in Lake Baikal using molecular-biological technologies // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1072-1078. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1072

## 1. Introduction

Massive development of cyanobacteria in water bodies is accompanied by the release of various toxic metabolites. The most common are microcystins, cyclic heptapeptides consisting of 7 amino acids: Cyclo-(D-Ala-X-D-D-MeAsp-Z-Adda-D-GluMdhA), where D-Ala is D-alanine, D is MeAsp-D-erythro- $\beta$ -methylaspartic acid, Adda is 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, D-Glu - D-glutamate, MdhA - N-methyldehydroalanine, X and Z - variable L-amino acids. More than 279 variants of microcystins have been discovered today (Bouaïcha et al., 2019). Due to their cyclic structure, microcystins are very stable and able to accumulate in the ecosystem (Massey and Yang, 2020; WHO, 2020). Since the quality of water is a global problem, there is a constant search for means to purify water from cyanobacteria toxins. Physical methods are usually associated with high cost, while chemical treatments need accurate calculations of reagent dosages. Biodegradation is the gentlest way to destroy microcystins in aquatic ecosystems, but it requires detailed study. The simplest way

to treat water by biodegradation is filtration through a sand filter containing native bacteria (Bourne et al., 2006; Salter et al., 2021). The bacterial taxa involved in microcystin degradation belong to three bacterial phyla: Actinobacteria, Pseudomonadota, and Bacillota (Pal et al., 2021; Zhang et al., 2011; Bourne et al., 1996). One of the microcystin degradation pathways is associated with the *mlrABCD* gene cluster, which encodes three hydrolysis enzymes, *mlrA* microcystinase, peptidases of linear microcystin residues, and an oligopeptide transfer protein. The first step involves disruption of the cyclic structure by breaking the Arg-Adda bond. Under the influence of the second enzyme, encoded by the *mlrB* gene, the linear peptide is degraded to a tetrapeptide to form the fragment ADDA-Glu-MdhA-Ala. The enzyme *mlrC* cleaves the tetrapeptide, releasing the amino acid Adda. The *mlrD* gene encodes a transporter protein that transfers microcystin and its degradation products into bacterial cells (He et al., 2022; Schmidt et al., 2014; Yuan et al., 2021). This degradation pathway generally takes place in eutrophic water bodies (Dexter et al., 2021). However, it has been shown in experiments that microcystin can be efficiently removed

\*Corresponding author.

E-mail address: [iren@lin.irk.ru](mailto:iren@lin.irk.ru) (I.V. Tikhonova)

**Received:** August 02, 2024; **Accepted:** August 16, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





in the absence of microcystinase (Salter et al., 2021, Salter et al., 2023). The glutathione pathway of microcystin detoxification is carried out by the enzyme glutathione-S-transferase (Krausfeldt et al., 2019, Liu et al., 2024). Glutathione transferases (*gst*; EC 2.5.1.18) belong to the drug metabolism category in the KEGG database and are involved in the detoxification of lipophilic toxins via nucleophilic attack. They are engaged in cellular defense against oxidative stress in all aerobic bacteria (Allocati et al., 2009). During degradation of microcystin-LR, glutathione binds to the amino acid Mdha to form a microcystin-LR-glutathione conjugate. Further, gamma-glutamic acid is cleaved from the resulting compound. The formed microcystin-LR-cysteine-glycine conjugate undergoes the dipeptidase effect and then it is oxidized by acetyltransferase to microcystin-LR-mercaptopuronic acid (Schmidt et al., 2014).

The deep-water oligotrophic Lake Baikal has mesotrophic areas in the coastal zone and shallow bays where toxic cyanobacteria blooms are observed in summer. Also, cyanobacterial blooms are observed in lakes Gusinoye and Doroninskoye. Microcystins were previously found in the water of lakes Baikal and Kotokel (Belykh et al., 2011, Belykh et al., 2015). The aim of our work is to search for microcystin-degradating bacteria in Lake Baikal and other water bodies using PCR and high-throughput sequencing.

## 2. Materials and methods

PCR analysis was performed using 150 DNA templates from plankton samples (Lake Baikal, Lake Doroninskoye, and Lake Gusinoye) and from bacterial cultures isolated from plankton, benthos and bottom water of Lake Baikal. The *mlrA* key enzyme was searched using the primers *mlrAtf/mlrAtr* (Zhang et al., 2017). Sequencing of the obtained PCR fragments was performed on a genetic analyzer Nanofor 05 (Syntol, Russia).

Bioinformatic search for enzymes capable of degrading microcystin was performed in the DNA of the non-axenic culture of microcystin-producing *Tychonema* BBK16. The methodology for analyzing the genome of a cyanobacterium enriched with genomes of satellite bacteria has been described previously (Krasnopeev et al., 2023). Genes matching the sequences responsible for microcystin degradation were extracted from the assembled bins of bacterial symbionts using a blast search in the GenBank database. Additionally, a repeated, but already “reverse” search was performed based on the extracted complete genes in the whole assembly, not separated into bins. Glutathione transferases were determined by KEGG annotation using the BlastKOALA service (<https://www.kegg.jp/blastkoala>).

## 3. Results

PCR analysis with primers to microcystinase detected fragments of about 700, 800 and 1000 bp in length, but sequence determination revealed that they were products of nonspecific amplification. Thus, the key microcystin degradation enzyme *mlrA* was not

detected either in water or in the isolated bacterial strains.

In symbiont bacteria of the strain *Tychonema* sp. BBK16 a fragment of the *mrlC* gene was detected in the *Aminobacter* bin. It was present in multiple copies in the *Aminobacter* bins and matched the microcystin-degrading genes of the organisms *Mesorhizobium* sp. 113-3-3 (microcystinase C, similarity 87.4%), *Aminobacter aminovorans* KCTC 2477 (*mlrC* C-terminus family protein, similarity 87.4%), *Mesorhizobium loti* (Microcystin LR degradation protein *mlrC* CDS, similarity 87%), *Aminobacter* sp. NyZ550 (M81 family metallopeptidase, similarity 90%).

Glutathione transferases were present in all symbiont bacteria of the strain *Tychonema* sp. BBK16, indicating aerobic metabolism of these bacteria. Increased copy number of *gst* gene vary from 2 to 4 per genome/bin of *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, and *Sphingomonas*.

## 4. Discussion

Degradation of microcystins by *mlr* pathway has been described in many eutrophic water bodies, but it is not the only way of destruction. It is possible that in Baikal, Doroninskoye and Gusinoye lakes microcystinase *mlrA* is not detected from the mismatch in primer structure. However, the ability to reduce microcystin concentrations in the absence of *mlr* genes was found in oligo-mesotrophic Lake Erie blooms (Mou et al., 2013; Krausfeldt et al., 2019; Thees et al., 2019). As a deep-water oligotrophic lake with well-warmed shallow areas, Baikal is similar to Lake Erie in having a pronounced warm summer period with cyanobacterial blooms. We hypothesized that, as in Erie, the explored bacteria have a different mechanism of microcystin detoxification. The mechanism of glutathione-transferase modification is universal and widely used by bacteria. Baikal microorganisms - symbionts of toxic cyanobacteria have enzymes of the glutathione pathway, which makes this pathway potentially possible. Moreover, it is energetically advantageous to use enzymes of the glutathione cycle, as they are a universal defense against stress. The presence of the *mlr*-cluster enzyme, *mlrC*, in a bacterial genome derived from a toxic cyanobacterium community may indicate involvement in microcystin degradation, but it is necessary to determine the first step in the degradation of the cyclic microcystin molecule and whether degradation can proceed by a combination of glutathione cycle enzymes and *mrl* enzymes. It should be noted that metagenomic assembly of bacterial genomes can only suggest bacterial abilities. Accurate genome characterization requires isolation of a pure culture of *Aminobacter*. It is also necessary to carry out experiments with bacterioplankton and bacterial cultures with analytical determination of toxic peptide fragments.

## 5. Conclusions

DNA analysis of plankton from lakes Baikal, Doroninskoye, and Gusinoye, as well as bacterial cultures, showed the absence of the gene *mrlA* which is

the key enzyme of the selective degradation pathway. Perhaps there are bacteria containing the *mlrABCD* gene cluster, but the primers we used are not suitable for amplification.

Symbiotic bacteria of the microcystin-producing cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 contain glutathione transferase enzymes in their genome that protect them from toxic metabolites and oxidative stress. Genome assemblies belonging to the bacteria *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, and *Sphingomonas* have multiple copies of this gene, suggesting that these particular bacteria actively utilize these enzymes for detoxification. The bacterium *Aminobacter* was also found to contain fragments of the *mrlC* gene and is presumably involved in the degradation of linear microcystin residues after the first steps of degradation of the toxic peptide's cyclic structure are realized. In such a way, in order to fully understand the mechanisms of microcystin degradation in Lake Baikal, it is necessary to conduct experiments to determine what changes cyanotoxins undergo under the action of bacterioplankton and bacterial cultures.

## Acknowledgements

The study was funded by the state assignment № 0279-2021-0015. This study was carried out in Instrumental Center “Ultramicroanalysis” (sequencing) and “Experimental Freshwater Aquarium Complex for Baikal Hydrobionts” (cyanobacteria and bacteria cultivating). Bioinformatics analysis was performed on the supercomputer LIN SB RAS. The authors thank the crews of the research vessels “Titov”, “Koptyug”, “Vereshchagin”, “Papanin” for plankton and benthos sampling in Lake Baikal.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Allocati N., Federici L., Masulli M. et al. 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal* 276: 58–75. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2008.06743](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743)
- Belykh O., Sorokovikova E., Fedorova G. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Belykh O., Gladkikh A., Sorokovikova E. et al. 2015. Identification of toxic cyanobacteria in Lake Baikal. Reports of the Academy of Sciences 463(3): 353. DOI: [10.7868/S0869565215210227](https://doi.org/10.7868/S0869565215210227)
- Bouaïcha N., Miles C.O., Beach D.G. et al. 2019. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins* 11(12): 714. DOI: [10.3390/toxins11120714](https://doi.org/10.3390/toxins11120714)
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L. et al. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied Environmental Microbiology* 62(11): 4086-4094. DOI: [10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996)
- Bourne D.G., Blakeley R.L., Riddles P. et al. 2006. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Resources* 40(6): 1294-1302. DOI: [10.1016/j.watres.2006.01.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.022)
- Dexter J., McCormick A.J., Fu P. et al. 2021. Microcystinase - a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA. *Water Resources* 189: 116646. DOI: [10.1016/j.watres.2020.116646](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116646)
- He Q., Wang W., Xu Q. et al. 2022. Microcystins in water: detection, microbial degradation strategies, and mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(20): 13175. DOI: [10.3390/ijerph192013175](https://doi.org/10.3390/ijerph192013175)
- Krasnopeev A.Y., Tikhonova I.V., Podlesnaya G.V. et al. 2023. Diversity of bacteria and their metabolic pathways in a non-axenic culture of *Tychonema* sp. BBK16. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 229-243. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-229](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-229)
- Krausfeldt L.E., Steffen M.M., McKay R.M. et al. 2019. Insight into the molecular mechanisms for microcystin miodegradation in Lake Erie and Lake Taihu. *Frontiers in Microbiology* 10: 2741. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02741](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02741)
- Liu B.-L., Yu P.-F., Guo J.-J. et al. 2024. Congener-specific fate and impact of microcystins in the soil-earthworm system. *Journal of Hazardous Materials* 471: 134439. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2024.134439](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134439)
- Massey I.Y., Yang F. 2020. A mini review on microcystins and bacterial degradation. *Toxins* 12(4): 268. DOI: [10.3390/toxins12040268](https://doi.org/10.3390/toxins12040268)
- Mou X., Lu X., Jacob J. et al. 2013. Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie. *PLoS One* 8(4): e61890. DOI: [10.1371/journal.pone.0061890](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061890)
- Pal M., Purohit H.J., Qureshi A. 2021. Genomic insight for algicidal activity in *Rhizobium* strain AQ\_MP. *Archives of Microbiology* 203(8): 5193-5203. DOI: [10.1007/s00203-021-02496-z](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02496-z)
- Salter C., VanMensel D., Reid T. et al. 2021. Investigating the microbial dynamics of microcystin-LR degradation in Lake Erie sand. *Chemosphere* 272: 129873. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2021.129873](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129873)
- Salter C., Westrick J.A., Chaganti S.R. et al. 2023. Elucidating microbial mechanisms of microcystin-LR degradation in Lake Erie beach sand through metabolomics and metatranscriptomics. *Water Resources* 247: 120816. DOI: [10.1016/j.watres.2023.120816](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120816)
- Schmidt J.R., Wilhelm S.W., Boyer G.L. 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. *Toxins* 6(12): 3354-3387. DOI: [10.3390/toxins6123354](https://doi.org/10.3390/toxins6123354)
- Thees A., Atari E., Birbeck J. et al. 2019. Isolation and characterization of Lake Erie bacteria that degrade the cyanobacterial microcystin toxin MC-LR. *Journal of Great Lakes Research* 45(1): 138-149. DOI: [10.1016/j.jglr.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.10.013)
- WHO. 2020. Cyanobacterial toxins: microcystins. Guidelines for drinking-water quality and guidelines for safe recreational water environments. WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6. World Health Organization. Switzerland: Geneva. p. 55
- Yuan M., Ding Q., Sun R. et al. 2021. Biodegradation of nodularin by a microcystin-degrading bacterium: performance, degradation pathway, and potential application. *Toxins* 13(11): 813. DOI: [10.3390/toxins13110813](https://doi.org/10.3390/toxins13110813)
- Zhang H., Huang Q., Yu Z. et al. 2011. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologia* 41 (1): 70-77.
- Zhang J., Lu Q., Ding Q. et al. 2017. A novel and native microcystin-degrading bacterium of *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Taihu. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(10): 1187. DOI: [10.3390/ijerph14101187](https://doi.org/10.3390/ijerph14101187)

# Поиск бактерий, способных к биодegradации микроцистинов в озере Байкал, с помощью молекулярно-биологических технологий

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Рымарева Е.А.<sup>1\*</sup>, Тихонова И.В.<sup>1</sup>, Сороковикова Е.Г.<sup>1</sup>, Кан Г.В.<sup>1</sup>, Сулова М.Ю.<sup>1</sup>, Потапов С.А.<sup>1</sup>, Краснопеев А.Ю.<sup>1</sup>, Гутник Д.И.<sup>1</sup>, Горшкова А.С.<sup>1</sup>, Липко И.А.<sup>1</sup>, Гладких А.С.<sup>2</sup>, Белых О.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В работе обсуждаются возможности бактериопланктона озер Байкал, Доронинское, Гусиное разрушать циклическую молекулу микроцистина. ПЦР-анализ показал отсутствие ключевого фермента *mlr*-пути – микроцистиназы *mlrA*. Однако анализ метагеномной сборки сообщества культуры токсичной цианобактерии *Tychoneta* sp. ВВК16 выявил присутствие гена *mlrC*, ответственного за расщепление линейных остатков молекулы микроцистина. Выявлено, что бактерии-спутники токсичной цианобактерии содержат глутатион-трансферазы, являющиеся ферментами неспецифической деструкции липофильных токсичных веществ, к которым также относятся микроцистины.

**Ключевые слова:** бактериопланктон, цианобактерии, микроцистин, ПЦР, высокопроизводительное секвенирование

**Для цитирования:** Рымарева Е.А., Тихонова И.В., Сороковикова Е.Г., Кан Г.В., Сулова М.Ю., Потапов С.А., Краснопеев А.Ю., Гутник Д.И., Горшкова А.С., Липко И.А., Гладких А.С., Белых О.И. Поиск бактерий, способных к биодegradации микроцистинов в озере Байкал, с помощью молекулярно-биологических технологий // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1072-1078. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1072

## 1. Введение

Массовое развитие цианобактерий в водоемах сопровождается выделением различных токсичных метаболитов в воду. Наиболее распространенными являются микроцистины - циклические гептапептиды, состоящие из 7 аминокислот: цикло-(D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-GluMdh), где D-Ala – D-аланин, D – MeAsp-D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, Adda – 3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота, D-Glu – D-глутамат, Mdh – N-метилдегидроаланин, X и Z – переменные L-аминокислоты. К настоящему времени обнаружено более 279 вариантов микроцистинов (Bouaïcha et al., 2019). Благодаря своей циклической структуре, микроцистины очень стабильны и способны существовать и накапливаться в экосистеме (Massey and Yang, 2020; WHO, 2020). Так как проблема качества воды является глобальной, постоянно ведутся поиски средств очистки

воды от токсинов цианобактерий. Недостатками предложенных способов является высокая стоимость (в случае физических методов) и необходимость расчета дозировок и очистки от реагентов (химические методы). Биодegradация является наиболее мягким путем разрушения микроцистинов в водных экосистемах, однако она требует подробного изучения. Наиболее простым способом очистки воды с помощью биодegradации является фильтрация через песочный фильтр, содержащий нативные бактерии (Bourne et al., 2006; Salter et al., 2021). Таксоны бактерий, участвующие в расщеплении микроцистина, принадлежат трем бактериальным филумам: Actinobacteria, Pseudomonadota, and Bacillota (Bourne et al., 1996; Zhang et al., 2011; Pal et al., 2021). Один из изученных путей разложения микроцистинов связан с кластером генов *mlr*ABCD, который кодирует три фермента гидролиза – микроцистиназу *mlrA*, пептидазы линейных остатков микроцистина и белок-переносчик олиго-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [iren@lin.irk.ru](mailto:iren@lin.irk.ru) (И.В. Тихонова)

Поступила: 02 августа 2024; Принята: 16 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





пептидов. На первом этапе происходит разрушение циклической структуры путем разрушения связи Arg-Adda. Полученный линейный продукт разлагается до тетрапептида вторым ферментом, кодируемым геном *mlrB*. При этом происходит гидролиз связей аланин-лейцин и образуется пептидный промежуточный продукт ADDA-Glu-Mdha-Ala. Фермент *mlrC* расщепляет тетрапептид, высвобождая аминокислоту Adda. Ген *mlrD* кодирует белок-транспортер, который осуществляет транспорт микроцистина и продуктов его деградации в бактериальные клетки (Schmidt et al., 2014; Yuan et al., 2021; He et al., 2022). Этот путь деградации реализуется в эвтрофных водоемах (Dexter et al., 2021). Однако в экспериментах показано, что микроцистин может эффективно удаляться в отсутствие микроцистиназы (Salter et al., 2021, Salter et al., 2023). Альтернативный глутатионовый путь детоксикации токсичных веществ осуществляется ферментом глутатион-S-трансфераза (Krausfeldt et al., 2019, Liu et al., 2024). Глутатионтрансферазы (GST; EC 2.5.1.18) в базе данных KEGG находятся в категории Drug metabolism и участвуют в детоксикации липофильных токсинов посредством нуклеофильной атаки. Они участвуют в защите клеток от окислительного стресса у всех аэробных бактерий (Allocati et al., 2009). При деградации микроцистина-LR, глутатион связывается с аминокислотой Mdha с образованием конъюгата микроцистин-LR-глутатион. Далее от полученного соединения отщепляется гамма-глутаминовая кислота и образовавшийся конъюгат микроцистин-LR-цистеин-глицин, подвергается сначала действию дипептидазы, а после окисляется ацетилтрансферазой до микроцистин-LR-меркаптуроновой кислоты (Schmidt et al., 2014).

В глубоководном олиготрофном озере Байкал в прибрежной зоне и мелководных заливах присутствуют мезотрофные участки, где летом наблюдается цветение токсичных цианобактерий. Также, цианобактериальные цветения отмечаются в озерах Котокель, Гусиное и Доронинское. Ранее микроцистины обнаружены в воде озер Байкал и Котокель (Belykh et al., 2011, Belykh et al., 2015). Цель нашей работы – поиск бактерий-деструкторов микроцистина в озере Байкал и других водоемах, с помощью ПЦР и высокопроизводительного секвенирования.

## 2. Материалы и методы

Для ПЦР-анализа использовали 150 образцов ДНК, выделенной из образцов планктона озер Байкал, Доронинское, Гусиное, а также ДНК культур бактерий, изолированных из планктона, бентоса и придонной воды озера Байкал. Поиск ключевого фермента специфического пути деградации *mlrA* вели с помощью праймеров *mlrAtf/mlrAtr* (Zhang et al., 2017). Секвенирование полученных фрагментов ПЦР выполнено на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия).

Биоинформатический поиск ферментов, способных разрушать микроцистин, проводили в геномной ДНК неаксеничной культуры *Tychonema*

sp. ВВК16, синтезирующей микроцистин. Методика анализа генома цианобактерии, обогащенного геномами бактерий-спутников, описана ранее (Краснопеев и др., 2023). Собранные бины бактерий-симбионтов использовали для извлечения генов, которые совпали при поиске в базе GenBank с последовательностями генов, отвечающих за деградацию микроцистинов. Дополнительно осуществляли повторный, но уже «обратный» поиск на основе извлеченных полных генов в полной сборке, не разбитой на бины. Глутатион-трансферазы определены аннотацией по KEGG с помощью сервиса BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala>).

## 3. Результаты

При ПЦР-анализе с праймерами к микроцистиназе обнаружены фрагменты длиной около 700, 800 и 1000 п.н., однако при определении последовательностей выявлено, что они являются продуктами неспецифичной амплификации. Таким образом, ключевого фермента деструкции микроцистина *mlrA* не обнаружено ни в воде, ни в выделенных штаммах бактерий.

У бактерий-симбионтов штамма *Tychonema* sp. ВВК16 обнаружены фрагменты гена *mlrC* у бина *Aminobacter*. В бинах *Aminobacter* они присутствовали в нескольких копиях и совпадали с микроцистин-деградирующими генами организмов *Mesorhizobium* sp. 113-3-3 (microcystinase C, сходство 87.4%), *Aminobacter aminovorans* KCTC 2477 (*mlrC* C-terminus family protein, сходство 87.4%), *Mesorhizobium loti* (Microcystin LR degradation protein *mlrC* CDS, сходство 87%), *Aminobacter* sp. NyZ550 (M81 family metalloproteinase, сходство 90%).

Глутатион-трансферазы присутствовали у всех бактерий-спутников штамма *Tychonema* sp. ВВК16, что говорит о том, что они аэробные микроорганизмы. В бинах бактерий *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, *Sphingomonas* копияность этих генов составляла от 2 до 4 копий на геном.

## 4. Обсуждение

Деградация микроцистинов ферментами *mlrABCD* кластера описана во многих эвтрофных водоемах, однако она не является единственным путем деструкции. Возможно, в Байкале, Доронинском и Гусином озере микроцистиназа *mlrA* не обнаружена из-за несовпадения структуры праймеров. При цветении олиго-мезотрофного озера Эри концентрация микроцистина в воде снижалась в отсутствие активности *mlr* генов (Mou et al., 2013; Krausfeldt et al., 2019; Thees et al., 2019). Являясь глубоководным олиготрофным озером с хорошо прогреваемыми мелководными участками, Байкал сходен с озером Эри наличием ярко выраженного теплого летнего периода с цветениями цианобактерий. Возможно, как и в озере Эри, в исследуемых нами озерах другой механизм детоксикации микроцистина. Механизм работы глутатион-трансферазы универсальный и широко используется бактери-



ями. У байкальских микроорганизмов – симбионтов токсичной цианобактерии присутствуют ферменты глутатионового пути, что делает этот путь потенциально возможным, при этом энергетически выгодно использовать ферменты цикла глутатиона, поскольку они являются универсальной защитой от стресса. Присутствие фермента *mlr*-кластера – *mlrC* в геноме симбионтной бактерии, собранном из сообщества токсичной цианобактерии, может свидетельствовать о способности деструкции микроцистина. В таком случае, надо установить, как проходит первый этап разрушения циклической молекулы микроцистина и может ли деградация протекать комбинацией ферментов глутатионового цикла и ферментов *mlr*. Следует отметить, что метагеномная сборка бактериальных геномов позволяет только предположить способности бактерий, для точной характеристики генома требуется выделение чистой культуры *Aminobacter*. Также необходимо поставить эксперименты с бактериопланктоном и культурами бактерий с аналитическим определением фрагментов токсичного пептида, чтобы понять путь деструкции.

## 5. Выводы

Анализ ДНК планктона озер Байкал, Хубсугул, Доронинское, Гусиное, а также культур бактерий, показал отсутствие гена ключевого фермента селективного пути деградации *mlrA*. Возможно, все-таки есть бактерии, содержащие кластер генов *mlr ABCD*, но используемые нами праймеры не подходят для их идентификации.

Бактерии, ассоциированные с токсичной цианобактерией *Tychonema* sp. BVK16, содержат в своем геноме ферменты глутатионтрансферазы, защищающие их от токсичных метаболитов и окислительного стресса. Геномы, принадлежащие бактериям *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, *Sphingomonas*, имеют несколько копий этого гена, что позволяет предположить, что именно эти бактерии активно пользуются этими ферментами для детоксикации. Бактерия *Aminobacter* содержит фрагменты гена *mlrC* и предположительно участвует в деструкции линейных остатков микроцистина после первых этапов деструкции циклической структуры токсичного пептида.

Для полного понимания механизмов деградации микроцистинов в озере Байкал, необходим эксперимент, помогающий определить, какие изменения претерпевают цианотоксины под действием бактериопланктона и культур бактерий.

## Благодарности

Исследование выполнено по теме государственного задания № 0279-2021-0015. Работы проведены в приборном центре «Ультрамикрoанализ» (секвенирование) и в экспериментальном пресноводном аквариумном комплексе для байкальских гидробионтов (культивирование цианобактерий и бактерий). Биоинформатический анализ проводился

на суперкомпьютере ЛИН СО РАН. Авторы выражают благодарность командам научно-исследовательских судов «Титов», «Коптюг», «Верещагин», «Папанин» за помощь в отборе проб планктона и бентоса на озере Байкал.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Краснопеев А.Ю., Тихонова И.В., Подлесная Г.В. и др. 2023. Разнообразие бактерий и путей их метаболизма в неаксеничной культуре *Tychonema* sp. BVK16. *Limnology and Freshwater Biology* 2023 (6): 229-243. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-229](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-229)
- Allocati N., Federici L., Masulli M. et al. 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal* 276: 58–75. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2008.06743](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743)
- Belykh O., Sorokovikova E., Fedorova G. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Belykh O., Gladkikh A., Sorokovikova E. et al. 2015. Identification of toxic cyanobacteria in Lake Baikal. *Reports of the Academy of Sciences* 463(3): 353. DOI: [10.7868/S0869565215210227](https://doi.org/10.7868/S0869565215210227)
- Bouaïcha N., Miles C.O., Beach D.G. et al. 2019. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins* 11(12): 714. DOI: [10.3390/toxins11120714](https://doi.org/10.3390/toxins11120714)
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L. et al. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied Environmental Microbiology* 62(11): 4086-4094. DOI: [10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996)
- Bourne D.G., Blakeley R.L., Riddles P. et al. 2006. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Resources* 40(6): 1294-1302. DOI: [10.1016/j.watres.2006.01.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.022)
- Dexter J., McCormick A.J., Fu P. et al. 2021. Microcystinase - a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA. *Water Resources* 189: 116646. DOI: [10.1016/j.watres.2020.116646](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116646)
- He Q., Wang W., Xu Q. et al. 2022. Microcystins in water: detection, microbial degradation strategies, and mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(20): 13175. DOI: [10.3390/ijerph192013175](https://doi.org/10.3390/ijerph192013175)
- Krausfeldt L.E., Steffen M.M., McKay R.M. et al. 2019. Insight into the molecular mechanisms for microcystin miodegradation in Lake Erie and Lake Taihu. *Frontiers in Microbiology* 10: 2741. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02741](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02741)
- Liu B.-L., Yu P.-F., Guo J.-J. et al. 2024. Congener-specific fate and impact of microcystins in the soil-earthworm system. *Journal of Hazardous Materials* 471: 134439. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2024.134439](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134439)
- Massey I.Y., Yang F. 2020. A mini review on microcystins and bacterial degradation. *Toxins* 12(4): 268. DOI: [10.3390/toxins12040268](https://doi.org/10.3390/toxins12040268)
- Mou X., Lu X., Jacob J. et al. 2013. Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie. *PLoS One* 8(4): e61890. DOI: [10.1371/journal.pone.0061890](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061890)
- Pal M., Purohit H.J., Qureshi A. 2021. Genomic insight for algicidal activity in *Rhizobium* strain AQ\_MP. *Archives*

of Microbiology 203(8): 5193-5203. DOI: [10.1007/s00203-021-02496-z](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02496-z)

Salter C., VanMensel D., Reid T. et al. 2021. Investigating the microbial dynamics of microcystin-LR degradation in Lake Erie sand. *Chemosphere* 272: 129873. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2021.129873](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129873)

Salter C., Westrick J.A., Chaganti S.R. et al. 2023. Elucidating microbial mechanisms of microcystin-LR degradation in Lake Erie beach sand through metabolomics and metatranscriptomics. *Water Resources* 247: 120816. DOI: [10.1016/j.watres.2023.120816](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120816)

Schmidt J.R., Wilhelm S.W., Boyer G.L. 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. *Toxins* 6(12): 3354-3387. DOI: [10.3390/toxins6123354](https://doi.org/10.3390/toxins6123354)

Thees A., Atari E., Birbeck J. et al. 2019. Isolation and characterization of Lake Erie bacteria that degrade the cyanobacterial microcystin toxin MC-LR. *Journal of Great Lakes Research* 45(1): 138-149. DOI: [10.1016/j.jglr.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.10.013)

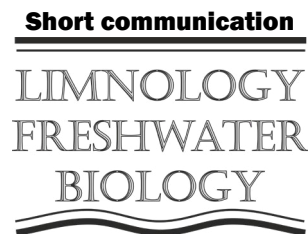
WHO. 2020. Cyanobacterial toxins: microcystins. Guidelines for drinking-water quality and guidelines for safe recreational water environments. WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6. World Health Organization. Switzerland: Geneva. p. 55

Yuan M., Ding Q., Sun R. et al. 2021. Biodegradation of nodularin by a microcystin-degrading bacterium: performance, degradation pathway, and potential application. *Toxins* 13(11): 813. DOI: [10.3390/toxins13110813](https://doi.org/10.3390/toxins13110813)

Zhang H., Huang Q., Yu Z. et al. 2011. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologica* 41 (1): 70-77.

Zhang J., Lu Q., Ding Q. et al. 2017. A novel and native microcystin-degrading bacterium of *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Taihu. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(10): 1187. DOI: [10.3390/ijerph14101187](https://doi.org/10.3390/ijerph14101187)

# Composition of microbial communities as an indicator of the condition of water reservoirs artificially separated from the sea basins (based on the example of the Kislogubskaya tidal power plant bay, Barents sea)



Savvichev A.S.<sup>1\*</sup>, Demidenko N.A.<sup>3</sup>, Kadnikov V.V.<sup>2</sup>, Belenkova V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

<sup>2</sup> K.G. Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

<sup>3</sup> Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

**ABSTRACT.** The Kislaya Bay currently refers to the water reservoirs formed as a result of the construction of the dam of the tidal power station (TPP) in the Russian Federation (1968). As a result of the reduction in the influence of tidal currents mixing the water column of the bay, the hydrological regime of the reservoir has changed. The reduction in water exchange led to the appearance of bottom stagnant waters deprived of oxygen, as well as hydrogen sulfide contamination. In the 90-s of the twentieth century, the operation of the Kislogubskaya TPP ceased and the flow regime was partially restored. In the winter season of 2024, we conducted microbiological and biogeochemical studies of the Kislaya Bay. It was shown that there was no hydrogen sulfide in the bottom water of the bay, and the processes of sulfate reduction, methane formation and methane oxidation were extremely low. At the same time, in the subsurface layer of sediment, bacteria and archaea were found that dominate the microbial communities of anoxic waters of meromictic reservoirs. We believe that with a stable exchange of water through the TPP dam, the composition of the microbial community of water and sediment will be restored. In case of negative developments, it is possible to predict the transformation of the bay into a reservoir with a community of microorganisms similar to meromictic reservoirs.

**Keywords:** microbial communities, microbial processes, Kislogubskaya TPP, meromictic water reservoirs, stratification, hydrogen sulfide contamination

**For citation:** Savvichev A.S., Demidenko N.A., Kadnikov V.V., Belenkova V.V. Composition of microbial communities as an indicator of the condition of water reservoirs artificially separated from the sea basins (based on the example of the Kislogubskaya tidal power plant bay, Barents sea) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1079-1086. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-1079](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-1079)

## 1. Introduction

Hydrological, hydrochemical, hydrobiological and ecological studies in isolated marine basins are becoming relevant due to the increasing influence of human economic activities on coastal ecosystems. Construction of protective dams, overpasses and embankments for laying roads, creation of basins for tidal power plants (TPP), etc. – leads to the cutting off of sea bays and is accompanied by a decrease in their natural water exchange with the sea. The Kislogubskaya TPP basin is a small bay with a narrow neck and an

underwater threshold, 3.5 km long. In the middle and top of the bay there are two depressions with a depth of 36 and 30 m. A river flows into the top of the bay. Before the construction of the TPP (1965–1968), water exchange with the sea was free. In 1968, the first and so far the only TPP in Russia was put into operation. During the construction and operation of the TPP, the flowing tidal regime of the TPP was significantly disrupted. This led to the appearance of bottom stagnant waters deprived of oxygen, as well as hydrogen sulfide contamination. In the 90-s of the twentieth century, the operation of the Kislogubskaya TPP ceased and the flow

\*Corresponding author.

E-mail address: [savvichev@mail.ru](mailto:savvichev@mail.ru)

**Received:** May 30, 2024; **Accepted:** June 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



regime was partially restored.

The composition of microbial communities in the water column and bottom sediments of both fresh and marine water bodies depends on the hydrological regime of these water bodies. Mixing of the water column due to tidal processes leads to an influx of oxygen-containing waters and, as a consequence, the formation of an oxygen-dependent microbial community. On the contrary, a reduction in water exchange leads to the depletion of oxygen and the appearance of anoxic zones, in which the composition of microbial communities changes significantly. It is known that the microbial community of anoxic waters is fundamentally different from the microbial community of the oxygenated water column (Pjevac et al., 2015; Tassi et al., 2018; Savvichev et al., 2023).

The purpose of this study was to obtain data on the hydrochemical state, the composition of microbial communities of bottom water and the surface layer of sediments, the rates of microbial processes of carbon and sulfur cycles in Kislogubsky Bay and to compare the composition of microbial communities with the communities of the open part of the bay. The practical significance of studying of microbial communities and microbial processes in such water bodies is associated, first of all, with the need to predict the negative consequences of hydrogen sulfide contamination in artificially enclosed marine areas that appeared as a result of human intervention, as well as with the need to predict the response of marine ecosystems to the emergence of a near-bottom anoxic zone (Velinsky and Fogel, 1999; Savvichev et al., 2017; Middelburg and Levin, 2009).

## 2. Materials and methods

Sampling of bottom water and sediments was carried out in early April 2024. Temperature, salinity, oxygen, hydrogen sulfide, and methane content were measured. The total number of microorganisms was counted. The rates of microbial processes: dark car-

bon dioxide assimilation (DCA), sulfate reduction (SR), autotrophic (hydrogenotrophic) methane formation (Mgh) and methane oxidation (MO) was determined by the radioisotope method using labeled compounds -  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ,  $^{14}\text{CH}_4$  and  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  (Pimenov and Bonch-Osmolovskaya, 2006; Savvichev et al., 2021). Isolation of DNA, PCR amplification, and high-throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments were carried out according to (Kadnikov et al., 2019).

## 3. Results and discussion

Sediments 2 and 3 (0–2 cm) were sampled from deep depressions of the Kislogubsky Bay, consisted of pelite and silt, had a gray-brown color, and were weakly oxidized ( $E_h = 40\text{--}80$  mV). Sediment 4 (2–7 cm) had inclusions of hydrotroilite, was weakly reduced ( $E_h = -20\text{--}+40$  mV), and did not smell of hydrogen sulfide. Sediment 1 was sampled as a “control” in the open sea part of the bay and consisted of silt and sand and was oxidized. Hydrogen sulfide sediment 5 (1.95  $\text{mmol L}^{-1}$ ; also “control”) was sampled in Kanda Bay.

Low rates of microbial processes were noted in the sediment of the “marine” station (DCA; 50–110  $\text{nmol L}^{-1} \text{day}^{-1}$ ). In the sediments of Kislogubsky Bay, DCA rate was noticeably higher (up to 910  $\text{nmol L}^{-1} \text{day}^{-1}$ ), but lower than in the restored sediment of Kanda Bay (up to 34  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{day}^{-1}$ ). The rate of hydrogenotrophic methanogenesis was shown only in “control” sediment 6. The rate of MO was extremely low in sediment 1 and high in sediment 6. In sediments 2, 3 and 4, the MO rate varied from 80 to 320  $\text{nmol CH}_4 \text{dm}^{-3} \text{day}^{-1}$ . SR rate was minimal in sediment 1, increased in sediments of Kislogubsky Bay (up to 1.2  $\mu\text{mol S}^2\text{dm}^{-3} \text{day}^{-1}$ ) and expectedly high in sediment 6 (up to 30  $\mu\text{mol S dm}^{-3} \text{day}^{-1}$ ) of Kanda Bay.

Figure presents the correlation data for the 10 most representative taxonomic groups that make up the microbial communities of the analyzed marine sediments. Microbial communities of the surface layer

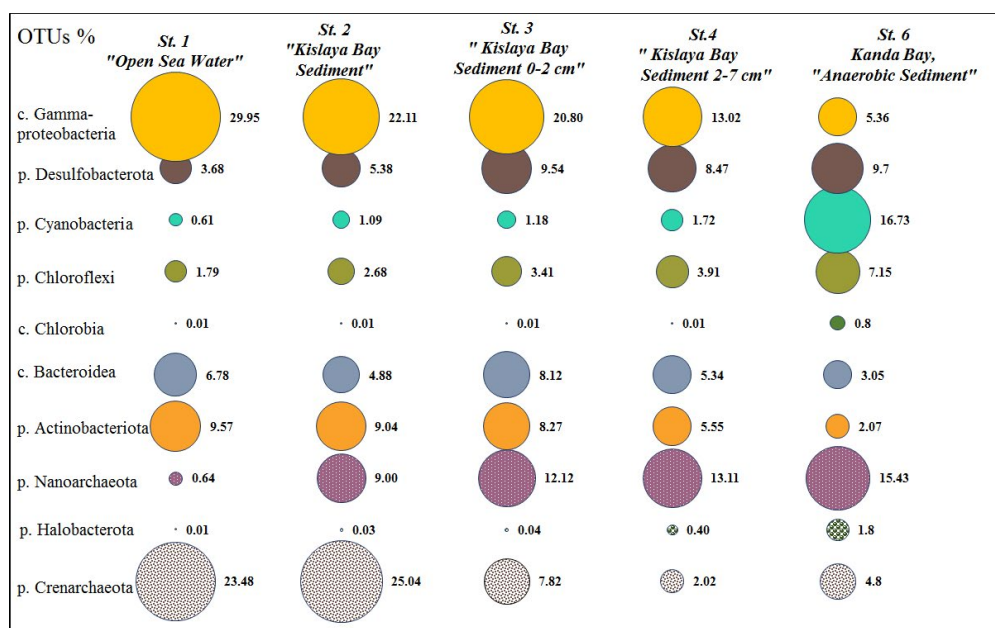


Fig. The contents of the main taxonomic groups of archaea and bacteria in the microbial community in sediment samples from Kislogubsky Bay and “comparison water reservoirs”.



of sediments differed significantly from each other. In the “control” sediment, the archaeal community was clearly dominated by uncultivated archaea of the genus *Nitrosopumilus* (phylum Crenarchaeota). Archaea of the genus *Nitrosopumilus* are obligate aerobes capable of ammonium oxidation. In the remaining sediments, *Nitrosopumilus* archaea were represented in minimal proportions. The presence of *Nitrosopumilus* in samples from Kislogubsky Bay indicates proximity to the open sea.

Bacteria of the Bacteroidia class were found in close proportions in all samples. Bacteria of this class are widespread in a wide variety of habitats, from marine and fresh waters and soil to the gastrointestinal tract of animals. Bacteria of the genus *Chloroflexi* were found in microbial communities of oxygen-deficient sediments. A significant part of *Chloroflexi* was represented by heterotrophic unculturable bacteria from the class Anaerolineae, genus SBR1031. These bacteria are anaerobic syntrophs mutualistically associated with methanogenic archaea. Cyanobacteria live in the photic zone of water bodies; the bottom layer (if light does not reach it) is exclusively a place of accumulation, but not habitat, of cyanobacteria. The abundance of cyanobacteria is an indicator of the productivity of the photic zone. In terms of the abundance of cyanobacteria, Kislogubskaya Bay was ahead of the open bay, but clearly inferior to Kanda Bay. Sulfate-reducing bacteria of the phylum Desulfobacterota were found in all sediment samples. Most representatives of the phylum Desulfobacterota belonged to the classes Desulfobacteria and Desulfobulbia. The abundance of bacteria of the Gammaproteobacteria class in the studied samples turned out to be a striking feature that distinguishes the sediment sample from the open part of the bay from other samples. Bacteria close to classical methanotrophs from the genera *Methylocystis* and *Methylocapsa* were found in sediment samples.

The studies have shown that the sediments of the Kislogubsky Bay are similar to the sediments of the open part of the bay. At the same time, signs of restoration conditions acquired during the construction of the TPP remain. This is oxygen deficiency and the presence of hydrogen sulfide. In the bottom water of the bay, the rate of microbial processes is noticeably increased: carbon dioxide assimilation, sulfate reduction, methanogenesis and methane oxidation, which indicates the acquisition of new qualities inherent in stratified water reservoirs. Reservoirs of this type are known on the White Sea coast (Krasnova et al., 2015). They are unique in origin, because formed by separation from the sea due to the rapid uplift of land. As one moves away from the sea, the leaching regime weakens, which leads to the activation of anaerobic microbial processes, primarily the process of sulfate reduction (Losyuk et al., 2015). Sulfate-reducing bacteria do not limit the list of anaerobic microorganisms involved in the transformation of organic compounds. Under anaerobic conditions, methane formation is provided by methanogenic archaea, which participate, along with sulfate-reducing bacteria, in the terminal phase of decomposition of organic matter.

## 4. Conclusions

The studies carried out showed that the restoration of the flow regime had a beneficial effect on the state of the water column and bottom sediments. Hydrogen sulfide disappeared from the bottom water (at least in the winter season), the intensity of anaerobic microbial processes weakened, and the composition of the microbial community turned out to be closer to the open part of the bay than to the meromictic reservoir. We believe that with a stable exchange of water through the PES dam, the composition of the microbial community of water and sediment will be completely restored.

## 5. Funding

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 23-24-00208).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V. et al. 2019. Microbial communities involved in the methane cycle in the near-bottom water layer and sediments of the meromictic subarctic Lake Svetloe. Antonie van Leeuwenhoek. DOI: [10.1007/s10482-019-01308-1](https://doi.org/10.1007/s10482-019-01308-1)
- Krasnova E.D., Kharcheva A.V., Milyutina I.A. et al. 2015. Study of microbial communities in redox zone of meromictic lakes isolated from the White Sea using spectral and molecular methods. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom: 1–12. DOI: [10.1017/S0025315415000582](https://doi.org/10.1017/S0025315415000582)
- Losyuk G., Kokryatskaya N., Krasnova E. 2015. Formation of hydrogen sulfide in isolated basins at the Karelian of the White Sea coast. EARSel eProc 14: 49–54.
- Middelburg J.J., Levin L.A. 2009. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. Biogeosciences 6 (7): 1273–1293. DOI: [10.5194/bg-6-1273-2009](https://doi.org/10.5194/bg-6-1273-2009)
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. 2006. In situ activity studies in thermal environments. In: Rainey FA, Oren A. (Eds.), Extremophiles. Methods in Microbiology. Vol. 35. Elsevier Ltd. pp. 29–53.
- Pjevac P., Korlevic´ M., Berg J.S. et al. 2015. Community shift from phototrophic to chemotrophic sulfide oxidation following anoxic holomixis in a stratified seawater lake. Applied Environmental Microbiology 81: 298–308. DOI: [10.1128/AEM.02435-14](https://doi.org/10.1128/AEM.02435-14)
- Savvichev A.S., Demidenko N.A., Krasnova E.D. et al. 2017. Microbial processes in the Kanda bay, a meromictic water body artificially separated from the White Sea. Doklady Biological Sciences 474 (1): 135–139.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Rusanov I.I. et al. 2021. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles and the relevant microorganisms in the water column of the meromictic lake Bol’shie Khruslomeny Lake at the White Sea coast. Frontiers in Microbiology 11: 1–17. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01945](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01945)
- Savvichev A.S., Demidenko N.A., Kadnikov V.V. et al. 2023. Microbial community composition as an indicator of the state of basins located at the sea coast (exemplified by the Kanda bay, Kandalaksha gulf, White Sea). Microbiology 92 (6): 819–830.

Tassi F., Fazi S., Rossetti S. et al. 2018. The biogeochemical vertical structure renders a meromictic volcanic lake a trap for geogenic CO<sub>2</sub> (Lake Averno, Italy) // PLoS ONE 13(3): e0193914. DOI: [10.1371/journal.pone.0193914](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193914)

Velinsky D.J., Fogel M.L. 1999. Cycling of dissolved and particulate nitrogen and carbon in the Framvaren Fjord, Norway: Stable isotopic variations. *Marine Chemistry* 67 (3-4): 161-180.

# Состав микробных сообществ как индикатор состояния водоемов, искусственно отделенных от морского бассейна (на примере залива Кислогубской приливной электростанции, Баренцево море)



Саввичев А.С.<sup>1\*</sup>, Демиденко Н.А.<sup>3</sup>, Кадников В.В.<sup>2</sup>, Беленкова В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

<sup>2</sup> Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

<sup>3</sup> Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва, 117997 Россия

**АННОТАЦИЯ.** Залив (губа) Кислая в настоящее время относится к водоемам, образовавшимся в результате строительства плотины единственной в Российской Федерации приливной электростанции (1968 г). В результате сокращения влияния приливно-отливных течений, перемешивающих водную толщу залива, изменился гидрологический режим водоема. Сокращение водообмена привело к появлению придонных застойных вод, лишенных кислорода, а также сероводородного заражения. В 90-х годах XX века эксплуатация Кислогубской ПЭС прекратилась и проточный режим частично восстановился. В зимний сезон 2024 г нами проведены микробиологические и биогеохимические исследования водоема. Показано, что в придонной воде залива сероводород отсутствовал, процессы сульфатредукции, метанобразования и метаноокисления были крайне низки. Вместе с тем в подповерхностном слое осадка найдены бактерии и археи, доминирующие в микробных сообществах аноксигенных вод меромиктических водоемов. Мы полагаем, что при устойчивом обмене вод через плотину ПЭС состав микробного сообщества вод и осадков восстановится. При негативном развитии событий можно дать прогноз превращения залива в водоем с сообществом микроорганизмов, сходным с меромиктическими водоемами.

**Ключевые слова:** микробные сообщества, микробные процессы, Кислогубская ПЭС, меромиктические водоемы, стратификация, сероводородное заражение

**Для цитирования:** Саввичев А.С., Демиденко Н.А., Кадников В.В., Беленкова В.В. Состав микробных сообществ как индикатор состояния водоемов, искусственно отделенных от морского бассейна (на примере залива Кислогубской приливной электростанции, Баренцево море) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1079-1086. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1079

## 1. Введение

Гидрологические, гидрохимические, гидробиологические и экологические исследования в морских изолированных бассейнах становятся актуальными в связи с возрастающим влиянием хозяйственной деятельности человека на прибрежные экосистемы. Сооружение защитных дамб и плотин, эстакад и насыпей для прокладки дорог, создание бассейнов приливных электростанций (ПЭС) и т.п. – приводит к отсечению морских заливов и сопровождается уменьшением их естественного водообмена с морем. Бассейн Кислогубской ПЭС – это небольшой залив с узким горлом и подводным порогом, длиной 3.5 км. В середине и вершине губы

– две впадины с глубиной 36 и 30 м. В вершину губы впадает речка. До сооружения ПЭС (1965–1968 гг.) водообмен с морем был свободный. В 1968 г. была сдана в эксплуатацию первая и пока единственная в России ПЭС. Во время строительства и эксплуатации ПЭС проточный приливно-отливной режим ПЭС был существенно нарушен. Это привело к появлению придонных застойных вод, лишенных кислорода, а также сероводородного заражения. В 90-х годах XX века эксплуатация Кислогубской ПЭС прекратилась и проточный режим частично восстановился.

Состав микробных сообществ водной толщи и донных осадков как пресных, так и морских водоемов зависит от гидрологического режима этих водоемов. Перемешивание водной толщи за счет

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [savvichev@mail.ru](mailto:savvichev@mail.ru)

Поступила: 30 мая 2024; Принята: 21 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



приливо-отливных процессов приводит к притоку кислородсодержащих вод и, как следствие, формированию кислородзависимого микробного сообщества. Напротив, сокращение водообмена приводит к истощению кислорода и появлению аноксических зон, в которых значительно меняется состав микробных сообществ. Известно, что микробное сообщество аноксических вод коренным образом отличается от микробного сообщества кислородсодержащей водной толщи (Pjevac et al., 2015; Tassi et al., 2018; Savvichev et al., 2023).

Целью настоящего исследования было получение данных о гидрохимическом состоянии, составе микробных сообществ придонной воды и поверхностного слоя донных осадков, интенсивности микробных процессов циклов углерода и серы в Кислогубском заливе и сравнению состава сообществ с микробными сообществами открытой части залива. Практическая значимость исследования микробных сообществ и микробных процессов в таких водоемах связана, прежде всего, с необходимостью прогноза негативных последствий сероводородного заражения в искусственно замкнутых морских акваториях, появившихся в результате вмешательства человека, а также с необходимостью прогноза реакции морских экосистем на появление придонной аноксической зоны (Velinsky and Fogel, 1999; Savvichev et al., 2017; Zhang et al., 2010; Middelburg and Levin, 2009).

## 2. Материалы и методы

Отбор проб придонной воды и донных осадков проводили в начале апреля 2024 г. Измеряли температуру, соленость, содержание кислорода, сероводорода, метана. Проводили учет общей численности микроорганизмов (ОЧМ). Интенсивности микробных процессов: темновой ассимиляции углекислоты (DCA), сульфатредукции (SR), автотрофного (гидрогенотрофного) образования метана

(MGh) и окисления метана (MO) определяли радиоизотопным методом с использованием меченых соединений –  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ,  $^{14}\text{CH}_4$  и  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  (Pimenov and Bonch-Osmolovskaya, 2006; Savvichev et al., 2021). Выделение метагеномной ДНК, ПЦР-амплификация и высокопроизводительное секвенирование фрагментов генов 16S рРНК проводили согласно (Kadnikov et al., 2019)

## 3. Результаты и обсуждение

Осадки 2 и 3 (0–2 см) были отобраны из глубоких понижений Кислогубского залива, состояли из пелита и алевролита, имели серо-коричневый цвет, были слабо окисленными ( $E_h = 40\text{--}80\text{ mV}$ ). Осадок 4 (2–7 см) имел вкрапления гидротроилита, был слабо восстановленным ( $E_h = -20\text{--}+40\text{ mV}$ ), запаха сероводорода не имел. Осадок 1 был отобран как «контрольный» в открытой части залива, состоял из алевролита и песка и был окисленным. Сероводородный осадок 5 (1.95 ммоль  $\text{л}^{-1}$ ; также «контрольный») был отобран в заливе Канда.

Интенсивность микробных процессов в поверхностных осадках Кислогубского залива. Низкая микробная активность ТАУ была отмечена в осадке «морской» станции (50–110 нмоль  $\text{л}^{-1}\text{ сут}^{-1}$ ). В осадках Кислогубского залива активность ТАУ была заметно выше (до 910 нмоль  $\text{л}^{-1}\text{ сут}^{-1}$ ), но ниже, чем в восстановленном осадке залива Канда (до 34 мкмоль  $\text{л}^{-1}\text{ сут}^{-1}$ ). Активность (гидрогенотрофного) метаногенеза была показана только в «контрольном» осадке 6. Интенсивность МО была крайне низкой в осадке 1 и высокой в осадке 6. В осадках 2, 3 и 4 величина МО варьировала от 80 до 320 нмоль  $\text{CH}_4\text{ дм}^{-3}\text{ сут}^{-1}$ . Активность SR была минимальной в осадке 1, повышенной в осадках Кислогубского залива (до 1.2 мкмоль  $\text{S}^{2-}\text{ дм}^{-3}\text{ сут}^{-1}$ ) и ожидаемо высокой в осадке 6 (до 30 мкмоль  $\text{S дм}^{-3}\text{ сут}^{-1}$ ) залива Канда.

На рисунке представлены данные соотношения 10 наиболее представительных таксономиче-

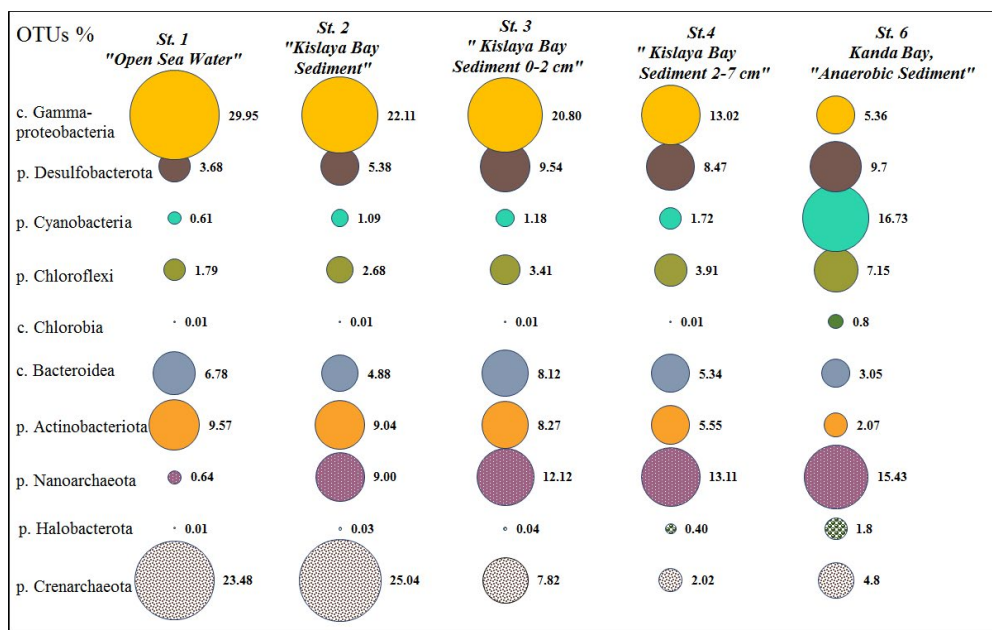


Рис. Доля основных таксономических групп архей и бактерий в составе микробного сообщества в образцах осадков Кислогубского залива и «водоемах сравнения».



ских групп, составляющих микробные сообщества проанализированных морских осадков. Микробные сообщества поверхностного слоя осадков значительно отличались друг от друга. В «контрольном» осадке в сообществе архей явно доминировали некультивируемые археи рода *Nitrosopumilus*, (филум Crenarchaeota). Археи рода *Nitrosopumilus* – облигатные аэробы, способные к окислению аммония. В остальных осадках археи *Nitrosopumilus* были представлены в минимальных долях. Присутствие *Nitrosopumilus* в образцах Кислогубского залива указывает на близость к открытой части моря.

Бактерии класса *Bacteroidia* во всех образцах найдены в близких долях. Бактерии этого класса широко распространены в самых разных местах обитания, от морских и пресных вод и почвы до желудочно-кишечного тракта животных. Бактерии рода *Chloroflexi* найдены в составе микробных сообществ осадков с дефицитом кислорода. Значительная часть *Chloroflexi* была представлена гетеротрофными некультивируемыми бактериями из класса *Anaerolineae*, род SBR1031. Эти бактерии являются анаэробными синтрофами, мутуалистически связанными с метаногенными археями. Цианобактерии обитают в фотической зоне водоемов, придонный слой (если до него не доходит свет) является исключительно местом накопления, но не обитания цианобактерий. Обилие цианобактерий является показателем продуктивности фотической зоны. По обилию цианобактерий Кислогубская губа опережала открытый залив, но явно уступала заливу Канда. Сульфатредуцирующие бактерии филума *Desulfobacterota* найдены во всех образцах осадков. Большинство представителей филума *Desulfobacterota* относились к классам *Desulfobacteria* и *Desulfobulbia*. Обилие бактерий класса *Gammaproteobacteria* в исследуемых образцах оказалось ярким признаком, отличающим образец осадка открытой части залива от остальных образцов. В образцах осадков найдены бактерии близкие к классическим метанотрофам из родов *Methylocystis* и *Methylocapsa*.

Проведенные исследования показали, что осадки Кислогубского залива похожи на осадки открытой части залива. При этом сохраняются признаки восстановительных условий, приобретенных в период строительства ПЭС. Это дефицит кислорода и наличие сероводорода. В придонной воде залива заметно повышена интенсивности микробных процессов: ассимиляции углекислоты, сульфатредукции, метаногенеза и метаноокисления, что указывает на приобретение новых качеств, присущих стратифицированным водоемам. Водоемы такого типа известны на побережье Белого моря (Krasnova et al., 2015). Они уникальны по происхождению, т.к. образуются путем отделения от моря из-за быстрого поднятия суши. По мере отдаления от моря происходит ослабление промывного режима, что ведет к активизации анаэробных микробных процессов, в первую очередь процесса сульфатредукции (Losyuk et al., 2015). Сульфатредуцирующие бактерии не ограничивают перечень анаэробных микроорганиз-

мов, участвующих в трансформации органических соединений. В анаэробных условиях образование метана обеспечивают метаногенные археи, участвующие, наряду с сульфатредуцирующими бактериями, в терминальной фазе разложения органического вещества.

#### 4. Выводы

Проведенные исследования показали, что восстановление проточного режима благоприятно отразилось на состоянии водной толщи и донных осадков. Из придонной воды исчез сероводород (по крайней мере, в зимний сезон), ослабла интенсивность анаэробных микробных процессов, состав микробного сообщества оказался более близким к открытой части залива, чем к меромиктическому водоему. Мы полагаем, что при устойчивом обмене вод через плотину ПЭС состав микробного сообщества вод и осадков полностью восстановится.

#### 5. Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 23-24-00208).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V. et al. 2019. Microbial communities involved in the methane cycle in the near-bottom water layer and sediments of the meromictic subarctic Lake Svetloe. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI: [10.1007/s10482-019-01308-1](https://doi.org/10.1007/s10482-019-01308-1)
- Krasnova E.D., Kharcheva A.V., Milyutina I.A. et al. 2015. Study of microbial communities in redox zone of meromictic lakes isolated from the White Sea using spectral and molecular methods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*: 1–12. DOI: [10.1017/S0025315415000582](https://doi.org/10.1017/S0025315415000582)
- Losyuk G., Kokryatskaya N., Krasnova E. 2015. Formation of hydrogen sulfide in isolated basins at the Karelian of the White Sea coast. *EARSeL eProc* 14: 49–54.
- Middelburg J.J., Levin L.A. 2009. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. *Biogeosciences* 6 (7): 1273–1293. DOI: [10.5194/bg-6-1273-2009](https://doi.org/10.5194/bg-6-1273-2009)
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. 2006. In situ activity studies in thermal environments. In: Rainey FA, Oren A. (Eds.), *Extremophiles. Methods in Microbiology*. Vol. 35. Elsevier Ltd. pp. 29–53.
- Pjevac P., Korlevic´ M., Berg J.S. et al. 2015. Community shift from phototrophic to chemotrophic sulfide oxidation following anoxic holomixis in a stratified seawater lake. *Applied Environmental Microbiology* 81: 298–308. DOI: [10.1128/AEM.02435-14](https://doi.org/10.1128/AEM.02435-14)
- Savvichev A.S., Demidenko N.A., Krasnova E.D. et al. 2017. Microbial processes in the Kanda bay, a meromictic water body artificially separated from the White Sea. *Doklady Biological Sciences* 474 (1): 135–139.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Rusanov I.I. et al. 2021. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles and the relevant microorganisms in the water column of the

meromictic lake Bol'shie Khruslomeny Lake at the White Sea coast. *Frontiers in Microbiology* 11: 1–17. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01945](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01945)

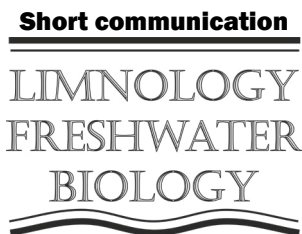
Savvichev A.S., Demidenko N.A., Kadnikov V.V. et al. 2023. Microbial community composition as an indicator of the state of basins located at the sea coast (exemplified by the Kanda bay, Kandalaksha gulf, White Sea). *Microbiology* 92 (6): 819–830.

Tassi F., Fazi S., Rossetti S. et al. 2018. The biogeochemical vertical structure renders a meromictic volcanic lake a trap for geogenic CO<sub>2</sub> (Lake Averno, Italy) // *PLoS ONE* 13(3): e0193914. DOI: [10.1371/journal.pone.0193914](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193914)

Velinsky D.J., Fogel M.L. 1999. Cycling of dissolved and particulate nitrogen and carbon in the Framvaren Fjord, Norway: Stable isotopic variations. *Marine Chemistry* 67 (3-4): 161-180.

Zhang J.D., Gilbert D., Gooday A. et al. 2010. Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences, European Geosciences Union (EGU)* 7: 1443-1467.

# Studying the number of ammonium-oxidizing bacteria in bottom sediments of Lake Baikal



Semiguzov N.D.\*, Kan G.V., Suslova M.Yu., Belykh O.I.

*Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya Str., Irkutsk, 664033, Russia*

**ABSTRACT.** Using the limiting dilution assay, the number of ammonium-oxidizing bacteria in the bottom sediments of the area of the Baikal Pulp and Paper Mill (BPPM, Southern Baikal) was determined. The maximum number of bacteria under study was determined at the station where treated wastewater from the city of Baikalsk is discharged into the lake.

**Keywords:** nitrogen, nitrification, ammonium, ammonium-oxidizing bacteria, Lake Baikal

**For citation:** Semiguzov N.D., Kan G.V., Suslova M.Yu., Belykh O.I. Studying the number of ammonium-oxidizing bacteria in bottom sediments of Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. - № 4. - P. 1087-1090. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1087

## 1. Introduction

Nitrogen is one of the main biophilic elements, which is part of the main polymers of any living cell. In the aquatic environment, nitrogen occupies a particularly important position, and often the overall productivity of a reservoir depends on the quantity and nature of its compounds (Golovanova and Stupnikova, 2020). The release of nitrogen-containing compounds into water bodies has a significant impact on water quality, causing excessive growth of phytoplankton and eutrophication. Nitrification is a fundamental process in aquatic ecosystems as it controls the level of nitrogen compounds (Xia et al., 2004).

Ammonium oxidation, like other stages of the nitrogen cycle, is carried out by microorganisms and significantly affects the functioning of biota in water bodies, which indicates the importance of studying the functional group of nitrifying bacteria. The aim of this work is to study the number of ammonium-oxidizing bacteria in bottom sediments of the Baikal pulp and paper mill area (BPPM) in Southern Baikal.

## 2. Materials and methods

The material for the study was samples of bottom sediments collected in the waters of the city of Baikalsk during an expedition on the R/V Titov in July 2023. A total of 12 samples were collected and analyzed. The study area is characterized by increased technogenic load. Waste from BPPM paper mill, commissioned in

1966, have had and continue to have an adverse impact on the Baikal ecosystem. In addition, the sewage treatment plant of the city of Baikalsk (MUP “KOS BMO”) discharges wastewater directly into Baikal at some distance from the shore to a depth of more than 30 m. In 2020, the territorial bodies of Rosprirodnadzor identified technical and technological violations at these treatment plants indicators, as a result of which it was established that insufficiently treated wastewater is being discharged into the lake (App. to the letter of the SB RAS).

The number of ammonium-oxidizing bacteria in the samples was determined by the limiting dilution assay using Winogradsky’s liquid medium for phase I (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{NaCl}$  – 2,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.4,  $\text{CaCO}_3$  – 5 (Egorov, 1976). After autoclaving, a sterile solution of elements according to Pfennig (1 ml/L of medium) was added to the medium.

Incubation was carried out in a thermostat at +28°C in the dark; bacteria were counted after 30 days. The development of ammonium oxidizers is indicated by the appearance of nitrites in the environment. A qualitative reaction to nitrites was carried out using the Griess reagent.

## 3. Results and discussion

The number of ammonium-oxidizing bacteria in the study area varied from 0 to 41.2 cells/g of bottom sediments. The highest abundance was detected at sta-

\*Corresponding author.

E-mail address: [nazarsemiguzov@gmail.com](mailto:nazarsemiguzov@gmail.com) (N.D. Semiguzov)

**Received:** July 23, 2024; **Accepted:** August 16, 2024;

**Available online:** August 30, 2024



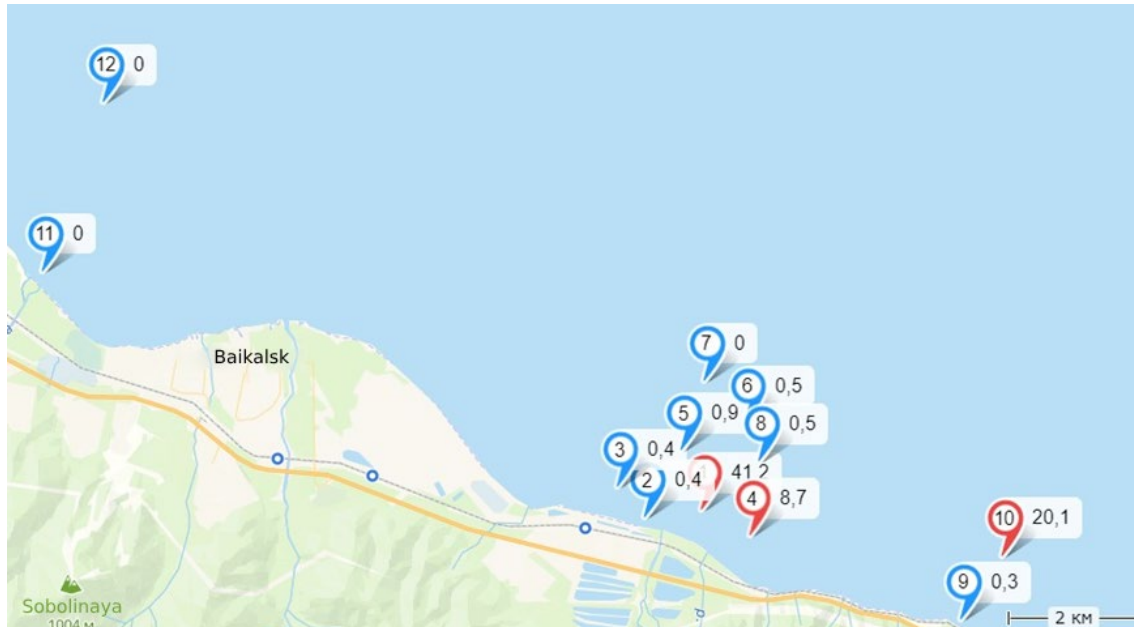


Fig. Map of sampling stations with indicated numbers of ammonium-oxidizing bacteria (cells/g).

tion 1, located directly at the outlet of treated wastewater from the pipe of the treatment plant. Also, increased values were found at stations 10 and 4 - 20.1 and 8.7 cells/g, respectively, which is due to the action of the alongshore current, which picks up treated wastewater coming from the pipe into the water area of Baikalsk, and carries it towards Solzan (Fig.).

#### 4. Conclusions

Thus, the number of ammonium-oxidizing bacteria in the bottom sediments of BPPM area was determined. In the future, the isolation of DNA from enrichment cultures and the amplification of functional genes responsible for the oxidation of ammonium to nitrite will be of scientific interest.

#### Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the topic of state assignment No. 0279-2021-0015 (121032300269-9).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Golovaneva A.E., Stupnikova N.A. 2020. Microbiological transformation of nitrogen in Lake Khalaktyskoye (Kamchatka Territory). *International Journal of Scientific Research* 96(8): 38–44. (in Russian)
- Egorov N.S. 1976. Workshop on microbiology. Moscow: Publishing house Moscow state university: 307. (in Russian)
- Appendix 1 to the letter of the SB RAS dated 08/05/2021 No. 15001-15237-2115.4/218.
- Xia X.H., Yang Z.F., Huang G.H. et al. 2004. Nitrification in natural waters with high suspended-solid content. A study for the Yellow River. *Chemosphere* 57 (8): 1017–1029. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2004.08.027](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.027)



# Изучение численности аммоний-окисляющих бактерий в донных осадках озера Байкал

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Семигузов Н.Д.\*, Кан Г.В., Сусллова М.Ю., Белых О.И.

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** С помощью метода предельных разведений определена численность аммоний-окисляющих бактерий в донных осадках района Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК, Южный Байкал). Максимальная численность исследуемых бактерий определена на станции, где в озеро осуществляется сброс очищенных сточных вод г. Байкальск.

**Ключевые слова:** азот, нитрификация, аммоний, аммоний-окисляющие бактерии, озеро Байкал

**Для цитирования:** Семигузов Н.Д., Кан Г.В., Сусллова М.Ю., Белых О.И. Изучение численности аммоний-окисляющих бактерий в донных осадках озера Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1087-1090. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1087

## 1. Введение

Азот – один из главных биофильных элементов, который входит в состав основных полимеров любой живой клетки. В водной среде азот занимает особенно важное положение, и зачастую, от количества и характера его соединений зависит общая продуктивность водоема (Голованева и Ступникова, 2020). Поступление азотсодержащих соединений в водоемы оказывает значительное воздействие на качество воды, вызывая чрезмерный рост фитопланктона и эвтрофикацию. Нитрификация является фундаментальным процессом в водных экосистемах, так как контролирует уровень азотистых соединений (Xia et al., 2004).

Окисление аммония, как и другие этапы круговорота азота, проводится микроорганизмами и значительно влияет на функционирование биоты в водоемах, что говорит о важности исследования функциональной группы бактерий нитрификаторов. Цель настоящей работы – исследовать численность аммоний-окисляющих бактерий в донных осадках района Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК) Южного Байкала.

## 2. Материалы и методы

Материалом для исследования послужили пробы донных осадков, отобранные в акватории г. Байкальск в ходе экспедиции на НИС «Титов» в

июле 2023 г. Всего отобрано и проанализировано 12 проб. Исследуемый район характеризуется повышенной техногенной нагрузкой. Отходы БЦБК, запущенного в эксплуатацию в 1966 г., оказывали и оказывают неблагоприятное влияние на экосистему Байкала. Кроме того, канализационные очистные сооружения г. Байкальска (МУП «КОС БМО») осуществляют сброс сточных вод непосредственно в Байкал на некотором расстоянии от берега на глубину более 30 м. В 2020 г. территориальными органами Росприроднадзора на данных очистных сооружениях выявлены нарушения технических и технологических показателей, в следствие чего установлено, что осуществляется сброс недостаточно очищенных сточных вод в озеро (Прил. к письму СО РАН).

Численность аммоний-окисляющих бактерий в пробах определяли методом предельных разведений, используя жидкую среду Виноградского для I фазы (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2 \text{ г}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1 \text{ г}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5 \text{ г}$ ,  $\text{NaCl} - 2 \text{ г}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,4 \text{ г}$ ,  $\text{CaCO}_3 - 5 \text{ г}$  (Егоров, 1976). После автоклавирования в среду добавляли стерильный раствор элементов по Пфеннигу (1мл/л среды).

Инкубацию проводили в термостате при  $+28^\circ\text{C}$  в темноте, учет бактерий осуществляли через 30 суток. О развитии аммоний-окислителей свидетельствует появление в среде нитритов. Качественную реакцию на нитриты осуществляли с помощью реактива Грисса.

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [nazarsemiguzov@gmail.com](mailto:nazarsemiguzov@gmail.com) (Н.Д. Семигузов)

Поступила: 23 июля 2024; Принята: 16 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



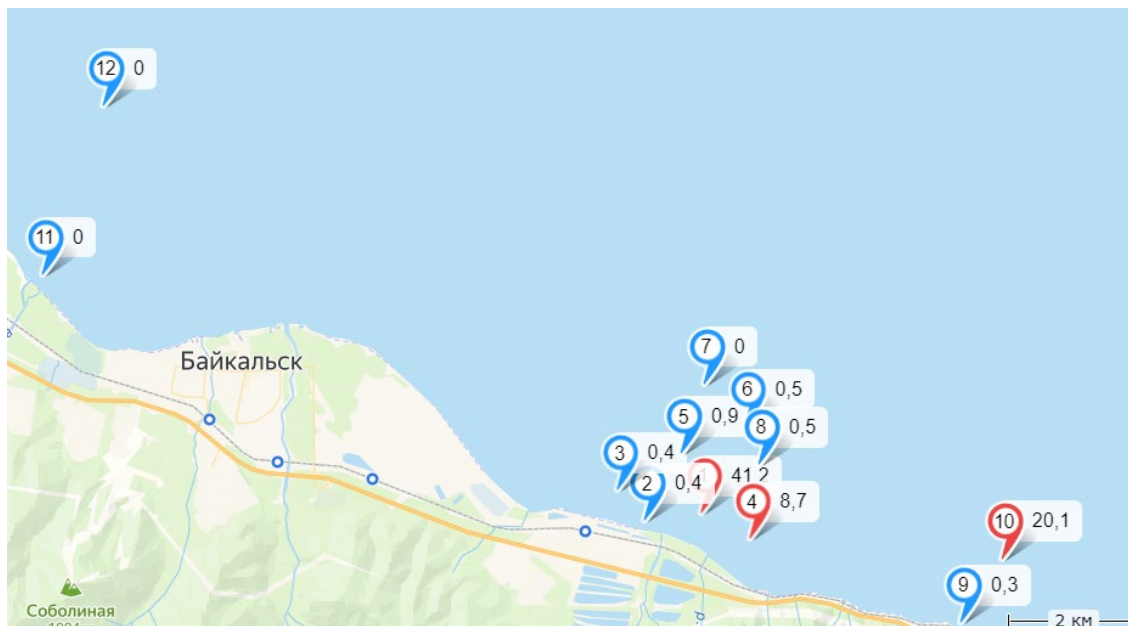


Рис. Карта станций отбора проб с обозначенной численностью аммоний-окисляющих бактерий (к/г).

### 3. Результаты и обсуждение

Численность аммоний-окисляющих бактерий в исследуемом районе варьировала от 0 до 41,2 к/г донных осадков. Наибольшее значение численности детектировали на станции 1, расположенной непосредственно на выходе очищенных сточных вод из трубы очистного сооружения. Также повышенные значения обнаружены на станциях 10 и 4 – 20,1 и 8,7 к/г соответственно, что обусловлено действием вдоль берегового течения, которое подхватывает очищенные сточные воды, поступающие в акваторию г. Байкальска, и несет их в сторону Солзана (Рис.). В ходе работы получено 12 накопительных культур.

### 4. Выводы

Таким образом, определена численность аммоний-окисляющих бактерий в донных осадках района Байкальского ЦБК. В дальнейшем научный интерес представляет выделение ДНК накопительных культур, амплификация функциональных генов, ответственных за окисление аммония до нитрита.

### Благодарности

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 0279-2021-0015 (121032300269-9).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Голованева А.Е., Ступникова Н.А. 2020. Микробиологическая трансформация азота в озере Халактыском (Камчатский край). *Международный научно-исследовательский журнал*: 96 (8): 38–44.
- Егоров Н.С. 1976. *Практикум по микробиологии*. Москва: Изд-во МГУ: 307.
- Приложение 1 к письму СО РАН от 05.08.2021 № 15001-15237-2115.4/218.
- Xia X.H., Yang Z.F., Huang G.H. et al. 2004. Nitrification in natural waters with high suspended-solid content. A study for the Yellow River. *Chemosphere* 57 (8): 1017–1029. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2004.08.027](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.027)

# Microbial biodiversity as an indicator of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems



Senina A.M.\* , Khusnutdinova D.R., Markelova M.I., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Khaliullina L.Yu., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V.

Kazan Federal University, Kremlevskaya Str., 18, Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** It is important to study the level of anthropogenic pollution of rivers in order to maintain the health of ecosystems and provide the sustainable development of society. Surface water pollution is mainly caused by urbanisation, agriculture and industrial discharges. Here, we present the results of a three-year study of the chemical composition and bacterial diversity of samples collected from three rivers of the Kuibyshev Reservoir. Statistically significant differences between chemical parameters and alpha diversity indices were found. In addition, a negative correlation was between the Shannon index and manganese content, and the Chao1 index with nitrite ions.

**Keywords:** microbiome of water, biodiversity, 16S rRNA gene amplicon sequencing, anthropogenic pollution

**For citation:** Senina A.M., Khusnutdinova D.R., Markelova M.I., Siniagina M.N., Boulygina E.A., Khaliullina L.Yu., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V. Microbial biodiversity as an indicator of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1091-1094. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-1091](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-1091)

## 1. Introduction

Various anthropogenic factors, including agricultural and industrial activities, lead to the worsening of water quality in rivers. Not only aquatic species are at risk, but also human health (Breton-Deval et al., 2019, Akhtar et al., 2021). Anthropogenic activities affect the composition of water, increasing the content of various chemical elements in natural sources (Matveeva et al., 2022). For example, nitrates, phosphates and organic compounds are released into the water from agricultural activities (Yuce et al., 2006), while nitrogen and manganese pollution are mainly associated with industry (Li et al., 2014). As a result, the composition and diversity of the aquatic microbial community changes, so the microbiome can be used as an indicator of water quality (Yuce et al., 2006). Next-generation sequencing techniques are being developed and their costs are decreasing, making this approach available for a deeper understanding of the relationship between the microbial community and physicochemical parameters of water, as well as for water quality monitoring.

## 2. Materials and methods

Samples were taken from the surface of the water at the mouths of the Kama, Volga and Kazanka

Rivers in the area of the Kuibyshev Reservoir for three years. Water samples were centrifuged for 15 minutes at 8000 rpm in 50 ml bottles to obtain a cell pellet. DNA was then isolated from the obtained sediment using the DNA-Express kit (Lytech, Russia) according to the manufacturer's recommendations. Amplification of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene and subsequent library preparation was carried out according to the protocol 'Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System' (Illumina, USA). Sequencing of the 16S rRNA amplicons was carried out on the MiSeq platform (Illumina, USA) according to the manufacturer's protocol. The resulting reads were processed using QIIME 1.9. All statistical calculations were performed using the R v.4.2.2 programming language in the RStudio v.2023.12.1 + 402 program. Statistically significant differences in the parameters studied between samples from different rivers were calculated using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Correlations between alpha diversity and hydrochemical parameters were calculated using Spearman's rank correlation test.

## 3. Results and discussion

The study revealed significant differences between rivers in terms of indicators and levels of

\*Corresponding author.

E-mail address: [Anastasiahm@list.ru](mailto:Anastasiahm@list.ru) (A.M. Senina)

**Received:** June 01, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



substances associated with anthropogenic water pollution such as ammonium ions, manganese, nitrate ions, nitrite ions, phosphate ions, total phosphorus and chemical oxygen demand. Samples from the Kazanka River contained significantly more ammonium ions ( $1.24 \pm 0.7$  mg/l to  $0.43 \pm 0.2$  mg/l in the Volga River and  $0.44 \pm 0.1$  mg/l in the Kama River) and less nitrate ions ( $0.7 \pm 0.4$  mg/l to  $1.4 \pm 0.5$  mg/l in the Volga River and  $1.15 \pm 0.2$  mg/l in the Kama River) than the other rivers studied. Samples from the Volga River contained more manganese ( $0.02 \pm 0.02$  mg/l) compared to the Kama River ( $0.01 \pm 0.003$  mg/l), and phosphate ions ( $0.2 \pm 0.1$  mg/l to  $0.10 \pm 0.03$  mg/l in the Kama River and  $0.1 \pm 0.1$  mg/l in the Kazanka River) and total phosphorus ( $0.06 \pm 0.03$  mg/l to  $0.03 \pm 0.01$  mg/l in the Kama River and  $0.04 \pm 0.03$  mg/l in the Kazanka River) were higher in this river compared to the other analyzed rivers. We also found significant differences in alpha diversity indicators. Samples from the Kama River had the highest values of all alpha diversity indices analyzed compared to the Kazanka River, and the highest values of Shannon ( $7.3 \pm 0.5$  to  $6.95 \pm 0.4$  in the Volga River and  $6.46 \pm 0.7$  in the Kazanka River) and Simpson ( $0.98 \pm 0.01$  to  $0.96 \pm 0.02$  in the Volga River and  $0.93 \pm 0.05$  in the Kazanka River) indices were for the Kama River compared to the other rivers. Correlation analysis of seven chemical indicators studied with the biodiversity indices was also performed. We found a negative correlation of the Shannon index with the amount of manganese ( $R = -0.5$ ;  $p < 0.1$ ) and a negative correlation of the Chao1 index with nitrite ions ( $R = -0.4$ ;  $p < 0.1$ ). The results obtained indicate a possible negative impact of these anthropogenic chemical factors on the biodiversity of the microbial community. It is known that excess manganese is toxic to plants and animals and can cause central nervous system disorders in humans (Matveeva et al., 2022). Nitrite ions are mutagens and can cause various human diseases such as cancer, methaemoglobinemia, thyroid enlargement and diabetes mellitus (Parvizishad et al., 2017).

#### 4. Conclusions

In this study, samples from three different rivers in the same geographical area were analyzed. We found

that water pollution with manganese and nitrite ions affect the diversity of the aquatic microbial community.

#### Acknowledgements

The work was carried out on the basis of the Interdisciplinary Center for Collective Use of Kazan Federal University within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan Federal University (PRIORITY-2030) and was financed by a subsidy allocated to the Kazan Federal University for the implementation of the state assignment in the field of scientific activity (project No. FZSM-2023-0013).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Akhtar N., Syakir Ishak M.I., Bhawani S.A. et al. 2021. Various natural and anthropogenic factors responsible for water quality degradation: A review. *Water* 13(19): 2660. DOI: [10.3390/w13192660](https://doi.org/10.3390/w13192660)
- Breton-Deval L., Sanchez-Flores A., Juárez K. et al. 2019. Integrative study of microbial community dynamics and water quality along The Apatlaco River. *Environmental pollution* 255: 113158. DOI: [10.1016/j.envpol.2019.113158](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113158)
- Li P., Qian H., Howard K.W.F. et al. 2014. Anthropogenic pollution and variability of manganese in alluvial sediments of the Yellow River, Ningxia, northwest China. *Environ Monit Assess* 186: 1385–1398. DOI: [10.1007/s10661-013-3461-3](https://doi.org/10.1007/s10661-013-3461-3)
- Matveeva V.A., Alekseenko A.V., Karthe D. et al. 2022. Manganese pollution in mining-influenced rivers and lakes: Current state and forecast under climate change in the Russian Arctic. *Water* 14(7): 1091. DOI: [10.3390/w14071091](https://doi.org/10.3390/w14071091)
- Parvizishad M., Dalvand A., Mahvi A.H. et al. 2017. Review of Adverse Effects and Benefits of Nitrate and Nitrite in Drinking Water and Food on Human Health. *Health Scope* 6(3): e14164. DOI: [10.5812/jhealthscope.14164](https://doi.org/10.5812/jhealthscope.14164)
- Yuce G., Pinarbasi A., Ozcelik S. et al. 2006. Soil and water pollution derived from anthropogenic activities in the Porsuk River Basin, Turkey. *Environmental Geology* 49: 359–375. DOI: [10.1007/s00254-005-0072-5](https://doi.org/10.1007/s00254-005-0072-5)



# Микробное биоразнообразие как индикатор антропогенного загрязнения водных экосистем

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Сенина А.М.\*, Хуснутдинова Д.Р., Маркелова М.И., Синягина М.Н., Булыгина Е.А., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Исследование уровня антропогенного загрязнения рек является важной задачей для поддержания здоровья экосистем и обеспечения устойчивого развития общества. Загрязнение поверхностных вод в основном происходит из-за урбанизации, сельского хозяйства и промышленных сбросов. В данном исследовании представлены результаты исследования химического состава и бактериального разнообразия образцов, полученных из трех рек Куйбышевского водохранилища в течение трех лет. Нами были найдены статистически значимые отличия химических показателей и индексов альфа-разнообразия. Кроме того, была выявлена отрицательная корреляция индекса Шеннона с содержанием марганца и индекса Чао1 с нитрит-ионами.

**Ключевые слова:** микробиом водоемов, биоразнообразие, секвенирование ампликонов гена 16S рРНК, антропогенное загрязнение

**Для цитирования:** Сенина А.М., Хуснутдинова Д.Р., Маркелова М.И., Синягина М.Н., Булыгина Е.А., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В. Микробное биоразнообразие как индикатор антропогенного загрязнения водных экосистем // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1091-1094. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1091

## 1. Введение

Различные антропогенные факторы, включающие деятельность сельскохозяйственных и промышленных предприятий, ведут к ухудшению качества воды в реках. Это не только угрожает видам, обитающим в водоемах, но и создает угрозу для здоровья людей (Breton-Deval et al., 2019, Akhtar et al., 2021). Антропогенная деятельность оказывает влияние на состав воды, повышая содержание различных химических элементов в природных источниках (Matveeva et al., 2022). Например, нитраты, фосфаты и органические соединения поступают в водоемы в результате сельскохозяйственной деятельности (Yuce et al., 2006), а загрязнения азотом и марганцем, в основном, связано с промышленностью (Li et al., 2014). В результате, происходит изменение состава и разнообразия микробного сообщества водоемов, позволяя использовать микробиом как индикатор качества воды (Yuce et al., 2006). Развитие и удешевление методов секвенирования нового поколения делает доступным использование данной технологии для более глубокого понимания взаимосвязи микробного сообщества с физико-химическими показателями воды, а также для мониторинга качества водоемов.

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [Anastasiahm@list.ru](mailto:Anastasiahm@list.ru) (А.М. Сенина)

**Поступила:** 01 июня 2024; **Принята:** 14 июня 2024;

**Опубликована online:** 30 августа 2024

## 2. Материалы и методы

Отбор проб производился с поверхности воды в устьях рек Камы, Волги и Казанки на территории Куйбышевского водохранилища в течение трех лет. Образцы воды центрифугировали в фальконах объемом 50 мл 15 минут при 8000 об/мин для получения клеточного осадка. Затем из полученного осадка проводили выделение ДНК с использованием набора «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия), согласно рекомендациям производителя. Амплификацию региона V3-V4 гена 16S рРНК и последующую подготовку библиотек проводили в соответствии с протоколом «Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System» (Illumina, США), секвенирование нуклеотидной последовательности ампликонов 16S рРНК осуществляли на платформе MiSeq (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Полученные прочтения обрабатывали с помощью QIIME 1.9. Все статистические расчеты производили в среде языка программирования R v.4.2.2 в программе RStudio v.2023.12.1 + 402. Статистически достоверные различия исследуемых параметров между образцами разных рек рассчитывались с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса.

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Корреляция между альфа-разнообразием и гидрохимическими показателями была рассчитана при помощи теста ранговой корреляции Спирмена.

### 3. Результаты и обсуждение

В исследовании были обнаружены достоверные отличия между реками в показателях и содержании веществ, связанных с антропогенным загрязнением водоёмов (аммоний-ионы, марганец, нитрат-ионы, нитрит-ионы, фосфат-ионы, общий фосфор и химическое потребление кислорода). В образцах из р. Казанка выявлено достоверно больше аммоний-ионов ( $1,2 \pm 0,7$  мг/дм<sup>3</sup> к  $0,4 \pm 0,2$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Волга и  $0,4 \pm 0,1$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Кама) и меньше нитрат-ионов ( $0,7 \pm 0,4$  мг/дм<sup>3</sup> к  $1,4 \pm 0,5$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Волга и  $1,15 \pm 0,2$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Кама), чем в других реках, представленных в исследовании. В образцах из р. Волга содержалось большее количество марганца ( $0,02 \pm 0,02$  мг/л), чем в образцах из р. Кама ( $0,01 \pm 0,003$  мг/л), фосфат-ионов ( $0,2 \pm 0,1$  мг/дм<sup>3</sup> к  $0,10 \pm 0,03$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Кама и  $0,1 \pm 0,1$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Казанка) и общего фосфора ( $0,06 \pm 0,03$  мг/дм<sup>3</sup> к  $0,03 \pm 0,01$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Кама и  $0,04 \pm 0,03$  мг/дм<sup>3</sup> в р. Казанка), чем в других исследованных реках. Также нами были обнаружены достоверные отличия в показателях альфа-разнообразия. Образцы из р. Кама имели самые высокие значения всех индексов альфа-разнообразия по сравнению с образцами из р. Казанка и самые высокие значения индексов Шеннона ( $7,3 \pm 0,5$  к  $6,95 \pm 0,4$  в р. Волга и  $6,46 \pm 0,7$  в р. Казанка) и Симпсона ( $0,98 \pm 0,01$  к  $0,96 \pm 0,02$  в р. Волга и  $0,93 \pm 0,05$  в р. Казанка) по сравнению со всеми реками, представленными в исследовании. Также в исследовании был проведен корреляционный анализ семи исследуемых химических показателей с представленными индексами биоразнообразия. Была обнаружена отрицательная корреляция индекса Шеннона с количеством марганца ( $R = -0,5$ ;  $p < 0,1$ ) и отрицательная корреляция индекса Чао1 с нитрит-ионами ( $R = -0,4$ ;  $p < 0,1$ ). Полученные результаты указывают на возможное негативное влияние данных химических антропогенных факторов на биоразнообразие микробного сообщества. Из данных литературы известно, что марганец в избытке токсичен для растений и животных, у человека может вызывать расстройства центральной нервной системы (Matveeva et al., 2022). Нитрит-ионы являются мутагенами и способны вызывать у человека различные заболевания, такие как рак, метгемоглобинемия, увеличение щитовидной железы и сахарный диабет (Parvizishad et al., 2017).

### 4. Выводы

В данном исследовании образцов, полученных из трех разных рек одной географической зоны, было выявлено, что загрязнение воды марганцем и нитрит-ионами влияет на разнообразие микробного сообщества.

### Благодарности

Работа выполнена на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект No FZSM-2023-0013).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Akhtar N., Syakir Ishak M.I., Bhawani S.A. et al. 2021. Various natural and anthropogenic factors responsible for water quality degradation: A review. *Water* 13(19): 2660. DOI: [10.3390/w13192660](https://doi.org/10.3390/w13192660)
- Breton-Deval L., Sanchez-Flores A., Juárez K. et al. 2019. Integrative study of microbial community dynamics and water quality along The Apatlaco River. *Environmental pollution* 255: 113158. DOI: [10.1016/j.envpol.2019.113158](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113158)
- Li P., Qian H., Howard K.W.F. et al. 2014. Anthropogenic pollution and variability of manganese in alluvial sediments of the Yellow River, Ningxia, northwest China. *Environ Monit Assess* 186: 1385–1398. DOI: [10.1007/s10661-013-3461-3](https://doi.org/10.1007/s10661-013-3461-3)
- Matveeva V.A., Alekseenko A.V., Karthe D. et al. 2022. Manganese pollution in mining-influenced rivers and lakes: Current state and forecast under climate change in the Russian Arctic. *Water* 14(7): 1091. DOI: [10.3390/w14071091](https://doi.org/10.3390/w14071091)
- Parvizishad M., Dalvand A., Mahvi A.H. et al. 2017. Review of Adverse Effects and Benefits of Nitrate and Nitrite in Drinking Water and Food on Human Health. *Health Scope* 6(3): e14164. DOI: [10.5812/jhealthscope.14164](https://doi.org/10.5812/jhealthscope.14164)
- Yuce G., Pinarbasi A., Ozcelik S. et al. 2006. Soil and water pollution derived from anthropogenic activities in the Porsuk River Basin, Turkey. *Environmental Geology* 49: 359–375. DOI: [10.1007/s00254-005-0072-5](https://doi.org/10.1007/s00254-005-0072-5)

# Comparative analysis of the microbial community in the water resources of the city of Kazan



Siniagina M.N.\*, Khusnutdinova D.R., Markelova M.I., Senina A.M., Khaliullina L.J., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V.

Kazan Federal University, 18 Kremlyovskaya Str., Kazan 420008, Russia

**ABSTRACT.** The study of microbial communities is a useful tool for monitoring the degradation of aquatic ecosystems. Using 16S rRNA gene sequencing, we analyzed the bacterial communities of the rivers Volga and Kazanka which are the water resources of the city of Kazan. Despite the lack of significant differences in the biodiversity of these river ecosystems, some microbial taxa indicate the degradation status of the Kazanka River ecosystems compared to the Volga River.

**Keywords:** microbial community, next-generation sequencing, 16S rRNA gene, river ecosystem, biodiversity, Kazan

**For citation:** Siniagina M.N., Khusnutdinova D.R., Markelova M.I., Senina A.M., Khaliullina L.J., Khaliullin I.I., Grigoryeva T.V. Comparative analysis of the microbial community in the water resources of the city of Kazan // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1095-1100. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1095

## 1. Introduction

Water ecosystems in urban areas are constantly exposed to negative anthropogenic factors, which can lead to alteration of the natural flow regime, water pollution and a decrease in biodiversity. When monitoring river ecosystems in order to assess their status, it is common to analyze water communities and identify indicator organisms, particularly microorganisms that are more sensitive to moderate and chronic environmental degradation (Yang et al., 2019). However, freshwater microbial communities have mainly been studied in lake ecosystems, while river ecosystems have been studied to a lesser extent (Savio et al., 2015). Therefore, this study presents a comparative analysis of the microbial communities of the Volga and Kazanka rivers.

## 2. Materials and methods

Water samples were taken from the surface of the Volga River (n=12) and Kazanka River (n=13) between 2017 and 2019. All collected samples were centrifuged to concentrate biomass. DNA was extracted using a DNA-express kit (Lytech, Russia). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified and then sequenced on MiSeq platform (Illumina, USA) using 300 bp paired-end read mode. The obtained data were

analyzed using the QIIME v. 1.9.1. The paired reads were merged and filtered for quality. The sequences were grouped into operational taxonomic units (OTUs) based on a 97% similarity threshold to the GreenGenes v. 13.8 reference database. For diversity analysis of the bacterial community, the Shannon index was calculated. Student's t-test was used to compare the bacterial community between the rivers (p-value < 0.05 considered significant).

## 3. Results and discussion

There were no significant differences in the microbial diversity between the Volga and Kazanka rivers (Shannon index was  $6.95 \pm 0.42$  and  $6.52 \pm 0.68$ , respectively). Both Volga and Kazanka communities were equally represented by dominant bacterial taxa (>1% of the community in average) such as the representatives of the orders *Actinomycetales*, *Acidimicrobiales*, *Sphingobacteriales* and *Microbacteriaceae*, the families *Comamonadaceae* and *Microbacteriaceae*, and the genera *Flavobacterium* and *Sediminibacterium*.

According to a comparative analysis of the Volga and Kazanka microbial communities, there are statistically significant differences in the abundance of 102 bacterial taxa (p<0.05). Data on the abundance of dominant bacterial taxa (>1% of the com-

\*Corresponding author.

E-mail address: [marias25@mail.ru](mailto:marias25@mail.ru) (M.N. Siniagina)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024



munity) that differed significantly between the Volga and Kazanka Rivers are represented in Figure. It is interesting that cyanobacteria of the genus *Microcystis* made up the majority of the community in the Volga River ( $12.61 \pm 8.90\%$ ) and were almost absent in the Kazanka River ( $0.15 \pm 0.36\%$ ). At the same time, the Kazanka was dominated by cyanobacteria of the genus *Planktothrix* ( $24.53 \pm 10.71\%$ ), which were rare in the Volga ( $0.57 \pm 0.74\%$ ). Both genera of cyanobacteria are capable of producing toxins and are the dominant cause of freshwater blooms worldwide (Chen et al., 2020; Wilhelm et al., 2020).

While bacteria of the family *Pelagibacteraceae* ( $9.68 \pm 2.39\%$ ) and the genus *Limnohabitans* ( $4.57 \pm 1.13\%$ ) were dominant in the Volga, the Kazanka River contained significantly lower levels of these bacteria ( $2.53 \pm 0.98\%$  и  $2.69 \pm 0.98\%$ , respectively). Bacteria of the family *Pelagibacteraceae* are common in both freshwater and marine waters, and the genus *Limnohabitans* is most often found in river and lake ecosystems (Farkas et al., 2022). In the Volga River, the abundance of class SL56 of the phylum *Chloroflexi* ( $3.01 \pm 0.84\%$ ) and the families *Methylophilaceae* ( $2.43 \pm 0.77\%$ ) and *Xanthomonadaceae* ( $1.28 \pm 0.65\%$ ) was significantly higher than in the Kazanka River ( $0.34 \pm 0.16\%$ ,  $0.91 \pm 0.36\%$  and  $0.35 \pm 0.32\%$ , respectively). Interestingly, bacteria of the family *Methylophilaceae* are known denitrifiers, while both the family *Xanthomonadaceae* and the genus *Limnohabitans* are considered indicators of remediation in river eco-

systems (Yang et al., 2019). The low abundance of these taxa in the Kazanka may indicate a deterioration of the aquatic ecosystem. In addition, the Kazanka River has a higher numbers of the genus *Candidatus Xiphinematobacter* of the family *Chthoniobacteraceae*, which has been shown to be associated with high levels of arsenic in water (de Diego et al., 2022).

#### 4. Conclusion

Thus,  $\alpha$ -diversity in the river ecosystems of Kazan, represented by the Volga and the Kazanka rivers, does not differ significantly. However, the abundance of some bacterial taxa is significantly lower in the Kazanka, which indicates water pollution and degradation of the river ecosystem.

#### Acknowledgements

The work was carried out at the Interdisciplinary Center of Shared Use of Kazan Federal University and was supported by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project #FZSM-2023-0013).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

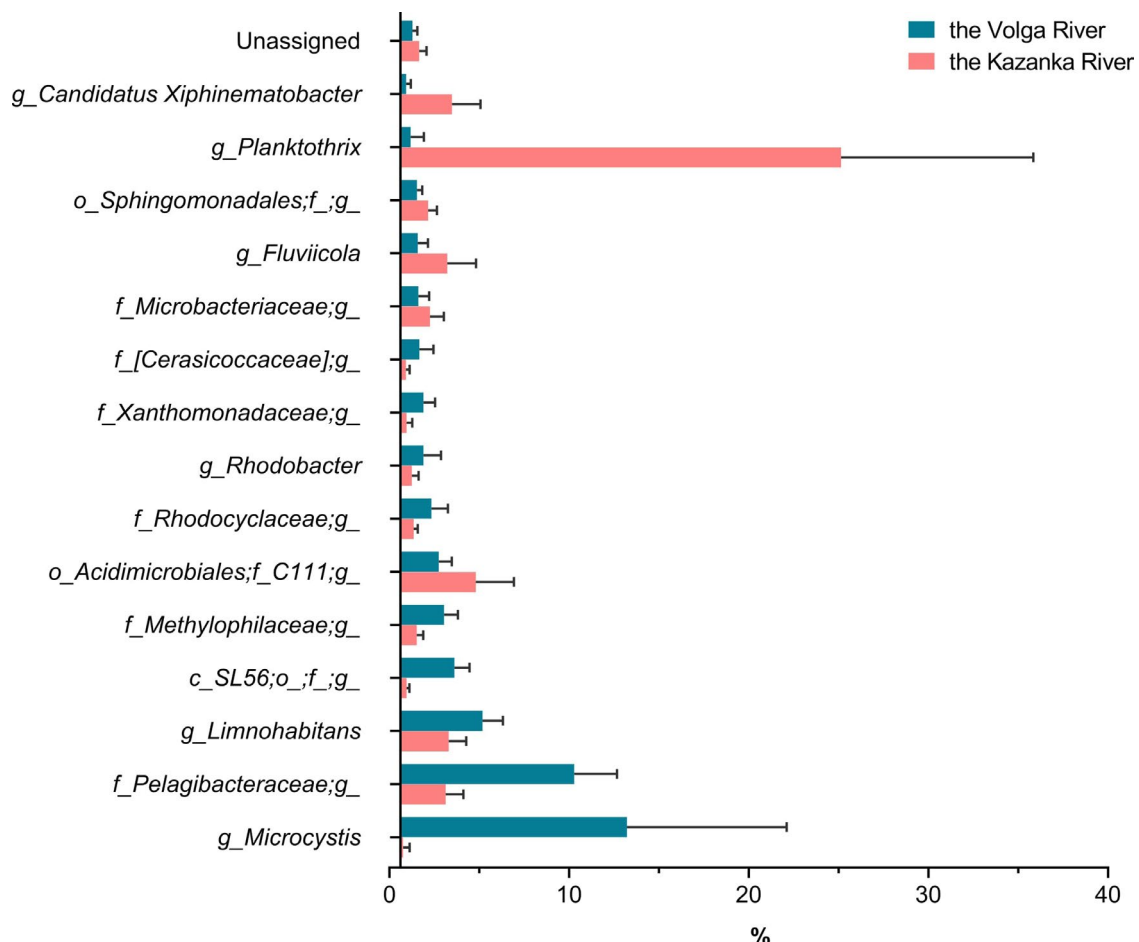


Fig. Abundance of dominant bacterial taxa (>1% of the community) that differ significantly between the Volga and Kazanka Rivers ( $p < 0.05$ )



## References

Chen X., Bai D., Song C. et al. 2020. Microcystis bloom in an urban lake after river water diversion—a case study. *Water* 12(6): 1811. DOI: [10.3390/w12061811](https://doi.org/10.3390/w12061811)

de Diego G.A., Penas-Steinhardt A., Ferro J.P. et al. 2022. Impact of exposure to arsenic on the bacterial microbiota associated with river biofilms in the Pampas region. *Aquatic Toxicology* 252: 106319. DOI: [10.1016/j.aquatox.2022.106319](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106319)

Farkas M., Szoboszlai S., Vörös L. et al. 2022. Bacterial community dynamics along a river-wetland-lake system. *Water* 14(21): 3519. DOI: [10.3390/w14213519](https://doi.org/10.3390/w14213519)

Savio D., Sinclair L., Ijaz U.Z. et al. 2015. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. *Environmental microbiology* 17(12): 4994-5007. DOI: [10.1111/1462-2920.12886](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886)

Wilhelm S.W., Bullerjahn G.S., McKay R.M. 2020. The complicated and confusing ecology of Microcystis blooms. *MBio* 11(3): 10-128. DOI: / DOI: [10.1128/mbio.00529-20](https://doi.org/10.1128/mbio.00529-20)

Yang Y., Li S., Gao Y. et al. 2019. Environment-driven geographical distribution of bacterial communities and identification of indicator taxa in Songhua River. *Ecological Indicators* 101: 62-70. DOI: [10.1016/j.ecolind.2018.12.047](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.12.047)

# Сравнительная характеристика микробных сообществ водных ресурсов города Казани

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Синягина М.Н., Хуснутдинова Д.Р., Маркелова М.И., Сенина А.М., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Кремлевская 18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Исследование микробных сообществ является полезным инструментом для мониторинга деградации водных экосистем. С помощью секвенирования гена 16S рРНК мы провели анализ бактериальных сообществ водных ресурсов города Казань – рек Волга и Казанка. Несмотря на отсутствие отличий в биоразнообразии данных речных экосистем, выявлены некоторые таксоны микроорганизмов, которые указывают на ухудшение состояния экосистемы р. Казанка по сравнению с р. Волга.

**Ключевые слова:** микробное сообщество, секвенирование следующего поколения, ген 16S рРНК, речная экосистема, биоразнообразие, Казань

Для цитирования: Синягина М.Н., Хуснутдинова Д.Р., Маркелова М.И., Сенина А.М., Халиуллина Л.Ю., Халиуллин И.И., Григорьева Т.В. Сравнительная характеристика микробных сообществ водных ресурсов города Казани // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1095-1100. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1095

## 1. Введение

Водные экосистемы, расположенные вблизи городов, постоянно подвергаются антропогенному воздействию, что может приводить к негативным последствиям, таким как изменение естественных водных потоков, загрязнение воды и снижение биоразнообразия. Для мониторинга состояния речных экосистем и оценки степени их нарушения проводят анализ водных сообществ и выявляют индикаторные организмы, в том числе микроорганизмы, которые более чувствительны к умеренной и хронической деградации окружающей среды (Yang et al., 2019). Однако пресноводные микробные сообщества исследуются преимущественно в озерных экосистемах, в то время как речные экосистемы остаются менее изученными (Savio et al., 2015). В этой связи, в данной работе мы представляем сравнительную характеристику микробных сообществ рек Волга и Казанка.

## 2. Материалы и методы

Отбор проб проводился с поверхности воды рек Волги (n=12) и Казанки (n=13) в период с 2017 по 2019 год. Собранные образцы концентрировали центрифугированием и далее проводили

выделение ДНК с помощью коммерческого набора «ДНК-экспресс» (Литех, Россия). Анализ микробного сообщества проводился методом секвенирования переменного региона V3-V4 гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina, США) в режиме парных прочтений по 300 п.н. Полученные данные были проанализированы с помощью программы QIIME v. 1.9.1. Парные риды были объединены, отфильтрованы по качеству. Прочтения были сгруппированы в операционные таксономические единицы (OTU) на основе 97%-ного порога сходства с базой данных GreenGenes v. 13.8. Для характеристики разнообразия бактериального сообщества был рассчитан индекс Шеннона. Для выявления статистически значимых различий при сравнительном анализе бактериального сообщества рек применяли Т-критерий Стьюдента.

## 3. Результаты и обсуждение

Микробное разнообразие рек Волга и Казанка достоверно не различается (индекс Шеннона  $6,95 \pm 0,42$  и  $6,52 \pm 0,68$ , соответственно). В обоих речных сообществах среди доминирующих таксонов (>1% сообщества в среднем) в равной доле представлены бактерии порядков *Actinomycetales*,

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [marias25@mail.ru](mailto:marias25@mail.ru) (М.Н. Синягина)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



*Acidimicrobiales*, *Sphingobacteriales* и *Microbacteriaceae*, семейств *Comamonadaceae* и *Microbacteriaceae*, а также родов *Flavobacterium* и *Sediminibacterium*.

По результатам сравнительного анализа микробных сообществ рек Казанка и Волга были выявлены статистически значимые различия в представленности 102 таксонов ( $p < 0,05$ ). Данные о численности доминантных бактериальных таксонов, достоверно различавшихся между р. Волга и р. Казанка, представлены на рисунке. Интересно, что составляющие большую долю в р. Волга цианобактерии рода *Microcystis* ( $12,61 \pm 8,90\%$ ) практически отсутствуют в р. Казанка ( $0,15 \pm 0,36\%$ ). В то же время, в р. Казанка доминируют цианобактерии рода *Planktothrix* ( $24,53 \pm 10,71\%$ ), которые практически отсутствуют в р. Волга ( $0,57 \pm 0,74\%$ ). Представители обоих родов цианобактерий способны продуцировать токсины и являются доминирующими источниками цветения в пресных водах по всему миру (Chen et al., 2020; Wilhelm et al., 2020).

Доля доминирующих в р. Волге бактерий семейства *Pelagibacteraceae* ( $9,68 \pm 2,39\%$ ) и рода *Limnohabitans* ( $4,57 \pm 1,13\%$ ), была значимо ниже в р. Казанка ( $2,53 \pm 0,98\%$  и  $2,69 \pm 0,98\%$ , соответственно). Представители семейства *Pelagibacteraceae* распространены как в пресных, так и морских водах, а представители рода *Limnohabitans* наиболее часто встречаются в реках и водно-болотных системах (Farkas et al., 2022). В р. Волга достоверно выше представленность бактерий класса SL56 филы *Chloroflexi* ( $3,01 \pm 0,84\%$ ), а также семейств *Methylophilaceae* ( $2,43 \pm 0,77\%$ ) и *Xanthomonadaceae*

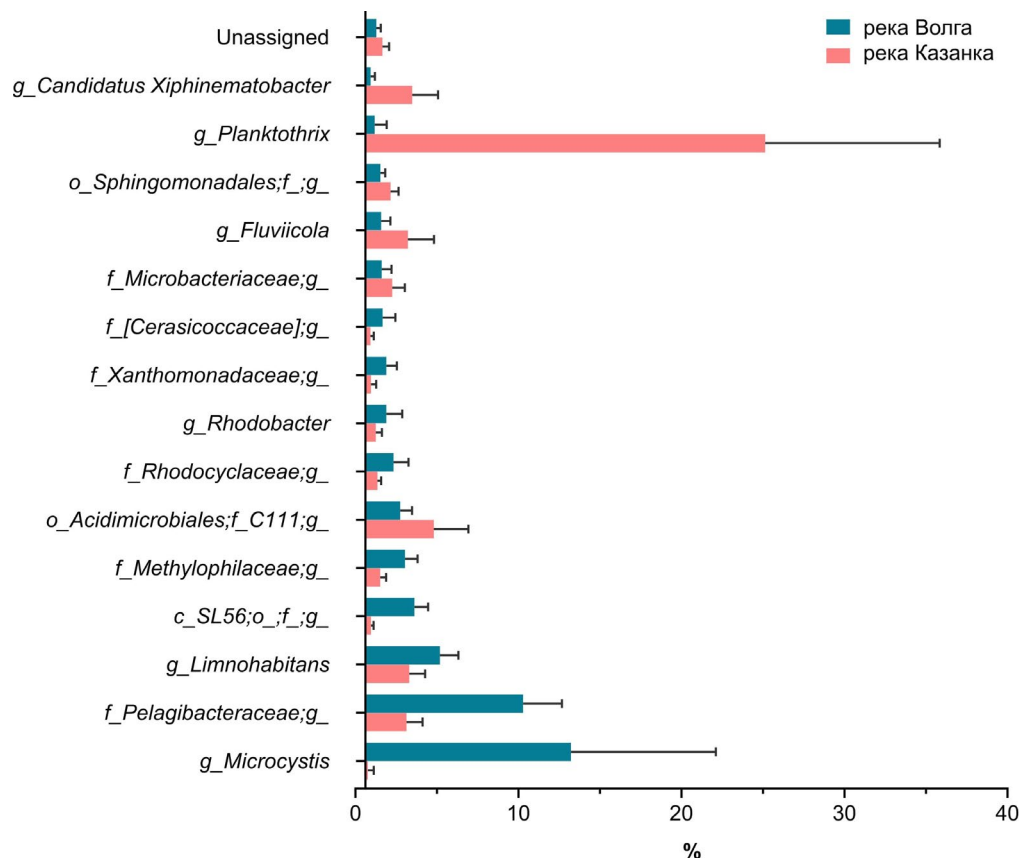
( $1,28 \pm 0,65\%$ ) по сравнению с их долей в р. Казанка ( $0,34 \pm 0,16\%$ ,  $0,91 \pm 0,36\%$  и  $0,35 \pm 0,32\%$ , соответственно). Интересно, что представители семейства *Methylophilaceae* являются распространенными денитрификаторами, а бактерий семейства *Xanthomonadaceae* и рода *Limnohabitans* считаются индикаторами восстановления речных экосистем (Yang et al., 2019). Низкая представленность данных таксонов в р. Казанка может указывать на ухудшение состояния водной экосистемы реки. Кроме того, в р. Казанка достоверно выше доля рода *Candidatus Xiphinematobacter* семейства *Chthoniobacteraceae*, доля которого повышается при высоком содержании мышьяка в воде (de Diego et al., 2022).

#### 4. Заключение

Таким образом,  $\alpha$ -разнообразие речных экосистем города Казани – рек Волга и Казанка – не отличается. Однако в бактериальном сообществе р. Казанка достоверно ниже представленность ряда таксонов, которые указывают на наличие водных загрязнений и нарушение данной речной экосистемы.

#### Благодарности

Работа выполнена на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ за счет субсидии, выделенной КФУ на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (№ FZSM-2023-0013).



**Рис.** Представленность доминантных бактериальных таксонов (>1% сообщества), достоверно различающихся между р. Волга и р. Казанка ( $p < 0,05$ )

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Chen X., Bai D., Song C. et al. 2020. Microcystis bloom in an urban lake after river water diversion—a case study. *Water* 12(6): 1811. DOI: [10.3390/w12061811](https://doi.org/10.3390/w12061811)

de Diego G.A., Penas-Steinhardt A., Ferro J.P. et al. 2022. Impact of exposure to arsenic on the bacterial microbiota associated with river biofilms in the Pampas region. *Aquatic Toxicology* 252: 106319. DOI: [10.1016/j.aquatox.2022.106319](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106319)

Farkas M., Szoboszlai S., Vörös L. et al. 2022. Bacterial community dynamics along a river-wetland-lake system. *Water* 14(21): 3519. DOI: [10.3390/w14213519](https://doi.org/10.3390/w14213519)

Savio D., Sinclair L., Ijaz U.Z. et al. 2015. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. *Environmental microbiology* 17(12): 4994-5007. DOI: [10.1111/1462-2920.12886](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886)

Wilhelm S.W., Bullerjahn G.S., McKay R.M. 2020. The complicated and confusing ecology of Microcystis blooms. *MBio* 11(3): 10-128. DOI: / DOI: [10.1128/mbio.00529-20](https://doi.org/10.1128/mbio.00529-20)

Yang Y., Li S., Gao Y. et al. 2019. Environment-driven geographical distribution of bacterial communities and identification of indicator taxa in Songhua River. *Ecological Indicators* 101: 62-70. DOI: [10.1016/j.ecolind.2018.12.047](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.12.047)



# Identification of microcystin producing cyanobacteria in the plankton of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir



Sorokovikova E.G. \*, Tikhonova I.V., Naidanova Ya.A., Belykh O.I.

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Genes of synthesis of hepatotoxic microcystin belonging to the genera *Microcystis* and *Dolichospermum* (*Anabaena*) were previously identified in samples of plankton from Lake Baikal and reservoirs of the Angara HPP cascade. However, accurate identification of toxin producing species is not possible without culture studies. In this study, 17 strains of planktonic cyanobacteria belonging to the most widespread species in water bodies of temperate zone were obtained by isolation and propagation of individual filaments or colonies. Using molecular biological and immunoassay analyses, it was revealed that the species *Dolichospermum lemmermannii* and *Microcystis aeruginosa* were microcystin producers. Of the eight *D. lemmermannii* strains obtained, only two produced microcystins, their morphological feature being the ability to form large colonies.

**Keywords:** *Dolichospermum lemmermannii*, *Microcystis aeruginosa*, water bloom, microcystin

**For citation:** Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Naidanova Ya.A., Belykh O.I. Identification of microcystin producing cyanobacteria in the plankton of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1101-1108. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1101

## 1. Introduction

Cyanobacterial blooms are a characteristic consequence of global processes of water body eutrophication and climate change (Huisman et al., 2018). Many negative effects are observed during blooms of water bodies, such as water pollution by products of life activity and decomposition of cyanobacteria, decreased transparency and deterioration of water quality, increased organic matter content, oxygen deficiency, etc., leading to changes in species composition and structure of biocenoses, functional relationships of hydrobionts, and, ultimately, ecosystem degradation. Blooming of water bodies and deterioration of water quality are urgent problems in most countries of the world. The frequency and prevalence of cyanobacterial blooms, including toxic blooms, have increased significantly in recent decades.

The first reports on the occurrence in Lake Baikal of cyanobacteria containing microcystin synthesis (MC) genes were obtained in 2010 (Belykh et al., 2015). Using markers to the *mcyE* gene, two MC-producing cyanobacterial genera were detected in Lake Baikal: *Dolichospermum* and *Microcystis*. The number of *Microcystis mcyE* gene sequences was low, in contrast to *Dolichospermum*, which is consistent with

their abundance. The presence of microcystin in water samples and phytoplankton biomass has been repeatedly confirmed by immunochemistry and chromatomass spectrometry (Belykh et al., 2013). Water blooms caused by saxitoxin-producing *D. lemmermannii* have been recorded in the Irkutsk Reservoir (Grachev et al., 2018).

Usually, up to five *Dolichospermum* species and up to three *Microcystis* species occur simultaneously in the phytoplankton of Lake Baikal, and genus-specific genetic markers are insufficient to identify toxin-producing species. The aim of the study is to obtain unialgal cultures of cyanobacteria by isolating and propagating individual trichomes or colonies and to determine their species identity and toxinogenic potential.

## 2. Materials and methods

Mesh samples were collected in July-August 2023 in Lake Baikal (coastal areas) and in the Irkutsk Reservoir in Yelovy Bay near Patrony settlement. Cultures were obtained from isolated colonies or single trichomes sampled with a Pasteur pipette under a stereomicroscope. Each isolate was cleaned in a few drops of sterile Baikal water until visible contaminants were removed and transferred to a screw-capped glass tube

\*Corresponding author.

E-mail address: [katrin@lin.irk.ru](mailto:katrin@lin.irk.ru) (E.G. Sorokovikova)

**Received:** August 01, 2024; **Accepted:** August 15, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



with 20 ml of liquid medium. In the laboratory, cultures were dispersed into tubes and flasks to obtain biomass sufficient for molecular biological and chemical analysis. Z-8 medium (Rippka, 1988) was used for growing filamentous cyanobacteria, cultured at room temperature (20-26°C) under natural light with supplementary illumination by a full-spectrum LED phytolamp (Uniel, China) in day:night 12:12 h mode. Cyanobacteria of the genus *Microcystis* were grown on MA medium (Watanabe and Oishi, 1985) at temperature 27-30°C with illumination by a full-spectrum fluorescent phytolamp in the day:night 12:12 h regime. Taxonomic identification of cultures was performed using an Axio Imager microscope (Carl Zeiss, Germany) and guides (Komárek, 2013; Komárek and Anagnostidis, 1999).

DNA isolation, PCR, and tree construction were performed according to the methods described previously (Belykh et al., 2011). The primers HepF and HepR were used to detect the *mcyE* gene (Jungblut and Neilan, 2006). Sequences were obtained on a Nanofor genetic analyzer (Syntol, Russia) using GenSeq reagents (Syntol) and deposited in GenBank under accession numbers PP971142-PP971144.

The presence of MC was determined using immunochemical “Test-system for rapid determination of microcystin in water and freshwater fish” (Signal Research Center, Russia) according to the manufacturer’s instructions. Preliminary 1 ml of culture was treated by freeze-thawing (5 cycles at – 20 and + 25°C) to destroy cell walls.

### 3. Results and discussion

The study of morphology using light microscopy showed that among the obtained strains, eight belong to the species *Dolichospermum lemmermannii* (family Aphanizomenonaceae, order Nostocales), a colonial filamentous cyanobacterium causing water blooms in Lake Baikal and Irkutsk Reservoir (Bondarenko et al., 2021; Grachev et al., 2018) (Table).

During the *D. lemmermannii* blooms, *D. smithii* and *D. crassum* species are usually found in phytoplankton in low abundance, and they were represented by one and two strains, respectively, in the culture collection. The strains *Aphanizomenon flos-aquae* 12/23Y and *Gloeotrichia echinulata* 14/23M belong to the same family. All these species are widely distributed in temperate zone water bodies, often cause water blooms and are potential producers of various cyanotoxins (Komárek, 2013).

Cyanobacteria of the genus *Microcystis* (order Chroococcales) were represented by species of *Microcystis aeruginosa* and *M. novacekii*, the latter being observed in Lake Baikal for the first time. These species are warm-loving and develop in the temperate zone only in shallow, well-warmed water bodies (Komárek and Anagnostidis, 1999). A strain of the associated cyanobacterium *Pseudanabaena mucicola* 13/23T (order Pseudanabaenales) was isolated from a colony of *M. novacekii* strain BT23 that inhabited in its colonial mucus. Strain 15/23M had small coccoid cells surrounded by mucus, it and was identified as a represen-

**Table.** Cyanobacterial strains and their characterization

No	Species	Strain	Place of isolation	Microcystin synthetase, <i>mcyE</i> gene	MC concentration, ng/mL
1	<i>Dolichospermum lemmermannii</i>	1/23Mu	Lake Baikal, Maloe More Strait, Mukhor Bay	–	0
2	<i>D. lemmermannii</i>	2/23M	Lake Baikal, Maritui settl.	+	> 1
3	<i>D. lemmermannii</i>	3/23Y	Irkutsk Reservoir, Yelovy Bay	–	0
4	<i>D. lemmermannii</i>	4/23Y		+	> 1
5	<i>D. lemmermannii</i>	5/23Y		–	0
6	<i>D. lemmermannii</i>	6/23M	Lake Baikal, Maritui settl.	–	0
7	<i>D. lemmermannii</i>	7/23M		–	0
8	<i>D. lemmermannii</i>	8/23M		–	0
9	<i>D. smithii</i>	9/23Y	Irkutsk Reservoir, Yelovy Bay	–	0
10	<i>D. crassum</i>	10/23Y		–	0
11	<i>D. crassum</i>	11/23Y		–	0
12	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BN23	Lake Baikal, Nizhneangarsk settl.	+	> 1
13	<i>M. novacekii</i>	BT23	Lake Baikal, Turka settl.	–	0
14	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	12/23Y	Irkutsk Reservoir, Yelovy Bay	–	0
15	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	13/23T	Lake Baikal, Turka settl. (endogloetic in <i>M. novacekii</i> BT23)	–	0
16	<i>Gloeotrichia echinulata</i>	14/23M	Lake Baikal, Maritui settl.	–	0
17	<i>Aphanocapsa</i> sp.	15/23M		–	0

tative of the genus *Aphanocapsa* (order Chroococcales) (Table).

Molecular biological analysis of strains using genus-specific primers to the aminotransferase domain of the microcystinsynthetase *mcyE* gene was positive for strains *Dolichospermum lemmermannii* 2/23M, *D. lemmermannii* 4/23Y, and *Microcystis aeruginosa* BN23. The sequence of strain BN23 was 98.5-98% similar to the sequences of *Microcystis aeruginosa* strains S1-S4 from Hilla River, Iraq, NIES-843 from Lake Kasumigaura, Japan and FCY-26 from Lake Paldang, Korea. The maximum similarity (98.7%) was observed with the uncultured sequence KF219506 obtained earlier from Lake Baikal (Belykh et al., 2015).

The sequence of strain 2/23M had close similarity (99.1-99%) to the sequences of *D. lemmermannii* strains 1tu32s11, NIVA-CYA 438 and NIVA-CYA 269 isolated from lakes in Norway and Finland. The sequence of strain 4/23Y was 99.5-99% similar to the sequences of *Dolichospermum* sp. strains BIR250A, UHCC 0315A and 0tu33s16 from Finnish lakes. It should be noted that the maximum similarity for strains 2/23M and 4/23Y (99.8% and 99.6%, respectively) was observed with the previously obtained uncultured sequence KF219514 from the Ust-Ilmsk reservoir (Belykh et al., 2013).

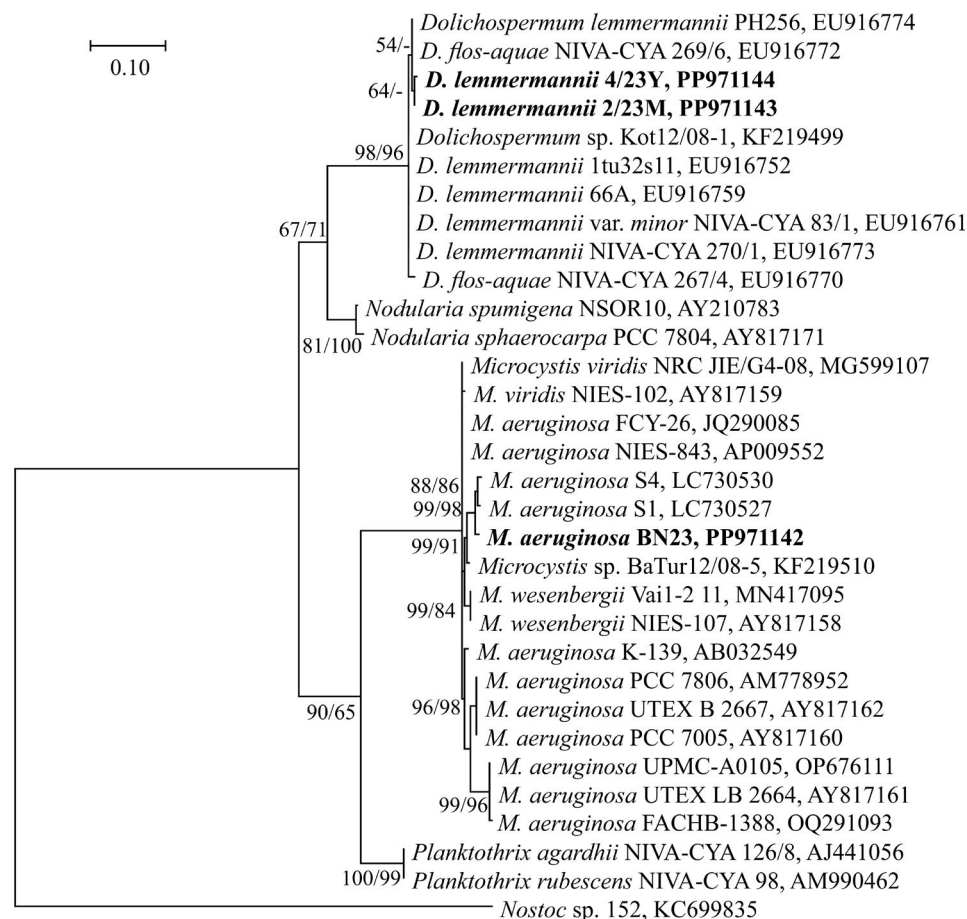
Phylogenetic trees constructed by the two different methods had a similar topology. The sequences are grouped into four stable clades according to cyanobacteria genera: *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, and *Planktothrix* (Fig.).

Immunoassay analysis using test strips showed that cultures containing the *mcyE* gene produced hepatotoxic microcystins at concentrations of more than 1 ng/mL (Table).

Thus, only two *D. lemmermannii* strains out of eight contained the *mcyE* gene and produced microcystins, which is consistent with the known evidence that both toxic and non-toxic genotypes belonging to the same species are simultaneously present in cyanobacterial communities (Vaitomaa et al., 2003). Toxic strains of *D. lemmermannii* had similar cell morphology to the non-toxic ones, but differed from them in their ability to form very large (up to 5 mm in diameter) colonies.

#### 4. Conclusions

In July-August 2023, 17 unialgal cultures of cyanobacteria were isolated from samples collected in the coastal areas of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir, 15 of which are potential causative agents of water blooms and toxin producers. The strains were identified as *Aphanocapsa* sp., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum crassum*, *D. lemmermannii*, *D. smithii*, *Gloeotrichia echinulata*, *Microcystis aeruginosa*, *M. novacekii* and *Pseudanabaena mucicola*. The two last species are new to Lake Baikal. Molecular biological and immunochemical analyses were used to identify cyanobacteria producing microcystins in Lake Baikal (*D. lemmermannii* and *Microcystis aeruginosa*) and Irkutsk Reservoir (*D. lemmermannii*). It was shown that toxic



**Fig.** Phylogenetic analysis of the aminotransferase domain of the *mcyE* and *ndaF* genes of planktonic cyanobacteria. The rooted tree obtained by ML analysis is shown. Numbers show bootstrap analysis results for trees ( $n = 1000$ ) constructed by different methods (ML/NJ). The sequences obtained in this work are shown in bold.

and non-microcystin-producing genotypes of *D. lemmermannii*, differing in colony size, exist simultaneously in the plankton of both water bodies.

## Acknowledgements

This study was carried out in The Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS within the framework of the State Task № 0279-2021-0015. The authors are grateful to the crew of R/V “Titov” for their assistance in sampling.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2015. Identification of toxic Cyanobacteria in Lake Baikal. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 463: 220-224. DOI: [10.1134/S1607672915040067](https://doi.org/10.1134/S1607672915040067)
- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2013. Microcystin-Producing Cyanobacteria in Water Reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chemistry for Sustainable Development* 21: 347-361.
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Fedorova G.A. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Bondarenko N.A., Tomberg I.V., Shirokaya A.A. et al. 2021. *Dolichospermum lemmermannii* (Nostocales) bloom in world's deepest Lake Baikal (East Siberia): abundance, toxicity and factors influencing growth. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 1101-1110. DOI: [10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101)
- Grachev M., Zubkov I., Tikhonova I. et al. 2018. Extensive Contamination of Water with Saxitoxin Near the Dam of the Irkutsk Hydropower Station Reservoir (East Siberia, Russia). *Toxins* 10: 402. DOI: [10.3390/toxins10100402](https://doi.org/10.3390/toxins10100402)
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16: 471-483. DOI: [10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)
- Jungblut A.D., Neilan B.A. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of microbiology* 185: 107-114. DOI: [10.1007/s00203-005-0073-5](https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5)
- Komárek J. 2013. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota. 3. Teil/Part 3: Heterocytous Genera. Heidelberg, Germany: Springer Spektrum. 1149 p.
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/1. Cyanoprokaryota. 1. Teil/Part 1: Chroococcales. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 554 p.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27. DOI: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K. et al. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7289-7297. DOI: [10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003)
- Watanabe M.F., Oishi S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1342-1344. DOI: [10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985](https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985)



# Идентификация цианобактерий-продуцентов микроцистина в планктоне озера Байкал и Иркутского водохранилища

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Сороковикова Е.Г.\* , Тихонова И.В., Найданова Я.А., Белых О.И.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В пробах планктона оз. Байкал и водохранилищ Ангарского каскада ГЭС ранее были идентифицированы гены синтеза гепатотоксина микроцистина, принадлежащие родам *Microcystis* и *Dolichospermum* (*Anabaena*). Однако точная идентификация видов, продуцирующих токсины, невозможна без исследования культур. В ходе исследования путем изолирования и размножения отдельных нитей или колоний было получено 17 штаммов планктонных цианобактерий, принадлежащих наиболее распространенным в водоемах умеренной зоны видам. С помощью молекулярно-биологического и иммуноферментного анализов показано, что продуцентами микроцистинов являлись виды *Dolichospermum lemmermannii* и *Microcystis aeruginosa*. Из восьми полученных штаммов *D. lemmermannii* только два продуцировали микроцистины, их морфологической особенностью являлась способность формировать крупные колонии.

**Ключевые слова:** *Dolichospermum lemmermannii*, *Microcystis aeruginosa*, цветение воды, микроцистин

Для цитирования: Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Найданова Я.А., Белых О.И. Идентификация цианобактерий-продуцентов микроцистина в планктоне озера Байкал и Иркутского водохранилища // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1101-1108. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1101

## 1. Введение

Цветения воды, вызванные цианобактериями, являются характерным следствием глобальных процессов эвтрофирования водоемов и изменения климата (Huisman et al., 2018). При цветении водоемов наблюдается множество негативных явлений, таких как загрязнение воды продуктами жизнедеятельности и разложения цианобактерий, уменьшение прозрачности и ухудшение качества воды, увеличение содержания органических веществ, дефицит кислорода и т.п., приводящих к изменению видового состава и структуры биоценозов, функциональных связей гидробионтов, и, в конечном итоге, к деградации экосистемы. Цветение водоемов и ухудшение качества воды являются актуальными проблемами в большинстве стран мира. Частота и распространенность вызванных цианобактериями цветений, в том числе и токсичных, существенно возросли в последние десятилетия.

Первые сведения о наличии в оз. Байкал цианобактерий, содержащих гены синтеза микроцистина (МС), были получены в 2010 г. (Belykh et al., 2015). С помощью маркеров к *mscE*-гену в оз. Байкал обнаружены два МС-продуцирующих рода

цианобактерий: *Dolichospermum* и *Microcystis*, при этом количество последовательностей *mscE*-гена *Microcystis* было невысоким, в отличие от таковых *Dolichospermum*, что согласуется с показателями их численности. Наличие микроцистинов в пробах воды и биомассе фитопланктона неоднократно подтверждалась с помощью иммунохимии и хромато-масспектрометрии (Belykh et al., 2013). В Иркутском водохранилище зарегистрировано цветение воды, вызванное *D. lemmermannii* с продукцией сакситоксинов (Grachev et al., 2018).

Обычно в фитопланктоне оз. Байкал одновременно встречаются до пяти видов *Dolichospermum* и до трех видов *Microcystis*, и родоспецифичных генетических маркеров недостаточно для идентификации видов-продуцентов токсинов. Цель исследования – получить чистые культуры цианобактерий путем изолирования и размножения отдельных трихомов или колоний и определить их видовую принадлежность и токсиногенный потенциал.

## 2. Материалы и методы

Сетные пробы были отобраны в июле-августе 2023 г. в оз. Байкал (прибрежные районы) и в

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [katrin@lin.irk.ru](mailto:katrin@lin.irk.ru) (Е.Г. Сороковикова)

Поступила: 01 августа 2024; Принята: 15 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Иркутском водохранилище в заливе Еловый в районе пос. Патроны. Культуры получали из изолированных колоний либо единичных трихомов, отобранных пипеткой Пастера под стереомикроскопом. Каждый изолят был очищен в нескольких каплях стерильной байкальской воды до удаления видимых контаминантов и перенесен в стеклянную пробирку с винтовой крышкой с 20 мл жидкой среды. В лаборатории культуры рассеивали в пробирки и колбы для получения биомассы, достаточной для молекулярно-биологического и химического анализа. Для выращивания нитчатых цианобактерий использовали среду Z-8 (Rippka, 1988), культивировали при комнатной температуре (20-26°C) при естественном освещении с досветкой светодиодной фитолампой полного спектра (Uniel, Китай) в режиме день:ночь 12:12 ч. Цианобактерии рода *Microcystis* выращивали на среде MA (Watanabe and Oishi, 1985) при температуре 27-30°C с освещением люминисцентной фитолампой полного спектра в режиме день:ночь 12:12 ч. Таксономическую идентификацию культур проводили с помощью микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия) и определителей (Komárek, 2013; Komárek and Anagnostidis, 1999).

Выделение ДНК, ПЦР и построение деревьев проводили в соответствии с методиками, описанными ранее (Belykh et al., 2011). Для выявления

гена *mscE* использовали праймеры HerF и HerR (Jungblut and Neilan, 2006). Последовательности были получены на генетическом анализаторе Нанофор (Синтол, Россия) с использованием реактивов GenSeq (Синтол) и депонированы в GenBank под номерами доступа PP971142–PP971144.

Наличие МС определяли с помощью иммунохимической «Тест-системы для экспресс-определения микроцистина в воде и пресноводной рыбе» (ФГУП НЦ «Сигнал», Россия) по методике производителя. Предварительно 1 мл культуры обрабатывали замораживанием-оттаиванием (5 циклов при –20 и +25°C) для разрушения клеточных стенок.

### 3. Результаты и обсуждение

Исследование морфологии с помощью световой микроскопии показало, что среди полученных штаммов восемь относятся к виду *Dolichospermum lemmermannii* (семейство Arphanizomenonaceae, порядок Nostocales) – колониальной нитчатой цианобактерии, вызывающей цветение воды в оз. Байкал и Иркутском водохранилище (Bondarenko et al., 2021; Grachev et al., 2018) (Таблица). Во время массового развития *D. lemmermannii* виды *D. smithii* и *D. crassum* обычно встречаются в фитопланктоне в небольшом количестве, в коллекции культур они были представлены одним и двумя штаммами, соответ-

Таблица. Штаммы цианобактерий и их характеристика

№	Вид	Штамм	Место выделения	Микроцистинсинтетаза, <i>mscE</i> -ген	Концентрация МС, нг/мл
1	<i>Dolichospermum lemmermannii</i>	1/23Му	Оз. Байкал, пр. Малое Море, з-в Мухор	–	0
2	<i>D. lemmermannii</i>	2/23М	Оз. Байкал, пос. Маритуй	+	> 1
3	<i>D. lemmermannii</i>	3/23У	Иркутское в-ще, з-в Еловый	–	0
4	<i>D. lemmermannii</i>	4/23У		+	> 1
5	<i>D. lemmermannii</i>	5/23У		–	0
6	<i>D. lemmermannii</i>	6/23М	Оз. Байкал, пос. Маритуй	–	0
7	<i>D. lemmermannii</i>	7/23М		–	0
8	<i>D. lemmermannii</i>	8/23М		–	0
9	<i>D. smithii</i>	9/23У	Иркутское в-ще, з-в Еловый	–	0
10	<i>D. crassum</i>	10/23У		–	0
11	<i>D. crassum</i>	11/23У		–	0
12	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BN23	Оз. Байкал, пос. Нижнеангарск	+	> 1
13	<i>M. novacekii</i>	BT23	Оз. Байкал, пос. Турка	–	0
14	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	12/23У	Иркутское в-ще, з-в Еловый	–	0
15	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	13/23Т	Оз. Байкал, пос. Турка (из колонии <i>M. novacekii</i> BT23)	–	0
16	<i>Gloeotrichia echinulata</i>	14/23М	Озеро Байкал, пос. Маритуй	–	0
17	<i>Aphanocapsa</i> sp.	15/23М		–	0

ственно. К этому же семейству относятся штаммы *Aphanizomenon flos-aquae* 12/23Y и *Gloeotrichia echinulata* 14/23M. Все эти виды широко распространены в водоемах умеренной зоны, часто вызывают цветение воды и являются потенциальными продуцентами различных цианотоксинов (Komárek, 2013).

Цианобактерии рода *Microcystis* (порядок Chroococcales) были представлены видами *Microcystis aeruginosa* и *M. novacekii*, последний отмечается в оз. Байкал впервые. Эти виды теплолюбивы, в умеренной зоне развиваются только в мелководных, хорошо прогреваемых водоемах (Komárek and Anagnostidis, 1999). Из колонии штамма *M. novacekii* BT23 выделен штамм сопутствующей цианобактерии *Pseudanabaena mucicola* 13/23T (порядок Pseudanabaenales), обитавший в его колониальной слизи. Штамм 15/23M имел мелкие коккоидные клетки, объединенные слизью, он был идентифицирован как представитель рода *Aphanocapsa* (порядок Chroococcales) (Таблица).

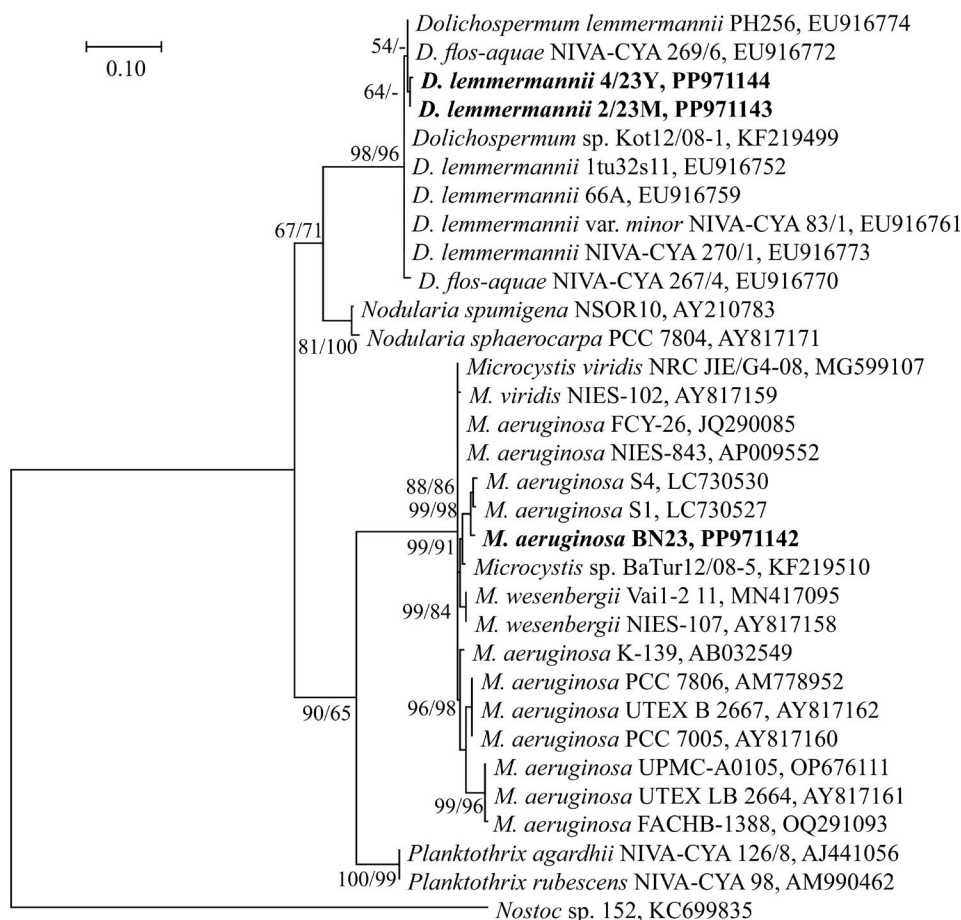
Молекулярно-биологический анализ штаммов с использованием родоспецифичных праймеров к домену аминотрансферазы гена микроцистинсинтетазы *mscE* был положительным для культур *Dolichospermum lemmermannii* 2/23M, *D. lemmermannii* 4/23Y и *Microcystis aeruginosa* BN23. Последовательность штамма BN23 была на 98.5-98% сходна с последовательностями штаммов *Microcystis*

*aeruginosa* S1-S4 из реки Hilla в Ираке, NIES-843 из оз. Kasumigaura, Япония и FCY-26 из оз. Палданг, Корея. Максимальное сходство (98.7%) было отмечено с некультивируемой последовательностью KF219506, полученной ранее из оз. Байкал (Belykh et al., 2015).

Последовательность штамма 2/23M имела близкое сходство (99.1-99%) с последовательностями штаммов *D. lemmermannii* 1tu32s11, NIVA-CYA 438 и NIVA-CYA 269, выделенных из озер Норвегии и Финляндии. Последовательность штамма 4/23Y была на 99.5-99% сходна с последовательностями штаммов *Dolichospermum* sp. BIR250A, UHCC 0315A и 0tu33s16 из озер Финляндии. Следует отметить, что максимальное сходство для штаммов 2/23M и 4/23Y (99.8% и 99.6%, соответственно) было отмечено с ранее полученной некультивируемой последовательностью KF219514 из Усть-Илимского водохранилища (Belykh et al., 2013).

Филогенетические деревья, построенные двумя различными методами, имели сходную топологию. Последовательности группируются в четыре устойчивые клады согласно родовой принадлежности цианобактерий: *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* (Рис.).

Иммуноферментный анализ с применением тест-полосок показал, что культуры, содержащие *mscE* ген, продуцируют гепатотоксины микроцистины в концентрации более 1 нг/мл (Таблица).



**Рис.** Филогенетический анализ домена аминотрансферазы *mscE* и *ndaF* генов планктонных цианобактерий. Изображено укорененное древо, полученное с помощью ML-анализа. Цифрами показаны результаты бутстреп-анализа для деревьев ( $n = 1000$ ), построенных разными методами (ML/NJ). Полученные в данной работе последовательности выделены жирным.

Таким образом, только два штамма *D. lemmermannii* из восьми содержали *тсуЕ* ген и продуцировали микроцистины, что согласуется с известными данными о том, что в сообществах цианобактерий одновременно присутствуют как токсичные, так и нетоксичные генотипы, относящиеся к одному виду (Vaitomaa et al., 2003). Токсичные штаммы *D. lemmermannii* имели сходную морфологию клеток с нетоксичными, но отличались от них способностью формировать очень крупные (до 5 мм в диаметре) колонии.

#### 4. Выводы

В июле-августе 2023 г. из проб, отобранных в прибрежных районах оз. Байкал и Иркутского водохранилища, выделено 17 чистых культур цианобактерий, 15 из которых являются потенциальными возбудителями цветения воды и продуцентами токсинов. Штаммы идентифицированы как *Aphanocapsa* sp., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum crassum*, *D. lemmermannii*, *D. smithii*, *Gloeotrichia echinulata*, *Microcystis aeruginosa*, *M. novacekii* и *Pseudanabaena mucicola*. Последние два вида являются новыми для оз. Байкал. С помощью молекулярно-биологического и иммунохимического анализов выявлены цианобактерии-продуценты микроцистинов в оз. Байкал (*D. lemmermannii* и *Microcystis aeruginosa*) и Иркутском водохранилище (*D. lemmermannii*). Показано, что в планктоне обоих водоемов одновременно существуют токсичный и не продуцирующий микроцистины генотипы *D. lemmermannii*, отличающиеся размером колоний.

#### Благодарности

Работа проводилась на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ») при финансовой поддержке гос. задания № 0279-2021-0015. Авторы выражают благодарность экипажу НИС «Титов» за помощь в отборе проб.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2015. Identification of toxic Cyanobacteria in Lake Baikal. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 463: 220-224. DOI: [10.1134/S1607672915040067](https://doi.org/10.1134/S1607672915040067)
- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2013. Microcystin-producing cyanobacteria in water reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chemistry for Sustainable Development* 21: 347-361.
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Fedorova G.A. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Bondarenko N.A., Tomberg I.V., Shirokaya A.A. et al. 2021. *Dolichospermum lemmermannii* (Nostocales) bloom in world's deepest Lake Baikal (East Siberia): abundance, toxicity and factors influencing growth. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 1101-1110. DOI: [10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101)
- Grachev M., Zubkov I., Tikhonova I. et al. 2018. Extensive contamination of water with saxitoxin near the dam of the Irkutsk hydropower station reservoir (East Siberia, Russia). *Toxins* 10: 402. DOI: [10.3390/toxins10100402](https://doi.org/10.3390/toxins10100402)
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16: 471-483. DOI: [10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)
- Jungblut A.D., Neilan B.A. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of microbiology* 185: 107-114. DOI: [10.1007/s00203-005-0073-5](https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5)
- Komárek J. 2013. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota. 3. Teil/Part 3: Heterocytous Genera. Heidelberg, Germany: Springer Spektrum. 1149 p.
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/1. Cyanoprokaryota. 1. Teil/Part 1: Chroococcales. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 554 p.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27. DOI: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K. et al. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7289-7297. DOI: [10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003)
- Watanabe M.F., Oishi S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1342-1344. DOI: [10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985](https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985)



# Identification of toxin-producing cyanobacteria in water reservoirs of Kirov region and assessment of their relationship with water toxicity to hydrobionts

Short communication  
LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Sysolyatina M.A.<sup>1</sup>, Sidelev S.I.<sup>2</sup>, Kutuyavina T.I.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Vyatka State University, Moskovskaya Str., 36, Kirov, 610000, Russia

<sup>2</sup> P.G. Demidov Yaroslavl State University, Sovetskaya Str., 14, Yaroslavl, 150003, Russia

**ABSTRACT.** Molecular genetic methods of analysis were used for the first time detection of cyanotoxin biosynthesis genes (microcystin, cylindrospermopsin, anatoxin-a, and saxitoxins) in organisms inhabiting the two largest water reservoirs of Kirov region (Belokholunitsky and Omutninsky) located in the northeast of the Russian Plain in the southern taiga subzone. The *mcyE* gene responsible for microcystin production was detected in all phytoplankton samples, and the *anaC* gene responsible for anatoxin-a production was detected in the most samples. 14 cyanobacteria taxa were found in the phytoplankton of the studied reservoirs. *Microcystis* and *Dolichospermum* are the most probable microcystin producers. The most probable anatoxin-a producers in Belokholunitsky reservoir are *Aphanizomenon flos-aquae* and *Dolichospermum planctonicum*, and in Omutninsky reservoir – *Cuspidothrix issatschenkoi* and *Dolichospermum flos-aquae*. Water from the studied reservoirs had an acute toxic effect on luminescent bacteria *Escherichia coli* (“Ecolum” test system) and protozoa *Paramecium caudatum* Ehrenberg, but was non-toxic to Entomostracans *Daphnia magna* Straus.

**Keywords:** algae bloom, cyanotoxin, bioassay, toxicity

**For citation:** Sysolyatina M.A., Sidelev S.I., Kutuyavina T.I. Identification of toxin-producing cyanobacteria in water reservoirs of Kirov region and assessment of their relationship with water toxicity to hydrobionts // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1109-1114. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1109

## 1. Introduction

Cyanobacterial “blooms” of water increasingly become a problem for water supply, fishing, recreational and touristic use of water bodies (Paerl and Otten, 2018; Voyakina et al., 2020; Bondarenko et al., 2021). Toxins produced by some cyanobacteria species are thought to cause various allergic reactions and may be associated with human diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, and others (Sini et al., 2021). In this regard, the identification of toxigenic cyanobacteria in water bodies and the search for ways to regulate their numbers is an urgent area of present scientific research. The aim of our work was to identify toxin-producing cyanobacteria in water reservoirs of Kirov region using molecular genetic analysis, and to assess the relationship between cyanobacteria and water toxicity for hydrobionts.

## 2. Materials and methods

The objects of the study were two channel reservoirs (Belokholunitsky and Omutninsky) located in the northeast of the Russian Plain in the southern taiga subzone. Both reservoirs are beta-mesosaprobic according to the classification of waters by tropho-saprobic indicators, adopted in GOST 17.1.2.04-77, as well as they are eutrophic according to the value of the trophic state index (Neverova-Dziopak et al., 2012).

Water samples for phytoplankton studies were collected by scooping water from the surface (0–30 cm depth) of water bodies in August 2023. Cyanobacteria (CB) species identification was carried out by direct microscopy using a laboratory microscope Mikmed-6 variant 7 (Russia) and identifiers. Species names are given according to <https://www.algaebase.org/> (date of access: 03.06.2024).

\*Corresponding author.

E-mail address: [kutyavinati@gmail.com](mailto:kutyavinati@gmail.com) (T.I. Kutuyavina)

**Received:** June 24, 2024; **Accepted:** July 12, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



For DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) phytoplankton samples were concentrated on MFAS-OS-2 membrane filters with 0.45 µm pore diameter (Vladipor, Russia). The search for cyanotoxin (microcystin (MC), cylindrospermopsin (CYN), anatoxin-a (AN-a) and saxitoxin (STX)) biosynthesis genes was performed by classic PCR using specific primers according to the previously described methodology (Sidelev and Babanazarova, 2020).

Water toxicity was determined using three laboratory test objects belonging to different trophic levels according to certified measurement methods: luminescent bacteria *Escherichia coli* (test system “Ecolum”) (PND F T 14.1:2:3:4.11-04), protozoans *Paramecium caudatum* Ehrenberg (FR.1.39.2015.19242), and Entomostracans *Daphnia magna* Straus (FR.1.39.2007.03222).

### 3. Results and discussion

The CB species composition of Belokholunitsky and Omutninsky reservoirs includes 14 taxa. We identified *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs, *Aphanizomenon* sp., *Aphanizomenon gracile* Lemmermann, *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usachev) P. Rajaniemi, Komárek, R. Willame, P. Hrouzek, K. Kastovská, L. Hoffmann & K. Sivonen, *Dolichospermum circinale* (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek, *Dolichospermum flos-aquae* (Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Hoffmann & Komárek, *Dolichospermum planctonicum* (Brunnthaler) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek, *Dolichospermum* sp., *Gomphosphaeria lacustris* var. *compacta* Lemmermann, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, *Microcystis viridis* (A. Braun) Lemmermann, *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek ex Komárek, *Pseudanabaena galeata* Böcher, *Spirulina laxissima* G.S.West. The minimum CB abundance (0.008-0.027 mln cells/L) and biomass (0.0007-0.022 mg/L) were typical to the near-dam sites with unfavorable conditions for CB development (low biogenic element content, strong wind

water mixing). Maximum CB abundance and biomass was found in shallow, well-warmed sites in the upper reaches of reservoirs. Thus, in the upper reaches of the Belokholunitskoye reservoir they amounted 14.8 mln cells/L and 1.55 mg/L, respectively.

According to the molecular genetic analysis, all water samples contained CB species with the *mcyE* gene, potentially capable to produce MS. Species of the genera *Microcystis* and *Dolichospermum* may be the most probable producers of MS. Cyanobacteria with *anaC* gene and potentially capable to produce AN-a neurotoxin were found in the most of the analyzed samples. Potential AN-a producers in Belokholunitsky reservoir are *A. flos-aquae* and *D. planctonicum*, in Omutninsky reservoir – *C. issatschenkoi* and *D. flos-aquae*. The *stxA* gene responsible for the STX neurotoxin biosynthesis and the *cyrJ* gene responsible for the hepato- and cytotoxin CYN biosynthesis were undetected in CB in any sample. This indicates the absence of STX- and CYN-producing cyanobacteria in the studied water bodies.

In the reservoir sites with MS and AN-a producing CB, water was acute toxic to bacteria and protozoa, but non-toxic to Entomostracans (Table). With reference to published data (Boas et al., 2020), we know that *P. caudatum* is more sensitive to MS and less studied microgynines in comparison with more highly organized species. The sensitivity of *P. caudatum* to cyanotoxins is also confirmed in our study. According to Nogueira et al. (2004), the decrease of cytosolic glutathione-S-transferases activity is observed during short-term exposure of *D. magna* to cyanotoxins. Prolonged exposure and high cyanotoxin content caused a decrease in growth rate, fecundity and reduced survival of *D. magna* (Nogueira et al., 2004; Schwarzenberger, 2022). While conducting water biotesting with daphnia in our study, we evaluated only one indicator – death of daphnia over 4 days. Obviously, at low cyanotoxin content in water and with short-term exposure to the toxicant, this indicator is uninformative. There is very little information available on the application of luminescent

**Table.** Results of molecular genetic detection of toxin-producing cyanobacteria and biotesting of water from water reservoirs of Kirov region in 2023

Reservoir site	Presence of genes responsible for the cyanotoxin synthesis	Toxicity Index (T), the degree of toxicity of water as determined by a test object:		Death of <i>Daphnia magna</i> , %
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Paramecium caudatum</i>	
Belokholunitsky reservoir				
upper reaches	<i>mcyE, anaC</i>	T = 64.3 ± 2.9 high	T = 0.30 ± 0.02 permissible	0
middle	<i>mcyE, anaC</i>	T = 39.0 ± 8.2 medium	T = 0.73 ± 0.02 high	0
near-dam	<i>mcyE, anaC</i>	T = 33.0 ± 6.4 medium	T = 0.31 ± 0.02 permissible	0
Omutninsky reservoir				
middle	<i>mcyE, anaC</i>	T = 16.4 ± 10.4 permissible	T = 0.56 ± 0.27 medium	0
near-dam	<i>mcyE, anaC*</i>	T = 12.0 ± 6.1 permissible	T = 0.59 ± 0.18 medium	0

**Note:** \* – was not present in all samples.

bacteria to assess the cyanotoxin toxicity (Kalinnikova et al., 2018). Our study have shown that “Ecolum” test system is quite sensitive to cyanotoxin content in water. It can be used in water bodies monitoring for rapid assessment of toxicity of waters that contain toxin-producing CB. The results of molecular genetic detection of toxin-producing CB and biotesting were compared. It was observed at the trend level that the simultaneous presence of both MS- and AN-a-producing CB in the analyzed samples increased the water toxicity for laboratory test organisms in comparison with the samples where only MS-producers were present. However, the correlation between the occurrence of toxin-producing cyanobacteria and the degree of water toxicity was rather weak ( $r=0.55$  at  $p\leq 0.05$ ).

#### 4. Conclusuon

Cyanobacterial “blooming” of water is a widespread phenomenon in freshwater continental water bodies. Toxin-producing CB are particularly dangerous in such “blooms”. Using molecular genetic methods, the detection of cyanotoxin biosynthesis genes (MS, CYN, AN-a, STX) was carried out for the first time in two largest water reservoirs of Kirov region. The *mcyE* gene responsible for MS production was detected in CB in all analyzed samples. The *anaC* gene involved in the biosynthesis of AN-a neurotoxin was detected in the most samples. The most probable MS and AN-a producers in the studied reservoirs are species of the genera *Microcystis* and *Dolichospermum*, as well as *C. issatschenkoi* and *A. flos-aquae*. Water from Belokholunitsky and Omutninsky reservoirs had an acute toxic effect on *E. coli* and protozoa *P. caudatum*, while the degree of water toxicity increased with the simultaneous presence in samples of MS and AN-a producing CB. In further monitoring studies on water reservoirs of the Kirov region we plan to quantify the content of cyanotoxins in water and select a set of the most sensitive test-organisms for rapid assessment of toxicity of waters subjected to “blooming” by toxin-producing CB.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-77-01034).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Boas L.A.V., Senra M.V.X., Fernandes K. et al. 2020. *In vitro* toxicity of isolated strains and cyanobacterial bloom biomasses over *Paramecium caudatum* (ciliophora): Lessons from a non-metazoan model organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 202: 110937. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2020.110937](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110937)
- Bondarenko N.A., Tomberg I.V., Shirokaya A.A. et al. 2021. *Dolichospermum lemmermannii* (Nostocales) bloom in world's deepest Lake Baikal (East Siberia): abundance, toxicity and factors influencing growth. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 1101-1110. DOI: [10.31951/2658-3518-2021-A-1-1101](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2021-A-1-1101)
- Kalinnikova T.B., Gainutdinov M.Kh., Shagidulin R.R. 2018. Methods for bioassay of toxins produced by cyanobacteria (review). *Rossiyskiy zhurnal prikladnoy ekologii* [Russian Journal of Applied Ecology] 2: 35-46. (in Russian)
- Neverova-Dziopak Ye.V., Tsvetkova L.I., Makarova S.V. et al. 2012. On the ecological safety of water bodies. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern Problems of Science and Education] 3: 1-9. (in Russian)
- Nogueira I.C.G., Pereira P., Dias E. et al. 2004. Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. *Toxicon* 44: 773-780. DOI: [10.1016/j.toxicon.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.006)
- Paerl H.W., Otten T.G., Kudela R. 2018. Mitigating the expansion of harmful algal blooms across the freshwater-to-marine continuum. *Environmental Science & Technology* 52(10): 5519-5529. DOI: [10.1021/acs.est.7b05950](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05950)
- Schwarzenberger A. 2022. Negative effects of cyanotoxins and adaptative responses of *Daphnia*. *Toxins* 14(11): 770. DOI: [10.3390/toxins14110770](https://doi.org/10.3390/toxins14110770)
- Sidelev S.I., Babanazarova O.V. 2020. Detection of cyanobacterial toxins in water supply sources and tap water of some Russian cities: search for producers and approbation of removal methods. *Vodnye resursy* [Water resources] 47(2): 218-229. (in Russian) DOI: [10.31857/S0321059620020182](https://doi.org/10.31857/S0321059620020182)
- Sini P., Dang T.B.C., Fais M. et al. 2021. Cyanobacteria, cyanotoxins, and neurodegenerative diseases: Dangerous liaisons. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 8726. DOI: [10.3390/ijms22168726](https://doi.org/10.3390/ijms22168726)
- Voyakina E.Ju., Russkikh Ia.V., Chernova E.N. et al. 2020. Toxic cyanobacteria and their metabolites in the lakes of the Russian Northwest. *Theoretical and Applied Ecology* 1: 124-129. DOI: [10.25750/1995-4301-2020-1-124-129](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-1-124-129) (in Russian)

# Выявление токсинпродуцирующих цианобактерий в водохранилищах Кировской области и оценка их связи с токсичностью воды для гидробионтов

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYСысолятина М.А.<sup>1</sup>, Сиделев С.И.<sup>2</sup>, Кутявина Т.И.<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Вятский государственный университет, Московская ул., 36, Киров, 610000, Россия<sup>2</sup> Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Советская ул., 14, Ярославль, 150003, Россия

**АННОТАЦИЯ.** С использованием молекулярно-генетических методов анализа впервые проведена детекция генов биосинтеза цианотоксинов (микроцистина, цилиндроспермопсина, анатоксина-а и сакситоксинов) в двух крупнейших водохранилищах Кировской области (Белохолуницком и Омутнинском), расположенных на северо-востоке Русской равнины в подзоне южной тайги. Во всех образцах фитопланктона обнаружен ген *тсуЕ*, отвечающий за продукцию микроцистина, а в большинстве образцов - ген *анаС*, подтверждающий способность цианобактерий продуцировать анатоксин-а. Из 14 видов цианобактерий, обнаруженных в фитопланктоне, наиболее вероятными продуцентами микроцистина в изученных водоемах являются виды рр. *Microcystis* и *Dolichospermum*. Наиболее вероятными продуцентами анатоксина-а в Белохолуницком водохранилище являются виды *Aphanizomenon flos-aquae* и *Dolichospermum planctonicum*, в Омутнинском - *Cuspidothrix issaschenkoi* и *Dolichospermum flos-aquae*. Вода из исследованных водоемов оказывала острое токсическое действие на люминесцентных бактерий *Escherichia coli* (тест-система «Эколюм») и простейших *Paramecium caudatum* Ehrenberg, но не была токсична для низших ракообразных *Daphnia magna* Straus.

**Ключевые слова:** «цветение» воды, цианотоксин, биотестирование, токсичность

Для цитирования: Сысолятина М.А., Сиделев С.И., Кутявина Т.И. Выявление токсинпродуцирующих цианобактерий в водохранилищах Кировской области и оценка их связи с токсичностью воды для гидробионтов // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1109-1114. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1109

## 1. Введение

Цианобактериальные «цветения» водных объектов всё чаще становятся проблемой для водоснабжения, рыболовства, рекреационного и туристического использования водоёмов (Paerl and Otten, 2018; Воякина и др., 2020; Сиделев и Бабаназарова, 2020; Bondarenko et al., 2021). Предполагается, что токсины, продуцируемые некоторыми видами цианобактерий (ЦБ), вызывают различные аллергические реакции и могут быть связаны с такими болезнями человека как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. (Sini et al., 2021). В связи с этим актуальным направлением научных исследований в настоящее время является выявление в водоёмах токсигенных ЦБ и поиск способов регулирования их численности. Целью нашей работы было выявление токсинпродуцирующих ЦБ в водохранилищах Кировской области с помощью молекулярно-генетических мето-

дов и оценка связи ЦБ с токсичностью воды для гидробионтов.

## 2. Материалы и методы

Объектами исследования были русловые водохранилища (Белохолуницкое и Омутнинское), расположенные на северо-востоке Русской равнины в подзоне южной тайги. Согласно классификации вод по трофо-сапробным показателям, принятой в ГОСТ 17.1.2.04-77, оба водохранилища являются бета-мезосапробными, по величине индекса трофического состояния (Неверова-Дзюпак и др., 2012) – эвтрофными.

Пробы воды для изучения фитопланктона отбирали путём зачерпывания воды с поверхности водоёмов (глубина 0–30 см) в августе 2023 г. Видовую идентификацию ЦБ проводили методом прямого микроскопирования с использованием

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [kutyavinati@gmail.com](mailto:kutyavinati@gmail.com) (Т.И. Кутявина)

Поступила: 24 июня 2024; Принята: 12 июля 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





микроскопа лабораторного Микмед-6 вариант 7 (Россия) и определителей. Названия видов приведены в соответствии с <https://www.algaebase.org/> (дата обращения: 03.06.2024).

Для выделения ДНК и проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) пробы фитопланктона концентрировали на мембранных фильтрах марки МФАС-ОС-2 с диаметром пор 0,45 мкм («Владипор», Россия). Поиск генов биосинтеза цианотоксинов (микроцистина (MC), цилиндроспермопсина (CYN), анатоксина-а (AN-а) и сакситоксинов (STX)) проводили методом классической ПЦР с использованием специфичных праймеров по ранее описанной методике (Сиделев и Бабаназарова, 2020).

Токсичность воды из водохранилищ определяли с использованием трёх лабораторных тест-объектов, относящихся к разным трофическим уровням, по аттестованным методикам измерений: люминесцентных бактерий *Escherichia coli* (тест-система «Эколюм») (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04), простейших *Paramecium caudatum* Ehrenberg (ФР.1.39.2015.19242) и низших ракообразных *Daphnia magna* Straus (ФР.1.39.2007.03222).

### 3. Результаты и обсуждение

В видовом составе ЦБ Белохолуницкого и Омутнинского водохранилищ выявлено 14 таксонов: *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs, *Aphanizomenon* sp., *Aphanizomenon gracile* Lemmermann, *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usachev) P. Rajaniemi, Komárek, R. Willame, P. Hrouzek, K. Kastovská, L. Hoffmann & K. Sivonen, *Dolichospermum circinale* (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek, *Dolichospermum flos-aquae* (Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Hoffmann & Komárek, *Dolichospermum planctonicum* (Brunnthal) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek, *Dolichospermum* sp., *Gomphosphaeria lacustris* var. *compacta* Lemmermann, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, *Microcystis viridis* (A. Braun) Lemmermann, *Microcystis wesenbergii* (Komárek

Komárek ex Komárek, *Pseudanabaena galeata* Böcher, *Spirulina laxissima* G.S.West. Минимальная численность (0,008–0,027 млн. кл./л) и биомасса ЦБ (0,0007–0,022 мг/л) были характерны для приплотинных участков водохранилищ, где для развития ЦБ складываются неблагоприятные условия (малое количество биогенных элементов, сильное ветровое перемешивание вод). Максимальные значения численности и биомассы ЦБ отмечены на мелководных хорошо прогреваемых участках в верховьях водохранилищ. Так, в верховье Белохолуницкого водохранилища они достигали 14,8 млн. кл./л и 1,55 мг/л, соответственно.

Согласно результатам молекулярно-генетического анализа, во всех пробах воды присутствовали виды ЦБ, содержащие ген *msyE* и потенциально способные продуцировать MC. Наиболее вероятными продуцентами MC в изучаемых водохранилищах могут быть виды рр. *Microcystis* и *Dolichospermum*. В большинстве проанализированных проб обнаружены ЦБ, содержащие ген *anaC* и потенциально способные продуцировать нейротоксин AN-а. Потенциальными продуцентами AN-а в Белохолуницком водохранилище являются виды *A. flos-aquae* и *D. planctonicum*, в Омутнинском – *C. issatschenkoi* и *D. flos-aquae*. Ген *stxA*, отвечающий за биосинтез нейротоксина STX, и ген *cyrJ*, отвечающий за биосинтез гепато- и цитотоксина CYN, не были обнаружены у ЦБ ни в одной из проб. Это свидетельствует об отсутствии STX- и CYN-продуцирующих ЦБ в пробах воды из исследуемых водоёмов.

Вода на участках, где были обнаружены ЦБ, способные к продуцированию MC и AN-а, оказывала острое токсическое действие на бактерий и простейших, но не являлась токсичной для низших ракообразных (Таблица). Из литературных данных известно, что *P. caudatum* является более чувствительным организмом к действию MC и менее изученных микрогининов, чем более высоко организованные организмы (Boas et al., 2020). Чувствительность

**Таблица.** Результаты молекулярно-генетической детекции токсинпродуцирующих цианобактерий и биотестирования воды из водохранилищ Кировской области в 2023 г.

Участок водохранилища	Наличие генов, отвечающих за синтез цианотоксинов	Индекс токсичности (Т), степень токсичности воды, определённая с помощью тест-объекта:		Гибель <i>Daphnia magna</i> , %
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Paramecium caudatum</i>	
Белохолуницкое водохранилище				
верховье	<i>msyE</i> , <i>anaC</i>	T = 64,3 ± 2,9 высокая	T = 0,30 ± 0,02 допустимая	0
средний	<i>msyE</i> , <i>anaC</i>	T = 39,0 ± 8,2 средняя	T = 0,73 ± 0,02 высокая	0
приплотинный	<i>msyE</i> , <i>anaC</i>	T = 33,0 ± 6,4 средняя	T = 0,31 ± 0,02 допустимая	0
Омутнинское водохранилище				
средний	<i>msyE</i> , <i>anaC</i>	T = 16,4 ± 10,4 допустимая	T = 0,56 ± 0,27 умеренная	0
приплотинный	<i>msyE</i> , <i>anaC</i> *	T = 12,0 ± 6,1 допустимая	T = 0,59 ± 0,18 умеренная	0

**Примечание:** \* - присутствовал не во всех пробах.

*P. caudatum* к действию цианотоксинов подтверждается и нашим исследованием. У *D. magna*, как отмечает ряд авторов, при краткосрочном воздействии цианотоксинов наблюдается уменьшение активности цитозольных глутатион-S-трансфераз (Nogueira et al., 2004), а при длительном воздействии и при высоких концентрациях цианотоксинов уже отмечаются такие ответные реакции, как снижение темпов роста, плодовитости и уменьшение выживаемости (Nogueira et al., 2004; Schwarzenberger, 2022). В нашем исследовании при проведении биотестирования воды с помощью дафний мы оценивали только один показатель – гибель организмов за 4 суток. Очевидно, при вероятно невысокой концентрации цианотоксинов в воде и при краткосрочном воздействии токсиканта этот показатель не является информативным. Об использовании люминесцентных бактерий для оценки токсичности цианотоксинов в литературе приводится очень мало сведений (Калинникова и др., 2018). Наши исследования показали, что тест-система «Эколюм» на основе *E. coli* довольно чувствительна к содержанию цианотоксинов в воде и может быть использована в мониторинге водных объектов для экспресс-оценки токсичности вод, содержащих токсинпродуцирующие ЦБ. Проведено сопоставление результатов молекулярно-генетической детекции токсинпродуцирующих ЦБ и биотестирования. Отмечено на уровне тенденции, что при одновременном присутствии в анализируемых пробах ЦБ, способных потенциально продуцировать МС и АН-а, степень токсичности воды для лабораторных тест-организмов повышалась по сравнению с таковой в пробах, где присутствовали только продуценты МС. Однако корреляционная связь между встречаемостью цианобактерий-продуцентов токсинов и степенью токсичности воды была довольно слабой ( $r = 0,55$  при  $p \leq 0,05$ ).

#### 4. Заключение

Цианобактериальное «цветение» воды – довольно широко распространённое явление в пресноводных континентальных водных объектах. Особую опасность при таких «цветениях» представляют токсинпродуцирующие ЦБ. С помощью молекулярно-генетических методов анализа впервые проведена детекция генов биосинтеза цианотоксинов (МС, СУН, АН-а, СТХ) в двух крупнейших водохранилищах Кировской области. Во всех проанализированных пробах у ЦБ обнаружен ген *mscE*, отвечающий за продуцирование МС, и в большинстве проб – ген *anaC*, участвующий в биосинтезе АН-а. Наиболее вероятными продуцентами МС и АН-а в исследуемых водохранилищах являются виды рр. *Microcystis* и *Dolichospermum*, а также *Cuspidothrix issatschenkoi* и *Aphanizomenon flos-aquae*. Вода из Белохолуницкого и Омутнинского водохранилищ оказывала острое токсическое воздействие на *Escherichia coli* и простейших *Paramecium caudatum*, при этом степень токсичности воды возрастала при одновременном присутствии в пробах

ЦБ, способных потенциально продуцировать МС и АН-а. В дальнейших мониторинговых исследованиях на водохранилищах Кировской области планируется провести количественную оценку содержания цианотоксинов в воде и подобрать комплекс из наиболее чувствительных тест-организмов для экспресс-оценки токсичности вод, подверженных «цветению» токсинпродуцирующими ЦБ.

#### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-77-01034).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Воякина Е.Ю., Русских Я.В., Чернова Е.Н. и др. 2020. Токсичные цианобактерии и их метаболиты в водоёмах Северо-Запада России. Теоретическая и прикладная экология. 1: 124–129. DOI: [10.25750/1995-4301-2020-1-124-129](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-1-124-129)
- Калинникова Т.Б., Гайнутдинов М.Х., Шагидуллин Р.Р. 2018. Методы биотестирования токсинов, продуцируемых цианобактериями (обзор). Российский журнал прикладной экологии 2: 35-46.
- Неверова-Дзюпак Е.В., Цветкова Л.И., Макарова С.В. и др. 2012. Об экологической безопасности водных объектов. Современные проблемы науки и образования 3: 1-9.
- Сиделев С.И., Бабаназарова О.В. 2020. Обнаружение цианобактериальных токсинов в источниках водоснабжения и водопроводной воде некоторых городов России: поиск продуцентов и апробация методов удаления. Водные ресурсы 47(2): 218-229. DOI: [10.31857/S0321059620020182](https://doi.org/10.31857/S0321059620020182)
- Boas L.A.V., Senra M.V.X., Fernandes K. et al. 2020. *In vitro* toxicity of isolated strains and cyanobacterial bloom biomasses over *Paramecium caudatum* (ciliophora): Lessons from a non-metazoan model organism. Ecotoxicology and Environmental Safety 202: 110937. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2020.110937](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110937)
- Bondarenko N.A., Tomberg I.V., Shirokaya A.A. et al. 2021. *Dolichospermum lemmermannii* (Nostocales) bloom in world's deepest Lake Baikal (East Siberia): abundance, toxicity and factors influencing growth. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 1101-1110. DOI: [10.31951/2658-3518-2021-A-1-1101](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2021-A-1-1101)
- Nogueira I.C.G., Pereira P., Dias E. et al. 2004. Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. *Toxicol* 44: 773–780. DOI: [10.1016/j.toxicol.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.08.006)
- Paerl H.W., Otten T.G., Kudela R. 2018. Mitigating the expansion of harmful algal blooms across the freshwater-to-marine continuum. *Environmental Science & Technology* 52(10): 5519–5529. DOI: [10.1021/acs.est.7b05950](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05950)
- Schwarzenberger A. 2022. Negative effects of cyanotoxins and adaptive responses of *Daphnia*. 14(11): 770. DOI: [10.3390/toxins14110770](https://doi.org/10.3390/toxins14110770)
- Sini P., Dang T.B.C., Fais M. et al. 2021. Cyanobacteria, cyanotoxins, and neurodegenerative diseases: Dangerous liaisons. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 8726. DOI: [10.3390/ijms22168726](https://doi.org/10.3390/ijms22168726)

# Features of changes in the concentrations of nutrients and plankton at the thermal bar: A numerical experiment



Tsydenov B.O.\*, Bart A.A., Degi D.V., Churuksaeva V.V., Trunov N.S.

Tomsk State University, Lenin Ave., 36, Tomsk, 634050, Russia

**ABSTRACT.** On the example of Barguzin Bay of Lake Baikal, mathematical modeling of the dynamics of nutrients and plankton during the development of the spring thermal bar was carried out. The meteorological data of the Ust-Barguzin station for June 2023 were set in the calculations. An analysis of the horizontal movement of the area of the maximum density temperature at the lake surface was carried out, the features of changes in the concentration of nitrates, ammonium, phosphates, dissolved oxygen, as well as phyto- and zooplankton in this area are described.

**Keywords:** numerical modeling, thermal bar, nutrients, dissolved oxygen, plankton, Lake Baikal

**For citation:** Tsydenov B.O., Bart A.A., Degi D.V., Churuksaeva V.V., Trunov N.S. Features of changes in the concentrations of nutrients and plankton at the thermal bar: A numerical experiment // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1115-1120. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1115

## 1. Introduction

Under the influence of natural and anthropogenic factors, the rate of negative changes occurring in bodies of water has accelerated significantly over the past decades. In Lake Baikal, the deterioration of water quality is mainly observed in the littoral, for example, in the delta of the Selenga River (Tomberg et al., 2014), while in the pelagic region during 1950-2015 the level of nutrients remains relatively stable (Domysheva et al., 2023).

Nutrients like dissolved oxygen, nitrogen and phosphorus serve as key indicators of the well-being of the aquatic ecosystem. Dissolved oxygen in the lake is replenished through photosynthesis, interaction with the atmosphere, is consumed during the respiration of living organisms, oxidation of organic substances, and is also involved in other chemical reactions (Palshin et al., 2021). According to measurements (Domysheva et al., 2023) in Baikal, the concentration of dissolved oxygen has stable daily and seasonal variability, and organic matter is unevenly distributed. During the development of the thermal bar (a natural phenomenon that is a narrow zone of surface water immersion in the vicinity of the temperature of maximum density) in Lake Baikal, spatial heterogeneities in the physical, chemical and biological characteristics of the deep waters of the lake are noted (Shimaraev et al., 1995; Likhoshway et al., 1996; Parfenova et al., 2000).

\*Corresponding author.

E-mail address: [tsydenov@math.tsu.ru](mailto:tsydenov@math.tsu.ru) (B.O. Tsydenov)

**Received:** May 27, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

The purpose of this work is mathematical modeling of the dynamics of plankton and nutrients at the front of the thermal bar on the example of Barguzin Bay of Lake Baikal.

## 2. Materials and methods

The vertical section of Barguzin Bay of Lake Baikal is considered, the origin of the coordinate system corresponds to the mouth of the Barguzin River (Fig. 1A). A computational domain having a length of 20 km and a depth of 100 m (Fig. 1B), covered with a uniform orthogonal grid with steps  $h_x = 25$  m and  $h_z = 2.5$  m. The time step is 10 s.

The mathematical model used in the work is based on models of the cycle of nitrogen (Fennel et al., 2006), phosphorus (Gan et al., 2014) and oxygen (Fennel et al., 2013). The circulation of dissolved oxygen in the body of water is carried out through oxygen exchange with the atmosphere, biogeochemical processes and physical transport. The biochemical dynamics of oxygen are described by the processes of photosynthesis (+O<sub>2</sub>), respiration (-O<sub>2</sub>), nitrification (-O<sub>2</sub>) and remineralization (-O<sub>2</sub>). The physical transport of nutrients and plankton in the lake is implemented on the basis of a thermohydrodynamic model, which includes equations of continuity, momentum, energy, turbulent characteristics, etc. (Tsydenov, 2022).

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



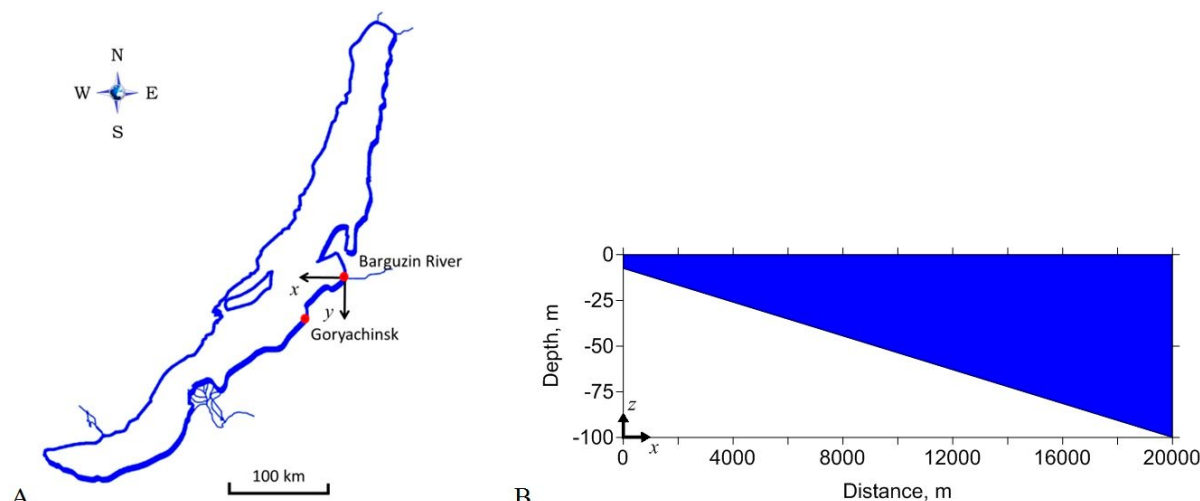


Fig.1. Lake Baikal cross-section (A) and calculation domain (B).

In the calculation experiment, the concentrations of nitrates, ammonium, phosphates and oxygen at the initial moment of time were taken equal to  $1.0 \text{ mmol/m}^3$ ,  $1.0 \text{ mmol/m}^3$ ,  $0.05 \text{ mmol/m}^3$  and  $312 \text{ mmolO}_2/\text{m}^3$ , respectively. The initial concentration distribution for planktonic and detrital components is  $0.2 \text{ mmolN/m}^3$  and  $0.1 \text{ mmolN/m}^3$ , respectively. The amount of chlorophyll a is determined from the ratio of chlorophyll/phytoplankton = 1.59. The boundary conditions at the confluence of the river into the lake for the biogeochemical model variables coincide with their initial values. The shear stress of the wind and the components of heat fluxes at the water surface were calculated according to the data from the weather conditions archive of the weather station in Ust-Barguzin for June 2023 (<https://rp5.ru/>). Values of physical parameters adopted in the model are given in (Tsydenov, 2023).

### 3. Results and discussion

The behavior of horizontal movement of the location of maximum density temperature on the surface of the lake (Fig. 2A) indicates an increase in the influence of intra-day variations in atmospheric parameters when the thermal bar is removed from the mouth of the river tributary. In the first 5 days of the month, the spread of

the thermal bar front either accelerates or slows down and even reverses (toward the mouth of the river) as a result of the joint effect of night cooling and the action of oppositely directed westerly winds. On day 5, the location of the maximum density temperature reached a distance of 3600 m, and on day 10 – 6850 m. The average horizontal velocity of the thermal bar was 685 m/day.

The concentration of dissolved oxygen on the surface of the body of water in the area of the temperature of maximum density increases by days 1-6 to  $341 \text{ mmolO}_2/\text{m}^3$ , after which (for 7-10 days) it fluctuates in a rather narrow range (Fig. 2C). There are jumps of 1, 2 and 6 days. The level of nitrates in this area rises from 1 to  $1.028 \text{ mmol/m}^3$  (Fig. 2B). The ammonium concentration gradually drops from 1 to  $0.972 \text{ mmol/m}^3$  (Fig. 2B). Zooplankton biomass gradually decreases from 0.2 to  $0.172 \text{ mmolN/m}^3$  (Fig. 2C). It is important to note that in the area of maximum density temperature, the change in the listed nutrients and zooplankton (unlike phosphates and phytoplankton) over time is monotonous. The phosphate concentration decreases from 0.05 to  $0.0493 \text{ mmol/m}^3$  on day 4, after which it returns to  $0.05 \text{ mmol/m}^3$  on day 10 (Fig. 2B). Phytoplankton biomass grows from 0.2 to  $0.206 \text{ mmolN/m}^3$  on day 3, and then drops to  $0.1875 \text{ mmolN/m}^3$  on day 10 (Fig. 2C).

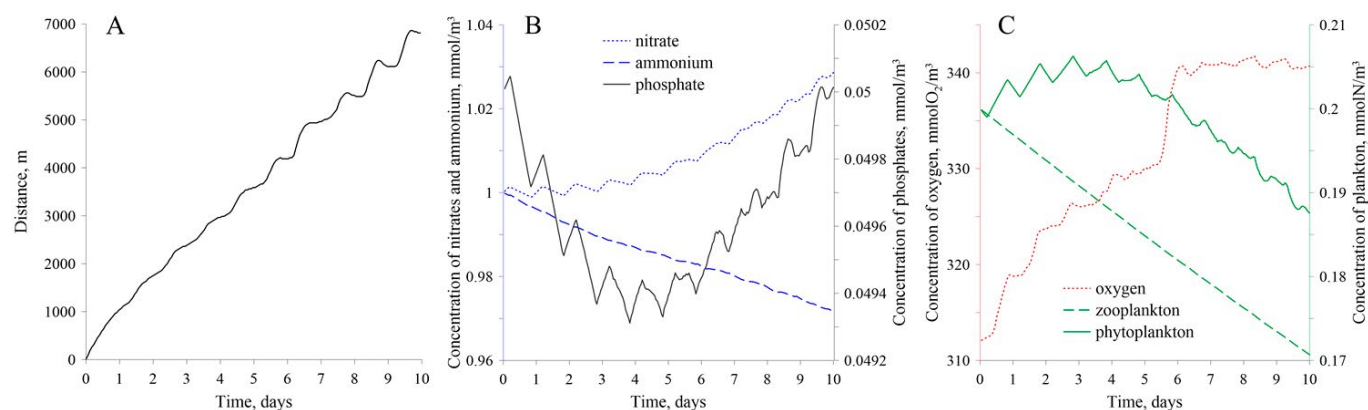


Fig.2. The position of maximum density temperature (A), the concentration of nutrients and plankton at this position (B, C).



## 4. Conclusions

The results of mathematical modeling performed for Barguzin Bay of Lake Baikal indicate an increase in the influence of intra-day variations in atmospheric parameters on the rate of propagation of the thermal bar as it moves away from the coast. In particular, the change in the direction of movement of the thermal front toward the mouth of the Barguzin River can be caused by a combination of two factors: (1) the effect of the west wind and (2) the effect of night cooling. It was found that over time, the content of nitrates and dissolved oxygen increases on the thermal front, and the level of ammonium and zooplankton tends to decrease. Changes in the concentration of phosphates and phytoplankton in the thermal bar area in the spring-summer period are non-monotonic.

## Acknowledgements

This study was funded by the Russian Science Foundation (project No. 23-71-10020, <https://www.rscf.ru/en/project/23-71-10020/>).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

Domysheva V., Vorobyeva S., Golobokova L. et al. 2023. Assessment of the current trophic status of the Southern Baikal littoral zone. *Water* 15: 1139. DOI: [10.3390/w15061139](https://doi.org/10.3390/w15061139)

Fennel K., Hu J., Laurent A. et al. 2013. Sensitivity of hypoxia predictions for the Northern Gulf of Mexico to sediment oxygen consumption and model nesting. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 118(2): 990–1002. DOI: [10.1002/jgrc.20077](https://doi.org/10.1002/jgrc.20077)

Fennel K., Wilkin J., Levin J. et al. 2006. Nitrogen cycling in the Middle Atlantic Bight: Results from a three-dimen-

sional model and implications for the North Atlantic nitrogen budget. *Global Biogeochemical Cycles* 20(3): GB3007. DOI: [10.1029/2005GB002456](https://doi.org/10.1029/2005GB002456)

Gan J., Lu Z., Cheung A. et al. 2014. Assessing ecosystem response to phosphorus and nitrogen limitation in the Pearl River plume using the Regional Ocean Modeling System (ROMS). *Journal of Geophysical Research: Oceans* 119(12): 8858–8877. DOI: [10.1002/2014JC009951](https://doi.org/10.1002/2014JC009951)

Likhoshway Y.V., Kuzmina A.Ye., Potyemkina T.G. et al. 1996. The distribution of diatoms near a thermal bar in Lake Baikal. *Journal of Great Lakes Research* 22(1): 5–14. DOI: [10.1016/S0380-1330\(96\)70929-2](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(96)70929-2)

Palshin N., Zdorovenova G., Efremova T. et al. 2021. Dissolved oxygen stratification in a small lake depending on water temperature and density and wind impact. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 937: 032019. DOI: [10.1088/1755-1315/937/3/032019](https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/3/032019)

Parfenova V.V., Shimaraev M.N., Kostornova T.Y. et al. 2000. On the vertical distribution of microorganisms in Lake Baikal during spring deep-water renewal. *Microbiology* 69: 357–363. DOI: [10.1007/BF02756748](https://doi.org/10.1007/BF02756748)

Shimaraev M.N., Grachev M.A., Imboden D.M. et al. 1995. Mezhdunarodnyj gidrofizicheskij eksperiment na Bajkale: processy obnovleniya glubinnyh vod v vesennij period [International hydrophysical experiment in Lake Baikal: Spring deep-water renewal]. *Doklady Akademii Nauk* 343(6): 824–827. (in Russian)

Tomberg I., Sorokovikova L., Popovskaya G. et al. 2014. Concentration dynamics of biogenic elements and phytoplankton at Selenga R. mouth and in Selenga shallows (Lake Baikal) *Water Resources* 41: 687–695. DOI: [10.1134/S0097807814050157](https://doi.org/10.1134/S0097807814050157)

Tsydenov B.O. 2022. Modeling biogeochemical processes in a freshwater lake during the spring thermal bar. *Ecological Modelling* 465: 109877. DOI: [10.1016/j.ecolmodel.2022.109877](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2022.109877)

Tsydenov B.O. 2023. A mathematical model of dissolved oxygen transport during the thermal bar evolution. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Matematika i mekhanika – Tomsk State University Journal of Mathematics and Mechanics* 86: 176–187. DOI: [10.17223/19988621/86/14](https://doi.org/10.17223/19988621/86/14)

# Особенности изменения концентрации планктона и биогенных элементов в области термобара: вычислительный эксперимент

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Цыденов Б.О.\*, Барт А.А., Деги Д.В., Чуруксаева В.В., Трунов Н.С.

Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, Россия

**АННОТАЦИЯ.** На примере Баргузинского залива оз. Байкал проведено математическое моделирование динамики биогенных элементов и планктона во время развития весеннего термобара. В расчетах задавались метеорологические данные станции п. Усть-Баргузин за июнь 2023 г. Проведен анализ горизонтального движения области расположения температуры максимальной плотности на поверхности озера, описаны особенности изменения концентрации нитратов, аммония, фосфатов, растворенного кислорода, а также фито- и зоопланктона в этой области.

**Ключевые слова:** численное моделирование, термобар, биогенные элементы, растворенный кислород, планктон, озеро Байкал

**Для цитирования:** Цыденов Б.О., Барт А.А., Деги Д.В., Чуруксаева В.В., Трунов Н.С. Особенности изменения концентрации планктона и биогенных элементов в области термобара: вычислительный эксперимент // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1115-1120. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1115

## 1. Введение

Под действием природных и антропогенных факторов темпы негативных изменений, происходящих в водоемах, за последние десятилетия существенно ускорились. В озере Байкал ухудшение качества воды главным образом наблюдается в литорали, например, в дельте р. Селенги (Tomberg et al., 2014), в то время как в пелагиали на протяжении 1950–2015 гг. уровень питательных веществ остается относительно стабильным (Domysheva et al., 2023).

Биогенные элементы, как растворенный кислород, азот и фосфор, служат ключевыми индикаторами благополучия водной экосистемы. Растворенный кислород в озере пополняется за счет фотосинтеза, взаимодействия с атмосферой, расходуется при дыхании живых организмов, окислении органических веществ, а также участвует в других химических реакциях (Palshin et al., 2021). Согласно данным измерений (Domysheva et al., 2023) в Байкале концентрация растворенного кислорода имеет устойчивую суточную и сезонную изменчивость, а органическое вещество распределено неравномерно. Во время развития термобара (природного явления, представляющего собой узкую зону погружения поверхностных вод в окрестности температуры максимальной плотности) в Байкале

отмечаются пространственные неоднородности физических, химических и биологических характеристик глубинных вод озера (Шимараев и др., 1995; Likhoshway et al., 1996; Parfenova et al., 2000).

Целью настоящей работы является математическое моделирование динамики планктона и биогенных элементов в области расположения фронта термобара на примере Баргузинского залива оз. Байкал.

## 2. Материалы и методы

Рассматривается вертикальное сечение Баргузинского залива оз. Байкал, начало системы координат соответствует устью р. Баргузин (Рис. 1, а). Вычислительная область, имеющая длину 20 км и глубину 100 м (Рис. 1, б), покрыта равномерной ортогональной сеткой с шагами  $h_x = 25$  м и  $h_z = 2.5$  м. Шаг по времени составляет 10 с.

Используемая в работе математическая модель основана на моделях цикла азота (Fennel et al., 2006), фосфора (Gan et al., 2014) и кислорода (Fennel et al., 2013). Циркуляция растворенного кислорода в водоеме осуществляется через природный обмен с атмосферой, биогеохимические процессы и физический транспорт. Биохимическая динамика кислорода описывается процессами

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [tsydenov@math.tsu.ru](mailto:tsydenov@math.tsu.ru) (Б.О. Цыденов)

Поступила: 27 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



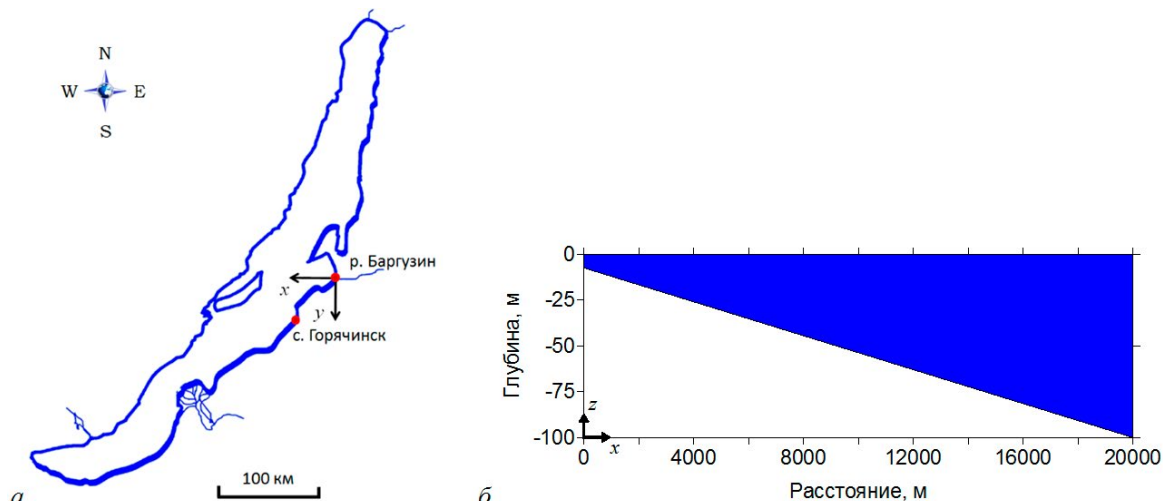


Рис.1. Схема разреза (а) и вычислительная область (б).

фотосинтеза (+O<sub>2</sub>), дыхания (-O<sub>2</sub>), нитрификации (-O<sub>2</sub>) и реминерализации (-O<sub>2</sub>). Физический транспорт биогенных элементов и планктона в озере реализован на основе термогидродинамической модели, включающей в себя уравнения неразрывности, количества движения, энергии, турбулентных характеристик и др. (Tsydenov, 2022).

В вычислительном эксперименте значения концентрации нитратов, аммония, фосфатов и кислорода в начальный момент времени приняты равными 1.0 ммоль/м<sup>3</sup>, 1.0 ммоль/м<sup>3</sup>, 0.05 ммоль/м<sup>3</sup> и 312 ммольО<sub>2</sub>/м<sup>3</sup> соответственно. Начальное распределение концентрации для планктонных и детритных компонентов составляет 0.2 ммольN/м<sup>3</sup> и 0.1 ммольN/м<sup>3</sup> соответственно. Количество хлорофилла а задано исходя из соотношения хлорофилл/фитопланктон = 1.59. Граничные условия на месте впадения реки в озеро для переменных биогеохимической модели совпадают с их начальными значениями. Касательное напряжение ветра и компоненты тепловых потоков, контактирующих с водной поверхностью, вычислены согласно данным из архива погодных условий метеостанции п. Усть-Баргузин за июнь 2023 г. (<https://rp5.ru/>). Значения физических параметров, принятых в модели, приведены в работе (Цыденов, 2023).

### 3. Результаты и обсуждение

Поведение горизонтального движения области расположения температуры максимальной плотности на поверхности озера (Рис. 2, а) свидетельствует об усилении влияния внутрисуточных вариаций атмосферных параметров при удалении термобара от устья речного притока. Во второй половине первой декады месяца распространение фронта термобара то ускоряется, то замедляется и даже наблюдается обратное движение (в сторону устья реки) в результате совместного эффекта ночного выхолаживания и действия противоположно направленных западных ветров. На 5 сут местоположение температуры максимальной плотности достигло расстояния 3600 м, а на 10 сут – 6850 м. Средняя скорость горизонтального движения термобара составила 685 м/сут.

Концентрация растворенного кислорода на поверхности водоема в области расположения температуры максимальной плотности на 1–6 сут возрастает до отметки в 341 ммольО<sub>2</sub>/м<sup>3</sup>, после чего (на 7–10 сут) колеблется в достаточно узком диапазоне (Рис. 2, в). Наблюдаются скачки на 1, 2 и 6 сут. Уровень нитратов в этой области повышается с 1 до 1.028 ммоль/м<sup>3</sup> (Рис. 2, б). Концентрация аммония

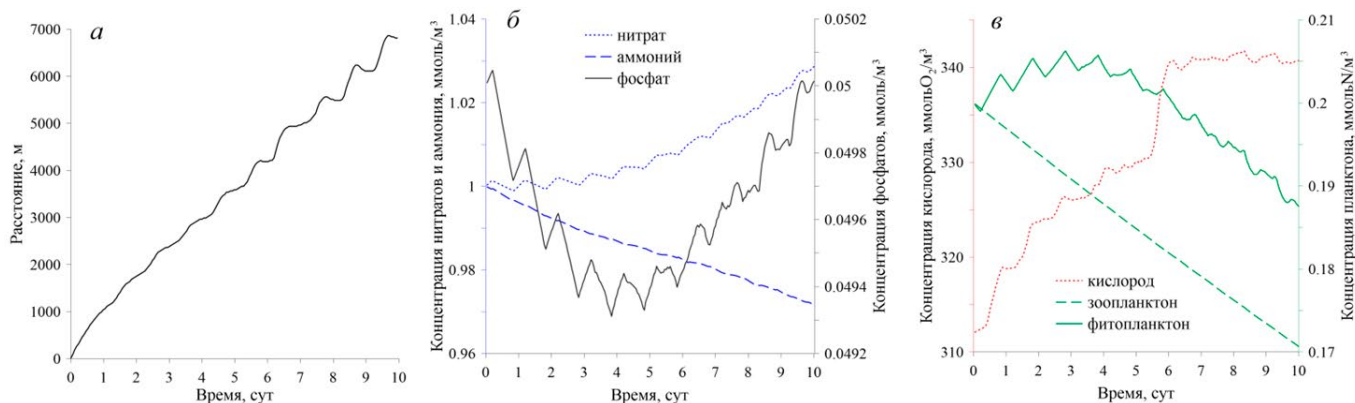


Рис.2. Область расположения температуры максимальной плотности на поверхности озера (а), концентрация биогенных элементов и планктона в этой области (б, в).

постепенно падает с 1 до 0.972 ммоль/м<sup>3</sup> (Рис. 2, б). Биомасса зоопланктона постепенно уменьшается с 0.2 до 0.172 ммольN/м<sup>3</sup> (Рис. 2, в). Важно заметить, что в области температуры максимальной плотности изменение перечисленных биогенных элементов и зоопланктона (в отличие от фосфатов и фитопланктона) с течением времени имеет монотонный характер. Концентрация фосфатов со значения 0.05 ммоль/м<sup>3</sup> сокращается до 0.0493 ммоль/м<sup>3</sup> на 4 сут, после чего возвращается к значению 0.05 ммоль/м<sup>3</sup> на 10 сут (рис. 2, б). Биомасса фитопланктона растет с 0.2 до 0.206 ммольN/м<sup>3</sup> на 3 сут, а затем падает до 0.1875 ммольN/м<sup>3</sup> на 10 сут (Рис. 2, в).

#### 4. Выводы

Результаты математического моделирования, выполненного для условий Баргузинского залива оз. Байкал, свидетельствуют об усилении влияния внутрисуточных вариаций атмосферных параметров на скорость распространения термобара по мере его удаления от берега. В частности, смена направления движения термического фронта в сторону устья р. Баргузин может быть вызвана комбинацией двух факторов: (1) воздействие западного ветра и (2) эффект ночного выхолаживания. Выявлено, что с течением времени содержание нитратов и растворенного кислорода повышается на термическом фронте, а уровень аммония и зоопланктона имеет тенденцию к снижению. Изменение концентрации фосфатов и фитопланктона в области термобара в весенне-летний период носит немонотонный характер.

#### Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №23-71-10020, <https://www.rscf.ru/project/23-71-10020/>.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Domyшева V., Vorobyeva S., Golobokova L. et al. 2023. Assessment of the current trophic status of the Southern Baikal littoral zone. *Water* 15: 1139. DOI: [10.3390/w15061139](https://doi.org/10.3390/w15061139)
- Fennel K., Hu J., Laurent A. et al. 2013. Sensitivity of hypoxia predictions for the Northern Gulf of Mexico to sediment oxygen consumption and model nesting. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 118(2): 990–1002. DOI: [10.1002/jgrc.20077](https://doi.org/10.1002/jgrc.20077)
- Fennel K., Wilkin J., Levin J. et al. 2006. Nitrogen cycling in the Middle Atlantic Bight: Results from a three-dimensional model and implications for the North Atlantic nitrogen budget. *Global Biogeochemical Cycles* 20(3): GB3007. DOI: [10.1029/2005GB002456](https://doi.org/10.1029/2005GB002456)
- Gan J., Lu Z., Cheung A. et al. 2014. Assessing ecosystem response to phosphorus and nitrogen limitation in the Pearl River plume using the Regional Ocean Modeling System (ROMS). *Journal of Geophysical Research: Oceans* 119(12): 8858–8877. DOI: [10.1002/2014JC009951](https://doi.org/10.1002/2014JC009951)
- Likhoshvay Y.V., Kuzmina A.Ye., Potyemkina T.G. et al. 1996. The distribution of diatoms near a thermal bar in Lake Baikal. *Journal of Great Lakes Research* 22(1): 5–14. DOI: [10.1016/S0380-1330\(96\)70929-2](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(96)70929-2)
- Palshin N., Zdorovenova G., Efremova T. et al. 2021. Dissolved oxygen stratification in a small lake depending on water temperature and density and wind impact. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 937: 032019. DOI: [10.1088/1755-1315/937/3/032019](https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/3/032019)
- Parfenova V.V., Shimaraev M.N., Kostornova T.Y. et al. 2000. On the vertical distribution of microorganisms in Lake Baikal during spring deep-water renewal. *Microbiology* 69: 357–363. DOI: [10.1007/BF02756748](https://doi.org/10.1007/BF02756748)
- Шимараев М.Н., Грачев М.А., Имбоден Д.М. и др. 1995. Международный гидрофизический эксперимент на Байкале: процессы обновления глубинных вод в весенний период. *Докл. РАН* 343(6): 824–827.
- Tomberg I., Sorokovikova L., Popovskaya G. et al. 2014. Concentration dynamics of biogenic elements and phytoplankton at Selenga R. mouth and in Selenga shallows (Lake Baikal). *Water Resources* 41: 687–695. DOI: [10.1134/S0097807814050157](https://doi.org/10.1134/S0097807814050157)
- Tsydenov B.O. 2022. Modeling biogeochemical processes in a freshwater lake during the spring thermal bar. *Ecological Modelling* 465: 109877. DOI: [10.1016/j.ecolmodel.2022.109877](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2022.109877)
- Цыденов Б.О. 2023. Математическая модель транспорта растворенного кислорода при развитии термобара. *Вестник Томского Государственного университета. Математика и механика* 86: 176–187. DOI: [10.17223/19988621/86/14](https://doi.org/10.17223/19988621/86/14)



# Cyanobacteria of alkaline ecosystems of Zabaikalie



Tsyrenova D.D.\*, Barkhutova D.D.

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Sakhyanova St., 6, Ulan-Ude, 660047, Russia

**ABSTRACT.** From the alkaline ecosystems of Zabaikalie, 12 monocultures of cyanobacteria belonging to the genera *Anabaena*, *Leptolyngbya*, *Mastigocladus*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* and *Synechococcus* were isolated. The studied organisms showed themselves to be thermo- and alkaliphiles. The temperature optimum growth of cultures ranged from 40-55°C. Cultures were able to grow at alkaline pH values (8.5-9.5) and in a wide range of NaCl concentrations (0 to 100 g/l). Based on analysis of the 16S rRNA gene sequence, 5 strains of cyanobacteria were identified and described.

**Keywords:** alkaline ecosystems, thermal springs, soda-salt lakes, Zabaikalie, cyanobacteria

**For citation:** Tsyrenova D.D., Barkhutova D.D. Cyanobacteria of alkaline ecosystems of Zabaikalie // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1121-1126. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1121

## 1. Introduction

Alkaline ecosystems are widespread on the territory of Zabaikalie (Saltish..., 2009; Geochemical..., 2011). The physicochemical conditions of water ecosystems are favorable for the activity of microbial communities, in which cyanobacteria, the main producers of organic matter, are dominant (Andreyuk et al., 1990; Zavarzin, 2007).

Isolating cultures of cyanobacteria, determining their characteristics of growth and development is an important stage in the study of their systematic position, since the modern classification of cyanobacteria is in the process of development. Currently, the Gen Bank database contains data on only 369 strains of cyanobacteria. Based on this, the aim of the present work was to isolate monocultures of cyanobacteria in the alkaline ecosystems of Zabaikalie and determine their ecophysiological characteristics and taxonomic position.

## 2. Materials and methods

Thermal springs and soda-salt lakes of Zabaikalie were objects of research. They are located in the Kurumkansky (springs Umkhey, Kuchiger, Uro, Alla, Garga) and Pribaikalsky (spring Goryachinsk) regions of Buryatia, in the Selenginsky region of Buryatia (lake

Sulfatnoye) and the Zabaikal region (lakes Gorbunka, Khilganta, Ekhe Torom). Studies of lakes were carried out in the spring-summer periods from 2001 to 2007, thermal springs - 2013, 2019.

Determination of physico-chemical parameters of aquatic ecosystems, sampling, isolation of cultures, study of their properties and molecular biological research were carried out according to a previously described method (Tsyrenova et al., 2011).

## 3. Results and discussion

Twelve monocultures of cyanobacteria were isolated from bottom sediments and microbial mats of alkaline ecosystems of Zabaikalie (Table).

Six monocultures of cyanobacteria belonging to the genera *Anabaena*, *Leptolyngbya*, *Mastigocladus*, *Phormidium* and *Synechococcus* were isolated from microbial mats of thermal springs of Buryatia. The studied organisms were thermophiles with optimum growth at 40°C. *Mastigocladus laminosus* (M122), with growth optimum at higher temperatures from 45 to 55°C, was an exception.

Identification of cultures to species was carried out based on morphological characteristics. In more detail, two strains *M. laminosus* (M122) and *Synechococcus bigranulatus* (S135) were described using

\*Corresponding author.

E-mail address: [baldanovad@rambler.ru](mailto:baldanovad@rambler.ru) (D.D. Tsyrenova)

**Received:** June 04, 2024; **Accepted:** June 20, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



**Table.** Cultures of cyanobacteria isolated from the studied water ecosystems

Culture	Isolation source	Identification according to Elenkin (1949) and Gollerbach et al. (1953)	Identification according to Komarek and Anagnostidis (1999, 2007)	Identification based on the 16S rRNA sequence analysis
Um-13-2	spring Umkhey	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp.	-
Ku-19-1	spring Kuchiger	<i>Oscillatoria animalis</i> Ag.	<i>Phormidium animale</i> (Ag. ex Gom.) Anagn. et Kom.	-
M122	spring Uro	<i>Fischerella thermalis</i> (Schwabe) Gom.	<i>Mastigocladus laminosus</i> Frémy	<i>M. laminosus</i> CCME5272 (99%)
Al-19-1	spring Alla	<i>Ph. fragile</i> (Menegh.) Gom.	<i>Leptolyngbya fragilis</i> (Gom.) Anagn. et Kom.	-
G-19-1	spring Goryachinsk	<i>Synechococcus elongatus</i> Näg.	<i>S. bigranulatus</i> Skuja	-
S135	spring Garga	<i>S. elongates</i> Näg.	<i>S. bigranulatus</i>	Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ1 (99%)
Cya 1	lake Sulfatnoye	<i>Oscillatoria brevis</i> (Kütz.) Gom.	<i>Phormidium breve</i> (Kütz. et Gom.)	<i>Phormidium</i> sp. NIVA-CYA 202 (99.2%)
Cya 2	lake Ekhe Torom	<i>Oscillatoria brevis</i> (Kütz.) Gom.	<i>Phormidium breve</i> (Kütz. et Gom.)	<i>Phormidium</i> sp. NIVA-CYA 202 (99.2%)
Cya 4	lake Sulfatnoye	<i>Phormidium frigidum</i> Fritsch.	<i>Pseudanabaena frigida</i> (Fritsch) Anagnost	-
Cya 5	lake Khilganta	<i>Anabaena sibirica</i> (Pop. et Degt.) Elenk.	<i>Nodularia</i> sp.	-
Cya 6	lake Gorbunka	<i>Anabaena sibirica</i> (Pop. et Degt.) Elenk.	<i>Nodularia</i> sp.	-
Cya 10	lake Khilganta	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Phormidium</i> sp.	<i>O. cf. laetevirens</i> Baja-Osc-1 (99.0%) <i>Phormidium</i> sp. UTCC 487 (98.9%)

**Note:** “-” - not defined.

the analysis of the 16S rRNA gene sequence. The strain *M. laminosus* (M122), isolated from the spring Uro (Kurumkansky region, Buryatia) was 99% identical to *M. laminosus* CCME5272, isolated from a thermal spring in Portugal (Miller et al., 2007). This is additional confirmation of the cosmopolitan nature of this species. The strain *S. bigranulatus* (S135) had the maximum similarity (99%) to the uncultivated representative of cyanobacteria Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ1.

From bottom sediments and microbial mats of lakes in Southern Zabaikalie 6 monocultures of cyanobacteria were isolated: three cultures (Cya 1, Cya 2, Cya 10) assigned to the genus *Phormidium*, two cultures (Cya 5 and Cya 6) to the genus *Nodularia*, one culture (Cya 4) – to the genus *Pseudanabaena* (Table). All cultures were alkalophilic (pH 8.5-9.5) and halotolerant organisms (5 g/l NaCl). Two identical cultures (Cya 5, Cya 6) identified as *Nodularia* sp. were the exception. They could grow at NaCl concentrations of up to 100 g/L, which is the highest mineralization value for the growth of known heterocyst cultures (Lehtimäki et al., 2000).

Analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA genes (1400 nucleotide pairs) was carried out for three cultures. *Phormidium* sp. (Cya 10) was most similar to *Oscillatoria cf. laetevirens* Baja-Osc-1 (99.0%) and *Phormidium* sp. UTCC 487 (98.9%) isolated from

mineralized reservoirs (Casamatta et al., 2005). Morphologically identical cultures identified as *Ph. breve* (Cya 1, Cya 2) were 99.2% similar to *Phormidium* sp. NIVA-CYA 202, isolated from a salt lake in Antarctica (Taton et al., 2006).

Thus, 12 monocultures of cyanobacteria were isolated from the studied alkaline ecosystems of Zabaikalie. 6 cultures were thermophiles with a temperature optimum for growth at 40°C, with the exception of *M. laminosus* (M122), which had a higher optimum – 45-55°C. The remaining 6 cultures are classified as moderate alkalophiles with optimal growth at an alkaline pH. They demonstrated the ability to develop in the absence of NaCl in the medium and up to its concentration of 100 g/l. Based on the analysis of 16S rRNA gene nucleotide sequences, 5 cyanobacterial cultures were identified.

### Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the theme of state assignment No. 121030100229-1.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Andreyuk E.I., Kopteva Zh.P., Zanina V.V. 1990. Cyanobacteria. Kiev: Naukova dumka (in Russian)
- Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L. et al. 2005. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the *Oscillatoriales* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 41(2): 421–438. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2005.04062.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04062.x)
- Elenkin A.A. 1949. Sinezelenye vodorosli SSSR. Spetsial'naya chast' (Blue-Green Algae of the USSR. Special Part), Moscow: Akad. Nauk SSSR, 990 p. (in Russian)
- Gollerbakh M.M., Kosinskaya E.K., Polyanskii V.I. 1953. Opredelitel' presnovodnykh vodoroslei SSSR (Freshwater Algae of the USSR. Identification Guide). Vol. 2. Moscow: Sovetskaya Nauka, p.650 (in Russian)
- Geochemical activity of microorganisms in hydrotherms of the Baikal rift zone. 2011. Namsaraev B.B., Barkhutova D.D., Danilova E.V. et al. (Eds.). Novosibirsk: Geo, p. 302 (in Russian).
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Cyanoprokariota 1. Teil: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ettl H., Gärtner G., Heynig H. et al. (Eds.). 19(1): 548.
- Komárek J., Anagnostidis K. 2007. Cyanoprokariota 2. Teil: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Büdel B., Gärtner G., Krienitz L. et al. (Eds.). 19(2): 759.
- Lehtimäki J., Lyra C., Suomalainen S. et al. 2000. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1043–1053.
- Miller S.R., Castenholz R.W., Pedersen D. 2007. Phylogeography of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(15): 4751–475. DOI: [10.1128/AEM.02945-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02945-06)
- Saltish and salt lakes of Zabaikalie: hydrochemistry, biology. 2009. In: Namsaraev B.B. (Ed.). Ulan-Ude: Buryat State University, 340 p. (in Russian). Taton A., Grubisic S., Ertz D. et al. 2006. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *Journal of Phycology* 42(6): 1257–1270. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x)
- Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B. et al. 2011. Taxonomic and ecological characterization of cyanobacteria from some brackish and saline lakes of Southern Transbaikal region. *Microbiology* 80(2): 216-227.
- Zavarzin G.A. 2007. Formation of soda conditions as a global process. Proceedings of the Institute of Microbiology named after. S.N. Vinogradsky. In: Galchenko V.F. (Ed.), Alkalophilic microbial communities. Vol. 14. Moscow: Science, pp. 8-57 (in Russian)

# Цианобактерии щелочных экосистем Забайкалья

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Цыренова Д.Д.\* , Бархутова Д.Д.

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 660047, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Из щелочных экосистем Забайкалья было выделено 12 монокультур цианобактерий относящихся к родам *Anabaena*, *Leptolyngbya*, *Mastigocladus*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* и *Synechococcus*. Изученные организмы проявили себя как термо- и алкалофилы. Температурный оптимум роста культур колебался от 40-55°C. Культуры способны развиваться при щелочных значениях pH (8.5-9.5) и в широком диапазоне концентрации NaCl (0 до 100 г/л). На основе анализа последовательности гена 16S рРНК идентифицированы и описаны 5 штаммов цианобактерий.

**Ключевые слова:** щелочные экосистемы, термальные источники, содово-соленые озера, Забайкалье, цианобактерии

Для цитирования: Цыренова Д.Д., Бархутова Д.Д. Цианобактерии щелочных экосистем Забайкалья // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1121-1126. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1121

## 1. Введение

На территории Забайкалья широко распространены щелочные экосистемы (Солоноватые..., 2009; Геохимическая..., 2011). Физико-химические условия данных водоемов являются благоприятными для активной деятельности микробных сообществ, в которых доминирующими являются цианобактерии – основные продуценты органического вещества (Андреюк и др., 1990; Заварзин, 2007).

Выделение культур цианобактерий, определение их особенностей роста и развития является важным этапом в изучении их систематического положения, поскольку современная классификация цианобактерий находится в процессе разработки. На данный момент в базе данных Gen Bank имеются данные всего 369 штаммов цианобактерий. Исходя из этого, целью настоящей работы являлось выделение монокультур цианобактерий щелочных экосистем Забайкалья, определение их экофизиологических особенностей и таксономического положения.

## 2. Материалы и методы

Исследуемыми водоемами являлись термальные источники и содово-соленые озера Забайкалья, расположенные в Курумканском (источники Умхей, Кучигер, Уро, Алла) и Прибайкальском (источ-

ник Горячинск) районах Республики Бурятия, в Селенгинском районе Республики Бурятия (озеро Сульфатное) и Забайкальском крае (озера Горбунка, Хилганта, Ехэ Тором). Исследования озер были проведены в весенне-летние периоды с 2001 по 2007 гг., термальных источников – 2013, 2019 гг.

Определение физико-химических параметров водоемов, отбор проб, выделение культур, изучение их свойств и молекулярно-биологическое исследование проводили по ранее описанной методике (Tsyrenova et al., 2011).

## 3. Результаты и обсуждение

Из донных осадков и микробных матов щелочных экосистем Забайкалья было выделено 12 монокультур цианобактерий (Таблица).

Из микробных матов термальных источников Бурятии было выделено 6 монокультур цианобактерий, относящиеся к родам *Anabaena*, *Leptolyngbya*, *Mastigocladus*, *Phormidium* и *Synechococcus*. Изученные организмы являлись термофилами с оптимумом роста при 40°C. Исключением была культура *Mastigocladus laminosus* (M122) с оптимумом роста при более высокой температуре от 45 до 55°C.

Идентификация культур до вида проведена на основе морфологических признаков. Более подробно, с помощью анализа последовательности

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [baldanovad@rambler.ru](mailto:baldanovad@rambler.ru) (Д.Д. Цыренова)

Поступила: 04 июня 2024; Принята: 20 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024





Таблица. Культуры цианобактерий, выделенные из исследованных водоемов

Культура	Водоем	Идентификация по Еленкину (1949), Голлербах и др. (1953)	Идентификация по Komárek and Anagnostidis (1999, 2007)	Идентификация по 16S рРНК
Um-13-2	ист. Умхей	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp.	-
Ku-19-1	ист. Кучигер	<i>Oscillatoria animalis</i> Ag.	<i>Phormidium animale</i> (Ag. ex Gom.) Anagn. et Kom.	-
M122	ист. Уро	<i>Fischerella thermalis</i> (Schwabe) Gom.	<i>Mastigocladus laminosus</i> Frémy	<i>M. laminosus</i> CCМEE5272 (99%)
Al-19-1	ист. Алла	<i>Ph. fragile</i> (Menegh.) Gom.	<i>Leptolyngbya fragilis</i> (Gom.) Anagn. et Kom.	-
G-19-1	ист. Горячинск	<i>Synechococcus elongatus</i> Näg.	<i>S. bigranulatus</i> Skuja	-
S135	ист. Гарга	<i>S. elongates</i> Näg.	<i>S. bigranulatus</i>	Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ1 (99%)
Суа 1	оз. Сульфатное	<i>Oscillatoria brevis</i> (Kütz.) Gom.	<i>Phormidium breve</i> (Kütz. et Gom.)	<i>Phormidium</i> sp. NIVA-CYA 202 (99.2%)
Суа 2	оз. Ехэ Тором	<i>Oscillatoria brevis</i> (Kütz.) Gom.	<i>Phormidium breve</i> (Kütz. et Gom.)	<i>Phormidium</i> sp. NIVA-CYA 202 (99.2%)
Суа 4	оз. Сульфатное	<i>Phormidium frigidum</i> Fritsch.	<i>Pseudanabaena frigida</i> (Fritsch) Anagnost	-
Суа 5	оз. Хилганта	<i>Anabaena sibirica</i> (Pop. et Degt.) Elenk.	<i>Nodularia</i> sp.	-
Суа 6	оз. Горбунка	<i>Anabaena sibirica</i> (Pop. et Degt.) Elenk.	<i>Nodularia</i> sp.	-
Суа 10	оз. Хилганта	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Phormidium</i> sp.	<i>O. cf. laetevirens</i> Baja-Osc-1 (99.0%) <i>Phormidium</i> sp. UTCC 487 (98.9%)

Примечание: «ист.» - источник; «оз.» - озеро; «-» - не определено.

гена 16S рРНК описаны два штамма – *M. laminosus* (M122) и *Synechococcus bigranulatus* (S135). Штамм *M. laminosus* (M122), выделенная из источника Уро (Курумканский район, Бурятия) на 99% был идентичен с *M. laminosus* CCМEE5272, выделенного из термального источника Португалии (Miller et al., 2007). Это дало дополнительное подтверждение о космополитности данного вида. Штамм *S. bigranulatus* (S135) имел максимальное сходство (99%) с некультивируемым представителем цианобактерий Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ1, что говорит о том, что номенклатура цианобактерий находится в стадии реконструкции.

Из донных осадков и микробных матов озер Южного Забайкалья было выделено 6 монокультур цианобактерий: три культуры (Суа 1, Суа 2, Суа 10) отнесены к роду *Phormidium*, две культуры (Суа 5, Суа 6) – к роду *Nodularia*, одна культура (Суа 4) – к роду *Pseudanabaena* (Таблица). Все культуры проявили себя как алкалофильные (рН 8.5-9.5) и галотолерантные организмы (5 г/л NaCl). Исключением являлись две идентичные культуры, определенные как *Nodularia* sp. (Суа 5, Суа 6) способные расти при концентрации NaCl до 100 г/л, что является самым высоким значением минерализации для роста известных гетероцистных культур (Lehtimäki et al., 2000).

Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (1400 пар нуклеотидов) было проведено для трех культур. *Phormidium* sp. (Суа 10) имела наибольшее сходство с *Oscillatoria* cf.

*laetevirens* Baja-Osc-1 (99.0%) и *Phormidium* sp. UTCC 487 (98.9%), выделенных из минерализованных водоемов (Casamatta et al., 2005). Морфологически идентичные культуры определенные как *Ph. breve* (Суа 1 и Суа 2) на 99.2 % были сходны с *Phormidium* sp. NIVA-CYA 202, выделенного из соленого озера Антарктиды (Taton et al., 2006).

Таким образом, из исследованных щелочных экосистем Забайкалья было выделено 12 монокультур цианобактерий. 6 культур являлись термофилами с оптимумом роста при 40°C, за исключение *M. laminosus* (M122), которая имела более высокий оптимум – 45-55°C. Остальные 6 культур отнесены к умеренными алкалофилам с оптимумом роста при щелочном рН. Они проявили способность развиваться при полном отсутствии NaCl в среде и до его концентрации 100 г/л. На основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК идентифицировано 5 культур цианобактерий.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121030100229-1.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Андреюк Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. 1990. Цианобактерии. Киев: Наукова думка.
- Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны. 2011. Намсараев Б.Б., Бархутова Д.Д., Данилова Э.В. и др. (Ред.). Новосибирск: Гео, 302 с.
- Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. 1953. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. Москва: Советская наука», 650 с.
- Еленкин А.А. 1949. Синезеленые водоросли СССР. Специальная часть. 2. Москва–Ленинград: АН СССР, 990 с.
- Заварзин Г.А. 2007. Образование содовых условий как глобальный процесс. Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Гальченко В.Ф. (Ред.), Алкалофильные микробные сообщества. Вып. 14. Москва: Наука, с. 8-57.
- Солоноватые и соленые озера Забайкалья: гидрохимия, биология. 2009. Намсараев Б.Б. (Ред.). УланУдэ: Бурятский госуниверситет, 340 с.
- Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L. et al. 2005. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the *Oscillatoriales* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 41(2): 421–438. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2005.04062.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04062.x)
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Cyanoprokariota 1. Teil: Chroococcales. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Ettl H., Gärtner G., Heynig H. et al. (Eds.). 19(1): 548.
- Komárek J., Anagnostidis K. 2007. Cyanoprokariota 2. Teil: Oscillatoriales. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Büdel B., Gärtner G., Krienitz L. et al. (Eds.). 19(2): 759.
- Lehtimäki J., Lyra C., Suomalainen S. et al. 2000. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1043–1053.
- Miller S.R., Castenholz R.W., Pedersen D. 2007. Phylogeography of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(15): 4751–4755. DOI: [10.1128/AEM.02945-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02945-06)
- Taton A., Grubisic S., Ertz D. et al. 2006. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *Journal of Phycology* 42(6): 1257–1270. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x)
- Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B. et al. 2011. Taxonomic and ecological characterization of cyanobacteria from some brackish and saline lakes of Southern Transbaikal region. *Microbiology* 80(2): 216-227.

# Biodiversity Survey of Hydrogen Sulfide Thermal Springs in Dagestan Using 16S Metabarcoding



Tutubalina N.A.<sup>1,2\*</sup>, Kozlova A.D.<sup>1</sup>, Krylova A.S.<sup>1</sup>, Prokopenko A.V.<sup>1</sup>, Alieva Z.A.<sup>3</sup>, Teymurov A.A.<sup>3</sup>, Gadzhiev A.A.<sup>3</sup>, Namsaraev Z.B.<sup>1</sup>, Toshchakov S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Research Centre “Kurchatov Institute”, Ac. Kurchatov sq., 1, Moscow, 123098, Russia

<sup>2</sup> Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119234, Russia

<sup>3</sup> Institute of Ecology and Sustainable Development of Dagestan State University, Dakhadaeva st., 21, Makhachkala, 367000, Russia

**ABSTRACT.** The Greater Caucasus region is rich in thermal hydrogen sulfide springs, but their microbiological composition is poorly studied. In this study, using high-throughput profiling of the V4 region of the 16S rRNA gene, we analyzed the microbial communities of such springs in the Republic of Dagestan, assessed their biodiversity, and investigated correlations between abiotic factors and microbial community composition. Results show that the alpha diversity of microbial communities is negatively correlated with temperature and pH, with community composition being significantly influenced by the presence of hydrocarbons, redox potential, and dissolved organic matter content. The springs near the village of Kayakent were distinguished by unique physicochemical parameters, and their microbial communities were characterized by high taxonomic novelty, dominated by uncultivated representatives of the families *Arcobacteraceae* and *Hydrogenophilaceae*.

**Keywords:** 16S, metabarcoding, North Caucasus, thermal springs, hydrogen sulfide springs, thermophiles

**For citation:** Tutubalina N.A., Kozlova A.D., Krylova A.S., Prokopenko A.V., Alieva Z.A., Teymurov A.A., Gadzhiev A.A., Namsaraev Z.B., Toshchakov S.V. Biodiversity Survey of Hydrogen Sulfide Thermal Springs in Dagestan Using 16S Metabarcoding // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1127-1130. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1127

## 1. Introduction

The Caucasus region is seismically and volcanically active, which results in an abundance of thermal springs and deep thermal reservoirs (Ershov et al., 2002; Masurenkov et al., 2009). The presence of evaporites, such as gypsum and anhydrite, in deep Mesozoic sediments contributes to the reduction of sulfates and the saturation of groundwater with hydrogen sulfide (Chervyatsova et al., 2020). Consequently, hydrogen sulfide springs are common in the North Caucasus, with some also being thermal. Despite the prevalence of thermal springs in the North Caucasus, their microbiological composition is still poorly understood. There are very few studies using classical microbiological methods (Chernousova et al., 2010; Khalilova et al., 2014; Gorlenko et al., 2019), while studies using modern metagenomic approaches are exceedingly rare (Toshchakov et al., 2021).

## 2. Materials and methods

\*Corresponding author.

E-mail address: [nina.tutubalina@gmail.com](mailto:nina.tutubalina@gmail.com) (N.A. Tutubalina)

Received: July 05, 2024; Accepted: July 21, 2024;

Available online: August 30, 2024

In this study, we used high-throughput profiling of communities in the V4 region of the 16S rRNA gene to analyze the microbiota composition of thermal hydrogen sulfide springs in the Republic of Dagestan. Library preparation and sequencing protocols followed those described by Toshchakov et al. (2021).

Reads were processed using the QIIME2 platform, clustered with a 97% similarity threshold, and assigned taxonomy using the DADA2 naïve Bayesian classifier. The Silva138 16S rRNA database (Quast et al., 2013) was used as a reference for both clustering and taxonomic assignment. Further data analysis was performed using the *phyloseq* package (McMurdie and Holmes, 2013).

## 3. Results and discussion

We assessed the alpha and beta diversity of the studied biotopes, investigated the correlations between abiotic environmental factors and microbial community composition, and identified marker taxa characteristic of different sources.

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Specifically, our findings indicate that alpha diversity indices (Shannon index, Chao1) show a negative correlation with both temperature and pH. Community composition is significantly influenced by factors such as the presence of hydrocarbons, temperature, redox potential, and the amount of dissolved organic matter (characterized by permanganate oxidation). In terms of ionic composition, we found positive correlations between representatives of genus *Thiofaba* and ammonium ion concentrations, genera *Sulfurovum*, *Sulfuricurvum*, and *Sulfurimonas* with nitrite ions and calcium cations, and genus *Marinobacter* and uncultivated representatives of *Deferribacteraceae* with cadmium and manganese cations.

The group of springs near the village of Kayakent was characterized by the most specific physicochemical parameters. Notably, some springs in this group exhibited higher salinity compared to other springs in the Republic of Dagestan, while others had a high sulfide content. Analysis of the community composition revealed high taxonomic novelty, with most microbes in the community classified only up to the family level. The most prevalent were uncultivated representatives of the families *Arcobacteraceae* and *Hydrogenophilaceae*, which are common in hydrogen sulfide springs (Chiciudean et al., 2022; Konrad et al., 2023).

#### 4. Conclusions

This study provides the first data on uncultivated microorganisms in the hydrogen sulfide hydrotherms of the North Caucasus. Further research on these communities, including the use of shotgun metagenomics, will help reveal the role of these microorganisms in biogeochemical cycles.

#### 5. Funding

This work was carried out within the state assignment of NRC “Kurchatov institute”.

#### Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Chernousova E.Y., Akimov V.N., Gridneva E.V. et al. 2010. Biodiversity and monitoring of colorless filamentous bacterioplankton sulfide aquatic systems of North Caucasus region. *Microbiology* 79(5): 672–678. DOI: [10.1134/S0026261710050127](https://doi.org/10.1134/S0026261710050127)
- Chervyatsova O.Y., Potapov S.S., Kuzmina L.Y. et al. 2020. Sulfuric acid speleogenesis in the North Caucasus: Sharo-Argun valley Caves (Chechen Republic, Russia). *Geomorphology* 369(3): 107346. DOI: [10.1016/j.geomorph.2020.107346](https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2020.107346)
- Chiciudean I., Russo G., Bogdan D.F. et al. 2022. Competition-cooperation in the chemoautotrophic ecosystem of Movile Cave: first metagenomic approach on sediments. *Environmental Microbiome* 17(1): 44. DOI: [10.1186/s40793-022-00438-w](https://doi.org/10.1186/s40793-022-00438-w)
- Ershov A.V., Brunet M.-F., Nikishin A.M. et al. 2002. Northern Caucasus basin: thermal history and synthesis of subsidence models. *Sedimentary Geology* 156(1-4): 95-118. DOI: [10.1016/S00370738\(02\)00284-1](https://doi.org/10.1016/S00370738(02)00284-1)
- Gorlenko V.M., Burganskaya E.I., Bryantseva I.A. 2019. Phototrophic communities of the berikei highly mineralized mesothermal sulfide springs (Dagestan, Russia). *Microbiology* 88: 146-155. DOI: [10.1134/S0026261719020048](https://doi.org/10.1134/S0026261719020048)
- Khalilova E.A., Nuratinov R.A., Kotenko S.C. et al. 2014. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms of hot springs and their significance in the assessment of the biodiversity of microbial communities. *Arid Ecosystems* 4(1): 25-30. DOI: [10.1134/S2079096114010028](https://doi.org/10.1134/S2079096114010028)
- Konrad R., Vergara-Barros P., Alcorta J. et al. 2023. Distribution and activity of sulfur-metabolizing bacteria along the temperature gradient in phototrophic mats of the Chilean hot spring Porcelana. *Microorganisms* 11(7): 1803. DOI: [10.3390/microorganisms11071803](https://doi.org/10.3390/microorganisms11071803)
- Masurenkov Y.P., Sobisevich A.L., Likhodeev D.V. et al. 2009. Thermal anomalies of the Northern Caucasus. *Doklady Earth Sciences* 429(1): 1318–1321. DOI: [10.1134/S10283334X09080170](https://doi.org/10.1134/S10283334X09080170)
- McMurdie P.J., Holmes S. 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8(4): e61217. DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)
- Toshchakov S.V., Izotova A.O., Vinogradova E.N. et al. 2021. Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the north Caucasus. *Biology* 10(12): 1352. DOI: [10.3390/biology10121352](https://doi.org/10.3390/biology10121352)
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(D1): D590–D596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)



# Исследование биоразнообразия сероводородных гидротерм Республики Дагестан методами 16S-метабаркодинга

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Тутубалина Н.А.<sup>1,2\*</sup>, Козлова А.Д.<sup>1</sup>, Крылова А.С.<sup>1</sup>, Прокопенко А.В.<sup>1</sup>, Алиева З.А.<sup>3</sup>, Теймуров А.А.<sup>3</sup>, Гаджиев А.А.<sup>3</sup>, Намсараев З.Б.<sup>1</sup>, Тоцаков С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИЦ Курчатовский институт, пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123098, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет, Ленинские горы, 1, Москва, 119234, Россия

<sup>3</sup> Институт экологии и устойчивого развития ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», ул. Дахадаева, 21, Махачкала, 367000, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Регион Большого Кавказа богат термальными сероводородными источниками, микробиологический состав которых плохо изучен. В этом исследовании с использованием высокопроизводительного профилирования по региону V4 гена 16S рРНК были проанализированы микробные сообщества этих источников в Республике Дагестан, оценено их биоразнообразие и исследованы корреляции между абиотическими факторами и составом микробных сообществ. Результаты показывают, что альфа-разнообразие сообществ отрицательно коррелирует с температурой и рН, при этом на состав сообщества оказывает значительное влияние присутствие углеводов, окислительно-восстановительный потенциал и содержание растворенных органических веществ. Источники вблизи села Каякент отличались уникальными физико-химическими параметрами, а их микробные сообщества характеризовались высокой таксономической новизной, в них преобладали некультивируемые представители семейств *Arcobacteraceae* и *Hydrogenophilaceae*.

**Ключевые слова:** 16S, метабаркодинг, Северный Кавказ, гидротермы, сероводородные источники, термофилы

Для цитирования: Тутубалина Н.А., Козлова А.Д., Крылова А.С., Прокопенко А.В., Алиева З.А., Теймуров А.А., Гаджиев А.А., Намсараев З.Б., Тоцаков С.В. Исследование биоразнообразия сероводородных гидротерм Республики Дагестан методами 16S-метабаркодинга // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1127-1130. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1127

## 1. Введение

Кавказский регион является сейсмически и вулканически активным и по этой причине изобилует гидротермами и глубокими термальными скважинами (Ershov et al., 2002; Masurenkov et al., 2009). Кроме того, присутствие эвапоритов (гипса и ангидрита) в глубоких мезозойских отложениях способствует восстановлению сульфатов и насыщению подземных вод сероводородом (Chervyatsova et al., 2020). В результате этого на Северном Кавказе весьма распространены сероводородные источники, ряд которых являются также термальными. Несмотря на многочисленность горячих источников Северного Кавказа, их микробный состав на данный момент остается слабо изученным. Исследования, использующие классические методы микробиологии, крайне немногочисленны (Chernousova et al., 2010; Khalilova et al., 2014; Gorlenko et al., 2019),

тогда как работы, использующие современные метагеномные подходы, и вовсе единичны (Toshchakov et al., 2021).

## 2. Материалы и методы

В рамках данной работы при помощи высокопроизводительного профилирования сообществ по V4 региону гена 16S рРНК был проведен анализ состава микробиоты термальных сероводородных источников Республики Дагестан. Протоколы подготовки библиотек и секвенирования были идентичны описанным в статье Toshchakov et al. (2021).

Чтения обрабатывались при помощи платформы QIIME2 и кластеризовались с порогом идентичности 97%. Для определения таксономического положения использовался наивный байесовский классификатор DADA2. В качестве референсной

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [nina.tutubalina@gmail.com](mailto:nina.tutubalina@gmail.com) (Н.А. Тутубалина)

Поступила: 05 июля 2024; Принята: 21 июля 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



базы данных и для кластеризации, и для таксономической классификации использовалась база данных Silva138 16S rRNA (Quast et al., 2013). Дальнейшая обработка данных проводилась при помощи библиотеки *phyloseq* (McMurdie and Holmes, 2013).

### 3. Результаты и обсуждение

Был проведен анализ альфа- и бета-разнообразия исследуемых биотопов, исследованы корреляции абиотических факторов среды с составом микробных сообществ, а также выявлены маркерные таксоны, характерные для разных источников.

В частности, было показано, что индексы альфа-разнообразия (индекс Шеннона, Chao1) демонстрируют отрицательную корреляцию с температурой и pH среды, тогда как на состав сообщества значительное влияние оказывают такие факторы, как присутствие углеводов, температура, редокс-потенциал и количество растворенного органического вещества (перманганатная окисляемость). В отношении ионного состава мы обнаружили положительные корреляции представителей рода *Thiofaba* с содержанием ионов аммония, родов *Sulfurovum*, *Sulfuricurvum* и *Sulfurimonas* с нитрит-ионами и катионами кальция, а также рода *Marinobacter* и некультивируемых представителей *Deferribacteraceae* с катионами кадмия и марганца.

Группа источников, расположенных недалеко от села Каякент, характеризовалась наиболее специфическими физико-химическими параметрами, в частности, ряд источников группы обладал высокой соленостью по сравнению с другими источниками Республики Дагестан, некоторые характеризовались высоким содержанием сульфида. Анализ состава сообщества показал, что данные источники характеризуются высокой таксономической новизной: большая часть сообщества классифицирована только до уровня семейства. Наиболее представленными были некультивируемые представители семейств *Arcobacteraceae* и *Hydrogenophilaceae*, характерные для сероводородных гидротерм (Chiciudean et al., 2022; Konrad et al., 2023).

### 4. Выводы

В данном исследовании получены первые данные о некультивируемых микроорганизмах сероводородных гидротерм Северного Кавказа. Дальнейшие исследования данных сообществ, в том числе методами *shotgun*-метагеномики, позволят понять роль данных микроорганизмов в биогеохимических циклах.

## 5. Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

### Список литературы

- Chernousova E.Y., Akimov V.N., Gridneva E.V. et al. 2010. Biodiversity and monitoring of colorless filamentous bacteitrtn sulfide aquatic systems of North Caucasus region. *Microbiology* 79(5): 672–678. DOI: [10.1134/S0026261710050127](https://doi.org/10.1134/S0026261710050127)
- Chervyatsova O.Y., Potapov S.S., Kuzmina L.Y. et al. 2020. Sulfuric acid speleogenesis in the North Caucasus: Sharo-Argun valley Caves (Chechen Republic, Russia). *Geomorphology* 369(3): 107346. DOI: [10.1016/j.geomorph.2020.107346](https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2020.107346)
- Chiciudean I., Russo G., Bogdan D.F. et al. 2022. Competition-cooperation in the chemoautotrophic ecosystem of Movile Cave: first metagenomic approach on sediments. *Environmental Microbiome* 17(1): 44. DOI: [10.1186/s40793-022-00438-w](https://doi.org/10.1186/s40793-022-00438-w)
- Ershov A.V., Brunet M.-F., Nikishin A.M. et al. 2002. Northern Caucasus basin: thermal history and synthesis of subsidence models. *Sedimentary Geology* 156(1-4): 95-118. DOI: [10.1016/S00370738\(02\)00284-1](https://doi.org/10.1016/S00370738(02)00284-1)
- Gorlenko V.M., Burganskaya E.I., Bryantseva I.A. 2019. Phototrophic communities of the berikei highly mineralized mesothermal sulfide springs (Dagestan, Russia). *Microbiology* 88: 146-155. DOI: [10.1134/S0026261719020048](https://doi.org/10.1134/S0026261719020048)
- Khalilova E.A., Nuratinov R.A., Kotenko S.C. et al. 2014. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms of hot springs and their significance in the assessment of the biodiversity of microbial communities. *Arid Ecosystems* 4(1): 25-30. DOI: [10.1134/S2079096114010028](https://doi.org/10.1134/S2079096114010028)
- Konrad R., Vergara-Barros P., Alcorta J. et al. 2023. Distribution and activity of sulfur-metabolizing bacteria along the temperature gradient in phototrophic mats of the Chilean hot spring Porcelana. *Microorganisms* 11(7): 1803. DOI: [10.3390/microorganisms11071803](https://doi.org/10.3390/microorganisms11071803)
- Masurenkov Y.P., Sobisevich A.L., Likhodeev D.V. et al. 2009. Thermal anomalies of the Northern Caucasus. *Doklady Earth Sciences* 429(1): 1318–1321. DOI: [10.1134/S10283334X09080170](https://doi.org/10.1134/S10283334X09080170)
- McMurdie P.J., Holmes S. 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8(4): e61217. DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)
- Toshchakov S.V., Izotova A.O., Vinogradova E.N. et al. 2021. Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the north Caucasus. *Biology* 10(12): 1352. DOI: [10.3390/biology10121352](https://doi.org/10.3390/biology10121352)
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(D1): D590–D596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)

# Diversity of planktonic pro- and microeukaryotes in water bodies of the Volga-Don basin during the period of cyanobacterial bloom according to metabarcoding data



Umanskaya M.V.<sup>1\*</sup>, Bykova S.V.<sup>1</sup>, Gorbunov M.Yu.<sup>1</sup>, Tarasova N.G.<sup>1,2</sup>, Krasnova E.S.<sup>1</sup>, Mukhortova O.V.<sup>1,2</sup>, Sherysheva N.G.<sup>1</sup>, Agapov A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara Federal Research Center RAS, Institute of Ecology of the Volga Basin RAS, st. Komzina, 10, Tolyatti, 445003, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biology of Inland Waters named after. I.D. Papanin RAS, pos. Borok, 109, Nekouz district, Yaroslavl region, 152742, Russia

**ABSTRACT.** The first data on the phylogenetic diversity of planktonic communities of pro- and microeukaryotes in different types of water bodies of the Volga-Don basin during the period of cyanobacterial bloom are presented. *Aphanizomenon flos-aquae*/*Dolichospermum flos-aquae* blooms were found mainly in the Kuibyshev Reservoir; *Planktothrix agardhii* bloom was observed in floodplain lakes of the majority of investigated rivers. Bloom of *Raphidiopsis raciborskii* was found in a lake on the Volga River terrace, and in a pond in the floodplain of the Samara River *Anabaenopsis* dominated among Cyanobacteria. Among heterotrophic prokaryotes, Proteobacteria, Bacteroidota, Verrucomicrobiota, Planctomycetota and Actinobacteriota predominate in the number of sequences, and among protists - Ciliophora, Gyrista (mainly Chrysophyceae), Cryptista and Myzozoa. During the period of cyanobacterial bloom, the contributions of Proteobacteria (especially, Burkholderiales and Pseudomonadales) and Actinobacteriota slightly decrease, while Myzozoa, on the contrary, increase. Monodominant blooms of various species of cyanobacteria significantly change the composition and structure of microbial communities, both at the OTUs and higher taxa levels. The plankton of the pond with *Anabaenopsis* bloom is most peculiar. Communities with blooms of *P. agardhii*, *R. raciborskii* and *A. flos-aquae*/*D. flos-aquae* are more similar to each other.

**Keywords:** cyanobacterial blooms; bacterioplankton; planktonic protists; community structure; small subunit rRNA gene metabarcoding

**For citation:** Umanskaya M.V., Bykova S.V., Gorbunov M.Yu., Tarasova N.G., Krasnova E.S., Mukhortova O.V., Sherysheva N.G., Agapov A.A. Diversity of planktonic pro- and microeukaryotes in water bodies of the Volga-Don basin during the period of cyanobacterial bloom according to metabarcoding data // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1131-1136. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1131

## 1. Introduction

The intensity, frequency, and duration of cyanobacterial blooms in fresh continental water bodies have increased in recent decades due to anthropogenic eutrophication and global climate change. This has been complicated by simultaneous changes in the composition of dominant species complexes and functional groups of cyanobacteria, and also by the change of the areals of certain bloom-forming cyanobacteria species (Huisman et al., 2018). All this causes significant changes in the structure of the entire plankton community of aquatic ecosystems. However, the available information on the impact of cyanobacterial blooms on the structure and

diversity of the plankton community as a whole and its individual components remains insufficient and partly contradictory (Zhao et al., 2022; Xu et al., 2022, etc.). The use of molecular genetic methods allows to assess the diversity of planktonic pro- and microeukaryotes more fully and to analyze complex associative relationships in their communities. So far, different geographical regions of the world have been studied to varying degrees, and there are still “blank spots” on the world map.

The purpose of this study was to determine the phylogenetic diversity of planktonic microbial communities in water bodies of the Volga-Don basin during the blooming period of various species of cyanobacteria.

\*Corresponding author.

E-mail address: [mvumansk67@gmail.com](mailto:mvumansk67@gmail.com) (Umanskaya M.V.)

**Received:** June 05, 2024; **Accepted:** July 04, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



## 2. Materials and methods

Eighteen water bodies were studied from June to September 2023, including the Kuybyshev Reservoir and three of its bays, lakes and ponds in the basins of the Sumka, Sok, B. Kinel, Samara, Volga, Don and Khoher rivers (Russia). Integral samples were taken from the photic layer with a step of 0.5-1 m. For DNA extraction 100–250 ml of water was filtered through 0.2 µm sterile Cellulose Nitrate (CN) Membrane Filters (Vladisart, Russia), fixed by 80% ethanol and stored at –18°C until further processing. DNA was extracted and sequenced at Syntol (Moscow, Russia). Amplification of variable regions of the 16S and 18S rRNA genes was performed using specific primers 515F and 806R (Walters et al., 2015) and Euk574F and Euk897R (Hugerth et al., 2014). The library pool was sequenced on Illumina MiSeq using MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). The Usearch 11.0.67 program (Edgar, 2010) was used for paired-end reads merging and for subsequent processing of the resulting raw combined reads. The taxonomic affiliation of the obtained operational taxonomic units (OTUs) was determined using the SILVA SSU database v. 138.1 and PR2 database v. 5.0.1.

## 3. Results and discussion

In the combined library, Archaea accounted for 209 OTUs and 2,232 sequences. Bacteria, excluding mitochondria, accounted for 5,703 OTUs and 2,225,250 sequences. 2,606 18S-OTUs with a total number of sequences of 3,039,444 belonged to Protista (including Fungi).

Judging by the proportion of Cyanobacteria sequences among total Bacteria and the ratio of the number of cyanobacteria and chloroplast sequences, cyanobacterial blooms were absent in only 15% of the samples studied in 2023. In the remaining water bodies, blooms with predominance of various species were observed, including: *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek (28% of all samples); *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault / *Dolichospermum flos-aquae* (Bornet &

Flahault) P.Wacklin, L.Hoffmann & Komárek (36%); *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera & al. (6%); *Anabaenopsis* sp. (3%) and mixed blooms of several species in similar quantities (12%). In samples with different types of cyanobacterial bloom, communities of heterotrophic bacteria and microeukaryotic organisms differ in the average number of OTUs per sample and diversity indices (Table). The dominant complex composition in samples with various types of cyanobacterial blooms is shown at figure.

The blooms of *A. flos-aquae* / *D. flos-aquae* in the Kuybyshev Reservoir and some water bodies of the Volga and Samara River basins was quite expected and generally corresponded to long-term results of microscopic observations (Korneva, 2015; Zharikov et al., 2009). The microbial community of this group was dominated by Burkholderiales (Proteobacteria), Ca. Nanopelagicales (Actinobacteriota), Cryptophyceae (Cryptista) and Spirotrichea (Ciliophora).

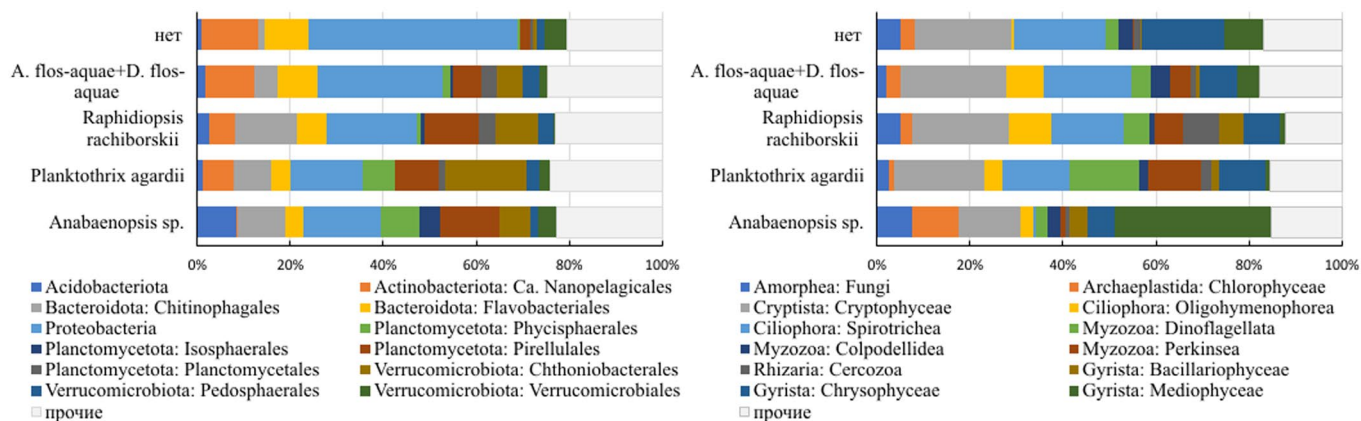
In most of the studied lakes in the basins of the Don, Khoher, Volga, Samara and Kinel rivers, blooms of *P. agardhii* were recorded in 2023. In previously studied lakes of the Volga floodplain, blooms of this species were not observed (Rozenberg et al., 2006). Data on the composition of cyanobacterial communities in other lakes of this group were obtained for the first time. These communities of heterotrophic prokaryotes and protists were dominated by Chthoniobacterales (Verrucomicrobiota), Proteobacteria, Cryptophyceae (Cryptista), Dinoflagellata and Perkinsea (Myzozoa) and Spirotrichea (Ciliophora).

The lake with the *R. raciborskii* bloom is located at the Volga River terrace; its community was dominated by Proteobacteria, Chitinophagales (Bacteroidota), Pirellulales (Planctomycetota), Cryptophyceae (Cryptista), Spirotrichea and Oligohymenophorea (Ciliophora). The pond with *Anabaenopsis* bloom is located in the Samara River basin and was dominated by Proteobacteria, Pirellulales (Planctomycetota), Chitinophagales (Bacteroidota) and Gyrista: Mediophyceae. It should be noted that only in this pond representatives of Blastocatellia (Acidobacteriota) were found as subdominants.

**Table 1.** Diversity indicators of plankton communities of heterotrophic prokaryotes and microeukaryotes in samples with blooms of different cyanobacteria species

Cyanobacterial bloom	Diversity indicators							
	Average number of OTUs per sample	Indices			Average number of OTUs per sample	Indices		
		Simpson (1-D)	Shannon (H)	Berger-Parker		Simpson (1-D)	Shannon (H)	Berger-Parker
	Heterotrophic prokaryotes				Microeukaryotes			
<i>Anabaenopsis</i> sp.	944	0.98	4.75	0.080	378	0.88	3.17	0.313
<i>A. flos-aquae</i> / <i>D. flos-aquae</i>	1,119	0.97	4.67	0.14	490	0.99	5.56	0.045
<i>P. agardhii</i>	866	0.99	5.25	0.057	497	0.97	4.53	0.101
<i>R. raciborskii</i>	1,193	0.98	5.08	0.062	499	0.97	4.15	0.09
Mixed blooms	548	0.99	5.54	0.04	572	0.98	4.76	0.083
No blooms	1,168	0.97	4.81	0.12	397	0.96	4.29	0.13





**Fig.1.** The structure of the microbial planktonic community (relative abundance, % of the total sequences of prokaryotes (left) and microeukaryotes (right)) under different species-specific cyanobacterial blooms and without blooms.

Clustering of all samples using the Jacquard index as a similarity measure showed that, according to the composition of OTUs two clusters of samples are formed at a low level of similarity, first one with *P. agardhii* and *R. raciborskii* blooms, and the second with blooms of *A. flos-aquae* / *D. flos-aquae* and mixed blooms. Samples with no cyanobacterial blooms and with *Anabaenopsis* sp. domination are most different from all the others.

#### 4. Conclusions

Thus, data on the phylogenetic diversity of planktonic pro- and microeukaryotes in different water bodies of the Volga-Don basin during the cyanobacterial bloom have been obtained and reported for the first time. Among prokaryotes, in terms of the number of sequences, Cyanobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobiota, Planctomycetota and Actinobacteriota predominate, and among protists - Ciliophora, Gyrista (mainly Chrysophyceae), Cryptista, Myzozoa and Amorphea. The contributions of Proteobacteria (especially Burkholderiales and Pseudomonadales) and Actinobacteria decrease slightly, while Myzozoa, on the contrary, increase in samples with cyanobacterial blooms. Monodominant blooms of various cyanobacteria species significantly influence the composition and structure of microbial communities. The plankton of the pond with the *Anabaenopsis* bloom is the most peculiar.

#### Acknowledgement

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation № 23-14-20005, <https://rscf.ru/project/23-14-20005/>.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Hugerth L.W., Muller E.E., Hu Y.O. et al. 2014. Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PloS one* 9(4): e95567. DOI: [10.1371/journal.pone.0095567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095567)
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16(8): 471-483. DOI: [10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)
- Korneva L.G. 2015. Phytoplankton of Volga reservoirs. Kostroma: Kostromskoy pechat-nyy dom. (in Russian)
- Rozenberg G.S., Pautova V.N., Pospelov A.P. et al. 2006. Combined delineation of water bodies from the south-east part of the National Park "Samarskaya Luka". *Bulletin "Samarskaya Luka"* 18: 38-96. (in Russian)
- Walters W., Hyde E.R., Berg-Lyons D. et al. 2015. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems* 1(1): e00009-15. DOI: [10.1128/mSystems.00009-15](https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15)
- Xu H., Liu W., Zhang S. et al. 2022. Cyanobacterial bloom intensities determine planktonic eukaryote community structure and stability. *Science of The Total Environment* 838: 156637. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.156637](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156637)
- Zhao K., Wang L., You Q. et al. 2022. Impact of cyanobacterial bloom intensity on plankton ecosystem functioning measured by eukaryotic phytoplankton and zooplankton indicators. *Ecological Indicators* 140: 109028. DOI: [10.1016/j.ecolind.2022.109028](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109028)
- Zharikov V.V., Gorbunov M.Yu., Bykova S.V. et al. 2009. Protists and bacteria of lakes of the Samara region. *Togliatti: Kassandra*. (in Russian)

# Разнообразии планктонных про- и микроэукариот в водоемах Волго-Донского бассейна в период цианобактериального цветения по данным метабаркодинга

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYУманская М.В.<sup>1\*</sup>, Быкова С.В.<sup>1</sup>, Горбунов М.Ю.<sup>1</sup>, Тарасова Н.Г.<sup>1,2</sup>, Краснова Е.С.<sup>1</sup>, Мухортова О.В.<sup>1,2</sup>, Шерышева Н.Г.<sup>1</sup>, Агапов А.А.<sup>1</sup><sup>1</sup>Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, ул. Комзина, 10, Тольятти, 445003, Россия<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, 109, Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В настоящей работе представлены первые данные о филогенетическом разнообразии планктонных сообществ про- и микроэукариот в разнотипных водоемах Волго-Донского бассейна в период цианобактериального цветения. Цветение *Aphanizomenon flos-aquae* / *Dolichospermum flos-aquae* обнаружено в основном в Куйбышевском водохранилище, *P. agardhii* – в основном в пойменных озерах по всей исследованной территории. В бассейнах рек Волга и Самара обнаружено по одному водоему с цветением *Raphidiopsis raciborskii* и *Anabaenopsis* sp., соответственно. Среди гетеротрофных прокариот по числу последовательностей преобладают Proteobacteria, Bacteroidota, Verrucomicrobiota, Planctomycetota и Actinobacteriota, а среди протистов - Ciliophora, Gyrista (преимущественно, Chrysophyceae), Cryptista и Myzozoa. В период цианобактериального цветения вклады Proteobacteria (особенно, Burkholderiales и Pseudomonadales) и Actinobacteriota несколько снижаются, а Myzozoa, напротив, увеличиваются. Монодоминантное цветение различных видов цианобактерий существенно меняет состав и структуру микробных сообществ, причем как на уровне ОТЕ, так и на уровне макротаксонов различного ранга. Наибольшим своеобразием отличается планктон водоема с цветением *Anabaenopsis* sp. Сообщества с цветением *P. agardhii*, *R. raciborskii* и *A. flos-aquae* / *D. flos-aquae* более сходны между собой.

**Ключевые слова:** цветение цианобактерий, бактериопланктон, планктонные протисты, структура сообществ, метабаркодинг генов малой субъединицы rRNA

Для цитирования: Уманская М.В., Быкова С.В., Горбунов М.Ю., Тарасова Н.Г., Краснова Е.С., Мухортова О.В., Шерышева Н.Г., Агапов А.А. Разнообразие планктонных про- и микроэукариот в водоемах Волго-Донского бассейна в период цианобактериального цветения по данным метабаркодинга // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1131-1136. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1131

## 1. Введение

В результате антропогенной эвтрофикации и глобальных климатических изменений в последние десятилетия интенсивность, частота и продолжительность цианобактериальных цветений пресных континентальных водоемов возрастает. Кроме того, происходят изменения в составе комплекса доминирующих видов и функциональных групп цианобактерий в различных водоемах, а также меняются ареалы распространения отдельных видов цианобактерий – возбудителей цветения (Huisman et al., 2018). Все это вызывает существенные изменения

структуры всего планктонного сообщества водных экосистем, однако имеющаяся информация о воздействии цианобактериальных цветений на структуру и разнообразие сообщества планктона в целом и его отдельных компонентов остается недостаточной и отчасти противоречивой (Zhao et al., 2022; Xu et al., 2022 и др.). Применение молекулярно-генетических методов позволяет более полно оценивать разнообразие планктонных про-и микроэукариот и анализировать сложные ассоциативные связи в их сообществах, однако различные географические регионы мира исследованы с разной степенью

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [mvumansk67@gmail.com](mailto:mvumansk67@gmail.com) (М.В. Уманская)

Поступила: 05 июня 2024; Принята: 04 июля 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



подробности и до сих пор на карте мира остаются «белые пятна».

Целью настоящего исследования было определить филогенетическое разнообразие планктонных микробных сообществ в водоемах Волго-Донского бассейна в период цветения различных видов цианобактерий.

## 2. Материалы и методы

В период с июня по сентябрь 2023 г. были исследованы 18 водоемов, включая Куйбышевское водохранилище с тремя заливами, озера и пруды в бассейнах рек Сумка, Сок, Б. Кинель, Самара, Волга, Дон и Хопер (Россия). Интегральные пробы были отобраны из фотического слоя с шагом 0,5-1 м. For DNA extraction from 100 to 250 ml of water was filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  sterile Cellulose Nitrate (CN) Membrane Filters (Vladisart, Russia), fixed by 80% ethanol and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until further processing. Выделение ДНК и секвенирование было проведено в компании «Синтол» (Москва, Россия). Амплификация переменных участков генов 16S и 18S рРНК осуществлялась с помощью специфических праймеров 515F и 806R (Walters et al., 2015) и Euk574F и Euk897R (Hugerth et al., 2014). Пул библиотек был секвенирован на Illumina MiSeq с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). Для объединения парноконцевых ридов и последующей обработки полученных сырых объединенных ридов использовали программу Usearch 11.0.67 (Edgar, 2010). Таксономическую принадлежность выделенных операционных таксономических единиц (ОТЕ) определяли с использованием баз данных SILVA SSU v. 138.1 и PR2 v. 5.0.1.

## 3. Результаты и обсуждение

Всего в объединенной библиотеке было зарегистрировано 209 ОТЕ, относящихся к Archaea, с общим числом последовательностей 2232; 5703 ОТЕ, принадлежащих к Bacteria (исключая митохондрии), с общим числом последовательностей 2225250; 2606 ОТЕ Protista (включая Fungi), с общим числом последовательностей 3039444.

Судя по доле последовательностей Cyanobacteria в составе Bacteria и соотношению числа последовательностей цианобактерий и хлоропластов цианобактериальное цветение отсутствовало только в 15% исследованных проб. В остальных исследованных водоемах в 2023 г. были обнаружены цветения с преобладанием *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek (28% всех проб); *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault / *Dolichospermum flos-aquae* (Bornet & Flahault) P.Wacklin, L.Hoffmann & Komárek (36%); *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera & al. (6%); *Anabaenopsis* sp. (3%) и смешанное цветение нескольких видов в близких количествах (12%). Сообщества гетеротрофных прокариот и микроэукариот в пробах с цветениями разными видами цианобактерий различаются по среднему числу ОТЕ в пробе и показателям разнообразия (Таблица). Состав доминирующего комплекса в пробах с разными типами цианобактериального цветения представлен на рисунке.

Цветение *A. flos-aquae* / *D. flos-aquae* в Куйбышевском водохранилище и некоторых водоемах бассейна р. Волга и Самара было вполне ожидаемо и в общем соответствовало многолетним результатам микроскопических наблюдений (Korneva, 2015; Zharikov et al., 2009). В микробном сообществе доминировали Burkholderiales (Proteobacteria), Ca. Nanopelagicales (Actinobacteriota), Cryptophyceae (Cryptista) и Spirotrichea (Ciliophora).

В большей части исследованных озер бассейнов р. Дон, Хопер, Волга, Самара и Кинель в 2023 г. было зарегистрировано цветение *P. agardhii*. В исследованных ранее пойменных озерах р. Волга цветение этого вида не отмечалось (Rozenberg et al., 2006), а данные по составу планктонных сообществ других озер этой группы получены впервые. В этих сообществах преобладали Chthoniobacterales (Verrucomicrobiota), Proteobacteria, Cryptophyceae (Cryptista), Dinoflagellata и Perkinsea (Myzozoa), и Spirotrichea (Ciliophora). Водоем с цветением *R. raciborskii* расположен в бассейне р. Волга, в составе его сообщества доминировали Proteobacteria, Chitinophagales (Bacteroidota), Pirellulales (Planctomycetota), Cryptophyceae (Cryptista),

**Таблица 1.** Показатели разнообразия сообществ гетеротрофных прокариот и микроэукариот в пробах с цветением разных видов цианобактерий.

Цветение	Показатели разнообразия							
	Число ОТЕ в пробе	индексы			Число ОТЕ в пробе	индексы		
		Simpson (1-D)	Shannon (H)	Berger-Parker		Simpson (1-D)	Shannon (H)	Berger-Parker
прокариоты				микроэукариоты				
<i>Anabaenopsis</i> sp.	944	0,98	4,75	0,080	378	0,88	3,17	0,313
<i>A. flos-aquae</i> / <i>D. flos-aqua</i>	1119	0,97	4,67	0,14	490	0,99	5,56	0,045
<i>P. agardhii</i>	866	0,99	5,25	0,057	497	0,97	4,53	0,101
<i>R. raciborskii</i>	1193	0,98	5,08	0,062	499	0,97	4,15	0,090
Смешанное	548	0,99	5,54	0,040	572	0,98	4,76	0,083
Нет цветения	1168	0,97	4,81	0,12	397	0,96	4,29	0,13

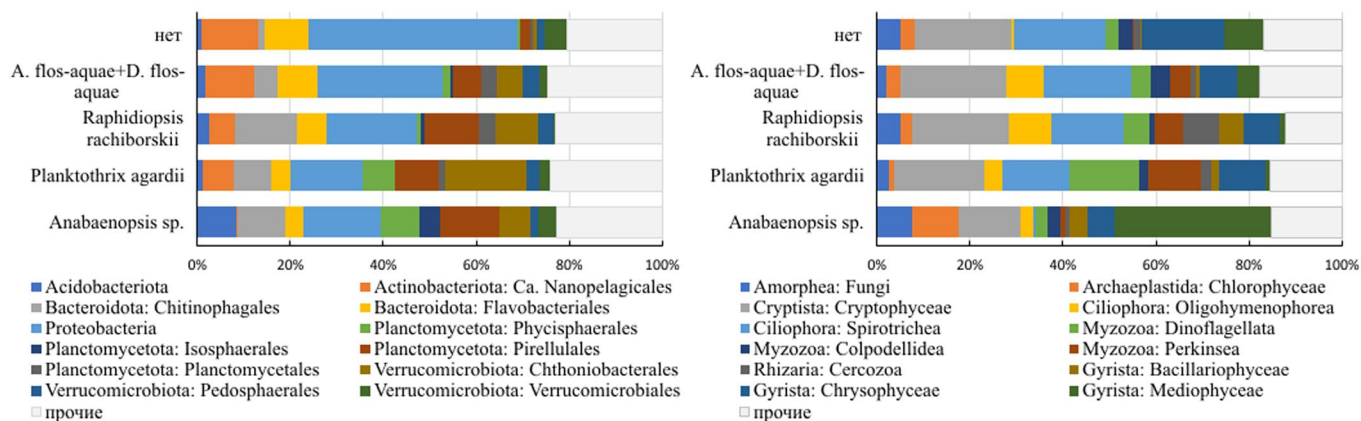


Рис.1. Структура микробного планктонного сообщества (% от общего числа последовательностей прокариот (слева) и микроэукариот (справа)) в условиях цветения разных видов цианобактерий и без цветения

Spirotrichea и Oligohymenophorea (Ciliophora). Водоем с цветением *Anabaenopsis sp.* находится в бассейне р. Самара и в нем доминировали Proteobacteria, Pirellulales (Planctomycetota), Chitinophagales (Bacteroidota) и Gyrysta: Mediophyceae. Надо отметить, что только здесь в состав субдоминантов вошли представители Blastocatellia (Acidobacteriota).

Кластеризация всех проб с использованием в качестве меры сходства индекса Жаккара показала, что по составу ОТЕ на низком уровне сходства формируется смешанный кластер проб с цветением *P. agardhii* и *R. rachiborskii*, с цветением *A. flos-aquae* / *D. flos-aquae* и смешанным типом цветения также объединяются между собой. Пробы без цветения и с цветением *Anabaenopsis sp.* наиболее сильно отличаются от всех остальных.

#### 4. Выводы

Таким образом, впервые получены данные о филогенетическом разнообразии планктонных сообществ про- и микроэукариот в разнотипных водоемах Волго-Донского бассейна в период цианобактериального цветения. Среди прокариот по числу последовательностей преобладают Cyanobacteria, Proteobacteria, Bacteroidota, Verrucomicrobiota, Planctomycetota и Actinobacteriota, а среди протистов - Ciliophora, Gyrysta (преимущественно, Chrysophyceae), Cryptista, Myzozoa and Amorphea. Вклады Proteobacteria (особенно, Burkholderiales и Pseudomonadales) и Actinobacteriota несколько снижаются, а Myzozoa, напротив, увеличиваются в условиях цветения. Монодоминантное цветение различных видов цианобактерий существенно меняет состав и структуру микробных сообществ. Наибольшим своеобразием отличается планктон водоема с цветением *Anabaenopsis sp.*

#### Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-20005, <https://rscf.ru/project/23-14-20005/>.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Hugerth L.W., Muller E.E., Hu Y.O. et al. 2014. Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PloS one* 9(4): e95567. DOI: [10.1371/journal.pone.0095567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095567)
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16(8): 471-483. DOI: [10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)
- Korneva L.G. 2015. Phytoplankton of Volga reservoirs. *Kostroma: Kostromskoy pechat-nyy dom.* (in Russian)
- Rozenberg G.S., Pautova V.N., Pospelov A.P. et al. 2006. Combined delineation of water bodies from the south-east part of the National Park "Samarskaya Luka". *Bulletin "Samarskaya Luka"* 18: 38-96. (in Russian)
- Walters W., Hyde E.R., Berg-Lyons D. et al. 2015. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems* 1(1): e00009-15. DOI: [10.1128/mSystems.00009-15](https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15)
- Xu H., Liu W., Zhang S. et al. 2022. Cyanobacterial bloom intensities determine planktonic eukaryote community structure and stability. *Science of The Total Environment* 838: 156637. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.156637](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156637)
- Zhao K., Wang L., You Q. et al. 2022. Impact of cyanobacterial bloom intensity on plankton ecosystem functioning measured by eukaryotic phytoplankton and zooplankton indicators. *Ecological Indicators* 140: 109028. DOI: [10.1016/j.ecolind.2022.109028](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109028)
- Zharikov V.V., Gorbunov M.Yu., Bykova S.V. et al. 2009. Protists and bacteria of lakes of the Samara region. *Togliatti: Kassandra.* (in Russian)



# Water and sediment microbial communities in shallow coastal ecosystems of Lake Baikal during summer 2021-2022



Zaitseva S.V.\* , Dagurova O.P.

Institute of General and Experimental Biology SD RAS, Sakhyanovoy Str., 6, Ulan-Ude, 670047, Russia

**ABSTRACT.** The taxonomical structure of the microbial community of shallow coastal areas is closely related to environmental conditions, and also changes rapidly in response to changes determined by water level fluctuations. The taxonomic structure of microbial communities in the shallow coastal areas of the Lake Baikal was studied during the period of high water level in summer months 2021-2022. At the phylum level, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota* and *Deinococcota* were dominant, accounting for 98.55 to 99.46% of the total microbial diversity in water microbial community. A significant similarity was revealed in the taxonomic composition of microbial communities in the shallow coastal areas of the Lake Baikal during certain summer months of 2021-2022. Similar water microbial communities formed in June 2021/22; in July 2022 in the Enkhaluk and Sukhaya sample sites, as well as at the Goryachinsk and Sukhaya sample sites in August 2022. Sediment microbial communities were dominated by *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidota*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteriota* and *Verrucomicrobiota*.

**Keywords:** microbial ecology, Lake Baikal, water level fluctuations

**For citation:** Zaitseva S.V., Dagurova O.P. Water and sediment microbial communities in shallow coastal ecosystems of Lake Baikal during summer 2021-2022 // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1137-1142. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1137

## 1. Introduction

The impact of water level fluctuations on microbial community is one of the poorly explored aspects in freshwater ecology. Environmental changes associated with hydrological fluctuations can have a strong impact on the composition and functioning of water and sediment microbial communities, and therefore alter biogeochemical cycles and energy flows in the ecosystem (Ren et al., 2019). Littoral zones are particularly affected by increased water level fluctuations and the ecological consequences of level changes are likely to be greatest in shallow coastal zones (Evtimova and Donohue, 2014). Some possible negative changes in the microbial community structure associated with water level fluctuations were identified in Lake Baikal (Borisova et al., 2022; Zaitseva et al., 2023). The aim of this study was to determine the taxonomic diversity of microbial communities in shallow water areas of Lake Baikal during the high-water period.

## 2. Material and methods

The studies were carried out in June, July and August of 2021-2022, which were characterized as a high-water period. Samples were collected from four sample sites at the east coast with specific hydrological and climatic features. First sample site Gremyachinsk is a part of the coast located outside the bays in the middle basin of Lake Baikal, with conditions characteristic of an extended part of the eastern coast of the lake. Second site Goryachinsk can be considered a typical bay area on the east coast. Sample sites Enkhaluk and Sukhaya are typical for deltaic coastal terrace areas. Triplicated water samples (1000 mL) were retrieved from each sampling site at the 1 m from the water and then filtered through membrane filters (pore diameter 0.22 µm) until clogged. DNA isolation, creation of DNA libraries for sequencing according to the recommendations of the Illumina Sample Preparation Guide and sequencing on the MiSeq platform (Illumina, USA)

\*Corresponding author.

E-mail address: [svet\\_zait@mail.ru](mailto:svet_zait@mail.ru) (S.V. Zaitseva)

**Received:** May 27, 2024; **Accepted:** June 10, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



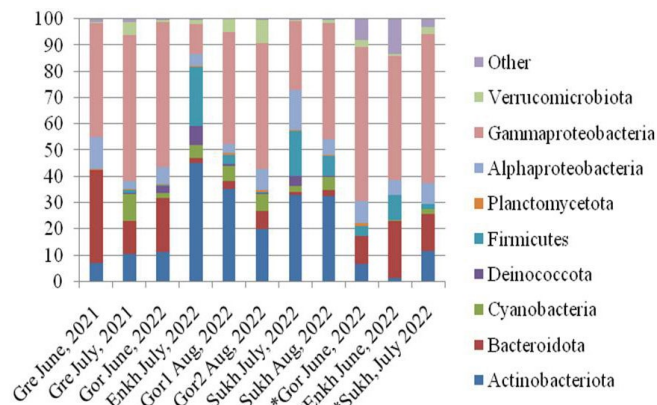
were carried out on the equipment of the Center for Collective Use “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” of the All-Russian Research Institute of Agricultural Meteorology. The QIIME (version 1.9.1) pipeline and SILVA programs were used to analyze the sequencing data (Quast et al., 2013). Principal coordinate analysis (PCoA) was carried out in MatLab11 with samples clustered according to the first two principal coordinates.

### 3. Results and discussion

Over the past five years, water level in Lake Baikal was characterized by significant differences (Bychkov and Nikitin, 2022). In 2021, a high-water period began, the average annual inflow had a supply of 3–4%, and in the third ten days of September the lake level reached 457.23 m (Bychkov and Nikitin, 2022). At the same time, negative consequences were noted both on the eastern coast of Lake Baikal, and in the downstream of the Irkutsk hydroelectric station (Plyusnin and Peryazeva, 2022). In 2022, the regulation range according to Decree No. 234 (2001) (456–457 m) was observed.

The taxonomic diversity of microbial communities in water and sediment of coastal shallow areas varied significantly in summer months (Fig. 1). At the phylum level, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota* and *Deinococcota* dominated in water, accounting for 98.55 to 99.46% of the total microbial diversity. *Comamonadaceae* were the numerous in June, 2021. In addition to them, the microbial communities were dominated by gamma-proteobacteria of g. *Acinetobacter* (4-38%), *Pseudomonas* (up to 17.5%), *Polynucleobacter* (up to 1.9%). In July, 2021, a significant amount of unclassified *Enterobacteriaceae* was noted in water (up to 3.75%) indicating intense anthropogenic influence on the coastal ecosystem. *Sphingomonas* was present in almost all samples accounted for up to 9% of microbial diversity in June, 2021. *Brevundimonas* accounted for 10.9% of the microbial community at the Sukhaya site in July, 2022 and 4.7% at the Goryachinsk site at the end of August, 2022. *Actinobacteriota* was mainly represented by unclassified *Micrococcaceae* (2-22%) and the *hgcl* clade (0.5-5.5%) in 2022. Among *Bacteroidota*, the dominant genera were: *Flavobacterium*, *Pseudarcicella*, *Sediminibacterium* and *Algoriphagus*, but their relative abundance varied significantly. In summer 2022, the relative abundance of *Cyanobacteria* varied from 1.8 in June to 6.9% in August, reaching maximum diversity and abundance in water sample Goryachinsk. Toxic cyanobacteria *Aphanizomenon* NIES81 and *Dolichospermum* NIES41, which are capable of forming abundant cyanobacterial blooms, were noted. *Dolichospermum* NIES41 bloom in littoral areas in the southern part of Lake Baikal in July-August 2019 was previously reported (Belykh et al., 2020).

Shannon index ranged from 3.63 to 3.86 in summer 2021 and from 3.12 to 4.1 in summer 2022 water samples. High microbial diversity was revealed in sediment samples. Shannon index varied 3.89-4.18. To



**Fig.1.** Relative microbial abundance (%) in water and sediment (\*) samples in summer months 2021 and 2022. Sampling sites: Gre – Gremyachinsk, Gor – Goryachinsk, Enkh – Enkhaluk, Sukh – Sukhaya.

assess the beta diversity of microbial communities at the genus level, principal coordinate analysis (PCoA) was performed, clustering samples along the first two principal coordinates. The analysis included data from 43 bacterial genera that represented >1% of total microbial diversity in at least one sample (Fig. 2).

Based on the results of the analysis, it can be concluded that similar microbial communities were formed in coastal shallow areas in certain summer months: June 2021/June 2022; in July 2022 in the Enkhaluk and Sukhaya sampling sites; in August 2022 at the Goryachinsk and Sukhaya sites; samples ‘Gremyachinsk July 2021’ and ‘Goryachinsk2 August 2022’ formed a separate cluster on the principal coordinates graph (Fig. 2). A similar composition of microbial communities was detected in June coastal water samples in 2021 and 2022. High abundance of the potentially toxic cyanobacteria *Aphanizomenon* NIES81, and the dominance of *Stenotrophomonas*, some representatives of which are capable of degrading cyanobacterial microcystins was identified in the ‘Gor1’ and ‘Gor2’ samples 2022. In 2014-2017 during low-water period, increasing of phytoplankton biomass was detected in shallow coastal areas (Borisova et al., 2022). Cyanobacteria distribution and abundance in microbial communities of Lake Baikal coastal water can serve as an indicator of unfavorable changes when the level changes.

### 4. Conclusions

1. Features of the taxonomic composition of bacterial communities in shallow coastal areas of Lake Baikal during the high-water period were identified.
2. *Comamonadaceae*, occupying up to 27% of the total microbial diversity, was an important factor in water microbial communities during high water period.
3. In the summer, 2022, the relative abundance of cyanobacteria varied from 1.8 to 6.9%, reaching maximum diversity and abundance in ‘Gor 1’ water sample, where toxic cyanobacteria *Aphanizomenon* NIES81 and *Dolichospermum* NIES41 were identified.

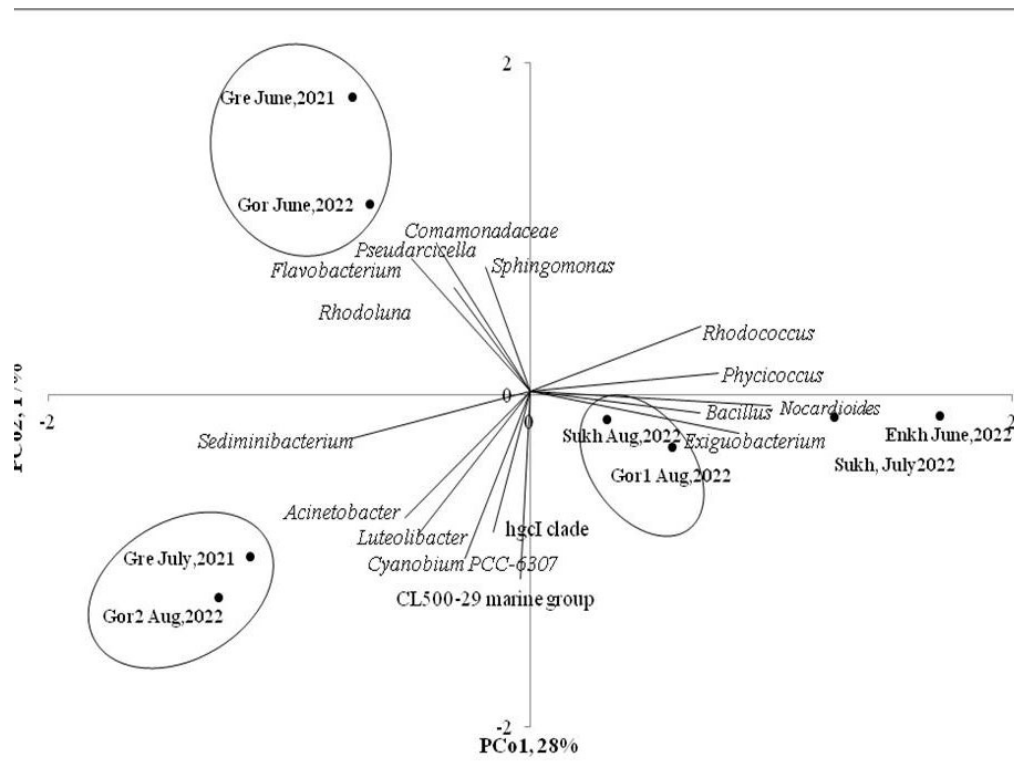


Fig.2. Principal coordinate analysis (PCoA) with samples clustered along the first two principal coordinates.

4. Significant similarity in the taxonomic composition of microbial communities in the shallow coastal areas of Lake Baikal was revealed during summer months of 2021-2022.

## Acknowledgements

The work was carried out within the framework of state assignments of the Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences №121030100229-1.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Belykh O.I., Tikhonova I.V., Kuzmin A.V. et al. 2020. Toxin-producing cyanobacteria in Lake Baikal and water bodies of the Baikal region (review). *Theoretical problems of ecology* 1: 21-27. DOI: [10.25750/1995-4301-2020-1-021-027](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-1-021-027) (in Russian)
- Borisova N.G., Anenkhonov O.A., Zaitseva S.V. et al. 2022. Conceptual schemes of the influence of changes in the level of Lake Baikal on the biota of coastal ecosystems. *Geography and natural resources* 5: 133-142. DOI: [10.15372/GIPR20220514](https://doi.org/10.15372/GIPR20220514) (in Russian)

- Bychkov I.V., Nikitin V.M. 2022. Modern problems of regulating the level of Lake Baikal. *Geography and natural resources* 5: 13-24. DOI: [10.15372/GIPR20220502](https://doi.org/10.15372/GIPR20220502) (in Russian)

Decree of the Government of the Russian Federation of March 26, 2001 No. 234. 2001. "On the maximum values of the water level in Lake Baikal when carrying out economic and other activities". *Collection of legislation of the Russian Federation*. 2001 14: 1366. (in Russian)

- Evtimova V.V., Donohue I. 2014. Quantifying ecological responses to amplified water level fluctuations in standing waters: an experimental approach. *Journal of Applied Ecology* 51: 1282-1291. DOI: [10.1111/-2664.12297](https://doi.org/10.1111/-2664.12297)

- Plyusnin A.M., Peryazeva E.M. 2022. The impact of rising Baikal levels on engineering structures of coastal settlements. *Geography and natural resources* 5: 74-82. DOI: [10.15372/GIPR20220508](https://doi.org/10.15372/GIPR20220508) (in Russian)

- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: D590-D596.

- Ren Z., Qu X., Zhang M. et al. 2019. Distinct bacterial communities in wet and dry seasons during a seasonal water level fluctuation in the largest freshwater lake (Poyang Lake) in China. *Frontiers Microbiology* 10: 1167. DOI: [10.3389/fmicb.2019.01167](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01167)

- Zaitseva S.V., Dagurova O.P., Tsyrenova D.D. 2023. Diversity of microbial communities in shallow water and coastal ecosystems of Lake Baikal in the summer period of 2021-2022. *Nature of Inner Asia* 4 (26):12-22. DOI: [10.18101/2542-0623-2023-4-12-22](https://doi.org/10.18101/2542-0623-2023-4-12-22)

# Микробные сообщества воды и донных отложений в мелководных прибрежных экосистемах озера Байкал летом 2021-2022 гг

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Зайцева С.В.\*, Дагурова О.П.

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Структура микробных сообществ мелководных прибрежных участков тесно взаимосвязана с экологическими условиями и быстро меняется в ответ на изменения уровня воды. Исследована таксономическая структура микробных сообществ воды и осадков прибрежных мелководных участков оз. Байкал в период повышенной водности. В воде доминировали *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota* и *Deinococcota*, составляя от 98,55 до 99,46% общего микробного разнообразия. Выявлено значительное сходство таксономического состава микробных сообществ воды прибрежных мелководных участков оз. Байкал в определенные летние месяцы 2021-2022 гг. Сходные микробные сообщества формировались в июне 2021/22 г.; в июле 2022 г. на участках Энхалук и Сухая; в августе 2022 г. на участках Горячинск и Сухая. В микробных сообществах осадков доминировали *Gamma proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteriota* и *Verrucomicrobiota*.

**Ключевые слова:** микробная экология, озеро Байкал, колебания уровня воды

**Для цитирования:** Зайцева С.В., Дагурова О.П. Микробные сообщества воды и донных отложений в мелководных прибрежных экосистемах озера Байкал летом 2021-2022 гг // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1137-1142. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1137

## 1. Введение

Влияние колебаний уровня воды на микробное сообщество является одним из малоизученных аспектов экологии пресных вод. Изменения окружающей среды, связанные с гидрологическими колебаниями, могут оказывать сильное влияние на состав и функционирование микробных сообществ воды и донных отложений и, следовательно, изменять биогеохимические циклы и потоки энергии в экосистеме (Ren et al., 2019). Прибрежные зоны особенно страдают от повышенных колебаний уровня воды, и экологические последствия изменений уровня, вероятно, будут наибольшими именно в мелководных прибрежных зонах (Evtimova and Donohue, 2014). В озере Байкал выявлены возможные негативные изменения в структуре микробного сообщества, связанные с колебаниями уровня воды (Борисова и др., 2022; Зайцева и др., 2023). Целью работы было определение таксономического разнообразия микробных сообществ мелководных участков оз. Байкал в многоводный период.

## 2. Материал и методы

Исследования проводились в июне, июле и августе 2021-2022 гг. Пробы были отобраны на четырех участках восточного побережья со специфическими гидролого-климатическими особенностями. Участок первой пробы Гремячинск представляет собой часть побережья, расположенную за пределами заливов средней котловины оз. Байкал, с условиями, характерными для протяженной части восточного побережья оз. Второй участок Горячинск можно считать типичной бухтой на восточном побережье. Участки Энхалук и Сухая типичны для дельтовых прибрежных террас. Пробы воды в трех экземплярах (1000 мл) были отобраны из каждого места отбора проб на расстоянии 1 м от воды и затем профильтрованы через мембранные фильтры (диаметр пор 0,22 мкм) до тех пор, пока они не засорятся. Выделение ДНК, создание библиотек ДНК и секвенирование на платформе MiSeq (Illumina, США) проводились на оборудовании ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» федерального государственного бюджетного учрежде-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [svet\\_zait@mail.ru](mailto:svet_zait@mail.ru) (С.В. Зайцева)

Поступила: 27 мая 2024; Принята: 10 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





ния «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной метеорологии». Для анализа данных секвенирования использовались конвейер QIIME (версия 1.9.1) и программы SILVA (Quast et al., 2013). Анализ главных координат (PCoA) проводился в MatLab11 с образцами, кластеризованными по первым двум главным координатам.

### 3. Результаты и обсуждение

За последние пять лет уровень воды в озере Байкал характеризовался значительными перепадами (Бычков и Никитин, 2022). В 2021 г. начался многоводный период, среднегодовой приток имел запас 3–4%, а в третьей декаде сентября уровень озера достиг 457,23 м (Бычков и Никитин, 2022). При этом негативные последствия отмечены как на восточном побережье озера Байкал, так и в нижнем течении Иркутской ГЭС (Плюснин и Перязева, 2022). В 2022 году диапазон регулирования согласно Постановлению № 234 (2001 г.) соблюдался (456–457 м).

Таксономическое разнообразие микробных сообществ в воде и донных отложениях прибрежных мелководий существенно различалось в летние месяцы (Рис. 1). На уровне филумов в воде доминировали *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota* и *Deinococcota*, составляя от 98,55 до 99,46% общего микробного разнообразия. Наиболее многочисленными в июне 2021 г. были *Comamonadaceae*. Помимо них в микробных сообществах доминировали гамма-протеобактерии родов *Acinetobacter* (4-38%), *Pseudomonas* (до 17,5%), *Polynucleobacter* (до 1,9%). В июле 2021 г. в воде отмечено значительное количество неклассифицированных *Enterobacteriaceae* (до 3,75%), что свидетельствует об интенсивном антропогенном воздействии на прибрежную экосистему. *Sphingomonas* присутствовали практически во всех пробах и в июне 2021 г. составляли до 9% микробного разнообразия. *Brevundimonas* составлял 10,9% микробного сообщества на участке Сухая в июле 2022 г. и 4,7% на участке Горячинск в конце августа в 2022. В 2022 году *Actinobacteriota* в основном была представлена неклассифицированными *Micrococcaceae* (2-22%) и кладой *hgcI* (0,5-5,5%). Среди *Bacteroidota* доминантными родами были: *Flavobacterium*, *Pseudarcicella*, *Sediminibacterium* и *Algoriphagus*, но их относительная численность значительно варьировала. Летом 2022 года относительная численность цианобактерий колебалась от 1,8 в июне до 6,9% в августе, достигая максимального разнообразия и численности в пробе воды Горячинска. Отмечены токсичные цианобактерии *Aphanizomenon* NIES81 и *Dolichospermum* NIES41, способные образовывать обильное цианобактериальное цветение. Ранее сообщалось о цветении *Dolichospermum* NIES41 на литорали южной части оз. Байкал в июле-августе 2019 г. (Белых и др., 2020).

Индекс Шеннона колебался от 3,63 до 3,86 летом 2021 г. и от 3,12 до 4,1 в пробах воды летом 2022 г. В пробах донных отложений выяв-

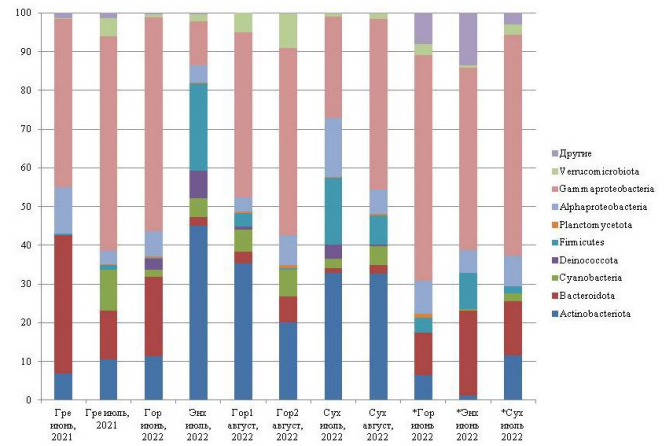


Рис.1. Таксономическое разнообразие (%) микробных сообществ воды и донных отложений (\*) прибрежных участков. Места отбора проб: Гре – Гремячинск, Гор – Горячинск, Энх – Энхалук, Сух – Сухая.

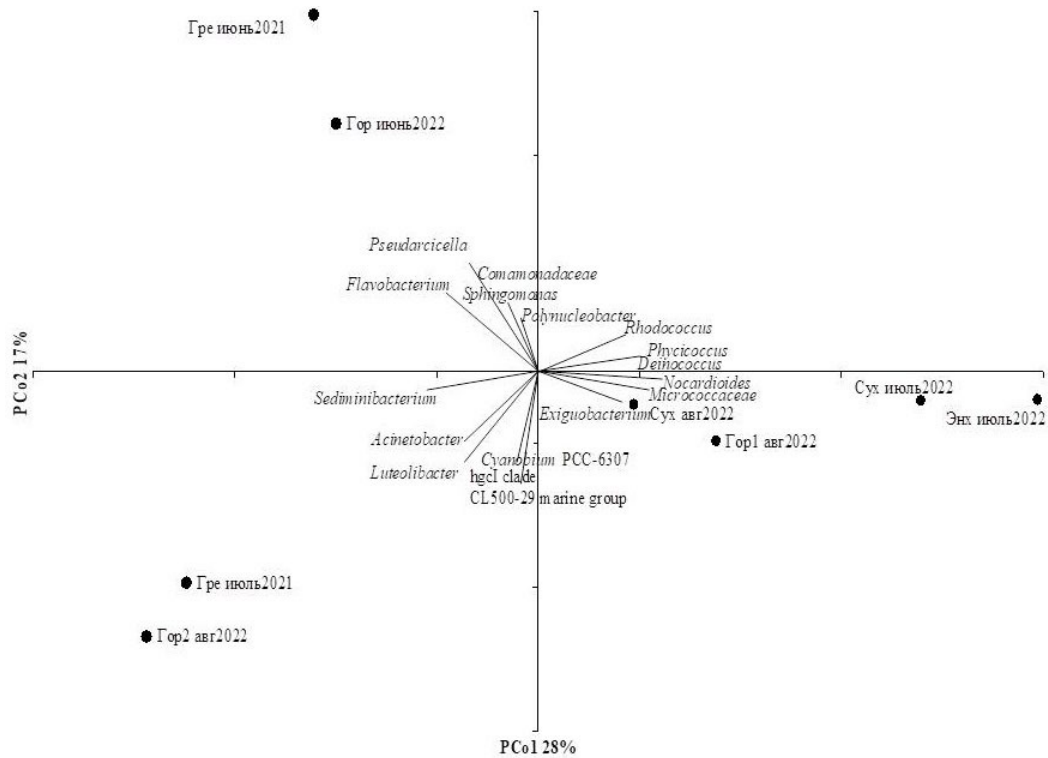
лено высокое микробное разнообразие. Индекс Шеннона варьировал в пределах 3,89-4,18. Для оценки бета-разнообразия микробных сообществ на уровне рода был проведен анализ главных координат (PCoA), группирующий образцы по первым двум главным координатам. В анализ были включены данные 43 родов бактерий, которые составляли >1% от общего микробного разнообразия хотя бы в одном образце (Рис. 2).

По результатам анализа можно сделать вывод, что таксономически сходные микробные сообщества формировались на прибрежных мелководьях в отдельные летние месяцы: июнь 2021 г./июль 2022 г.; в июле 2022 г. на участках Энхалук и Сухая; в августе 2022 г. на участках Горячинск и Сухая; пробы «Гремячинск июль 2021» и «Горячинск2 август 2022» образовали отдельный кластер на графике главных координат (Рис. 1). Аналогичный состав микробных сообществ был обнаружен в июньских пробах прибрежных вод в 2021 и 2022 годах. В 2022 г. в пробах «Гор1» и «Гор2» выявлена высокая численность потенциально токсичных цианобактерий *Aphanizomenon* NIES81 и доминирование *Stenotropomonas*, некоторые представители которых способны разлагать микроцистины цианобактерий. В маловодный период 2014-2017 гг. отмечено увеличение биомассы фитопланктона на мелководных прибрежных участках (Борисова и др., 2022). Распределение и численность цианобактерий в микробных сообществах прибрежных вод оз. Байкал могут служить индикатором неблагоприятных изменений при изменении уровня.

### 4. Заключение

1. Выявлены особенности таксономического состава бактериальных сообществ мелководных прибрежных участков оз. Байкал в многоводный период.

2. Важным фактором структурных изменений водных микробных сообществ в многоводный период были *Comamonadaceae*, занимавшие до 27% общего микробного разнообразия.



**Рис.2.** Анализ главных координат (PCoA) с кластеризацией образцов относительно первых двух главных координат. Места отбора проб: Гре – Гремьячинск, Гор – Горячинск, Энх – Энхалук, Сух – Сухая.

3. Летом 2022 года относительная численность цианобактерий колебалась от 1,8 до 6,9%, достигая максимального разнообразия и численности в пробе воды «Гор 1», где были идентифицированы токсичные цианобактерии *Aphanizomenon* NIES81 и *Dolichospermum* NIES41.

4. Значительное сходство таксономического состава микробных сообществ мелководных прибрежных участков оз. Байкал выявлено в летние месяцы 2021-2022 гг.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (FWSM-2021-0006, FWSM-2021-0003).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Белых О.И., Тихонова И.В., Кузьмин А.В. и др. 2020. Токсин-продуцирующие цианобактерии в озере Байкал и водоемах Байкальского региона (обзор). Теоретические проблемы экологии 1: 21–27. DOI: [10.25750/1995-4301-2020-1-021-027](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-1-021-027)

Борисова Н.Г., Аненхонов О.А., Зайцева С.В. и др. 2022. Концептуальные схемы влияния изменений уровня

озера Байкал на биоту прибрежных экосистем. География и природные ресурсы 5: 133–142. DOI: [10.15372/GIPR20220514](https://doi.org/10.15372/GIPR20220514)

Бычков И.В., Никитин В.М. 2022. Современные проблемы регулирования уровня озера Байкал. География и природные ресурсы 5:13–24. DOI: [10.15372/GIPR20220502](https://doi.org/10.15372/GIPR20220502)

Зайцева С.В., Дагурова О.П., Цыренова Д.Д. 2023. Разнообразие микробных сообществ мелководных и прибрежных экосистем озера Байкал в летний период 2021–2022 гг. Природа Внутренней Азии 4 (26): 12–22. DOI: [10.18101/2542-0623-2023-4-12-22](https://doi.org/10.18101/2542-0623-2023-4-12-22)

О предельных значениях уровня воды в озере Байкал при осуществлении хозяйственной и иной деятельности: постановление правительства Российской Федерации от 26 марта 2001 г. № 234. 2001. Собрание законодательства РФ. 2001 14:1366

Плюснин А.М., Перязева Е.М. 2022. Воздействие подъема уровня Байкала на инженерные сооружения прибрежных поселений. География и природные ресурсы 5: 74–82. DOI: [10.15372/GIPR20220508](https://doi.org/10.15372/GIPR20220508)

Evtimova V.V., Donohue I. 2014. Quantifying ecological responses to amplified water level fluctuations in standing waters: an experimental approach. Journal of Applied Ecology 51: 1282–1291. DOI: [10.1111/-2664.12297](https://doi.org/10.1111/-2664.12297)

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 41: D590–D596.

Ren Z., Qu X., Zhang M. et al. 2019. Distinct bacterial communities in wet and dry seasons during a seasonal water level fluctuation in the largest freshwater lake (Poyang Lake) in China. Frontiers Microbiology 10: 1167. DOI: [10.3389/fmicb.2019.01167](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01167)

# Diversity of microbial communities in long-term ice-covered water bodies of the Cold Pole region, Yakutia



Zakharova Yu.R.<sup>1\*</sup>, Galachyants Yu.P.<sup>1</sup>, Petrova D.P.<sup>1</sup>, Mikhailov I.S.<sup>1</sup>, Bedoshvili Ye.D.<sup>1</sup>, Tomberg I.V.<sup>1</sup>, Kopyrina L.I.<sup>2</sup>, Likhoshway Ye.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Institute for Biological Problems of Cryolithozone Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677980, Russia

**ABSTRACT.** Water bodies located in the north-east of Yakutia during the period of ice cover were studied. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene libraries revealed a high taxonomic diversity of microbial communities in the studied ecotopes. The majority of the under-ice communities was represented by *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Bacteroidota*, and *Planctomycetota*. The difference in community diversity between deep-water lakes Labyntyk, Vodorazdelnoye, and Ulu, the source of the Labyntyk River, and shallow-water lakes Myamichi and Mertvoye, the mouth of the Labyntyk River, is shown.

**Keywords:** under-ice microbial communities, high-throughput sequencing, freshwater bodies, Cold Pole

**For citation:** Zakharova Yu.R., Galachyants Yu.P., Petrova D.P., Mikhailov I.S., Bedoshvili Ye.D., Tomberg I.V., Kopyrina L.I., Likhoshway Ye.V. Diversity of microbial communities in long-term ice-covered water bodies of the Cold Pole region, Yakutia // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1143-1148. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1143

## 1. Introduction

The studies of seasonally ice-covered lakes reliably show that winter trophic webs and physical processes are active and complex (Salonen et al., 2009; Hampton et al., 2017). Low temperatures, limited nutrient inputs, and reduced light during the ice cover period affect the metabolic characteristics of freshwater microorganisms, as well as microbial diversity and, consequently, their role in trophic webs and global biogeochemical cycles throughout the year (Bertilsson et al., 2013; Wilhelm et al., 2014). In the subarctic zone to the northeast of Yakutia, in the area of extremely low temperatures at the Cold Pole, there are several oligotrophic lakes that are covered with ice for more than seven months of the year. Previously, we studied the ecology and structure of microbial communities under ice in Lakes Labyntyk and Vorota (Bashenkhaeva et al., 2020; Zakharova et al., 2022).

The study aimed to identify the main taxa of microbial communities and compare their diversity, as well as reveal the influence of environmental factors during the ice cover period in different water bodies of the Cold Pole region.

## 2. Materials and methods

Water samples were collected in April 2021-2022 from water bodies in the area of 62-63°N in the Oymyakonsky ulus in the north-eastern region of Yakutia. We investigated five lakes in the Indigirka River basin that are deep-water lakes: Labyntyk (maximum depth 60 m), Vodorazdelnoye (66 m), and the shallow lakes: Myamichi (3 m), Mertvoye (6 m), and Ulu (13 m), as well as the source and mouth of the Labyntyk River. Sampling, measurement of physico-chemical parameters (temperature, conductivity, pH, concentrations of oxygen, phosphate, nitrite, nitrate, ammonium, organic carbon), sample preparation, and DNA isolation were carried out by methods published previously (Zakharova et al., 2022; Firsova et al., 2024). Amplicon library preparation and sequencing were carried out at the CUC "Genomic technologies, Proteomics and Cell biology" of FSBSI ARRIAM, Saint-Petersburg. The variable region V3-V4 of the 16S rRNA gene was amplified with primer pairs U341F (5'-CCTACGGGGRSGCAGCAG-3') and U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3'). Sequencing data were analyzed in Usearch v.10. (Edgar, 2010) and

\*Corresponding author.

E-mail address: [julia.zakharova@gmail.com](mailto:julia.zakharova@gmail.com) (Yu.R. Zakharova)

**Received:** June 17, 2024; **Accepted:** July 10, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





Vsearch v.2.9.1 (Rognes et al., 2016). OTU sequences were taxonomically classified using Silva v.138 in Mothur v.1.43.0 (Schloss et al., 2009). Further statistical analyses were performed in R.

### 3. Results and discussion

The environmental parameters in the studied water bodies were relatively similar (Firsova et al. 2024). All lakes were 100% covered with snow, ranging in thickness from 31 to 51 cm and in ice thickness from 85 to 120 cm. The lowest values of water temperature were recorded in the Labyntyk River (0.5 °C) and in Lakes Labyntyk and Vodorazdelnoye (1.3 °C), and the highest values were recorded in Lake Myamichi (4.6 °C). The pH varied within slightly alkaline values (7.2–6.76), and conductivity values ranged from 47–68 µS/cm, except for samples from Lake Mertvoye (164 µS/cm). The nutrient content was consistently low in all samples. Phosphate concentrations ranged from 0.004–0.024 mg/l, with a maximum in Vodorazdelnoye Lake (0.168 mg/l). Also, the highest concentrations of ammonium ions were in Lake Myamichi (0.263 mg/l) and the Labyntyk River (0.123 mg/l), the maximum of nitrates was in Lake Mertvoye (1.242 mg/l), and nitrites did not exceed 0.025 mg/l. The value of organic carbon in the River and Lake Labyntyk was 1.80–2.81 mg/l, with high values recorded in Lakes Ulu up to 8.55 mg/l, Myamichi up to 10.35 mg/l, Mertvoye up to 30.78 mg/l, and Vodorazdelnoye up to 187.5 mg/l (Firsova et al. 2024).

Sequencing of 13 water samples yielded 225020 16S rRNA gene fragment sequences, clustered from 163 to 318 OTUs. In general, the number of OTUs, index values of taxonomic abundance (ACE), and diversity (Shannon) of bacterial communities in Lakes Mertvoye, Myamichi, Vodorazdelnoye, and the Labyntyk River (mouth) were lower than in the other samples. Higher values are found in samples from Lake Labyntyk. All OTUs were classified into 20 phyla, dominated by *Proteobacteria* (34%) and *Actinobacteriota* (29%), with *Cyanobacteria* (10%), *Verrucomicrobiota* (9%), *Bacteroidota* (8%), and *Planctomycetota* (4%) as subdominants. Our data (Bashenkhaeva et al., 2020, Zakharova et al., 2022) and other research (Tran et al., 2018) also indicated the abundance of these taxa in ice-covered ecosystems. The dominant phyla were represented in relatively equal shares in all the studied water bodies, except for the community from the mouth of the Labyntyk River, in which *Planctomycetota* and *Cyanobacteria* were not found. Representatives of the minor phyla *Firmicutes* (2%), *Chloroflexi* (1%), *Deinococcota* (0.8%) were most abundant in lakes Vodorazdelnoye, Ulu, Mertvoye and the Labyntyk River (source), *Acidobacteriota* (0.8%) in Lake Myamichi. Diversity analysis revealed a different abundance of some OTUs in the communities of the studied water bodies. For example, in Lake Myamichi, OTUs *Ilumatobacteraceae*, *Sporichthyaceae*, SAR11\_clade, *Methylobacter* prevailed; in Lake Vodorazdelnoye, *Methylacidiphilaceae*, *Cyanobium\_PCC-6307*, *Paenisporosarcina*; in Lake Ulu, *Terrimicrobium*, SAR11\_clade, *Gemmataceae*; in Lake Mertvoye,

*Polynucleobacter*, *Ilumatobacteraceae*; in Lake and the River (source) Labyntyk, *Acinetobacter*, *Cyanobium\_PCC-6307*, in the mouth of the River Labyntyk, *Methylobacter*, *Methylobacterium-Methylorubrum*. The comparison of beta diversity showed a division of the communities into two groups: the first group included the deep lakes Labyntyk, Vodorazdelnoye, Ulu and the source of the Labyntyk River. The communities of the shallow lakes Myamichi, Mertvoye, and the mouth of the Labyntyk River were similar in the second group. The correlation of bacterial community structure with snow thickness and ammonium ion concentration was shown.

### 4. Conclusions

In lakes covered by ice for long periods of time, microbial communities actively develop and change their species composition in response to environmental conditions. Expanding our knowledge of ice-covered water bodies in Yakutia, we characterized the diversity of microbial communities, which is important for understanding their ecological function, given that the study area is free of anthropogenic influence. Despite the severe environmental conditions, we found high diversity and differences in the abundance of community structure in the studied water bodies.

### Acknowledgements

The study was financially supported by projects No. 121032300186-9 (Limnological Institute SB RAS) and No. 121012190038-0 (Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS). The authors are grateful to A.A. Dolzhenkov, A.S. Gubin, A.V. Ilyichev, M.V. Makhlin, S.V. Zverev, R.Ya. Asanov, and S.F. Sivtsev for assistance in sampling.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Bashenkhaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal Great Lakes Reserch* 46: 508–518. DOI: [10.1016/j.jglr.2020.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.03.015)
- Bertilsson S., Burgin A., Carey C.C. et al. 2013. The under-ice microbiome of seasonally frozen lakes. *Limnology Oceanography* 58: 1998–2012. DOI: [10.4319/lo.2013.58.6.1998](https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.6.1998)
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Hampton S.E., Galloway A.W.E., Powers S.M. et al. 2017. Ecology under lake ice. *Ecology Letters* 20: 98–101. DOI: [10.1111/ele.12699](https://doi.org/10.1111/ele.12699)
- Firsova A., Bessudova A., Galachyants Yu. et al. 2024. Under-ice phytoplankton features of subarctic oligotrophic lakes of northeastern Yakutia. *Polar Biology* (in Press)
- Salonen K., Leppä M., Viljanen R.M. et al. 2009. Perspectives in winter limnology: closing the annual cycle of



freezing lakes. *Aquatic Ecology* 43: 609–616. DOI: [10.1007/s10452-009-9278-z](https://doi.org/10.1007/s10452-009-9278-z)

Rognes T., Flouri T., Nichols B. et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J* 4:e2584. DOI: [10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)[doi:10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)

Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75 (23): 7537–7541. DOI: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)

Tran P., Ramachandran A., Khawasik O. et al. 2018. Microbial life under ice: metagenome diversity and in situ activity of *Verrucomicrobia* in seasonally ice-covered lakes. *Environmental Microbiology* 20: 2568–2584. DOI: [10.1111/1462-2920.14283](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14283)

Wilhelm S.W., LeCleir G.R., Bullerjahn G.S. et al. 2014. Seasonal changes in microbial community structure and activity imply winter production is linked to summer hypoxia in a large lake. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 475–485. DOI: [10.1111/1574-6941.12238](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12238)

Zakharova Y., Bashenkhaeva M., Galachyants Y. et al. 2022. Variability of microbial communities in two long-term ice-covered freshwater lakes in the subarctic region of Yakutia, Russia. *Microbial Ecology* 84: 958–973. DOI: [10.1007/s00248-021-01912-7](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01912-7)

# Разнообразие микробных сообществ в длительно покрытых льдом водоемах региона Полюса холода, Якутия

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Захарова Ю.Р.<sup>1\*</sup>, Галачьянц Ю.П.<sup>1</sup>, Петрова Д.П.<sup>1</sup>, Михайлов И.С.<sup>1</sup>,  
Бедошвили Е.Д.<sup>1</sup>, Томберг И.В.<sup>1</sup>, Копырина Л.И.<sup>2</sup>, Лихошвай Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

<sup>2</sup>Институт биологических проблем криолитозоны, Сибирское отделение Российской академии наук, Якутск, 677980, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Исследованы водоемы на северо-востоке Якутии в период ледостава. Высокопроизводительное секвенирование библиотек генов 16S рРНК выявило высокое таксономическое разнообразие микробных сообществ в изученных экотопах. Основную часть подледного сообщества составляли *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Bacteroidota* и *Planctomycetota*. Показано различие в разнообразии сообществ между глубоководными озерами Лабынкыр, Водораздельное, Улу, истоком реки Лабынкыр и мелководными озерами Мямичи, Мертвое, устьем реки Лабынкыр.

**Ключевые слова:** подледные микробные сообщества, высокопроизводительное секвенирование, пресноводные водоемы, Полюс холода

Для цитирования: Захарова Ю.Р., Галачьянц Ю.П., Петрова Д.П., Михайлов И.С., Бедошвили Е.Д., Томберг И.В., Копырина Л.И., Лихошвай Е.В. Разнообразие микробных сообществ в длительно покрытых льдом водоемах региона Полюса холода, Якутия // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1143-1148. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1143

## 1. Введение

Исследования озер, сезонно покрытых льдом, достоверно показывают, что зимние пищевые сети и физические процессы являются активными и сложными (Salonen et al., 2009; Hampton et al., 2017). Низкие температуры, ограниченное поступление питательных веществ, пониженный уровень освещенности во время ледяного покрова влияют на особенности метаболизма пресноводных микроорганизмов, а также на микробное разнообразие и как следствие на их роль в пищевой сети и глобальных биогеохимических циклах в течение года (Bertilsson et al., 2013; Wilhelm et al., 2014). В субарктической зоне на северо-востоке Якутии, в районе экстремально низких температур Полюса холода расположено несколько олиготрофных озер, которые более семи месяцев в году покрыты льдом. Экология и структура микробных сообществ подо льдом в озерах Лабынкыр и Ворота были исследованы нами ранее (Bashenkhaeva et al., 2020; Zakharova et al., 2022).

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [julia.zakharova@gmail.com](mailto:julia.zakharova@gmail.com) (Ю.Р. Захарова)

Поступила: 17 июня 2024; Принята: 10 июля 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

Целью работы было идентифицировать основные таксоны микробных сообществ и сравнить их разнообразие, а также выявить влияние факторов окружающей среды во время ледостава в различных водоемах региона Полюса холода.

## 2. Материалы и методы

Пробы воды были отобраны из водоёмов, расположенных в районе 62–63° с.ш. в Оймяконском улусе Северо-Восточного региона Якутии, в апреле 2021–2022 гг. Исследовано пять озер бассейна реки Индигирки: глубоководные Лабынкыр (максимальная глубина 60 м), Водораздельное (66 м) и мелководные Мямичи (3 м), Мертвое (6 м) и Улу (13 м), а также исток и устье реки Лабынкыр. Отбор проб, измерения физико-химических показателей (температура, электропроводность, pH, концентрации кислорода, фосфатов, нитритов, нитратов, аммония, органического углерода), пробоподготовку и выделение ДНК проводили методами, опубликованными ранее (Zakharova et al., 2022; Firsova et

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



al., 2024). Подготовка библиотеки ампликонов и секвенирование были проведены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. Амплифицирована вариабельная область V3-V4 гена 16S рРНК с парой праймеров U341F (5'-ССТАСGGGRSGCAGCAG-3') и U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3'). Анализ данных секвенирования проводили в Usearch v.10. (Edgar, 2010), Vsearch v.2.9.1 (Rognes et al., 2016). Последовательности OTU были таксономически классифицированы с использованием Silva v.138 в Mothur v.1.43.0 (Schloss et al., 2009). Дальнейший статистический анализ проводили в R.

### 3. Результаты и обсуждение

Параметры окружающей среды в исследуемых водоемах были относительно сходными (Firsova et al., 2024). Все озера были на 100% покрыты снегом толщина которого варьировала от 31 до 51 см, а толщина льда была от 85 до 120 см. Наименьшие значения температуры воды зафиксированы в реке Лабынкыр (0.5 °C) и в озерах Лабынкыр и Водораздельное (1.3 °C), а наибольшие значения в озере Мямичи (4.6 °C). pH варьировал в пределах слабощелочных значений (7.26-7.76), значения электропроводности были в диапазоне 47-68  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , за исключением образцов из озера Мертвое (164  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Содержание биогенных элементов во всех пробах было стабильно низкое. Концентрации фосфатов были в пределах 0,004 – 0,024 мг/л, с максимумом в озере Водораздельное (0.168 мг/л). Так же наибольшие концентрации ионов аммония были в озере Мямичи (0.263 мг/л) и реке Лабынкыр (0.123 мг/л), максимум нитратов был в озере Мертвое (1.242 мг/л), нитриты не превышали 0.025 мг/л. Количество органического углерода в реке и озере Лабынкыр составляло 1.80-2.81 мг/л, при этом высокие значения определены в озерах Улу до 8.55 мг/л, Мямичи до 10.35 мг/л, Мертвое до 30.78 мг/л и Водораздельное до 187.5 мг/л (Firsova et al., 2024).

В результате секвенирования из 13 образцов воды было получено 225020 последовательностей фрагмента гена 16S рРНК сгруппированных от 163 до 318 OTUs. В целом, количество OTUs, значения индексов таксономического богатства (ACE) и разнообразия (Shannon) бактериальных сообществ в озерах Мертвое, Мямичи. Водораздельное и реке Лабынкыр (устье) были ниже чем в остальных образцах. Более высокие значения показаны в образцах озера Лабынкыр. Все OTUs были отнесены к 20 филумам, среди которых доминировали представители *Proteobacteria* (34%) и *Actinobacteriota* (29%), при этом субдоминантами являлись *Cyanobacteria* (10%), *Verrucomicrobiota* (9%), *Bacteroidota* (8%) и *Planctomycetota* (4%). Наши данные (Bashenkhaeva et al., 2020, Zakharova et al., 2022) и другие исследования (Tran et al., 2018) также указывали на обилие этих таксонов в экосистемах, покрытых льдом. Доминирующие филумы были представ-

лены относительно в равных долях во всех исследуемых водоемах, за исключением сообщества из устья реки Лабынкыр, в котором не обнаружены *Planctomycetota* и *Cyanobacteria*. При этом представители минорных филумов *Firmicutes* (2%), *Chloroflexi* (1%), *Deinococcota* (0.8%) были наиболее обильны в озерах Водораздельное, Улу, Мертвое и реке Лабынкыр (исток), *Acidobacteriota* (0.8%) в озере Мямичи. Анализ разнообразия выявил разное обилие некоторых OTUs в сообществах исследуемых водоемов. Например, в озере Мямичи преобладали OTUs *Ilumatobacteraceae*, *Sporichthyaceae*, SAR11\_clade, *Methylobacter*; в озере Водораздельное – *Methylacidiphilaceae*, *Cyanobium\_PCC-6307*, *Paenisporosarcina*; в озере Улу – *Terrimicrobium*, SAR11\_clade, *Gemmataceae*; в озере Мертвое – *Polynucleobacter*, *Ilumatobacteraceae*; в озере и реке (исток) Лабынкыр – *Acinetobacter*, *Cyanobium\_PCC-6307*, в устье реки Лабынкыр – *Methylobacter*, *Methylobacterium-Methylorubrum*. Сравнение бета разнообразия показало разделение сообществ на две группы: в первую группу вошли глубокие озера Лабынкыр, Водораздельное, Улу, а также исток реки Лабынкыр. Во второй группе были сходны сообщества мелководных озер Мямичи, Мертвое и устья реки Лабынкыр. Показана корреляция строения бактериальных сообществ с толщиной снега и концентрацией ионов аммония.

### 4. Выводы

В озерах, длительно покрытых льдом происходит активное развитие микробных сообществ и изменение их видового состава в зависимости от условий окружающей среды. Расширяя знания о покрытых льдом водоемах Якутии, мы охарактеризовали разнообразие микробных сообществ, важное для понимания их экологической функции, учитывая, что исследуемый район свободен от антропогенного влияния. Несмотря на суровые условия окружающей среды, мы обнаружили высокое разнообразие и различия богатства структуры сообществ в исследуемых водоемах.

### Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке проектов № 121032300186-9 (Лимнологический институт СО РАН) и № 121012190038-0 (Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН) Авторы выражают благодарность за помощь в отборе проб Долженкову А.А., Губину А.С., Ильичеву А.В., Махлину М.В., Звереву С.В., Асанову Р.Я., Сивцеву С.Ф.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Bashenkaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal Great Lakes Reserch* 46: 508-518. DOI: [10.1016/j.jglr.2020.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.03.015)
- Bertilsson S., Burgin A., Carey C.C. et al. 2013. The under-ice microbiome of seasonally frozen lakes. *Limnology Oceanography* 58: 1998–2012. DOI: [10.4319/lo.2013.58.6.1998](https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.6.1998)
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Hampton S.E., Galloway A.W.E., Powers S.M. et al. 2017. Ecology under lake ice. *Ecology Letters* 20: 98–101. DOI: [10.1111/ele.12699](https://doi.org/10.1111/ele.12699)
- Firsova A., Bessudova A., Galachyants Yu. et al. 2024. Under-ice phytoplankton features of subarctic oligotrophic lakes of northeastern Yakutia. *Polar Biology* (in Press)
- Salonen K., Leppa M., Viljanen R.M. et al. 2009. Perspectives in winter limnology: closing the annual cycle of freezing lakes. *Aquatic Ecology* 43: 609–616. DOI: [10.1007/s10452-009-9278-z](https://doi.org/10.1007/s10452-009-9278-z)
- Rognes T., Flouri T., Nichols B. et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J* 4:e2584. DOI: [10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)doi:[10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75 (23): 7537–7541. DOI: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)
- Tran P., Ramachandran A., Khawasik O. et al. 2018. Microbial life under ice: metagenome diversity and in situ activity of *Verrucomicrobia* in seasonally ice-covered lakes. *Environmental Microbiology* 20: 2568–2584. DOI: [10.1111/1462-2920.14283](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14283)
- Wilhelm S.W., LeCleir G.R., Bullerjahn G.S. et al. 2014. Seasonal changes in microbial community structure and activity imply winter production is linked to summer hypoxia in a large lake. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 475–485. DOI: [10.1111/1574-6941.12238](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12238)
- Zakharova Y., Bashenkaeva M., Galachyants Y. et al. 2022. Variability of microbial communities in two long-term ice-covered freshwater lakes in the subarctic region of Yakutia, Russia. *Microbial Ecology* 84: 958–973. DOI: [10.1007/s00248-021-01912-7](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01912-7)



# Production of the violet pigment violacein by psychrophilic strains of bacteria: extraction and identification



Zakharova Yu.R.\*, Martsinechko A.S., Marchenkov A.M., Petrova D.P., Fedorova G.A.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Psychrophilic pigment-forming strains, isolated from Lake Baikal and the Pokhabikha River, were studied. Based on culture-based, morphological, and biochemical properties, as well as the results of 16S rRNA gene sequence analysis, the studied bacteria were assigned to the genera *Janthinobacterium* and *Iodobacter*. The strains are able to form biofilms and produce violet pigment. When the pigments were extracted with methanol and identified by MALDI/TOF mass spectrometry, the pigments violacein and deoxyviolacein were identified.

**Keywords:** psychrophilic bacteria, purple pigment, violacein, MALDI/TOF

**For citation:** Zakharova Yu.R., Martsinechko A.S., Marchenkov A.M., Petrova D.P., Fedorova G.A. Production of the violet pigment violacein by psychrophilic strains of bacteria: extraction and identification // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1149-1154. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1149

## 1. Introduction

Microbial communities occupying cold habitats are constantly exposed to several stressors, such as extreme low temperatures, oligotrophic conditions, freeze-thaw cycles, and UV radiation. In order to survive these aggressive conditions, microorganisms adapt by means of several defense strategies, including the production of different pigments (Sajjad et al., 2020). The bacteria, which have a purple color that gives them the pigment violacein, belong to several genera that have been found in a variety of natural environments, including low temperatures (Baricz et al., 2018). Violacein is a violet or purple bisindole water-insoluble pigment synthesized by condensation of two modified tryptophan molecules and consists of oxindole, 2-pyrrolidone, and 5-hydroxyindole subunits (Füller et al., 2016). Violacein has a variety of biological activities, including strong antibacterial activity against a wide range of bacteria (Asencio et al., 2014; Arif et al., 2017), antifungal, antiviral, antiprotozoal, and anti-tumor activity (Durán et al., 2007; Soliev et al., 2011; Choi et al., 2015). In this work, we isolated three strains of psychrophilic, purple pigment-producing bacteria and described the methods for pigment extraction and identification by MALDI mass spectrometry.

## 2. Materials and methods

Surface water samples were collected in South Baikal in September 2022 near the Pokhabikha River and in March 2023 near the Bolshye Koty settlement. Seeds of water samples were incubated at 4°C for 10 days on PPA/10 nutrient medium. Purple-colored colonies were then selected and dispersed several times using the depleting stroke method until pure cultures were obtained. The culture-based and morphological characteristics of the strains obtained were studied microscopically as described previously (Bashenkhaeva and Zakharova, 2017). The optimum growth temperature for increasing the yield of bacterial biomass was investigated on 1% peptone broth at 0, 4, 8, 12, 16, 22, 26, 30, and 37°C. The growth of cultures was assessed in three replicates at each selected temperature for 10 days using a biological spectrophotometer Bio Spectrometr Basic, Eppendorf.

Taxonomic affiliation of the isolated strains was carried out by molecular-biological methods based on the analysis of sequences of 16S rRNA gene fragments. For DNA isolation, bacterial biomass was collected from agar slant in 1 ml of sterile TE buffer, followed by phenol-chloroform extraction method. Amplification of the 16S pPHK gene fragment was performed using

\*Corresponding author.

E-mail address: [julia.zakharova@gmail.com](mailto:julia.zakharova@gmail.com) (Yu.R. Zakharova)

**Received:** July 15, 2024; **Accepted:** August 02, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



the prepared PCR mixture 2XTaqM (AlkorBio, Russia) and primers 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1350R (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'). Amplification products were sequenced using the GenSeq kit (Syntol, Russia) on the genetic analyzer NanoFor 05 (Syntol, Russia) at the Ultramicroanalysis Center of LIN SB RAS (Irkutsk).

For pigment extraction, bacterial strains were dispersed on Petri dishes with SNA/10 medium and cultured at 26°C for 72 hours. Then, the bacterial biomass was collected, transferred to a test tube, 1 ml of methanol was added, shaken well for 10 min and centrifuged (13400 rpm, 5 min). The stained supernatant was separated, and methanol extraction was repeated until the cell mass was almost completely discolored (quantification of pigment production was not done). The supernatants were combined, concentrated to dryness in an argon current at room temperature, and redissolved in 50 µl of methanol. The methanol extract was used for pigment identification by MALDI mass spectrometric analysis. Due to the photosensitivity of violacein, all operations were performed without access to light (tubes were wrapped with aluminium foil) (Huang et al., 2023). One µl of methanol extract was applied to an AnchorChip target (Bruker Daltonik GmbH, Germany), mixed with 1 µl of 2.5-DHB matrix (2.5-dihydroxybenzoic acid, 10 mg/ml), and dried at the room temperature.

Mass-spectra of the extracts were recorded on an UltrafleXtreme MALDI-TOF MS mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Germany) in reflectron mode in the mass range of 300-1000 Da at positive ionisation. Violacein and deoxyviolacein were identified by the presence of intense molecular ions [M]<sup>+</sup> with characteristic ratios of  $m/z$  343.5 and  $m/z$  327.5 in the mass spectra of samples S-RP1, S-B17, and VK-B8.

### 3. Results and discussion

Three strains were isolated from the Pokhabikha River water (strain S-RP1), from the Baikal coastal water opposite the mouth of the Pokhabikha River (strain S-B17), and from the Baikal under-ice water near the settlement of Bolshye Koty (strain VK-B8). The growth of the strains was characterized by the accumulation of violet pigment, biofilm formation, and the ingrowth of colonies into agarized media. The shape, structure, and consistency of S-RP1 colonies were round, smooth, uniform, and dense; S-B17 colonies were round, festooned, striated, and dense; VK-B8 colonies were rhizoid, uniform, and mucilaginous. The bacteria studied were found to be aerobic Gram-negative motile rods arranged in singles, not forming spores with cell size in the range of  $1.3-2.4 \times 0.3-0.6 \mu\text{m}$ . Strains S-B17 and BK-B8 had a growth range from 0°C to 24°C, strain S-RP1 ranged from 0°C to 30°C. In the study of physiological-biochemical characteristics, positive tests for phospholipase, catalase, collagenase, and urease were determined. Strain BK-B8 was oxidase-positive and hydrolyzed casein but not starch. Strain S-B17 hydrolyzed starch, strain S-RP1 was phosphatase- and lipase-positive and hydrolyzed casein.

As a result of phylogenetic analysis, it is shown that the bacteria studied belong to the family *Oxalobacteraceae*. The sequences of strain S-RP1 had the highest sequence similarity to those of *Janthinobacterium lividum*, and those of strains S-B17 and BK-B8 to *Iodobacter* sp. The culture-based, morphological, and biochemical properties of the studied bacteria coincide with the properties of bacteria belonging to the genera *Janthinobacterium* and *Iodobacter* (Lyakhovchenko et al., 2021; Chernogor et al., 2022).

By the MALDI/TOF method, the purple pigment extracts produced by the tested bacteria were identified as violacein and deoxyviolacein by the presence of intense molecular ions [M]<sup>+</sup> with characteristic ratios of  $m/z$  343.5 and  $m/z$  327.5 in their mass spectra. The MALDI/TOF method is based on the desorption and ionization of the test substance co-crystallized with the matrix and is characterized by its tolerance to impurities and additives, which allowed the detection and identification of target compounds in the crude extract. The choice of matrix (2.5-DHB) in this study is explained by the insignificant background peaks in the low mass region (less than 500 Da) and its high ability to suppress fragmentation of the investigated compounds.

### 4. Conclusion

Bacterial pigments are important pharmaceutical and industrial chemicals. The violet pigment violacein has attracted the attention of the scientific community because of its broad biological activity. The isolation, investigation, and identification of strains of violacein producers are of interest for the development of biotechnological processes to enhance the biosynthesis of this compound. We isolated the psychrophilic pigmented bacteria from the genera *Janthinobacterium* and *Iodobacter*, which have high biochemical activity and require more detailed study, because of all the secondary metabolites with antibiotic activity, pigments represent an understudied group.

### Acknowledgements

The research was carried out using the equipment of the Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS with the financial support of the project of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 121032300186-9.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

Asencio G., Lavin P., Alegría K. et al. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 1–5.

Arif S., Batool A., Khalid N. et al. 2017. Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. *RSC Advances* 7: 4468.

Baricz A., Teban C.M., Chiriac E. et al. 2018. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a one health approach. *Scientific reports* 8: 15272. DOI: [10.1038/s41598-018-33691-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6)

Bashenkhaeva M.V., Zakharova Yu.R. 2017. Cultivated bacteria from the sub-ice algaebacterial communities of Lake Baikal. *Acta Biol Sibirica* 3(3): 76–85. DOI: [10.14258/abs.v3i3.3619](https://doi.org/10.14258/abs.v3i3.3619)

Chernogor L., Bakhvalova K., Belikova A. et al. 2022. Isolation and properties of the bacterial strain *Janthinobacterium* sp. SLB01. *Microorganisms* 10: 1071. DOI: [10.3390/microorganisms10051071](https://doi.org/10.3390/microorganisms10051071)

Choi S.Y., Yoon K.H., Lee J.I. et al. 2015. Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed Research International*. DOI: [10.1155/2015/465056](https://doi.org/10.1155/2015/465056)

Durán N., Justo G.Z., Ferreira C.V. et al. 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 48: 127–133.

Füller J.J., Röpke R., Krausze J. et al. 2016. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biological Chemistry* 291(38): 20068–20084.

Huang C., Chu X., Hui W. et al. 2023. Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *Escherichia coli* VioABCDE-SD. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 70(5): 1582-1596. DOI: [10.1002/bab.2454](https://doi.org/10.1002/bab.2454)

Lyakhovchenko N.S., Abashina T.N., Polivtseva V.N. et al. 2021. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod. *Microorganisms* 9: 102. DOI: [10.3390/microorganisms9010102](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102)

Sajjad W., Din G., Rafiq M. et al. 2020. Pigment production by coldadapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24: 447–473. DOI: [10.1007/s00792-020-01180-2](https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2)

Soliev A.B., Hosokawa K., Enomoto K. 2011. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 670349. DOI: [10.1155/2011/670349](https://doi.org/10.1155/2011/670349)

# Продукция фиолетового пигмента виолацеина психрофильными штаммами бактерий: экстракция и идентификация

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYЗахарова Ю.Р.\*, Марцинечко А.С., Марченков А.М.,  
Петрова Д.П., Федорова Г.А.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Исследованы психрофильные пигментобразующие штаммы, изолированные из озера Байкал и реки Похабиха. На основании культуральных, морфологических и биохимических свойств, а также по результатам анализа последовательностей гена 16S рРНК исследуемые бактерии были отнесены к родам *Janthinobacterium* и *Iodobacter*. Штаммы способны образовывать биопленки и продуцировать фиолетовый пигмент. При экстракции пигментов метанолом и их идентификации методом масс-спектрометрии МАЛДИ/ТОФ были идентифицированы пигменты виолацеин и деоксивиолацеин.

**Ключевые слова:** психрофильные бактерии, фиолетовый пигмент, виолацеин, МАЛДИ/ТОФ

Для цитирования: Захарова Ю.Р., Марцинечко А.С., Марченков А.М., Петрова Д.П., Федорова Г.А. Продукция фиолетового пигмента виолацеина психрофильными штаммами бактерий: экстракция и идентификация // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1149-1154. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1149

## 1. Введение

Микробные сообщества, населяющие холодные места обитания, постоянно подвергаются воздействию нескольких стрессовых факторов, таких как экстремально низкие температуры, олиготрофные условия, циклы замораживания-оттаивания, УФ излучение. Чтобы справиться с этими агрессивными условиями, микроорганизмы адаптируются с помощью нескольких защитных стратегий, включая продукцию различных пигментов (Sajjad et al., 2020). Бактерии, имеющие фиолетовый цвет, который придает им пигмент виолацеин, являются представителями нескольких родов, которые были обнаружены в разных природных средах, в том числе в условиях низких температур (Baricz et al., 2018). Виолацеин представляет собой фиолетовый или пурпурный бис-индоловый водонерастворимый пигмент, синтезируется путем конденсации двух модифицированных молекул триптофана и состоит из субъединиц оксиндола, 2-пирролидона и 5-гидроксииндола (Füller et al., 2016). Виолацеин обладает разнообразной биологической активностью, в том числе сильным антибактериальным действием против широкого спектра бактерий (Asencio et al., 2014; Arif et al., 2017), противогрибковой,

противовирусной, антипротозойной, противоопухолевой активностью (Durán et al., 2007; Soliev et al., 2011; Choi et al., 2015). В этой работе мы выделили три штамма психрофильных, вырабатывающих фиолетовый пигмент бактерий, и описали способы экстракции пигмента и идентификацию методом масс-спектрометрии МАЛДИ.

## 2. Материалы и методы

Пробы поверхностной воды были отобраны в Южном Байкале в сентябре 2022 г. в районе р. Похабихи и в марте 2023 г. в районе п. Большие Коты. Посевы образцов воды инкубировали при температуре 4°C в течение 10 суток на питательной среде РПА/10. Затем отбирали колонии фиолетового цвета и несколько раз рассеивали методом истощающего штриха до получения чистых культур. Культуральные и морфологические свойства полученных штаммов исследовали микроскопически как описано ранее (Башенхаева и Захарова, 2017). Оптимальная температура роста для увеличения выхода бактериальной биомассы была исследована на 1% пептонном бульоне при 0, 4, 8, 12, 16, 22, 26, 30, 37°C. Рост культур оценивали в трех повторностях при каждой выбранной температуре в течение

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [julia.zakharova@gmail.com](mailto:julia.zakharova@gmail.com) (Ю.Р. Захарова)

Поступила: 15 июля 2024; Принята: 02 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





10 суток с помощью биологического спектрофотометра Bio Spectrometr Basic, Eppendorf.

Таксономическую принадлежность изолированных штаммов проводили молекулярно-биологическими методами на основе анализа последовательностей фрагментов генов 16S рНК. Для выделения ДНК биомассу бактерий собирали со скошенного агара в 1 мл стерильного ТЕ-буфера, далее использовали метод фенол-хлороформной экстракции. Амплификацию фрагмента гена 16S рНК проводили с помощью готовой ПЦР-смесь 2ХТaqМ (АлкорБио, Россия) и праймеров 27F (5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'). Продукты амплификации секвенировали с помощью набора ГенСек (Синтол, Россия) на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия) в ЦКП «Ультрамикроанализа» ЛИН СО РАН (г. Иркутск).

Для экстракции пигмента бактериальные штаммы рассевали на чашках Петри со средой РПА/10 и культивировали при температуре 26°C в течение 72 часов. Затем бактериальную биомассу собирали петлей, переносили в пробирку, добавляли 1 мл метанола, энергично встряхивали в течение 10 мин, центрифугировали (13400 об/мин, 5 мин). Окрашенный супернатант отделяли и повторяли экстракцию метанолом до практически полного обесцвечивания клеточной массы (количественное определение производства пигмента не оценивали). Супернатанты объединяли, концентрировали досуха в токе аргона при комнатной температуре и перерастворяли в 50 мкл метанола. Метанольный экстракт использовали для идентификации пигмента методом масс-спектрометрического анализа МАЛДИ. В связи со светочувствительностью виолацеина все операции проводили без доступа света (пробирки оборачивали алюминиевой фольгой) (Huang et al., 2023). Метанольного экстракта (1 мкл) наносили на мишень AnchorChip (Bruker Daltonik GmbH, Германия), смешивали с 1 мкл матрицы 2,5-DHB (2,5-дигидроксibenзойная кислота, Dihydroxybenzoic acid, 10 мг/мл) и высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектры экстрактов регистрировали на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в режиме рефлектрона в диапазоне масс 300-1000 Да при положительной ионизации. Идентификация виолацеина и деоксивиолацеина (deoxyviolacein) выполняли по наличию в масс-спектрах проб S-RP1, S-B17, BK-B8 интенсивных молекулярных ионов  $[M]^+$  с характеристическими отношениями  $m/z$  343.5 и  $m/z$  327.5.

### 3. Результаты и обсуждение

Три штамма были выделены из воды р. Похабиха (штамм S-RP1), из прибрежной воды Байкала напротив устья р. Похабиха (штамм S-B17) и из подледной воды Байкала в районе п. Большие Коты (штамм BK-B8). Рост штаммов характеризовался накоплением фиолетового пигмента, образованием биопленок и вращением колоний в агари-

зованные среды. Форма, структура и консистенция колоний S-RP1 была круглая, ровная, однородная, плотная; S-B17 круглая фестончатая, струйчатая, плотная; BK-B8 ризоидная, однородная, слизистая. Выявлено, что исследуемые бактерии представлены аэробными грамотрицательными подвижными палочками, расположенными поодиночке, не образующими споры с размером клеток в диапазоне  $1.3-2.4 \times 0.3-0.6$  мкм. Штаммы S-B17 и BK-B8 имели диапазон роста от 0°C до 24°C, штамм S-RP1 имел рост от 0°C до 30°C. При изучении физиолого-биохимических характеристик определены положительные тесты на фосфолипазу, каталазу, коллагеназу, уреазу. Штамм BK-B8 был оксидазоположительным, гидролизировал казеин, но не крахмал. Штамм S-B17 гидролизировал крахмал, штамм S-RP1 был фосфатазо- и липазоположительным, гидролизировал казеин.

В результате филогенетического анализа показано, что исследуемые бактерии принадлежат к семейству *Oxalobacteraceae*. Последовательности штамма S-RP1 имели наибольшее сходство с последовательностями *Janthinobacterium lividum*, штаммов S-B17 и BK-B8 с *Iodobacter* sp. Культуральные, морфологические и биохимические свойства исследуемых бактерий согласуются со свойствами бактерий, принадлежащих к представителям родов *Janthinobacterium* и *Iodobacter* (Lyakhovchenko et al., 2021; Chernogor et al., 2022).

Методом МАЛДИ/ТОФ в экстрактах фиолетового пигмента, которые продуцируют исследуемые бактерии, были идентифицированы виолацеин и деоксивиолацеин по наличию в их масс-спектрах интенсивных молекулярных ионов  $[M]^+$  с характеристическими отношениями  $m/z$  343.5 и  $m/z$  327.5. Метод МАЛДИ/ТОФ основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества, сокристаллизованного с матрицей и характеризуется толерантностью по отношению к примесям и добавкам, что позволило выявить и идентифицировать целевые соединения в грубом экстракте. Выбор матрицы (2,5-DHB) в данном исследовании обусловлен незначительными фоновыми пиками в области низких масс (менее 500 Да) и ее высокой способностью подавлять фрагментацию исследуемых соединений.

### 4. Выводы

Бактериальные пигменты являются важными фармацевтическими и промышленными химическими веществами. Фиолетовый пигмент виолацеин привлекает внимание научного сообщества из-за его широкой биологической активности. Выделение, исследование и идентификация штаммов продуцентов виолацеина представляют интерес для разработки биотехнологических процессов, с целью повышения биосинтеза этого соединения. Изолированные нами психрофильные пигментированные бактерии из родов *Janthinobacterium* и *Iodobacter* обладают высокой биохимической активностью и требуют более детального изучения, поскольку из всех вторичных метаболитов, обла-

дающих антибиотической активностью, пигменты представляют собой недостаточно изученную группу.

## Благодарности

Исследование выполнено с использованием оборудования Приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ») при финансовой поддержке проекта Министерства науки и высшего образования РФ № 121032300186-9.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р. Культивируемые бактерии из подледных альго-бактериальных сообществ озера Байкал. 2017. *Acta Biologica Sibirica*. 3(3): 77–86. DOI: [10.14258/abs.v3i3.3619](https://doi.org/10.14258/abs.v3i3.3619)

Asencio G., Lavin P., Alegría K. et al. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 1–5.

Arif S., Batool A., Khalid N. et al. 2017. Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. *RSC Advances* 7: 4468.

Baricz A., Teban C.M., Chiriac E. et al. 2018. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a one health approach. *Scientific reports* 8: 15272. DOI: [10.1038/s41598-018-33691-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6)

Chernogor L., Bakhvalova K., Belikova A. et al. 2022. Isolation and properties of the bacterial strain *Janthinobacterium* sp. SLB01. *Microorganisms* 10: 1071. DOI: [10.3390/microorganisms10051071](https://doi.org/10.3390/microorganisms10051071)

Choi S.Y., Yoon K.H., Lee J.I. et al. 2015. Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed Research International*. DOI: [10.1155/2015/465056Sajjad](https://doi.org/10.1155/2015/465056Sajjad)

W., Din G., Rafq M. et al. 2020. Pigment production by coldadapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24: 447–473. DOI: [10.1007/s00792-020-01180-2](https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2)

Durán N., Justo G.Z., Ferreira C.V. et al. 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 48: 127–133.

Füller J.J., Röpke R., Krausze J. et al. 2016. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biological Chemistry* 291(38): 20068–20084.

Huang C., Chu X., Hui W. et al. 2023. Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *Escherichia coli* VioABCDE-SD. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 70(5): 1582-1596. DOI: [10.1002/bab.2454](https://doi.org/10.1002/bab.2454)

Lyakhovchenko N.S., Abashina T.N., Polivtseva V.N. et al. 2021. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod. *Microorganisms* 9: 102. DOI: [10.3390/microorganisms9010102](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102)

Sajjad W., Din G., Rafq M. et al. 2020. Pigment production by coldadapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24: 447–473. DOI: [10.1007/s00792-020-01180-2](https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2)

Soliev A.B., Hosokawa K., Enomoto K. 2011. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 670349. DOI: [10.1155/2011/670349](https://doi.org/10.1155/2011/670349)

# Microbial communities in the fluid migration zone in the sediments of the Krasny Yar methane seep (South Baikal)

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Zemskaya T.I.\*, Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Bukin S.V., Kolesnikov P.M., Shubenkova O.V., Khabuev A.V., Khlystov O.M.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** The diversity and structure of microbial communities were investigated using 16S rRNA gene barcoding in the sediments of the Krasny Yar methane seep, in the zone of near-surface occurrence of gas hydrates and the presence of oxidized and restored channels. The diversity of both bacteria and archaea along the core depth was similar to the diversity found in sediments from other areas: methylo-trophic methanogens and microorganisms involved in different stages of the organic matter fermentation were detected in the sediment strata of all depths investigated. Migration flows of oxygen-rich and aerobic bacteria-rich near-bottom water influenced greatly the diversity of microbial communities in oxidized channels. Fluids migrating from the deep zone to the bottom surface provided transport from anoxic sediments of anaerobic archaea involved in the AOM process. The data obtained are consistent with geochemical and geothermal indicators defining the zone of active migration of near-bottom waters.

**Keywords:** Lake Baikal, bottom sediments, fluid flows, microbial communities, 16S rRNA gene, diversity

**For citation:** Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Bukin S.V., Kolesnikov P.M., Shubenkova O.V., Khabuev A.V., Khlystov O.M. Microbial communities in the fluid migration zone in the sediments of the Krasny Yar methane seep (South Baikal) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1155-1179. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1155

## 1. Introduction

Lake Baikal, the oldest and deepest lake in the world, is characterized by thick bottom sediments, ranging in thickness from 7 to 9 kilometers in different basins (Logatchev, 1993; Scholz and Hutchinson, 2000). Long sedimentation histories and multi-kilometer deposits with high organic matter content (OM) contributed to the formation of large amounts of liquid and gaseous hydrocarbons in them (Kuzmin et al., 2001; Khlystov et al., 2013). Besides, accumulations of gas hydrates (GH), which are found in sediments of seas, oceans, and the permafrost of high latitudes, have been found in the Baikal sediments. In Lake Baikal, as in marine ecosystems (Milkov, 2005; Kopf, 2002), various geological structures (mud volcanoes, methane, and oil seeps) have been found in sites with fluid discharges to the lakebed (Khlystov et al., 2013). These geological formations tend to form in the zones where sediments are rapidly accumulating or in the areas of tectonic stress and/or hydrocarbon formation that create the overpressure necessary to discharge fluids (Hedberg, 1974; von Huene and Lee, 1983; Brown and Westbrook, 1988). The cold seepage systems in Lake

Baikal are comparable in size and frequency to the systems of oceanic high-productive continental margins but are characterized by special mechanisms of formation and peculiarities of circulation of gas-saturated fluid flows (Naudts et al., 2012; Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020). High gas saturation of the sedimentary strata, proximity to fractures or channels through which gases and fluids migrate in different directions and, in some cases, the presence of GH are indispensable conditions for their occurrence. For example, in the area of the Posolsky fault, gas emissions cause the clearing of the pore space in the bottom sediments under the GH stability zone, which is filled by water supplied from the water column through neighboring faults or channels in the bottom sediments. Water entering the sediment layers below the GH stability zone is heated, which in turn leads to the formation of an upward fluid flow and its outlet into the water column at the discharge point. This is confirmed by the presence of high positive values of warm flows adjacent to regions of abnormally low and negative values, allowing the formation of a convective “fluid loop” (Vanneste et al., 2011). Fluid inflow from significant depths (below the GH stability zone) was confirmed by

\*Corresponding author.

E-mail address: [tzema@lin.irk.ru](mailto:tzema@lin.irk.ru) (T.I. Zemskaya)

**Received:** July 23, 2024; **Accepted:** August 08, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



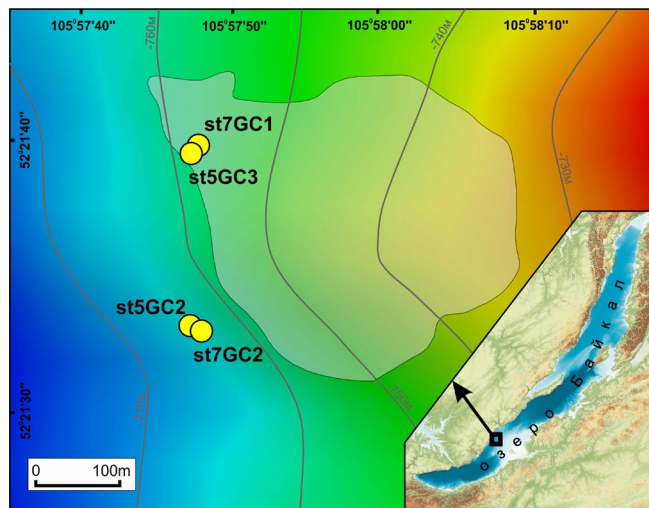
the presence of mantle helium in gas hydrate samples collected in this zone (Klerkx et al., 2006). According to Chernitsyna et al. (2016), microorganisms typical of deep recovered sedimentary strata enter the lakebed surface together with migrating deep fluids.

Migration of fluid flows with a different mechanism of their formation was also recorded in the sediments of another site of the Krasny Yar methane seep (Naudts et al., 2012; Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020). Based on geochemical and geothermal data, the heated mineralized gas-saturated fluid rises alongside the deep fault zone to the bottom surface, passing the zone of the lower boundary of GH stability, destabilizing them and enriching with a new composition of water and gas. Part of this gas in subsurface sediments forms GH again because of a temperature decrease, and another part of the gas is discharged into the water column in bubbles and dissolved form. Gas accumulating under the gas hydrate covers creates overpressure and causes cracking and changes in sediment permeability, allowing near-bottom waters to enter and mix with retaining and fluid waters. The subsurface microcirculation of water takes place in the 1.5 meter layer, where oxidized and restored fluid discharge channels are recorded (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020). No data are available on the influence of migration flows on the distribution of individual microorganisms in the sediments of this geological structure. Therefore, the aim of this work was to study the diversity and taxonomic structure of microbial communities in the fluid flow zone of sediments of the Krasny Yar methane seep and to assess the influence of the latter on the distribution of individual taxa.

## 2. Materials and methods of the study

### 2.1. Study objects and sampling

Four cores were sampled from the R/V “G.Yu. Vereshchagin” using a corer in the zone of the Krasny Yar methane seep (Fig. 1), located on the western slope of the Selenga River delta in the southern basin of Lake Baikal. Cores were sampled from the bottom surface to a depth of 3 m in the central part, where GHs were previously recorded in the upper zone of the geological section (Khabuev et al., 2016), taking into account the presence of oxidized or restored channels in the sediments. Two cores (St7GC1, St7GC2) (N52° 3612; E105° 9638) meeting these criteria were collected in July 2016 and two cores (St5GC2, St5GC3; N52° 3592; E105° 9638) in July 2021. In the section of cores from the GH zone (St7GC1 and St5GC2), restored channels were observed (Fig. 2), and in the latter, an oxidized channel was recorded. Outside this zone, there was an oxidized channel in the St7GC2 core, and there were oxidized and restored channels in the St5GC3 core. Cores were opened after lifting them aboard the vessel, and the sediment samples were packed in sterile foil and placed in liquid nitrogen until they were analyzed in the laboratory. Pore waters were pressed immediately after sampling from core sediments, and chemical analysis was performed in the laboratory according to methods generally accepted in freshwater hydrochem-



**Fig.1.** Sampling sites in the area of the Krasny Yar methane seep. Yellow circles represent the core sampling site; a solid line shows the gas hydrate zone (Khabuev et al., 2016).

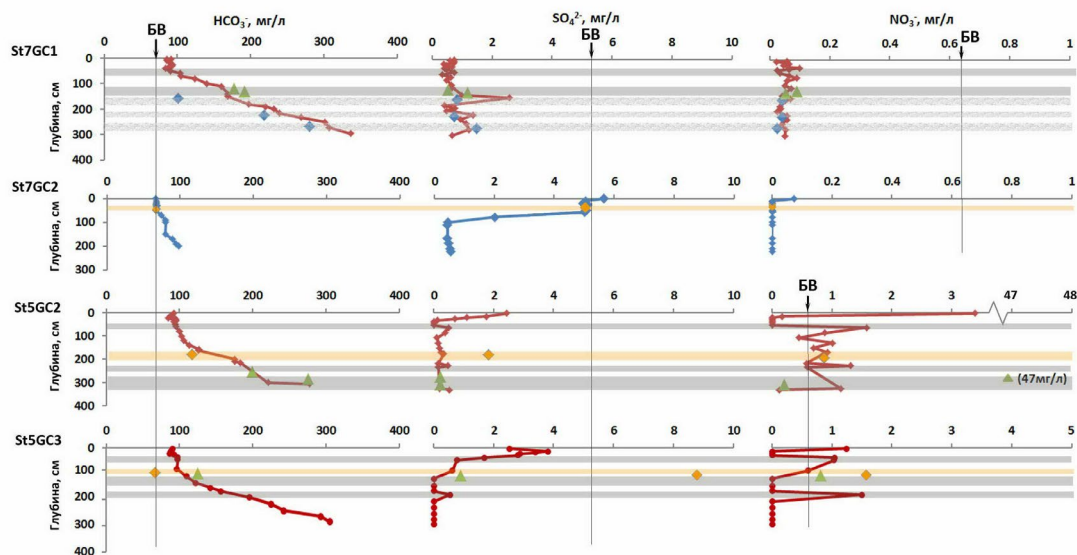
istry (Wetzel and Likens, 1991; Baram et al., 1999;), which we have described previously (Zemskaya et al., 2010). Concentrations of the following ions were analyzed: hydrogen carbonate, sulphate, chlorine, nitrates along the depth of the cores with the interval of 10-50 cm. Taking into account the lithological composition and the presence of channels in the collected cores, 22 DNA samples were isolated including the cores of 2016: St7GC1 (0-5, 15, 25, 150, 180, 216, 223, 250, 296 cm, restored channel - 50 cm) and St7GC2 (oxidized channel - 35-38 cm); in the cores of 2021: St5GC2 (0-5, 25, 30, 160, 185, 306, restored channel - 60 cm, oxidized channel - 200 cm) and St5GC3 (0-10 cm, oxidized channel - 110 cm and restored channel - 186 cm).

### 2.2. DNA isolation. Molecular microbiological methods

Total DNA from the bottom sediments was isolated by phenol-chloroform extraction method (Sambrook et al., 1987). The primers 16S\_BV2F (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-3') and 16S\_BV3R (5'-CCGCGGCTGCTGGCAC-3') (Sahm et al., 2013) were used for PCR amplification of fragments of the 16S rRNA gene of bacteria, which include the V2-V3 variable region. The primers Arch-0787F (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3') and Arch-1059R (5'-GCCATGCACCACCWCCTCT-3'), which include the V5-V6 variable region (Yu et al., 2005), were used for PCR amplification of fragments of the archaea 16S rRNA gene. Libraries were analyzed using Illumina MiSeq Standard Kit v.3 (Illumina) (CCU “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” in ARRIAM). The obtained forward and reverse sequencing reads were trimmed from the end to 270 bp using Trimmomatic version 0.39 (Bolger et al., 2014) to remove positions where more than 25% of the reads had bases with relative quality scores < 20, calculated using FastQC v. 0.11.9 (Andrews, 2020).

Further analysis was performed using the R v4.2.2 program in RStudio v2022.12.0. Libraries were processed using DADA2 v1.26. (Callahan et al., 2016a),





**Fig.2.** Chemical composition of pore waters of the bottom sediments in the Krasny Yar seep zone: St7GC1, St7GC2 – 2016, St5GC2, St5GC3 – 2021. Horizons of occurrence in the sediments of restored channels are highlighted in grey, and horizons of occurrence in the sediments of oxidized channels are highlighted in red, horizons of occurrence in the sediments of gas hydrates are highlighted in ripples. Red rhombs and curves indicate the distribution with depth of concentrations of hydrogen carbonate, sulphate and nitrate ions; blue rhombs represent the same in the presence of gas hydrates; green triangles represent the same in restored channels; red rhombs represent the same in oxidized channels. Thin black lines with arrows represent the concentration levels in Lake Baikal water.

according to the proposed protocol (Callahan et al., 2016b). The reads were filtered and united based on a minimum overlap of 12 bp. Chimeras were filtered out. Representative sequences were taxonomically classified using the 138\_1 database (<http://www.arb-silva.de>). ASV that were not taxonomically classified by phylum or were not assigned to bacterial or archaeal lineages, as well as ASV that were taxonomically assigned to mitochondria and chloroplasts, were excluded from further analysis. The results of raw 16S rRNA sequencing have been deposited in Sequence Read Archive under Bioproject PRJNA875570.

### 3. Results

#### 3.1. Sediment lithology and pore water chemistry

The lithological composition of the selected cores was similar; sediments are represented by dark grey sandy silty clay with numerous swellings, degassing cracks, gas filtration channels and lenses of GH located in the lower part of the cores. The surface layer was characterized by the presence of a brown, thin layer several millimeters thick. The pH values ranged from 6.7 in 2016 to 7.4 in 2021. The Eh values in core St5GC3\_21 at 15 cm depth were 96.2 mV, and at core depths of 88 - 306 cm, they were from - 306 mV to - 205 mV, respectively, indicating the presence of recovered conditions in the sediment sub-bottom layers. A distinctive feature of the cores examined was the presence of channels that differed in color from the sediments that contained them. In the St7GC1 core, lighter colored channels were marked at core depths of 50-75 cm, contrasting with black interlayers of hydrotroillite and dark grey silty clay. Lenses of gas hydrates were

present at a depth of 184 cm and deeper. The chemical composition of pore waters was characterized by a significant increase in concentrations of hydrogen carbonate ions with depth. The concentrations of sulphate and nitrate ions did not vary significantly along the depth of the cores and were lower than those observed in near-bottom water, their profiles near GH lenses had a saw-toothed character (Fig. 2). In the core of St7GC2, at a depth of 30-45 cm, there was an oxidized reddish channel with a diameter of 1 cm and a depth of 2-3 cm. The concentrations of hydrocarbonate and sulphate ions in the oxidized channel corresponded to those observed in the sediment-water-boundary zone (Fig. 2). In the deeper core layers, the sulphate ion concentration decreased to 0.3 mg/L, and the hydrocarbonate ion concentration increased slightly.

In the St 5 cores sampled in 2021, an increase in pore water salinity with depth was also observed; below 150 cm, the concentration gradient of pore waters increased, and the values were comparable to those in the St7GC1 core. In the St5GC2 core, restored channels with sand inclusion were noted at depths of 56-62 cm and deeper at depths ranging from 150 cm to 306 cm. In the St5GC2 core, oxidized channels were of small size and were observed at a depth of 185 cm, and in the St5GC3 core at a depth of 110 cm. In the latter core, several restored channels were also recorded at depths of 60-130 cm, 170-180 cm, and 186 cm. Analysis of the concentration profiles of the sulphate ion revealed higher levels of this ion in oxidized channels compared to restored channels. Chlorine ion concentrations exceeding values in background sediments are most likely related to the GH formation/dissolution process (Ginzburg and Solov'ev, 1994), and its profiles confirm the occurrence of this process in sediments up to a depth of more than 3 meters. We should also note

the unusually high nitrate ion values in the 2021 cores, with a maximum concentration of 47.3 mg/L in the surface layer of St5GC2.

### 3.2. Beta diversity of the microbial community

There were identified 1342087 fragments of the 16S rRNA gene characterizing the composition of microbial communities. The bacterial community of the studied cores is represented by 11 phyla: *Chloroflexota*, *Atribacterota* (previous *Caldatribacteriota*), *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota* (previous *Proteobacteria*), *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*, *Desulfobacterota*, *Sva0485*, *Patescibacteria*, *Caldisericotota*, *Elusimicrobiota*, *Spirochaetota*, MBNT15, and *Bacteroidota* made a minor contribution (no more than 3%) to the communities in 2016, and *Caldisericotota*, *Desulfobacterota*, and *Spirochaetota* (no more than 6%) in 2021. Representatives of such taxa as *Alphaproteobacteria*, *Sva0485*, and *Patescibacteria*, *Elusimicrobiota* constituted a higher percentage only in

the communities of some sediments layers. All communities were dominated by members of the five phyla (*Chloroflexota*, *Caldatribacteriota*, *Actinobacteriota*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*) and of the class *Gammaproteobacteria*. At the same time, the contribution of these taxa to the communities of different core layers in the studied years was not equal, with the most significant differences in bacterial community structure observed between oxidized surface sediments and lower-lying restored sediments (Figs. 3 and 4), as confirmed by community analysis based on Bray-Curtis dissimilarity. The studied communities were divided into two clusters (Fig. 4). The first included bacterial populations from the surface sediments of St7 (2016), and the second cluster contained the samples from the anoxic zone, divided into numerous subclusters. At the same time, communities from oxidized (St7GC2\_35-38) and restored (St5GC2\_60) channels were included in the same subcluster, which could be a consequence of the compensation of environmental conditions after GH dissolution, ensuring the development of metabolically diverse taxa.

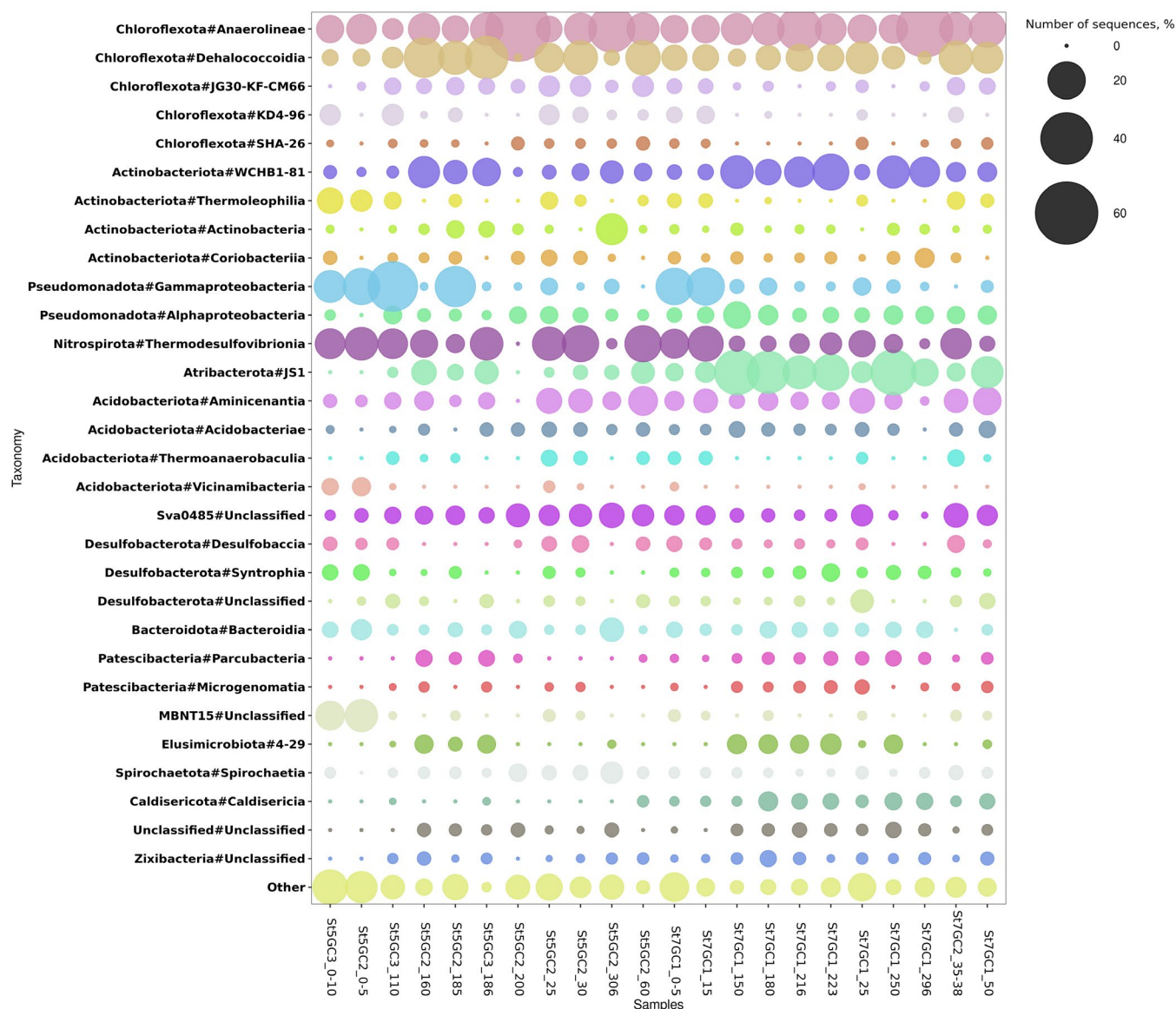
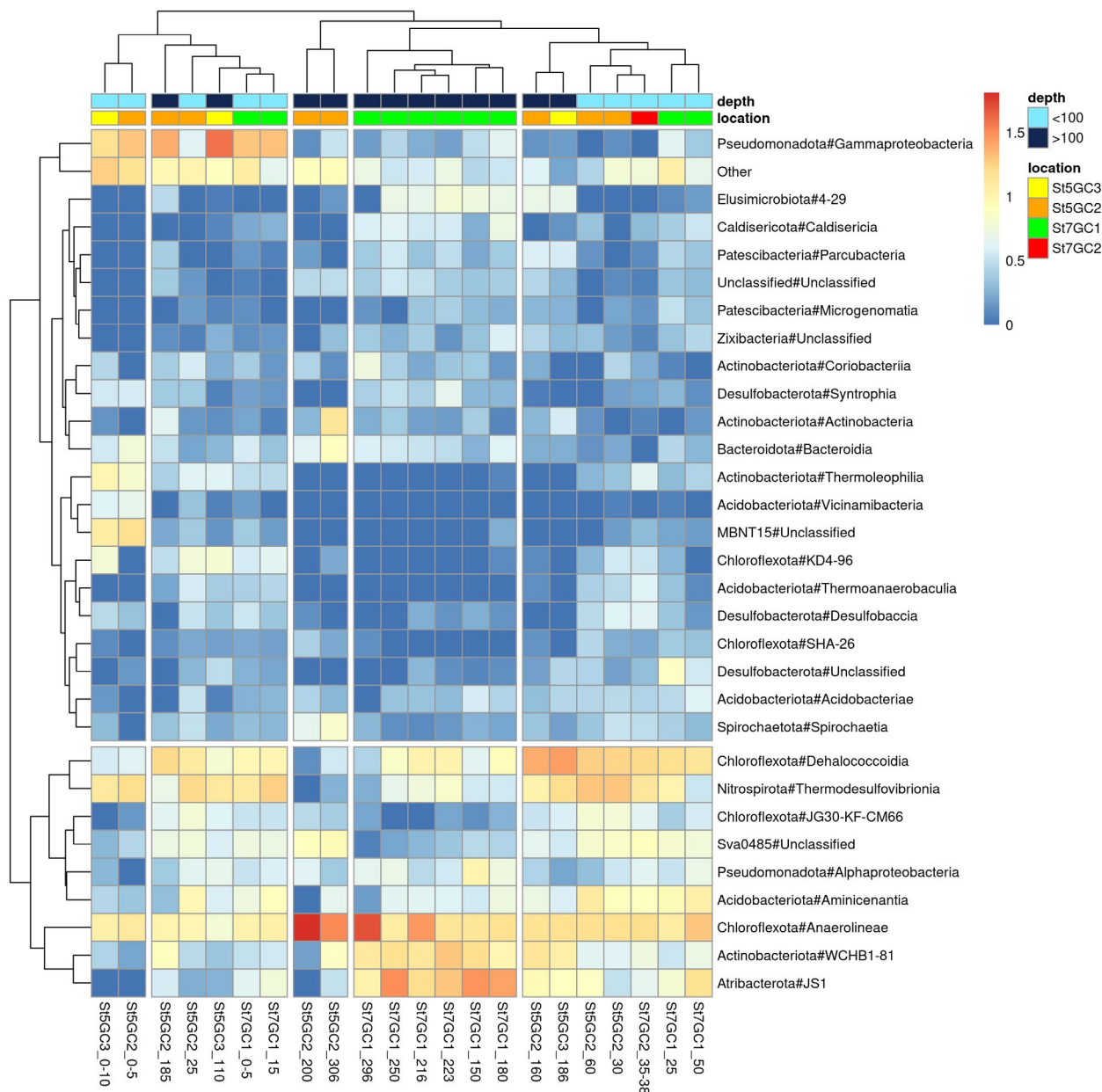


Fig.3. The average relative abundance (16S rRNA) of key bacterial taxa in communities from different sediment layers of the Krasny Yar methane seep.



**Fig.4.** Heat map showing differences in relative abundance of bacterial classes in different core layers based on Bray-Curtis distances. Colors show normalized relative abundance of taxa in different core layers.

The communities of all cores were dominated by *Chloroflexota*; their contribution in St7 cores ranged from 17.3% to 51%, and in St5 cores from 15.6 to 68.7%. These organoheterotrophic bacteria made a significant contribution to the microbial communities of the bottom sediments in other areas of Lake Baikal, including the zones of discharge of gas-containing mineralized fluids (Zemskaya et al., 2021; Lomakina et al., 2023). In the studied cores, the sequences of this phylum belonged mainly to the families *Anaerolineaceae* and *Dehalococcoidaceae*, and only a small percentage of them belonged to uncultivated *Chloroflexota* from different clusters (KD4-96, JG30-KF-CM66 and SHA-26) (Fig. 3). The maximum relative abundance of the first family was observed in sediment communities below 200 cm and of the second family at various depths, including communities of restored channels. Bacteria of the class *Anaerolineae* are obligate anaerobes and secondary fermenters, whereas members of the class *Dehalococcoidia* are organotrophic homoacetogens (Fincker et al., 2020;

Vuillemin et al., 2020). Some of them use oxygen as the final electron acceptor in respiration, participating in the fermentation of sugars and amino acids under anaerobic conditions (Hug et al., 2013).

The communities of surface samples St7GC1 and to a depth of 15 cm, as well as in the oxidized channel (St7GC2\_35-38), also showed a high relative abundance of *Nitrospirota* representatives (12.7, 18.5, and 12.7%, respectively), whose contribution in the underlying sediments did not exceed 5.2%. The communities of these layers of sediments differed from each other by the contribution of *Gammaproteobacteria*, whose percentage was less than 1% in the oxidized channel and about 20% in the surface sediments, which may be determined by the presence of energy sources, particularly oxygen, in this zone. The sequences of this class belonged to the orders *Burkholderiales* and *Methylococcales*. Representatives of the last order, aerobic methanotrophs are mainly found in surface sediments, where their contribution reached 1.5 and 8.3% in St5 cores and 10.6-16.8% in St7 cores.

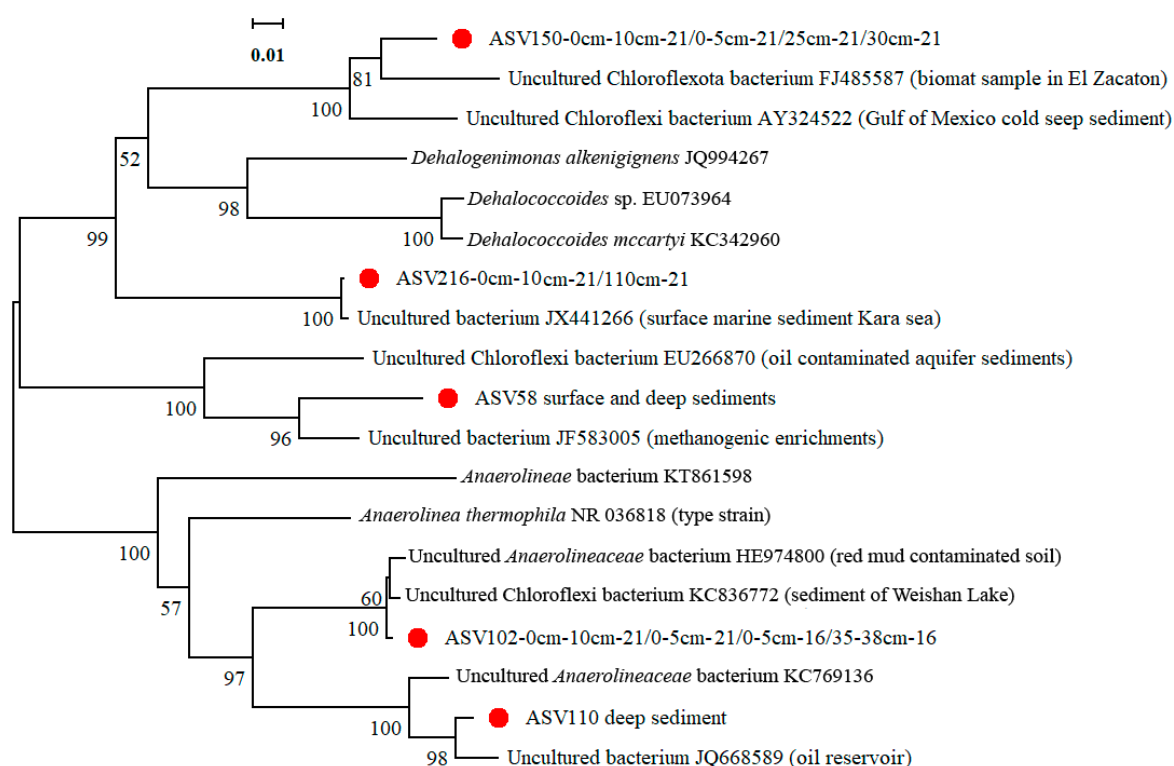


The oxidized (St7GC2\_35-38) and restored (St7GC1\_50) channel communities were also characterized by higher sequence contributions of *Caldatibacteriota* (13.7 and 3.7%) and *Nitrospirota* (12.7 and 2.7%) (Fig. 4) consistent with their metabolic capabilities. The chemoorganotrophic *Caldatibacteriota* are involved in the oxidation of peptides, amino acids, fatty acids, and simple sugars through aerobic and anaerobic respiration (Mori et al., 2009; Carr et al., 2015; Nobu et al., 2016). They were therefore predominant in anoxygenic sediments, where their contribution ranged from 5.3 to 30% of the total sequences, with a minor contribution in surface sediments (up to 3.4%). Among *Nitrospirota*, sequences of *Thermodesulfovibrionia* class are the most abundant and have been shown to be involved in hydrogen oxidation, sulphate and nitrate reduction, and sulfur disproportionation (Umezawa et al., 2022), allowing them to survive in a wide range of environmental conditions. The communities of the underlying sediments had a similar structure, with only sample St7GC1\_25 showing a high percentage of *Patescibacteria* (33.3%), which was less than 4.6% in other sediments.

The community structure in the surface layers of St5 cores differed from that observed in St7 communities due to the presence of representatives of the candidate phylum MBNT15 (14 and 11.3%, respectively). In addition, the relative abundance of sequences of *Caldatibacteriota* (0-7.8%), and *Desulfobacterota* (0-0.7%) in the communities of the studied St5 cores is significantly lower with their higher values in the oxidized channels of St5GC2\_185 and St5GC3\_110 (1.6-3.5%). The latter communities were dominated by *Gammaproteobacteria* (24 and 37%), and their relative abundance was higher than in the surface sed-

iments (14-19%). The oxidized channel communities (St5GC3\_110 and St5GC2\_185) were dominated by sequences of the order *Methylococcales* (24.5 and 13.5%, respectively), the percentage of which exceeded the values observed in the surface and deep sediments of this core, as well as in the restored channels (0.3-1.8%). In the deep layer of St5GC2\_200, where higher concentrations of hydrogen carbonate and nitrate ions were recorded, the structure of the bacterial community differed from others by the predominance (70%) of *Anaerolineaceae* (*Chloroflexota*) sequences and the minor contribution of taxa dominant in the upper-laying sediments (Fig. 3). The presence of taxonomically diverse representatives of this phylum in different ecotopes is confirmed by phylogenetic analysis. The *Chloroflexota* sequences in the studied cores formed 5 clusters on the phylogenetic tree (Fig. 5) with unclassifiable sequences. Two of them combined the sequences from either deep and GH-associated or surface sediment layers. Some sequences from surface sediments and oxidized channels formed two more clusters: one was represented by sequences from the surface and oxidized channel St5GC3\_110, and the other by sequences from the surface and oxidized channel St7GC2\_35-38. Another cluster was formed by sequences found in all ecotopes.

Common bacterial amplicon sequences (ASV) in communities from different ecotopes were determined using the Venn diagrams. The number of common ASV in the St7 core communities was 4%, including GIF9 sequences (family *Dehalococcoidia*), MSB-5B2 (*Anaerolineae*), *Cutibacterium* (*Actinobacteriota*), *Thermodesulfovibrionia* (*Nitrospirota*), JS1 (*Caldatibacteriota*), *Spirochaetota*,



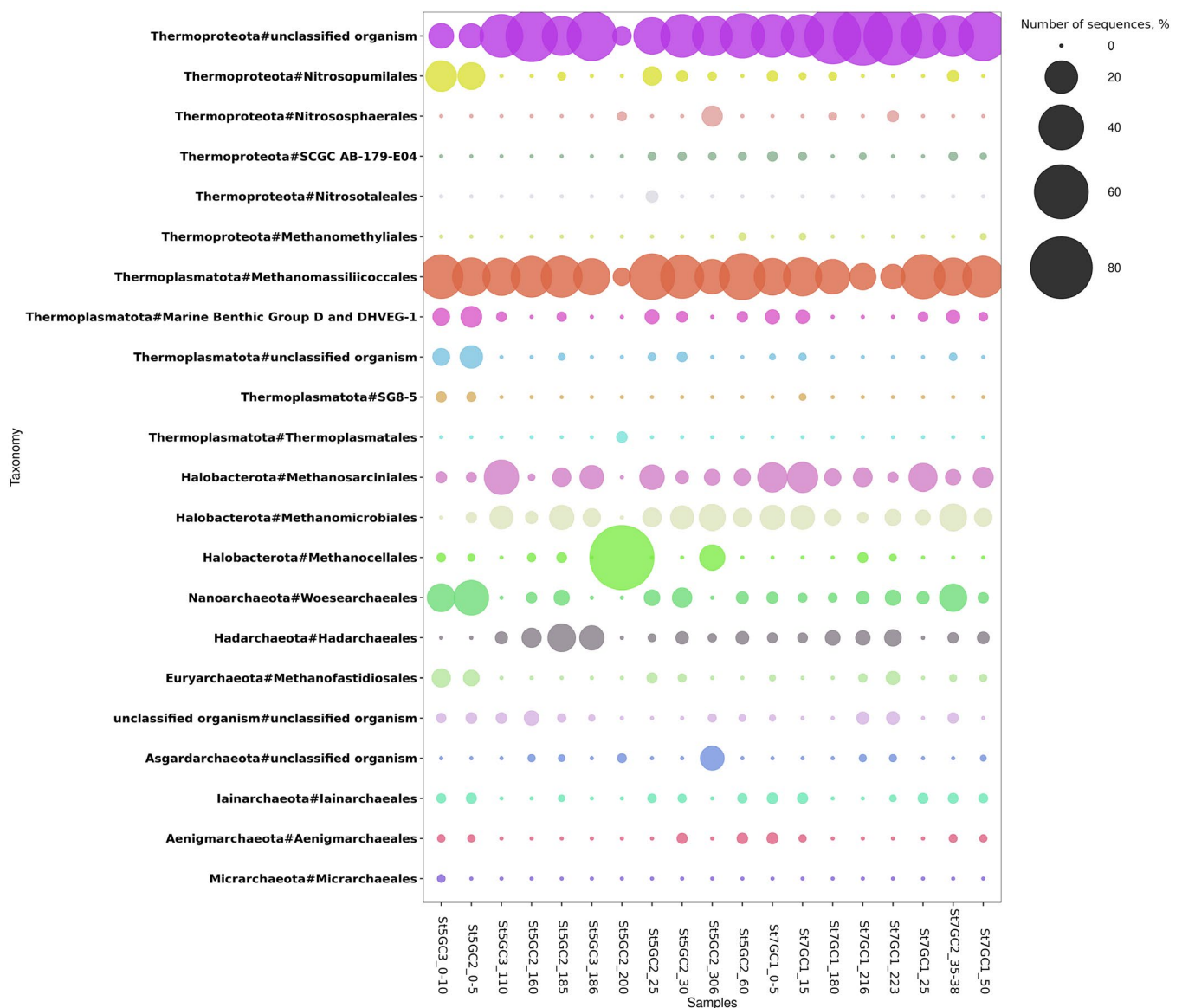
**Fig.5.** Phylogenetic tree of representatives of the phylum *Chloroflexota* based on 16S rRNA gene sequence analysis indicating the position of bacteria from different layers of the bottom sediments. The obtained sequences are highlighted by triangles on the phylogenetic tree. The scale bar shows the evolutionary distance corresponding to one nucleotide sequence per 100 nucleotides.



Sva0485, and *Zixibacteria*. Total ASV in the St5 core communities were less significant (<1%), and they also belonged to GIF9 (*Dehalococcoidia*), Sva0485, *Thermodesulfovibrionia* (*Nitrospirota*). The diversity of common ASV in the oxidized and restored channel communities in both years of the study was 4%, with GIF9 and *Thermodesulfovibrionia* sequences identified, as well as *Cutibacterium*, WCHB1-8 (*Actinobacteriota*), MSB-5B2 (*Anaerolineae*) and *Spirochaetota* found in certain ecotopes.

In 16S rRNA gene libraries of archaea, sequences of 9 phyla were detected in the studied cores, among which the most represented sequences are the following *Thermoproteota* (42%) (previous *Crenarchaeota*), *Thermoplasmata* (31%), and *Halobacteriota* (18%). Representatives of *Nanoarchaeota* (4%), *Hadarchaeota* (3%), *Iainarchaeota* (0.5%), *Euryarchaeota* (0.8%), *Aenigmarchaeota* (0.3%), and *Asgardarchaeota* (0.6%) constituted a minor part of the communities (Fig. 6). Among *Thermoproteota*, *Bathyarchaeia* dominated in all studied communities (5.5 to 70.5% of all sequences), mostly belonging to the unclassified communities. *Bathyarchaeia* play a significant role in the global car-

bon cycle and are the most abundant group of microorganisms in anaerobic ecosystems (Feng et al., 2019). In the Baikal sediments, these archaea were usually found in the deep sediment layers, while in the cores of the investigated site their contribution was also significant in the surface layers (up to 37%). The aerobic archaea *Nitrososphaeria* (*Thermoproteota*) dominating in the surface sediments of other sites are represented in a greater degree by ammonium-oxidizing members of the family *Nitrosopumiliaceae* and in a lesser degree by sequences of the family *Nitrosopumiliaceae* (Lomakina et al., 2018; Zemskaya et al., 2018). Sequences of the first family accounted for about 13% in the surface layers of the St7 cores and in the deep layer of St5GC2\_306. In other samples from the studied site, they belonged to the minor component of the archaea communities (0.4-3.5%). Archaea involved in methane production are typical of Lake Baikal sediments. Among methanogenic archaea, the largest contribution was made by sequences of the order *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmata*), consuming uncompetitive C<sub>1</sub>-methylated compounds. The relative abundance of this order varied in the St7 core communities from 12 to 38% and in the St5 cores



**Fig.6.** Taxonomic composition of archaeal communities from the bottom sediments of the Krasny Yar methane seep. Based on 16S rRNA gene analysis and classification from the SILVA database with a confidence threshold of 80%.

from 5 to 41%. In addition, acetoclastic and hydrogenotrophic archaea of the orders *Methanomicrobiales* (mainly of the genus *Methanoregula*, 1.2-12.4%) and *Methanosarcinales* (mainly of the genus *Methanosaeta*, 0.3-4.5%) were observed in the communities of the studied cores at different depths). The relative abundance of *Methanoperedens* (order *Methanosarcinales*) involved in anaerobic methane oxidation was high at depths from the surface and up to 25 cm (up to 12.8%), and in the oxidized and restored channels of St5GC3\_110 and 186 cm (9.7-20.7%, respectively). As we mentioned above, a high percentage of aerobic methanotrophs were observed in the same samples, confirming the diverse environmental conditions in the channels that support the development of both aerobic and anaerobic microorganisms. Marine Benthic Group D archaea (now *Thermopfundales*) are mixotrophic  $H_2$ -producers found in the sediments of this site, among other taxa widespread in the deep sediments (Zhou et al., 2019; Zhang et al., 2022). Representatives of this taxon and DHVEG-1 contributed little (no more than 2%) to archaea communities. The percentage of common archaeal ASV in the St7 communities was 7%, among which *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) and *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmata*) sequences were identified, whereas in the St5 communities, the common ASV were those of the last phylum (3%). Communities from oxidized and restored channels were characterized by the presence of ASV in the aforementioned two phyla and representatives of *Methanoregula* (*Halobacteriota*).

A heat map showing clustering (Bray-Curtis similarity) of the studied samples based on the relative abundance of key archaea families (Fig. 7) indicates a different community structure in different sediment

layers in both years of the study. The presence of strict anaerobic methanogens and anaerobic methanotrophic archaea *Methanoperedens* in the surface sediments and aerobic ammonio-oxidising *Nitrosopumilaceae* in the deep reduced sediments may be a consequence of the migration of multidirectional fluid flows supporting the development of a wide range of taxa. In addition, the development of archaea may also be influenced by differences in physicochemical conditions. Archaea belonging to the same phylum correlated differently (positively or negatively) with chemical parameters of the habitat (Spearman correlation) (Fig. 8). They formed two clusters with a small number of significant correlations between individual taxa of archaea and ion concentration in pore water and sediment depth. Positive correlations were observed between depth,  $HCO_3^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  concentrations and the archaea *Methanocella* (*Halobacteriota*), *Hadarchaeia* (*Hadarchaeota*) and *Asgardarchaeota*. A wider range of taxa was negatively correlated with these parameters because sediment substrates are depleted in deep restored sediments and this may have limited the development of many species (Fincker et al., 2020; Vuillemin et al., 2020).

#### 4. Discussion

The bottom sediments in the methane seep zone are visually similar to the previous description: they are gas saturated, characterized (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020) by fractures, the presence of oxidized and restored channels, and lens-shaped accumulations of gas hydrates. The profiles of major ion concentrations are also consistent with previously obtained data (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al.,

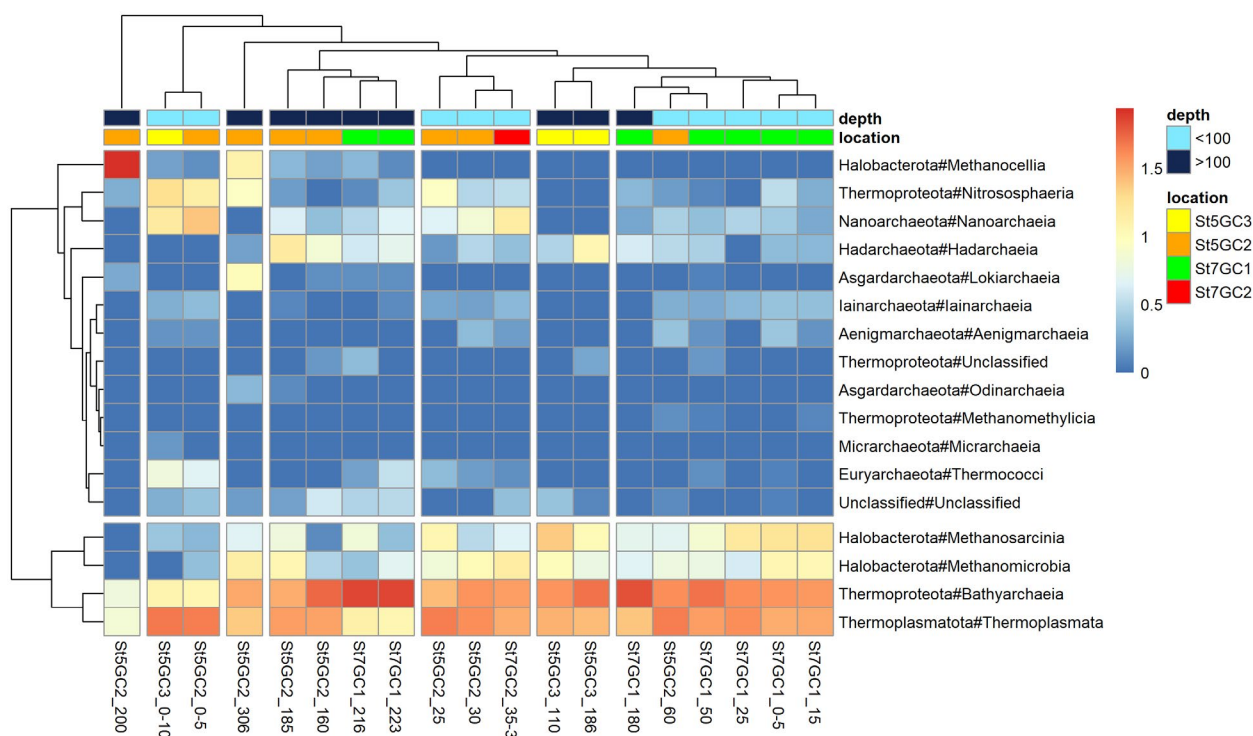
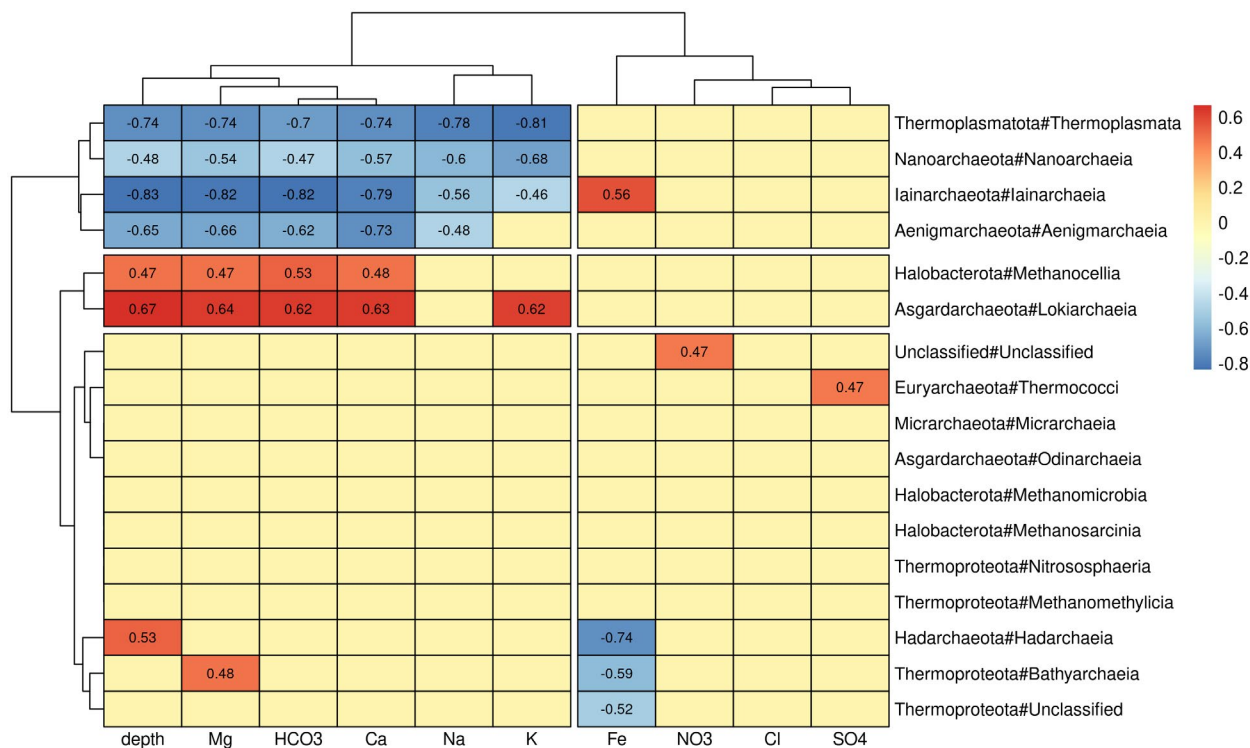


Fig.7. Heat map shows differences in the relative abundance of archaea (at the order level) in different core layers based on Bray-Curtis distances. Colors indicate the normalized relative abundance of taxa in different core layers.



**Fig.8.** Heat map of correlation relationships (Spearman correlation) between archaeal taxa and the concentration of individual ions in the pore water of the investigated sediments. Different colors indicate correlation coefficients based on the color scale to the right of the heat map. The coefficients  $p_v < 0.05$  are shown.

2020), which indicate both the presence of fluid advection from the bottom (St7 GC1) and the inflow of the near-bottom lake water into the sedimentary strata of the studied cores (St7 GC1 and St5 GC2).  $\text{HCO}_3^-$  trends in the upper few meters of the anaerobic zone of the Baikal sediments are also preserved, which are determined by submarine weathering processes occurring in deeper sediments (Lomonosov, 1974). The pore waters of 2021 were characterized by high concentrations of  $\text{NO}_3^-$ , which is an energetically advantageous oxidant and is used by microorganisms in the diagenesis of organic matter. Its significant concentrations were registered in certain years only in some regions of discharges; it was associated with the inflow of more mineralized hydrothermal and deep pore waters (Granina, 2008). We observed high concentrations of this ion in the surface sediments of St5 and a decrease with sediment depth (Figs. 2, 3, 4), which may be related to a more active consumption of this ion in the anoxic zone compared to oxygenated surface sediments, which was consistent with the taxonomic composition of microbial communities. Using nitrate as an electron acceptor during anaerobic methane oxidation, the archaea of *Methanoperedens* contributed significantly to the subsurface sediments, where a decrease in concentrations of this ion was observed.

The bottom sediments of the Krasny Yar methane seep are home to complex microbial communities involved in the transformation of various compounds and are common to freshwater lakes (Newton et al., 2011; Winters et al., 2014; Zhang et al., 2015; Vuillemin et al., 2016; Vuillemin et al., 2018; Han et al., 2020). The dominance of *Chloroflexota* representatives in communities is quite reasonable since they participate in the decomposition of vegetative compounds, which is

confirmed by the presence of cellulose, starch, long-chain sugars, and pyrogallol degradation pathways in their genomes (Hug et al., 2013). The development of organoheterotrophic bacteria in Lake Baikal sediments is favored by the presence of labile sources of organic matter, vegetated diatom algae, which are developed in Lake Baikal in spring and autumn (Votintsev et al., 1975). However, the difference in relative abundance and taxonomic affiliation of these bacteria does not indicate an increasing importance of anaerobic metabolism with increasing depth. As in other lakes, this may be a consequence of heterogeneity in organic carbon content, or differences in the intensity of migration flows and their component composition (Hug et al., 2013). The wide range of phylogenetic diverse ASV suggests that *Chloroflexota* are adapted to changing redox habitat conditions, and the broad plasticity of species in this phylum allows them to dominate at all sediment depths we studied under energy resource limits. The presence of other taxa, although less represented in the cores studied, provides further degradation that produces substrates used by other microorganisms. Thus, the anaerobic bacteria *Desulfobacterota*, present in the communities, are able to provide oxidation of short-chain fatty acids (*Syntrophaceae*, *Smithellaceae*) or acetate (*Desulfobaccaceae*) in syntrophic interaction with methanogenic archaea (Galushko and Kuever, 2019). Representatives of the chemoorgano-getrotrophic *Atribacterota* and *Caldisericota* participate in the oxidation of peptides, amino acids, fatty acids, and simple sugars in the processes of aerobic and anaerobic respiration (Mori et al., 2009; Carr et al., 2015; Nobu et al., 2016).

We did not find any special changes in the structure of methanogenic archaea communities; their tax-



onomic composition and diversity corresponded to those observed in sediments from other regions of the lake. Among the participants in anaerobic methane oxidation, archaea of the family *Methanoperedenaceae* using nitrate as electron acceptor were mainly detected (Raghoebarsing et al., 2006), while bacteria of the order *Methylospirales* (*Methylospirabiota*) using nitrite as electron acceptor were a minor component of the communities. Distinct differences were observed between oxidized and restored channel communities, as well as when compared to communities from other core layers. The oxidized channel communities (St5GC2\_110 and 185 cm) were characterized by the presence of a significant number of sequences of aerobic methanotrophic bacteria of the families *Methylophilaceae* and *Methylomonadaceae*. Its high relative abundance at depths below 1 m may be explained by the entry of oxygenated and cell-containing methanotrophs from the near-bottom water into the anoxygenic zone. The gradual depletion of oxygen in the presence of nitrate ions may also have contributed to the development of anaerobes that oxidize methane via a nitrate-dependent pathway of *Methanoperedenaceae* in the underlying sediments (Lomakina et al., 2020). In addition, the community structure in the sediments of the studied seep may be influenced by the dissolution of GH during fluid migration leading to pore water freshening. This could explain the reducing contribution of aerobic ammonium-oxidizing archaea of the family *Nitrosopumiliaceae* (*Thermoproteota*) in the surface sediments, while in deep sediments it explains the reducing contribution of bacteria of the phylum *Caldatibacteriota*.

## 5. Conclusions

Microbial communities in the deep lake sediments are known to be structured according to the principle of energy-conserving enzymatic metabolism with gradual depletion of electron acceptors in pore water (Berg et al., 2022) and labile OM (Glombitza et al., 2013). In the sediments of the Krasny Yar methane seep, changes in the structure of the microbial communities were recorded in the zone of fluid flow migration, mainly in oxidized channels, while outside them the diversity of both bacteria and archaea was similar to that observed in the sediments from other regions: at all sediment depths studied, methylotrophic methanogens and microorganisms involved in different stages of OM fermentation were identified. The similarity of community structure in anoxic sediments and restored channels differed little, most likely due to the presence of electron acceptors in these ecotopes at the time of the study. It is also clear that the gradual depletion of energy sources and compensation of chemical conditions will, over time, lead to the disappearance of aerobic microorganisms in the channels and the dominance of taxa common to the anoxygenic zone. Our studies have shown that the presence of aerobic bacteria has been observed in the sediments down to a depth of 2 m, which coincides with geochemical and geothermal indicators that define the zone of active migration of near-bottom waters (Pogodaeva et al., 2020). The struc-

ture of microbial communities and chemical parameters in the sediments of the Krasny Yar methane seep also differs from that observed in the Posolskaya Banka upwelling region by a more active influence of the near-bottom waters on the structure in the anoxygenic zone, whereas in the fluid loop zone a greater influence of deep migration currents transporting anaerobic bacteria to the lake bottom surface was observed. It is also evident that migration flows contribute to the degradation of buried organic matter by supplying substrates that promote the development of aerobic and anaerobic microorganisms in the subsurface sediments.

## Acknowledgements

The research was carried out within the State Assignment of LIN SB RAS No. 0279-2021-0006. This study was carried out using the equipment of the Core Centrum “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” in ARRIAM. The authors would like to thank Irkutsk Supercomputer Center SB RAS for providing access to HPCcluster “Akademik V.M. Matrosova”.

## Compliance with ethical standards

The present paper does not contain the results of studies using humans or animals as subjects.

## Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J. et al. 2019. Biogeochemical processes at the Krasny Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps. *Geo-Marine Letters* 39(1): 59–75. DOI: [10.1007/s00367-019-00560-8](https://doi.org/10.1007/s00367-019-00560-8)
- Andrews S. 2020. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. available online: URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed on 1 February 2022)
- Baram G.I., Vereshchagin A.L., Golobokova L.P. 1999. Microcolumn high performance liquid chromatography with UV detect in for the determination of anion in environmental materials. *Journal of Analytical Chemistry* 54: 854–857.
- Berg J.S., Lepine M., Laymand E. et al. 2022. Ancient and modern geochemical signatures in the 13,500-year sedimentary record of Lake Cadagno. *Frontiers in Earth Science* 9. DOI: [10.3389/feart.2021.754888](https://doi.org/10.3389/feart.2021.754888)
- Brown K., Westbrook G.K. 1988. Mud diapirism and subcretion in the Barbados Ridge accretionary complex – the role of fluids in accretionary processes. *Tectonics* 7: 613–640.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. et al. 2014. Flexible trimmer for Illumina sequence data *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583.
- Callahan B.J., Sankaran K., Fukuyama J.A. et al. 2016. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000 Research* 5: 1492.
- Carr S.A., Orcutt B.N., Mandernac K.W. et al. 2015. Abundant Atribacteria in deep marine sediment from the Adélie Basin, Antarctica. *Frontiers in microbiology* 6: 872.



Advance online publication. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00872](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00872)

Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Lomakina A.V. et al. 2016. Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk Bank bottom sediments, Lake Baikal. *Microbiology* 85(6): 672–680 (in Russian) DOI: [10.1134/s0026261716060060](https://doi.org/10.1134/s0026261716060060)

Feng X., Wang Y., Zubin R. et al. 2019. Core metabolic features and hot origin of *Bathyarchaeota*. *Engineering* 5(3): 498–504. DOI: [10.1016/j.eng.2019.01.011](https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.01.011)

Fincker M., Huber J.A., Orphan V.J. et al. 2020. Metabolic strategies of marine subsea floor Chloroflexi inferred from genome reconstructions. *Environment Microbiology* 22(8): 3188–3204. DOI: [10.1111/1462-2920.15061](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15061)

Galushko A., Kuever J. 2019. *Desulfobacca*. In: M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Advance online publication. DOI: [10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2)

Ginzburg G.D., Solov'ev V.A. 1994. Submarine gas hydrates. St-Petersburg: VNI Okeanologiya Press. (in Russian)

Glombitza C., Stockhecke M., Schubert C. et al. 2013. Sulfate reduction controlled by organic matter availability in deep sediment cores from the saline, alkaline Lake Van (Eastern Anatolia, Turkey). *Frontiers in Microbiology* 4. DOI: [10.3389/fmicb.2013.00209](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00209)

Granina L.Z. 2008. Early diagenesis of bottom sediments in Lake Baikal. Academicl Publish House “Geo”. (in Russian)

Han X., Schubert C.J., Fiskal A. et al. 2020. Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments. *Environmental Microbiology* 22(8): 3446–3462. DOI: [10.1111/1462-2920.15115](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15115)

Hedberg H.D. 1974. Relation of methane generation to under compacted shales, shale diapirs, and mud volcanoes. *AAPG Bulletin* 58: 661–673.

Hug L.A., Castelle C.J., Wrighton K.C. et al. 2013. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome* 1(1): 22. DOI: [10.1186/2049-2618-1-22](https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-22)

Khabuev A.V., Chensky D.A., Solovieva M.A. et al. 2016. Gas hydrate resources estimation by geophysical methods in the zone of underwater gas discharge at the seep “Krasny Yar” of Lake Baikal. *Proceedings of the Siberian Branch of the Earth Sciences Section of the Russian Academy of Natural Sciences*. 1: 67–74. (in Russian)

Khlystov O., De Batist M., Shoji H. et al. 2013. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties. *Journal of Asian Earth Sciences* 62(1): 162–166 DOI: [10.1016/j.jseaes.2012.03.009](https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2012.03.009)

Klerkx J., De Batist M., Poort J. et al. 2006. Tectonically controlled methane escape in Lake Baikal. *Advances in the geological storage of carbon dioxide*. NATO Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences. Netherlands: IOS PRESS Springer. 65: 203–219. DOI: [10.1007/1-4020-4471-2\\_17](https://doi.org/10.1007/1-4020-4471-2_17)

Kopf A. 2002. Significance of mud volcanism. *Reviews of Geophysics* 40(2): 2–52 DOI: [10.1029/2000RG000093](https://doi.org/10.1029/2000RG000093)

Kuzmin M.I., Karabanov E.B., Kawai T. et al. 2001. Deep drilling on Lake Baikal: main results. *Russian Geology and Geophysics* 42: 8–34.

Logatchev N.A. 1993. History and geodynamics of the Lake Baikal rift in the context of the Eastern Siberia rift system: a review. *Bulletin des centres de recherches exploration-production Elf-Aquitaine* 17(2): 353–370.

Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Pogodaeva T.V. et al. 2018. Anaerobic methane oxidation in enrichment cultures from deep sediments of a mud volcano Peschanka (South Baikal). *Microbiology* 87(3): 317–325. (In Russian). DOI: [10.1134/s0026261718030049](https://doi.org/10.1134/s0026261718030049)

Lomakina A., Pogodaeva T., Kalmychkov G. et al. 2020. Diversity of NC10 Bacteria and ANME-2d Archaea in sedi-

ments of fault zones at Lake Baikal. *Diversity* 12(1): 1–19. DOI: [10.3390/d12010010](https://doi.org/10.3390/d12010010)

Lomakina A., Bukin S., Shubenkova O. et al. 2023. Microbial communities in ferromanganese sediments from the northern basin of Lake Baikal (Russia). *Microorganisms* 11(7): 1865. DOI: [10.3390/microorganisms11071865](https://doi.org/10.3390/microorganisms11071865)

Lomonosov I.S. 1974. *Geochemistry and formation of modern hydrotherms in the Baikal rift*. Novosibirsk: Nauka (in Russian).

Milkov A.V. 2005. Molecular and stable isotope compositions of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings. *Organic Geochemistry* 36 (5): 681–702. DOI: [10.1016/j.orggeochem.2005.01.010](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2005.01.010)

Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y. et al. 2009. *Caldisericum* exile gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(11): 2894–2898 DOI: [10.1099/ijs.0.010033-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.010033-0)

Naudts L., Khlystov O., Granin N. et al. 2012. Stratigraphic and structural control on the distribution of gas hydrates and active gas seeps on the Posolsky Bank, Lake Baikal. *Geo-Marine Letters* 32(5): 395–406. DOI: [10.1007/s00367-012-0286-y](https://doi.org/10.1007/s00367-012-0286-y)

Newton R.J., Jones S.E., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(1): 14–49. DOI: [10.1128/mmr.00028-10](https://doi.org/10.1128/mmr.00028-10)

Nobu M.K., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K. et al. 2016. Phylogeny and physiology of candidate phylum ‘Atribacteria’ (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *International Society for Microbial Ecology* 10(2): 273–286. DOI: [10.1038/ismej.2015.97](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.97)

Pogodaeva T.V., Poort J., Aloisi G. et al. 2020. Fluid migrations at the Krasny Yar methane seep of Lake Baikal according to geochemical data. *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 123–131. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.08.003)

Raghoebarsing A.A., Arjan P.K., van de Pas-Schoonen T. et al. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440(7086): 918–921. DOI: [10.1038/nature0461](https://doi.org/10.1038/nature0461)

Sahm K., John P., Nacke H. et al. 2013. High abundance of heterotrophic prokaryote in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles* 7: 649–662. DOI: [10.1007/s00792-013-0548-2](https://doi.org/10.1007/s00792-013-0548-2)

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1987. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scholz C.A., Hutchinson D.R. 2000. Stratigraphic and structural evolution of the Selenga delta accommodation zone, Lake Baikal rift, Siberia. *International Journal of Earth Sciences* 89(2): 212–228. DOI: [10.1007/s005310000095](https://doi.org/10.1007/s005310000095)

Umezawa K., Kojima H., Kato Y. et al. 2022. Corrigendum to “*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*”. *Systematic and Applied Microbiology* 45(6): 126323. Advance online publication. DOI: [10.1016/j.syapm.2022.126323](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126323)

Vanneste H., Kelly-Gerreyn B.A., Connelly D.P. et al. 2011. Spatial variation in fluid flow and geochemical fluxes across the sediment–seawater interface at the Carlos Ribeiro mud volcano (Gulf of Cadiz). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 1124–1144. DOI: [10.1016/j.gca.2010.11.017](https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.11.017)

Votintsev K.K., Meshcheryakova A.I., Popovskaya G.I.

1975. Cycle of organic matter in Lake Baikal. Novosibirsk: Nauka.

Vuillemin A., Friese A., Alawi M. et al. 2016. Geomicrobiological features of ferruginous sediments from Lake Towuti, Indonesia. *Frontiers in Microbiology* 7. Advance online publication. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01007](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01007)

Vuillemin A., Ariztegui D., Horn F. et al. 2018. Microbial community composition along a 50 000-year lacustrine sediment sequence. *FEMS Microbiology Ecology* 94(4): Advance online publication. DOI: [10.1093/femsec/fiy029](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy029)

Vuillemin A., Kerrigan Z., D'Hondt S. et al. 2020. Exploring the abundance, metabolic potential and gene expression of seafloor Chloroflexi in million-year-old oxic and anoxic abyssal clay. *FEMS Microbiology Ecology* 96(12) DOI: [10.1093/femsec/fiaa223](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa223)

Von Huene R., Lee H.J. 1983. The possible significance of pore fluid pressures in subduction zones. *The American Association of Petroleum Geologists Members* 34: 781–791.

Wetzel R.G., Likens G.E. 1991. *Limnological Analyses*. New York: Springer.

Winters A.D., Marsh T.L., Brenden T. et al. 2014. Molecular characterization of bacterial communities associated with sediments in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 40(3): 640–645. DOI: [10.1016/j.jglr.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.04.008)

Yu Y., Lee C., Kim J. et al. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 670–679. DOI: [10.1002/bit.20347](https://doi.org/10.1002/bit.20347)

Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V. et al. 2010. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3. *Geo-Marine Letters* 30(3–4): 411–425. DOI: [10.1007/s00367-010-0199-6](https://doi.org/10.1007/s00367-010-0199-6)

Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Mamaeva E.V. et al. 2018. Composition of microbial communities in sediments from Southern Baikal containing Fe/Mn concretions. *Microbiology* 87(3): 291–302. DOI: [10.7868/S0026365618030072](https://doi.org/10.7868/S0026365618030072)

Zemskaya T.I., Bukin S.V., Lomakina A.V. et al. 2021. Microorganisms in the sediments of Lake Baikal, the deepest and oldest lake in the world. *Microbiology* 90(3): 298–313. DOI: [10.1134/S0026261721030140](https://doi.org/10.1134/S0026261721030140)

Zhang J., Yang Y., Zhao L. et al. 2015. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(7): 3291–3302. DOI: [10.1007/s00253-014-6262-x](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6262-x)

Zhang X., Huang Y., Liu Y. et al. 2022. An ancient respiratory system in the widespread sedimentary archaea *Thermopfundales*. *Molecular Biology and Evolution* 39(10): msac213. DOI: [10.1093/molbev/msac213](https://doi.org/10.1093/molbev/msac213)

Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G. et al. 2019. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermopfundales* (MBG-D archaea) *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 13(4): 885–901. DOI: [10.1038/s41396-018-0321-8](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0321-8)

# Микробные сообщества в зоне миграции флюидопотоков в донных отложениях метанового сипа Красный Яр (Южный Байкал)



Земская Т.И.\*, Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Букин С.В., Колесников П.М., Шубенкова О.В., Хабуев А.В., Хлыстов О.М.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В осадках метанового сипа Красный Яр, в зоне приповерхностного залегания газовых гидратов и наличия окисленных и восстановленных каналов, исследовано разнообразие и структура микробных сообществ методом баркодирования гена 16S рРНК. Разнообразие как бактерий, так и архей по глубине кернов было сходно с таковыми в осадках других районов: на всех исследованных глубинах осадочной толщи выявлялись метилотрофные метаногены и микроорганизмы, участвующие в разных этапах ферментации органического вещества. Существенное влияние на разнообразие микробных сообществ из окисленных каналов оказывали миграционные потоки придонной воды, обогащенной кислородом и аэробными бактериями. Флюиды, мигрирующие из глубинной зоны к поверхности дна, обеспечивали перемещение из аноксигенных осадков анаэробных архей, участвующих в процессе АОМ. Полученные данные согласуются с геохимическими и геотермическими показателями, определяющими зону активной миграции придонных вод.

**Ключевые слова:** озеро Байкал, донные отложения, флюидопотоки, микробные сообщества, ген 16S рРНК, разнообразие

Для цитирования: Земская Т.И., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Букин С.В., Колесников П.М., Шубенкова О.В., Хабуев А.В., Хлыстов О.М. Микробные сообщества в зоне миграции флюидопотоков в донных отложениях метанового сипа Красный Яр (Южный Байкал) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1155-1179. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1155

## 1. Введение

Озеро Байкал самое древнее и глубокое озеро мира характеризуется мощными донными отложениями, толщина которых в разных котловинах составляет от 7 до 9 километров (Logatchev, 1993; Scholz and Hutchinson, 2000). Длительная история седиментации и многокилометровые отложения с высоким содержанием органического вещества (ОВ) способствовали образованию в них больших количеств жидких, газообразных углеводородов (Kuzmin et al., 2001; Khlystov et al., 2013). Кроме того, в осадках Байкала обнаружены скопления газовых гидратов (ГГ), которые встречаются в донных осадках морей, океанов и в вечной мерзлоте высоких широт. Как и в морских экосистемах (Milkov, 2005; Kopf, 2002), в Байкале на участках с выходом флюидов на дно озера обнаружены различные типы геологических структур (грязевые вулканы, метановые и нефтяные сипы) (Khlystov et al., 2013). Такие геологические образования имеют тенденцию образовываться

в тех районах, где осадки быстро накапливаются или в зонах, подверженных тектоническому напряжению и/или образованию углеводородов, создающих избыточное давление, необходимое для выброса флюидов (Hedberg, 1974; von Hueene and Lee, 1983; Brown and Westbrook, 1988). Системы холодного просачивания в Байкале по размеру и частоте сравнимы с системами океанических высокопродуктивных континентальных окраин, но характеризуются особыми механизмами образования и особенностями движения газонасыщенных флюидопотоков (Naudts et al., 2012; Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020). Непременными условиями для их протекания является высокая газонасыщенность осадочной толщи, близость к разломам или каналам, по которым в разных направлениях мигрируют газы и жидкости, и в некоторых случаях, наличие ГГ. Например, в районе Посольского разлома выход газа обуславливает освобождение порового пространства в донных отложениях под зоной стабильности ГГ, которое заполняется водой,

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [tzema@lin.irk.ru](mailto:tzema@lin.irk.ru) (Т.И. Земская)

Поступила: 23 июля 2024; Принята: 08 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





всасывающейся из водной толщи по соседним разломам или через каналы в донных отложениях. Вода, попадая в слои осадка под зоной стабильности ГГ, нагревается, что вновь приводит к формированию восходящего потока жидкости и его выходу в водную толщу в месте разгрузки. Это подтверждено наличием высоких положительных значений тепловых потоков, соседствующих с областями аномально низких и отрицательных, обеспечивающих формирование конвективной «флюидной петли» (Vanneste et al., 2011). Поступлению флюидов со значительных глубин (ниже зоны стабильности ГГ) подтверждалось присутствием мантийного гелия в образцах газовых гидратов, отобранных в данном районе (Klerkx et al., 2006). Как было показано Chernitsyna et al. (2016) вместе с мигрирующими глубинными флюидами на поверхность дна поступают и микроорганизмы, характерные для глубоководных восстановленных осадочных толщ.

В осадках другого района, метанового сипа Красный Яр также зафиксирована миграция флюидопотоков с иным механизмом их формирования (Naudts et al., 2012; Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020). Согласно геохимическим и геотермическим данным разогретый минерализованный газонасыщенный флюид поднимается вдоль зоны глубинного разлома к поверхности дна, и проходя зону нижней границы стабильности ГГ, дестабилизирует их, обогащаясь новой по составу водой и газом. Часть этого газа в подповерхностных осадках из-за снижения температуры вновь образует ГГ, а часть разгружается в водную толщу в пузырьковой и растворенной форме. Газ, скапливаясь под газогидратными крышками, создает избыточное давление и вызывает растрескивание и изменение проницаемости осадка, обеспечивая поступление придонных вод и их смешение с вмещающими водами и водами флюида. Приповерхностная микроциркуляция вод осуществляется в 1.5 метровом слое, где фиксируются окисленные и восстановленные каналы разгрузки флюидов (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020). Данных о влиянии миграционных потоков на распределение отдельных микроорганизмов в донных отложениях этой геологической структуры не имеется. Поэтому целью настоящей работы являлось исследование разнообразия и таксономической структуры микробных сообществ в зоне флюидопотоков осадков метанового сипа Красный Яр и оценке влияния последних на распределение отдельных таксонов.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Объекты исследования и отбор образцов

С помощью гравитационных труб с борта НИС «Т.Ю. Верещагин» отобрано 4 керны, в районе метанового сипа Красный Яр (Рис. 1), расположенного на западном склоне дельты реки Селенги в южной котловине озера Байкал. Керны отбирались в центральной зоне, где в верхней части геологического разреза - от поверхности дна и до глубины 3 м,

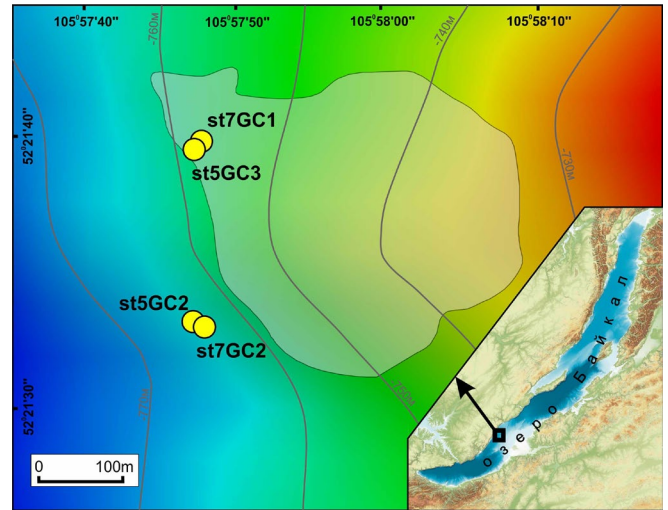


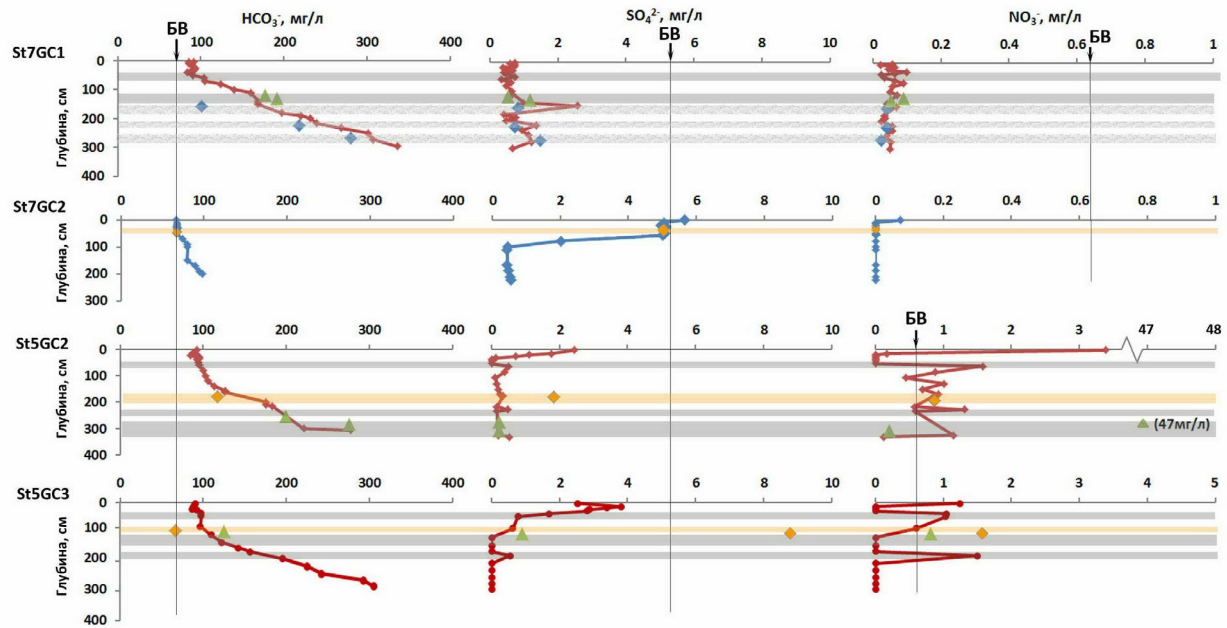
Рис.1. Места отбора проб в районе метанового сипа Красный Яр. Желтые круги – место отбора кернов, сплошной линией показана газогидратная зона (Khabuev et al., 2016).

ранее регистрировались ГГ (Khabuev et al., 2016), а также с учетом наличия в осадках окисленных или восстановленных каналов. Соответствующие этим критериям два керны (St7GC1, St7GC2) получены в июле 2016 г. (N52° 3612; E105° 9638) и два (St5GC2, St5GC3) в июле 2021 г. (N52° 3592; E105° 9638). В разрезе кернов из ГГ зоны (St7GC1 и St5GC2) отмечались восстановленные каналы (Рис.2), а в последнем - и окисленный. Вне этой зоны, в керне St7GC2, наблюдался окисленный канал, а керне St5GC3 окисленные и восстановленные каналы. Керны после поднятия на борт судна вскрывали, образцы донных отложений упаковывали в стерильную фольгу и помещали в жидкий азот до момента их анализа в лаборатории. Поровые воды отжимали непосредственно после отбора проб из донных отложений керны, химический анализ проводили в лаборатории в соответствии с общепринятыми в гидрохимии пресных вод методами (Wetzel and Likens, 1991; Baram et al., 1999), которые описаны нами ранее (Zemskaya et al., 2010). Анализировались концентрации следующих ионов: гидрокарбоната, сульфата, хлора, нитратов по глубине кернов с интервалом 10-50 см. С учетом литологического состава и наличия каналов в отобранных кернах было выделено 22 образца ДНК, в том числе в 2016 г. в кернах St7GC1 (0-5, 15, 25, 150, 180, 216, 223, 250, 296 см, восстановленный канал - 50 см) и St7GC2 (окисленный канал - 35-38 см); в 2021 г. в кернах St5GC2 (0-5, 25, 30, 160, 185, 306, восстановленный канал - 60 см, окисленный канал - 200 см) и St5GC3 (0-10 см, окисленный канал - 110 см и восстановленный канал - 186 см).

### 2.2. Выделение ДНК. Молекулярно-микробиологические методы

Суммарную ДНК из донных осадков выделяли методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1987). Для ПЦР-амплификации





**Рис.2.** Химический состав поровых вод донных отложений в районе сипа Красный Яр: St7GC1, St7GC2 – 2016 г., St5GC2, St5GC3 – 2021 г. Серым цветом выделены горизонты присутствия в отложениях восстановленных каналов, рыжим цветом выделены горизонты присутствия в отложениях окисленных каналов, рябью выделены горизонты присутствия в отложениях газовых гидратов. Красные ромбы и кривые – распределение с глубиной концентраций ионов гидрокарбоната, сульфата и нитрата; синие ромбы – то же в присутствие газовых гидратов; зеленые треугольники – то же в восстановленных каналах; рыжие ромбы – то же в окисленных каналах. Тонкие черные линии со стрелкой – уровень концентраций в воде оз. Байкал.

фрагментов гена 16S рРНК бактерий, включающего вариабельный участок V2-V3, использовали праймеры 16S\_BV2F (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-3') и 16S\_BV3R (5'-CCGCGGCTGCTGGCAC-3') (Sahm et al., 2013). Для ПЦР-амплификации фрагментов гена 16S рРНК архей использовали праймеры Arch-0787F (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3') and Arch-1059R (5'-GCCATGCACCWCCTCT-3'), включающего вариабельный участок V5-V6 (Yu et al., 2005). Библиотеки анализировали с использованием стандартного набора Illumina MiSeq Standard Kit v.3 (Illumina) (ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология», ВНИИАМ). Полученные чтения прямого и обратного секвенирования были обрезаны с конца до 270 п.н. с использованием Trimmomatic версии 0.39 (Bolger et al., 2014), для удаления позиций, в которых более 25% чтений имели основания с относительными показателями качества < 20, рассчитанными с использованием FastQC v. 0.11.9 (Andrews, 2020).

Дальнейший анализ проводился с использованием программы R v4.2.2 в RStudio v2022.12.0. Библиотеки обрабатывались с использованием DADA2 v1.26. (Callahan et al., 2016a) в соответствии с предложенным протоколом (Callahan et al., 2016b). Считывания были отфильтрованы и объединены на основе минимального перекрытия 12 п.н. Репрезентативные последовательности были таксономически классифицированы, используя базу 138\_1 (<http://www.arb-silva.de>). ASV, которые не были таксономически классифицированы по филуму или не были отнесены к бактериальным

или архейным линиям, а так же ASV, которые были таксономически отнесены к митохондриям и хлоропластам, были исключены из дальнейшего анализа. Результаты необработанного секвенирования 16S рРНК были депонированы в Sequence Read Archive Биопроект PRJNA875570.

### 3. Результаты

#### 3.1. Литология осадков и химический состав поровых вод

Литологический состав отобранных кернов был сходным, осадки представлены темно-серой песчанистой алевритистой глиной с многочисленными вспучиваниями, трещинами дегазации, газовыми каналами фильтрации и линзами ГТ, расположенных в нижней части кернов. Поверхностный слой характеризовался наличием коричневого тонкого слоя толщиной несколько миллиметров. Значения pH варьировали от 6.7 в 2016 г. и до 7.4 в 2021 г. Значения Eh составляли в керне St5GC3\_21, на глубине 15 см –96,2 mV, и на глубине керна 88 – 300 см от – 306 mV до – 205 mV соответственно, что свидетельствует о наличии восстановленных условиях в поддонных слоях осадков. Характерной чертой исследованных кернов являлось наличие каналов, отличающихся по цвету от вмещающего их осадка. В керне St7GC1, более светлые по цвету каналы отмечались на глубине керна 50-75 см, выделяясь на фоне черных прослоев гидротроиллита и темно-серой алевритистой глины. На глубине 184 см и ниже присутствовали линзы газовых гидра-

тов. Химический состав поровых вод характеризовался значительным увеличением концентраций гидрокарбонат ионов с глубиной. Концентрации сульфат и нитрат ионов по глубине кернов изменялись не значительно и были ниже отмечаемых в придонной воде, их профили вблизи линз ГТ имели пилообразный характер (Рис. 2). В керне St7GC2 на глубине 30-45 см присутствовал окисленный канал рыжего цвета диаметром 1 см и глубиной 2-3 см. Концентрации гидрокарбонат- и сульфат ионов в окисленном канале соответствовали отмечаемым в придонной области (Рис. 2), в нижерасположенных слоях керна концентрация сульфат иона уменьшалась до 0.3 мг/л, а гидрокарбонат иона несколько увеличивалась.

В кернах St 5, отобранных в 2021 г. также наблюдалось увеличение минерализации поровых вод с глубиной, ниже 150 см концентрационный градиент поровых вод возрастал и по значениям был сопоставим с таковым в керне St7GC1. В керне St5GC2 восстановленные каналы с включением песка отмечались на глубине 56-62 см, и ниже на глубинах от 150 см до 306 см. В керне St5GC2 окисленные каналы имели небольшие размеры и отмечались на глубине 185 см, а в керне St5GC3 на 110 см. В последнем также наблюдалось несколько восстановленных каналов на глубинах 60-130 см, 170-180 см и 186 см. Анализ профилей концентраций сульфат иона свидетельствовал о более высоких значениях этого иона в окисленных каналах по сравнению с восстановленными. Концентрации ионов хлора, превышающие значения в фоновых осадках, скорее всего обусловлены процессом образования/растворения ГТ (Ginzburg and Solov'ev, 1994), а его профили подтверждают протекание этого процесса в осадке до глубины более 3 м. Следует отметить также необычайно высокие значения нитрат иона в кернах 2021 г., с максимальной концентрацией 47,3 мг/л в поверхностном слое St5GC2.

### 3.2. Бета разнообразие микробного сообщества

Идентифицировано 1342087 фрагментов гена 16S рРНК, характеризующих состав микробных сообществ. Бактериальное сообщество исследованных кернов представлено 11 филумами: *Chloroflexota*, *Atribacterota* (ранее *Caldatibacteriota*), *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota* (ранее *Proteobacteria*), *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*, *Desulfobacterota*, *Sva0485*, *Patescibacteria*, *Caldiseriicota*, *Elusimicrobiota*. В 2016 г. минорный вклад (не более 3%) в сообществах составляли представители *Spirochaetota*, MBNT15 и *Bacteroidota*, а в 2021 г. *Caldiseriicota*, *Desulfobacterota* и *Spirochaetota* (не более 6%). Представители таких таксонов как *Alphaproteobacteria*, *Sva0485*, *Patescibacteria*, *Elusimicrobiota* составляли более высокий процент лишь в сообществах некоторых слоев осадка. Во всех сообществах доминировали представители 5 филумов (*Chloroflexota*, *Caldatibacteriota*, *Actinobacteriota*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*) и класса *Gammaproteobacteria*. Вместе с тем, вклад этих так-

сонов в сообщества разных слоев кернов в исследуемые годы не был одинаковым, наиболее значимые отличия в структуре бактериальных сообществ наблюдались между окисленными поверхностными и нижерасположенными восстановленными осадками (Рис. 3 и Рис. 4), что подтверждалось анализом сообществ на основе Bray–Curtis dissimilarity. Исследованные сообщества разделялись на два кластера (Рис. 4). В первый входили бактериальные популяции из поверхностных осадков St7 (2016 г.), во второй, образцы из аноксигенной зоны, разделяющиеся на многочисленные подкластеры. При этом, в один подкластер входили сообщества из окисленного (St7GC2\_35-38) и восстановленного (St5GC2\_60) каналов, что могло быть следствием выравнивания условий среды после растворения ГТ, обеспечивающей развитие метаболически разнообразных таксонов.

В сообществах всех кернов доминировали *Chloroflexota*, их вклад в кернах St7 варьировал от 17.3 % до 51%, а в кернах St5 от 15.6 до 68.7%. Эти органогетеротрофные бактерии вносили значимый вклад в микробные сообщества донных осадков и в других районах озера Байкал, включая зоны разгрузок газосодержащих минерализованных флюидов (Zemskaya et al., 2021; Lomakina et al., 2023). В исследованных кернах последовательности этого филума принадлежали в основном семействам *Anaerolineaceae* и *Dehalococcoidaceae*, и лишь небольшой их процент некультивируемым *Chloroflexota* из разных кластеров (KD4-96, JG30-KF-CM66 и SHA-26) (Рис. 3). При этом максимальная относительная численность первого семейства наблюдалась в сообществах осадков ниже 200 см, а второго на разных глубинах, включая сообщества восстановленных каналов. Бактерии класса *Anaerolineae* являются облигатными анаэробами и вторичными ферментерами, тогда как представители класса *Dehalococcoidia* органотрофными гомоацетогенами (Fincker et al., 2020; Vuillemin et al., 2020). Часть из них, в процессе дыхания используют кислород в качестве конечного акцептора электронов, участвуя в ферментации сахаров и аминокислот в анаэробных условиях (Hug et al., 2013).

В сообществах поверхностных образцов St7GC1 и до глубины 15 см, а также в окисленном канале (St7GC2\_35-38) наблюдалась также высокая относительная численность представителей *Nitrospirota* (12.7, 18.5 и 12.7% соответственно), вклад которых в нижерасположенных осадках не превышал 5,2%. Сообщества этих слоев осадка различались между собой вкладом *Gammaproteobacteria*, процент которых в окисленном канале был менее 1%, и около 20% в поверхностных осадках, что может определяется наличием в этой зоне источников энергии, в частности кислорода. Последовательности этого класса принадлежали порядкам *Burkholderiales* и *Methylococcales*. Представители последнего порядка, аэробные метанотрофы в основном характерны для поверхностных осадков, где их вклад в кернах St5 достигал 1.5 и 8.3%, а в кернах St7 10.6-16.8%. Сообщества окисленного (St7GC2\_35-38) и восста-

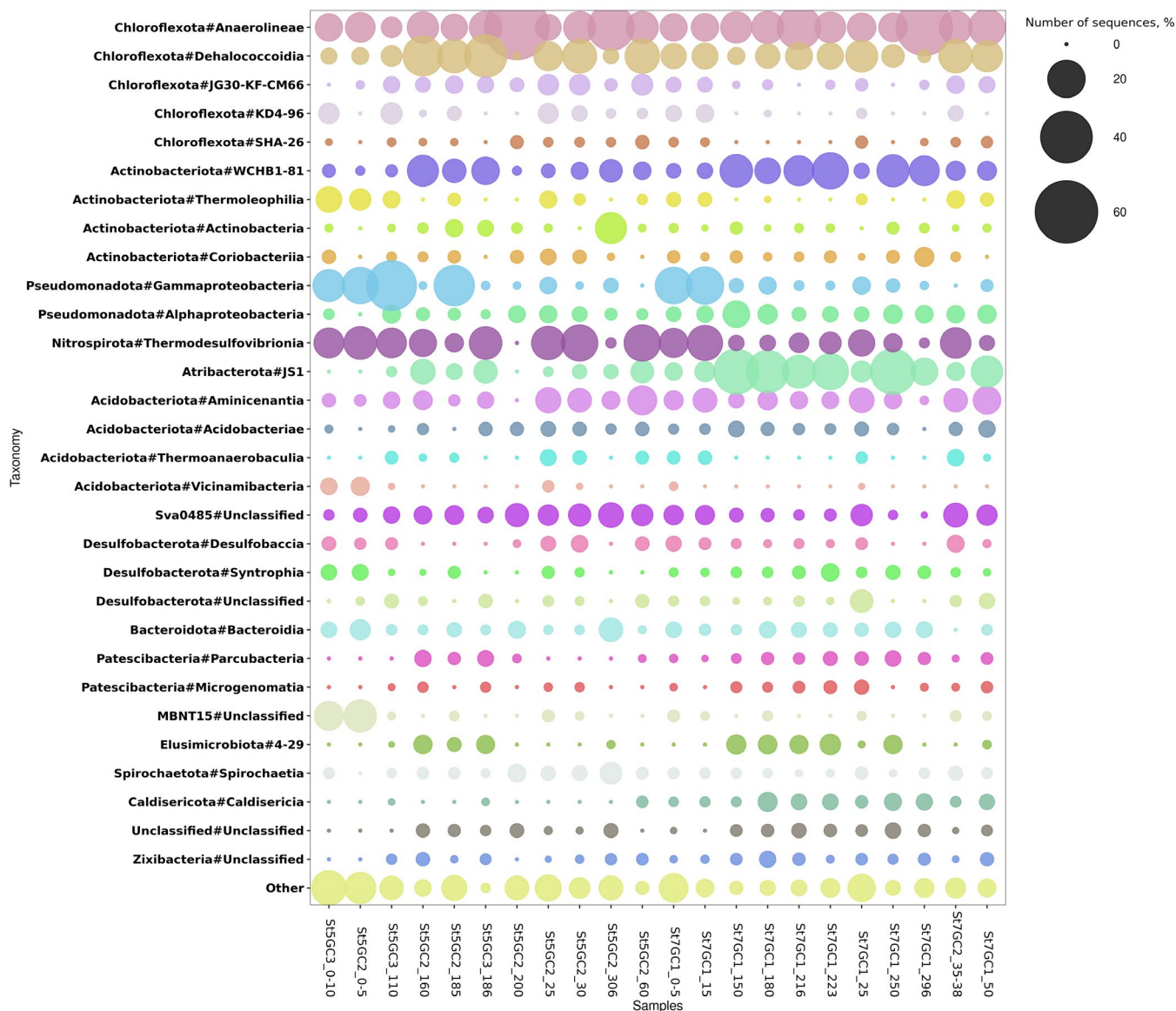


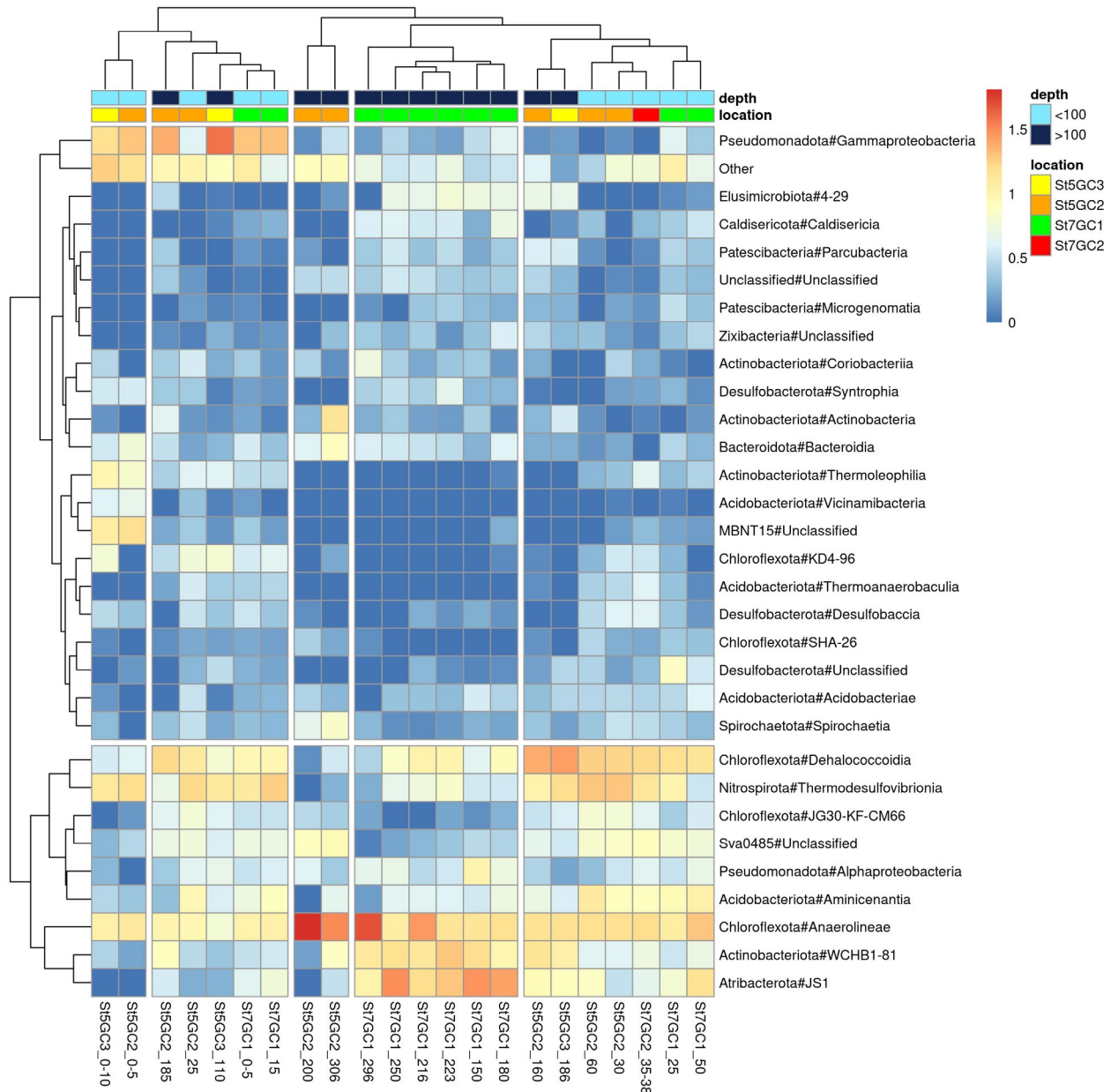
Рис.3. Средняя относительная численность (16S rRNA) ключевых бактериальных таксонов в сообществах из разных слоев донных осадков метанового сипа Красный Яр.

новленного (St7GC1\_50) каналов также характеризовались более высоким вкладом последовательностей *Caldatribacteriota* (13.7 и 3.7%) и *Nitrospirota* (12.7 и 2.7%) (Рис. 4), что согласуется с их метаболическими возможностями. Хемоорганогетротрофные *Caldatribacteriota* участвуют в окислении пептидов, аминокислот, жирных кислот и простых сахаров посредством аэробного и анаэробного дыхания (Mori et al., 2009; Carr et al., 2015; Nobu et al., 2016). Поэтому они преобладали в аноксигенных осадках, где их вклад варьировал от 5.3 до 30% от общего количества последовательностей, при минорном вкладе в поверхностных (до 3.4%). Среди *Nitrospirota* наиболее многочисленны последовательности класса *Thermodesulfovibrionia*, для которых показано участие в процессах окисления водорода, восстановления сульфатов, нитратов и диспропорционирования серы (Umezawa et al., 2022), что позволяет им выживать в широком диапазоне условий среды. Сообщества нижерасположенных слоев осадка имели сходную структуру, лишь в образце St7GC1\_25 регистрировался высокий процент представителей *Patescibacteria* (33.3%), составляющих в

других слоях не более 4.6%.

Структура сообществ в поверхностных слоях кернов St5 отличалась от наблюдаемой в сообществах St7 наличием представителей кандидатного филума MBNT15 (14 и 11.3% соответственно). Кроме того, в сообществах исследованных кернов St5 значительно меньше относительная численность последовательностей *Caldatribacteriota* (0 - 7.8%), и в глубинных слоях *Desulfobacterota* (0–0.7%) при более высоких их значениях в окисленных каналах St5GC2\_185 и St5GC3\_110 (1.6–3.5%). В последних сообществах доминировали *Gammaproteobacteria* (24 и 37%), причем их относительная численность превышала таковую в поверхностных осадках (14–19%). В сообществах окисленных каналов (St5GC3\_110 и St5GC2\_185) преобладали последовательности порядка *Methylococcales* (24.5 и 13.5%, соответственно), процент которых превышал отмечаемые значения в поверхностных и глубинных осадках этого керна, а также и в восстановленных каналах (0.3–1.8%). В глубинном слое St5GC2\_200, где регистрировались повышенные концентрации гидрокарбонат и нитрат ионов, структура бактери-





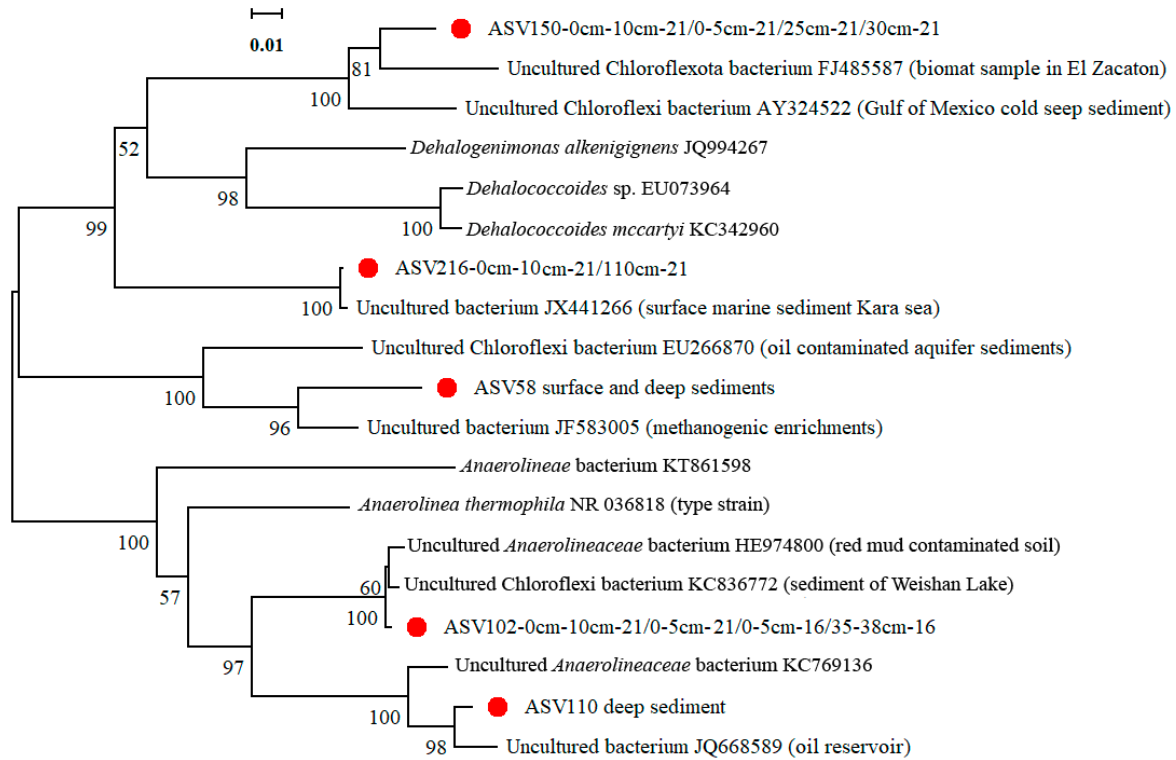
**Рис.4.** Тепловая карта, показывающая различия в относительном обилии бактериальных классов в разных слоях кернов на основе расстояний Брея-Кертиса. Цветами показано нормализованное относительное обилие таксонов в разных слоях кернов.

ального сообщества отличалась от других преобладанием (70%) последовательностей *Anaerolineaceae* (*Chloroflexota*) и минорном вкладе таксонов, доминирующих в вышерасположенных осадках (Рис. 3). Присутствие таксономически разнообразных представителей этого филума в разных экотопах подтверждается филогенетическим анализом. Последовательности *Chloroflexota* в исследованных ядрах формировали на филогенетическом древе 5 кластеров (Рис. 5) с неклассифицируемыми последовательностями. Два из них объединяли последовательности либо из глубинных и ассоциированных с ГГ, либо из поверхностных слоев осадков. Часть последовательностей из поверхностных осадков и окисленных каналов формировали еще два кластера: один представлен последовательностями из поверхностных и окисленного канала St5GC3\_110, второй из поверхностных и окисленного канала

St7GC2\_35-38. Еще один кластер был сформирован последовательностями, встречающимися во всех экотопах.

С помощью диаграмм Венна определены общие бактериальные последовательности ампликонов (ASV) в сообществах из разных экотопов. Количество общих ASV в сообществах кернов St7 составляло 4%, среди них отмечались последовательности GIF9 (сем. *Dehalococcoidia*), MSB-5B2 (*Anaerolineae*), *Cutibacterium* (*Actinobacteriota*), *Thermodesulfovibrionia* (*Nitrospirota*), JS1 (*Caldatribacteriota*), *Spirochaetota*, Sva0485, *Zixibacteria*. Общих ASV в сообществах кернов St5 было менее значительным (<1%), они принадлежали также GIF9 (*Dehalococcoidia*), Sva0485, *Thermodesulfovibrionia* (*Nitrospirota*). Разнообразие общих ASV в сообществах окисленных и восстановленных каналов в оба года исследований составляло 4%, среди них идентифицированы последователь-





**Рис.5.** Филогенетическое дерево представителей филума *Chloroflexota* на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК, указывающее на положение бактерий из разных слоев донных отложений. Масштабная линейка показывает эволюционное расстояние, соответствующее одной нуклеотидной последовательности на 100 нуклеотидов.

ности GIF9 и *Thermodesulfovibrionia*, а также встречающиеся в определенных экотопах *Cutibacterium*, WCHB1-8 (*Actinobacteriota*), MSB-5B2 (*Anaerolineae*) и *Spirochaetota*.

В библиотеках генов 16S рРНК архей в исследованных кернах выявлены последовательности 9 филумов, среди которых наиболее представлены последовательности *Thermoproteota* (42%) (ранее *Crenarchaeota*), *Thermoplasmata* (31%), *Halobacteriota* (18%). Представители *Nanoarchaeota* (4%), *Nadarchaeota* (3%), *Iainarchaeota* (0.5%), *Euryarchaeota* (0.8%), *Aenigmarchaeota* (0.3%), *Asgardarchaeota* (0.6%) составляли минорную часть сообществ (Рис. 6). Среди *Thermoproteota* во всех исследуемых сообществах доминировали *Bathyarchaeia* (от 5.5 до 70.5% от всех последовательностей), в основном относящиеся к неклассифицированным. *Bathyarchaeia* играют значительную роль в глобальном цикле углерода и являются наиболее распространенной группой микроорганизмов в анаэробных экосистемах (Feng et al., 2019). Обычно в байкальских осадках эти археи выявлялись в глубинных слоях осадка, тогда как в кернах исследованного района их вклад был значительным и в поверхностных (до 37%). Доминирующие в поверхностных осадках других районов аэробные археи *Nitrososphaeria* (*Thermoproteota*) представлены в большей степени аммоний-окисляющими представителями сем. *Nitrosopumiliaceae*, и менее, последовательностями сем. *Nitrososphaeraceae* (Lomakina et al., 2018; Zemskaya et al., 2018). Последовательности первого семейства составляли около 13% в поверхностных слоях кернов St7 и в глубинном слое St5GC2\_306. В других образцах исследованного района они отно-

сились к минорной компоненте сообществ архей (0.4–3.5%). Археи, участвующие в продуцировании метана характерны для осадков озера Байкал. Среди метаногенных архей наибольший вклад составляли последовательности порядка *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmata*), потребляющие неконкурентные C1-метилированные соединения. Относительная численность этого порядка варьировала в сообществах кернов St7 от 12 до 38%, и в кернах St5 от 5 до 41%. Кроме того, в сообществах исследованных кернов на разных глубинах отмечены ацетокластические и гидрогенотрофные археи порядков *Methanomicrobiales* (в основном рода *Methanoregula*, 1.2–12.4%) и *Methanosarcinales* (в основном рода *Methanosaeta*, 0.3–4.5%). Относительная численность участвующих в анаэробном окислении метана *Methanoperedens* (порядок *Methanosarcinales*) была высокой на глубинах от поверхности и до 25 см (до 12.8%), а также в окисленном и восстановленном каналах St5GC3\_110 и 186 см (9.7–20.7% соответственно). Как мы отмечали выше, в этих же образцах наблюдался высокий процент аэробных метанотрофов, что подтверждает наличие разнообразных экологических условий в каналах, позволяющих развиваться как аэробным, так и анаэробным микроорганизмам.

В осадочных отложениях этого района среди других таксонов, широко распространенных в глубинных осадках, обнаружены археи Marine Benthic Group D (сейчас *Thermoprofundales*) - миксотрофные продуцирующие H<sub>2</sub> (Zhou et al., 2019; Zhang et al., 2022). Представители этого таксона и DHVEG-1 вносили небольшой вклад (не более 2%) в сообщества архей. Процент общих архейных ASV в сообществах

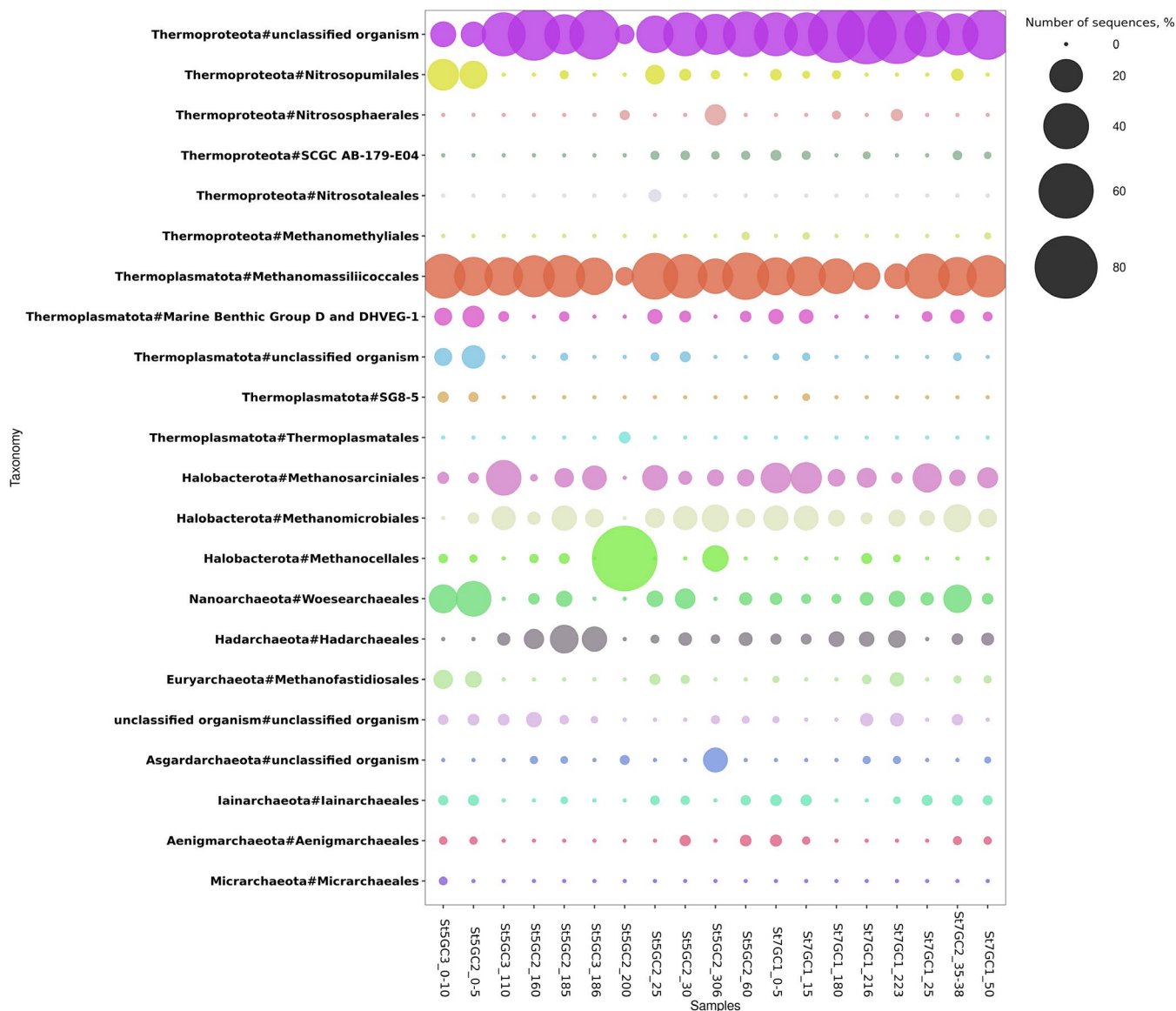


Рис.6. Таксономический состав архейных сообществ из донных отложений метанового сипа Красный Яр. На основе анализа гена 16S рPHK и классификации из базы данных SILVA с порогом достоверности 80 %.

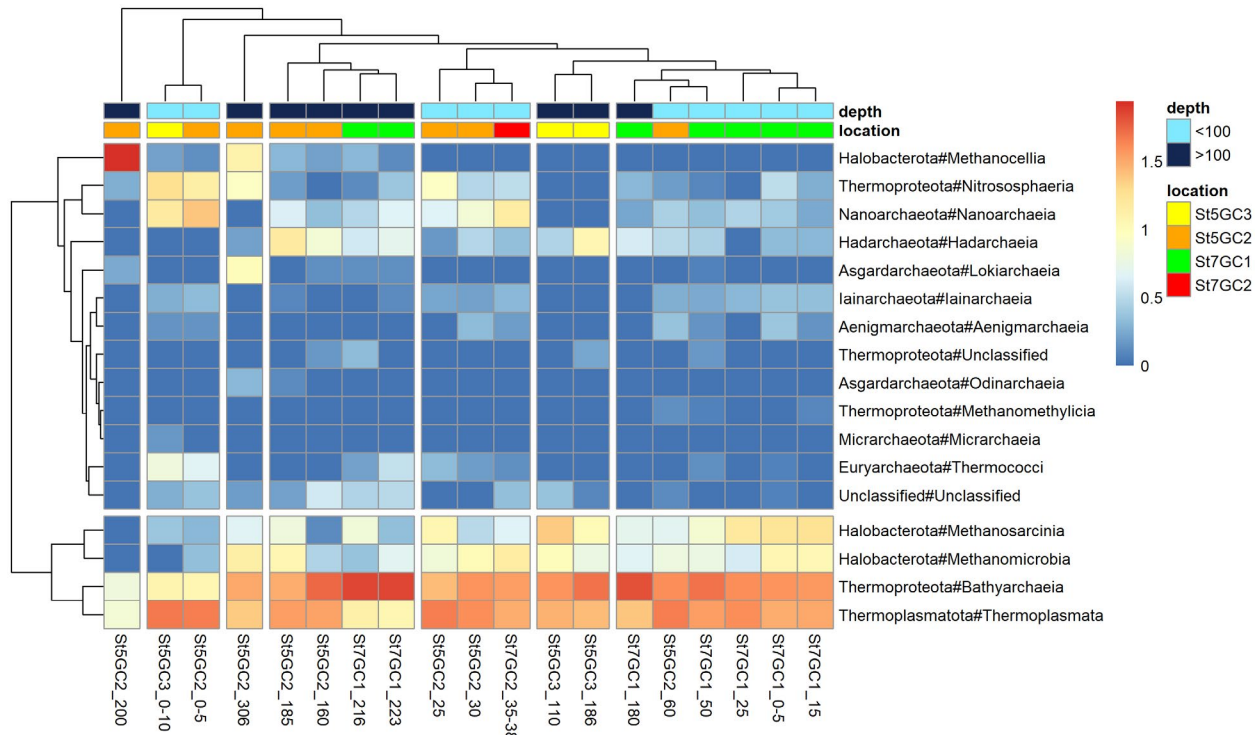
St7 составил 7%, среди которых идентифицированы последовательности *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) и *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmatota*), тогда как для сообществ St5, общими были ASV последнего филума (3%). Сообщества из окисленных и восстановленных каналов характеризовались присутствием ASV двух вышеуказанных филумов и представителей *Methanoregula* (*Halobacteriota*).

Тепловая карта, демонстрирующая кластеризацию (сходство Брея – Кертиса) изученных образцов на основе относительной численности ключевых семейств архей (Рис. 7) свидетельствует о различии структуры сообществ в разных слоях осадочной толщи в оба года исследований. Присутствие в поверхностных осадках строгих анаэробных метаногенов и анаэробных метанотрофных архей *Methanoperedens*, а в глубинных восстановленных осадках аэробных аммоний-окисляющих Nitrosopumilaceae может быть следствием миграции разнонаправленных флюидопотоков, поддерживающих развитие широкого спектра таксонов. Кроме того, на развитие архей может вли-

ять и различие физико-химических условий. Археи, принадлежащие одному филуму, по-разному коррелировали (положительно или отрицательно) с химическими параметрами среды обитания (корреляция Спирмена) (Рис. 8). Они формировали два кластера с небольшим числом значимых корреляций между отдельными таксонами архей и концентрацией ионов в поровой воде и глубиной осадочной толщи. Положительная корреляция отмечалась между глубиной, концентрацией  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и археями *Methanocella* (*Halobacteriota*), *Hadarchaeia* (*Hadarchaeota*) и *Asgardarchaeota*. Более широкий спектр таксонов был отрицательно взаимосвязан с этими параметрами, поскольку в глубоких восстановленных отложениях осадочные субстраты обеднены и это могло ограничить развитие многих видов (Fincker et al., 2020; Vuillemin et al., 2020).

#### 4. Обсуждение

Донные отложения в районе метанового сипа визуально сходны с ранее приведенным описанием,



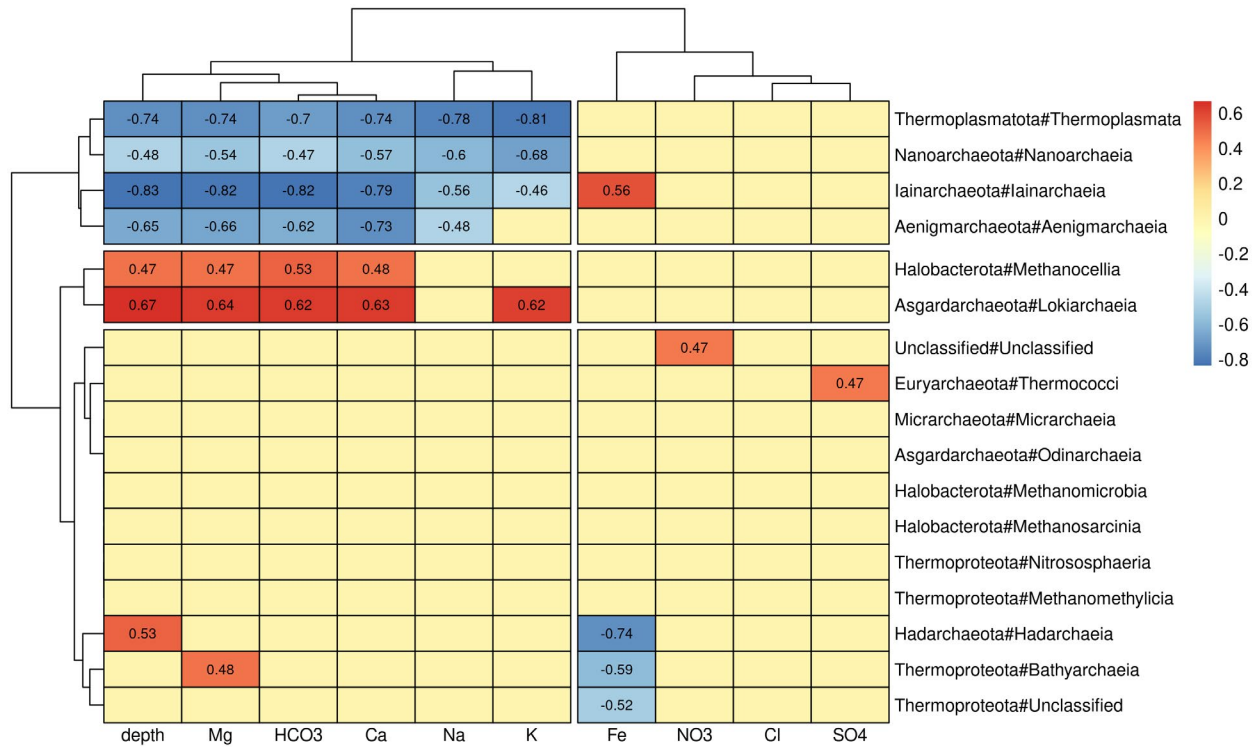
**Рис.7.** Тепловая карта, показывающая различие относительного обилия архей (на уровне порядков) в разных слоях кернов на основе расстояний Брея-Кертиса. Цветами показано нормализованное относительное обилие таксонов в разных слоях кернов.

они газонасыщены, характеризуются (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020) трещиноватостью, присутствием окисленных и восстановленных каналов, а также линзовидными скоплениями газогидратов. Профили концентраций основных ионов также согласуются с ранее полученными данными (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020), которые свидетельствуют как о наличии адвекции флюидов снизу (St7 GC1), так и о поступлении придонных озерных вод в осадочные породы исследованных кернов (St7 GC1 и St5 GC2). Также сохраняются тренды  $\text{HCO}_3^-$  в верхних нескольких метрах анаэробной зоны байкальских отложений, которые обусловлены процессами подводного выветривания, происходящими в более глубоких отложениях (Lomonosov, 1974). Поровые воды 2021 г. отличались высокими концентрациями  $\text{NO}_3^-$ , который является энергетически выгодным окислителем и используется микроорганизмами в диагенезе органического вещества. Его значительные концентрации регистрировались в отдельные годы лишь в некоторых районах разгрузок, что связывалось с поступлением более минерализованных гидротермальных, а также глубинных поровых вод (Granina, 2008). Наблюдаемые нами высокие концентрации этого иона в поверхностных осадках St5 и уменьшение с глубиной осадка могут быть обусловлены более активным потреблением этого иона в аноксигенной зоне по сравнению с насыщенными кислородом поверхностными осадками, что согласуется с таксономическим составом микробных сообществ. Использующие нитрат в качестве акцепторов электронов в процессе анаэробного окисления метана, археи *Methanoperedens* составляли достаточно высокий вклад в подповерх-

ностных слоях осадка, где наблюдалось уменьшение концентраций этого иона.

В донных отложениях метанового сипа Красный Яр обитают сложные микробные сообщества, участвующие в трансформации различных соединений и характерные для пресноводных озер (Newton et al., 2011; Winters et al., 2014; Zhang et al., 2015; Vuillemin et al., 2016; Vuillemin et al., 2018; Han et al., 2020). Доминирование в сообществах представителей *Chloroflexota* вполне объяснимо, поскольку они участвуют в разложении растительных соединений, что подтверждено наличием в их геномах путей разложения целлюлозы, крахмала, длинноцепочечных сахаров и пирогаллола (Hug et al., 2013). Развитию органогетеротрофных бактерий в осадках озера Байкал способствует наличие лабильных источников ОВ – отцветавших диатомовых водорослей, в массе развивающихся в озере Байкал в весенний и осенний периоды (Votintsev et al., 1975). Вместе с тем, различие относительной численности и таксономической принадлежности этих бактерий не указывает на возрастающее значение анаэробного метаболизма с увеличением глубины. Как и в других озерах, это может быть следствием гетерогенности содержания органического углерода или разной интенсивности миграционных потоков и их компонентного состава (Hug et al., 2013). Широкий спектр филогенетических разнообразных ASV позволяют предполагать, что *Chloroflexota* адаптированы к изменяющимся окислительно-восстановительным условиям среды обитания, а широкая пластичность видов этого филума позволяет им занимать доминирующее положение на всех исследованных нами глубинах осадочной толщи при лимите энергетиче-





**Рис.8.** Тепловая карта корреляционных связей (корреляция Спирмена) между таксонами архей и концентрацией отдельных ионов в поровой воде исследованных отложений. Справа от тепловой карты разными цветами обозначены значения коэффициентов корреляции. Показаны коэффициенты  $p_v < 0.05$ .

ских ресурсов. Присутствие других таксонов, хотя и менее представленных в исследованных кернах, обеспечивает дальнейшую деструкцию, в результате которой образуются субстраты, используемые другими микроорганизмами. Так, присутствующие в сообществах анаэробные бактерии *Desulfobacterota*, способны обеспечивать окисление короткоцепочечных жирных кислот (*Syntrophaceae*, *Smithellaceae*), либо ацетата (*Desulfobaccaceae*) в синтрофном взаимодействии с метаногенными археями (Galushko and Kuever, 2019). А представители хемоорганотрофных *Atribacterota* и *Caldisericota*, участвуют в окислении пептидов, аминокислот, жирных кислот и простых сахаров в процессах аэробного и анаэробного дыхания (Mori et al., 2009; Carr et al., 2015; Nobu et al., 2016).

Мы не наблюдали особых изменений в структуре сообществ метаногенных архей, их таксономический состав и разнообразие соответствовали отмечаемым в осадках других районов озера. Среди участников анаэробного окисления метана в основном детектировались археи сем. *Methanoperedenaceae*, использующие нитраты в качестве акцептора электронов (Raghoebarsing et al., 2006), тогда как бактерии порядка *Methylomirabiliales* (*Methylomirabiota*), использующие в качестве акцептора электронов нитрит, относились к минорной компоненте сообществ. Явные различия наблюдались между сообществами окисленных и восстановленных каналов, а также при сравнении с сообществами из других слоев кернов. Сообщества окисленных каналов (St5GC2\_110 и 185 см) характеризовались присутствием значительного количества последовательностей аэробных метанотрофных бактерий сем.

*Methylophilaceae* и *Methylomonadaceae*. Их высокая относительная численность на глубине ниже 1 м может быть обусловлена поступлением в аноксигенную зону придонных вод, насыщенных кислородом и содержащих клетки метанотрофов. Постепенное истощение кислорода при наличии ионов нитрата могли также способствовать в поддонных осадках развитию анаэробных, окисляющих метан по нитразависимому пути *Methanoperedenaceae* (Lomakina et al., 2020). Кроме того, на структуру сообществ в осадках исследованного сипа может влиять растворение ГГ при миграции флюидов, которое приводит к распреснению поровых вод. Этим можно объяснить уменьшение вклада аэробных аммоний окисляющих архей семейства *Nitrosopumiliaceae* (*Thermoproteota*) в поверхностных осадках, а в глубинных – бактерий филума *Caldatribacteriota*.

## 5. Выводы

Известно, что микробные сообщества в глубоких озерных отложениях структурируются по принципу энергосберегающего ферментативного метаболизма с постепенным истощением акцепторов электронов в поровой воде (Berg et al., 2022) и лабильного ОВ (Glombitza et al., 2013). В осадках метанового сипа Красный Яр, в зоне миграции флюидопотоков зафиксированы изменения в структуре микробных сообществ, в основном в окисленных каналах, тогда как вне их, разнообразие как бактерий, так и архей было сходно с отмечаемым в осадках других районов: на всех исследованных глубинах осадочной толщи выявлялись метилотрофные метаногены и микроорганизмы, участвующие



в разных этапах ферментации ОВ. Сходство структуры сообществ в аноксигенных осадках и восстановленных каналах мало различалось что, скорее всего, определялось наличием акцепторов электронов на момент исследования в этих экотопах. Также очевидно, что постепенное истощение источников энергии и выравнивание химических условий, будет приводить с течением времени к исчезновению аэробных микроорганизмов в каналах и доминированию таксонов, характерных для аноксигенной зоны. Как показали наши исследования, наличие аэробных бактерий в осадках отмечалось до глубины 2 м, что совпадает с геохимическими и геотермическими показателями, определяющими зону активной миграции придонных вод (Pogodaeva et al., 2020). Структура микробных сообществ и химических параметров в осадках метанового сипа Красный Яр отличается также от наблюдаемой в районе поднятия Посольская Банка более активным влиянием придонных вод на структуру в аноксигенной зоне, тогда как в зоне флюидной петли отмечалось большее влияние глубинных миграционных потоков, перемещающих на поверхность дна озера анаэробных бактерий. Также очевидно, что миграционные потоки способствуют деструкции захороненного органического вещества, поставляя субстраты, способствующие развитию аэробных и анаэробных микроорганизмов в подповерхностных осадках.

## Благодарности

Исследования выполнены в рамках государственного задания ЛИН СО РАН 0279-2021-0006, а также с использованием оборудования Core Centrum «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» в ARRIAM. Авторы выражают благодарность Иркутскому суперкомпьютерному центру СО РАН за предоставление доступа к НРС-кластеру «Академик В.М. Матросов».

## Соблюдение этических стандартов

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

## Конфликт интересов

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

## Список литературы

Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J. et al. 2019. Biogeochemical processes at the Krasny Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps. *Geo-Marine Letters* 39(1): 59–75. DOI: [10.1007/s00367-019-00560-8](https://doi.org/10.1007/s00367-019-00560-8)

Andrews S. 2020. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. available online: URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed on 1 February 2022)

Baram G.I., Vereshchagin A.L., Golobokova L.P. 1999. Microcolumn high performance liquid chromatography with UV detect in for the determination of anion in environmental materials. *Journal of Analytical Chemistry* 54: 854–857.

Berg J.S., Lepine M., Laymand E. et al. 2022. Ancient and modern geochemical signatures in the 13,500-year sedimentary record of Lake Cadagno. *Frontiers in Earth Science* 9. DOI: [10.3389/feart.2021.754888](https://doi.org/10.3389/feart.2021.754888)

Brown K., Westbrook G.K. 1988. Mud diapirism and subcretion in the Barbados Ridge accretionary complex – the role of fluids in accretionary processes. *Tectonics* 7: 613–640.

Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. et al. 2014. Flexible trimmer for Illumina sequence data *Bioinformatics* 30: 2114–2120.

Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583.

Callahan B.J., Sankaran K., Fukuyama J.A. et al. 2016. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000 Research* 5: 1492.

Carr S.A., Orcutt B.N., Mandernac K.W. et al. 2015. Abundant Atribacteria in deep marine sediment from the Adélie Basin, Antarctica. *Frontiers in microbiology* 6: 872. Advance online publication. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00872](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00872)

Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Lomakina A.V. et al. 2016. Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk Bank bottom sediments, Lake Baikal. *Microbiology* 85(6): 672–680 (in Russian) DOI: [10.1134/s0026261716060060](https://doi.org/10.1134/s0026261716060060)

Feng X., Wang Y., Zubin R. et al. 2019. Core metabolic features and hot origin of *Bathyarchaeota*. *Engineering* 5(3): 498–504. DOI: [10.1016/j.eng.2019.01.011](https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.01.011)

Fincker M., Huber J.A., Orphan V.J. et al. 2020. Metabolic strategies of marine subsea floor Chloroflexi inferred from genome reconstructions. *Environmental Microbiology* 22(8): 3188–3204. DOI: [10.1111/1462-2920.15061](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15061)

Galushko A., Kuever J. 2019. *Desulfobacca*. In: M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Advance online publication. DOI: [10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2](https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01061.pub2)

Ginzburg G.D., Solov'ev V.A. 1994. Submarine gas hydrates. St-Petersburg: VNII Okeanologiya Press. (in Russian)

Glombitza C., Stockhecke M., Schubert C. et al. 2013. Sulfate reduction controlled by organic matter availability in deep sediment cores from the saline, alkaline Lake Van (Eastern Anatolia, Turkey). *Frontiers in Microbiology* 4. DOI: [10.3389/fmicb.2013.00209](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00209)

Granina L.Z. 2008. Early diagenesis of bottom sediments in Lake Baikal. Academic Publish House “Geo”. (in Russian)

Han X., Schubert C.J., Fiskal A. et al. 2020. Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments. *Environmental Microbiology* 22(8): 3446–3462. DOI: [10.1111/1462-2920.15115](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15115)

Hedberg H.D. 1974. Relation of methane generation to under compacted shales, shale diapirs, and mud volcanoes. *AAPG Bulletin* 58: 661–673.

Hug L.A., Castelle C.J., Wrighton K.C. et al. 2013. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome* 1(1): 22. DOI: [10.1186/2049-2618-1-22](https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-22)

Khabuev A.V., Chensky D.A., Solovieva M.A. et al. 2016. Gas hydrate resources estimation by geophysical methods in the zone of underwater gas discharge at the seep “Krasny Yar” of Lake Baikal. *Proceedings of the Siberian Branch of the Earth Sciences Section of the Russian Academy of Natural Sciences*. 1: 67–74. (in Russian)

- Khlystov O., De Batist M., Shoji H. et al. 2013. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties. *Journal of Asian Earth Sciences* 62(1): 162-166 DOI: [10.1016/j.jseaes.2012.03.009](https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2012.03.009)
- Klerkx J., De Batist M., Poort J. et al. 2006. Tectonically controlled methane escape in Lake Baikal. *Advances in the geological storage of carbon dioxide*. NATO Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences. Netherlands: IOS PRESS Springer. 65: 203-219. DOI: [10.1007/1-4020-4471-2\\_17](https://doi.org/10.1007/1-4020-4471-2_17)
- Kopf A. 2002. Significance of mud volcanism. *Reviews of Geophysics* 40(2): 2-52 DOI: [10.1029/2000RG000093](https://doi.org/10.1029/2000RG000093)
- Kuzmin M.I., Karabanov E.B., Kawai T. et al. 2001. Deep drilling on Lake Baikal: main results. *Russian Geology and Geophysics* 42: 8–34.
- Logatchev N.A. 1993. History and geodynamics of the Lake Baikal rift in the context of the Eastern Siberia rift system: a review. *Bulletin des centres de recherches exploration-production Elf-Aquitaine* 17(2): 353-370.
- Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Pogodaeva T.V. et al. 2018. Anaerobic methane oxidation in enrichment cultures from deep sediments of a mud volcano Peschanka (South Baikal). *Microbiology* 87(3): 317–325. (In Russian). DOI: [10.1134/s0026261718030049](https://doi.org/10.1134/s0026261718030049)
- Lomakina A., Pogodaeva T., Kalmychkov G. et al. 2020. Diversity of NC10 Bacteria and ANME-2d Archaea in sediments of fault zones at Lake Baikal. *Diversity* 12(1): 1-19. DOI: [10.3390/d12010010](https://doi.org/10.3390/d12010010)
- Lomakina A., Bukin S., Shubenkova O. et al. 2023. Microbial communities in ferromanganese sediments from the northern basin of Lake Baikal (Russia). *Microorganisms* 11(7): 1865. DOI: [10.3390/microorganisms11071865](https://doi.org/10.3390/microorganisms11071865)
- Lomonosov I.S. 1974. *Geochemistry and formation of modern hydrotherms in the Baikal rift*. Novosibirsk: Nauka (in Russian).
- Milkov A.V. 2005. Molecular and stable isotope compositions of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings. *Organic Geochemistry* 36 (5): 681–702. DOI: [10.1016/j.orggeochem.2005.01.010](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2005.01.010)
- Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y. et al. 2009. *Caldisericum* exile gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(11): 2894–2898 DOI: [10.1099/ijs.0.010033-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.010033-0)
- Naudts L., Khlystov O., Granin N. et al. 2012. Stratigraphic and structural control on the distribution of gas hydrates and active gas seeps on the Posolsky Bank, Lake Baikal. *Geo-Marine Letters* 32(5): 395-406. DOI: [10.1007/s00367-012-0286-y](https://doi.org/10.1007/s00367-012-0286-y)
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A. et al. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(1): 14–49. DOI: [10.1128/mmr.00028-10](https://doi.org/10.1128/mmr.00028-10)
- Nobu M.K., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K. et al. 2016. Phylogeny and physiology of candidate phylum ‘Atribacteria’ (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *International Society for Microbial Ecology* 10(2): 273–286. DOI: [10.1038/ismej.2015.97](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.97)
- Pogodaeva T.V., Poort J., Aloisi G. et al. 2020. Fluid migrations at the Krasny Yar methane seep of Lake Baikal according to geochemical data. *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 123–131. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.08.003)
- Raghoebarsing A.A., Arjan P.K., van de Pas-Schoonen T. et al. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 13, 440(7086): 918-921. DOI: [10.1038/nature0461](https://doi.org/10.1038/nature0461)
- Sahm K., John P., Nacke H. et al. 2013. High abundance of heterotrophic prokaryote in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles* 7: 649–662. DOI: [10.1007/s00792-013-0548-2](https://doi.org/10.1007/s00792-013-0548-2)
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1987. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scholz C.A., Hutchinson D.R. 2000. Stratigraphic and structural evolution of the Selenga delta accommodation zone, Lake Baikal rift, Siberia. *International Journal of Earth Sciences* 89(2): 212-228. DOI: [10.1007/s005310000095](https://doi.org/10.1007/s005310000095)
- Umezawa K., Kojima H., Kato Y. et al. 2022. Corrigendum to “*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*”. *Systematic and Applied Microbiology* 45(6): 126323. Advance online publication. DOI: [10.1016/j.syapm.2022.126323](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126323)
- Vanneste H., Kelly-Gerrey B.A., Connelly D.P. et al. 2011. Spatial variation in fluid flow and geochemical fluxes across the sediment–seawater interface at the Carlos Ribeiro mud volcano (Gulf of Cadiz). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 1124–1144. DOI: [10.1016/j.gca.2010.11.017](https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.11.017)
- Votintsev K.K., Meshcheryakova A.I., Popovskaya G.I. 1975. *Cycle of organic matter in Lake Baikal*. Novosibirsk: Nauka.
- Vuillemin A., Friese A., Alawi M. et al. 2016. Geomicrobiological features of ferruginous sediments from Lake Towuti, Indonesia. *Frontiers in Microbiology* 7. Advance online publication. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01007](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01007)
- Vuillemin A., Ariztegui D., Horn F. et al. 2018. Microbial community composition along a 50 000-year lacustrine sediment sequence. *FEMS Microbiology Ecology* 94(4): Advance online publication. DOI: [10.1093/femsec/fiy029](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy029)
- Vuillemin A., Kerrigan Z., D’Hondt S. et al. 2020. Exploring the abundance, metabolic potential and gene expression of subsurface Chloroflexi in million-year-old oxic and anoxic abyssal clay. *FEMS Microbiology Ecology* 96(12). DOI: [10.1093/femsec/fiaa223](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa223)
- Von Huene R., Lee H.J. 1983. The possible significance of pore fluid pressures in subduction zones. *The American Association of Petroleum Geologists Members* 34: 781–791.
- Wetzel R.G., Likens G.E. 1991. *Limnological Analyses*. New York: Springer.
- Winters A.D., Marsh T.L., Brenden T. et al. 2014. Molecular characterization of bacterial communities associated with sediments in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 40(3): 640–645. DOI: [10.1016/j.jglr.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.04.008)
- Yu Y., Lee C., Kim J. et al. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 670–679. DOI: [10.1002/bit.20347](https://doi.org/10.1002/bit.20347)
- Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V. et al. 2010. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3. *Geo-Marine Letters* 30(3–4): 411–425. DOI: [10.1007/s00367-010-0199-6](https://doi.org/10.1007/s00367-010-0199-6)
- Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Mamaeva E.V. et al. 2018. Composition of microbial communities in sediments from Southern Baikal containing Fe/Mn concretions. *Microbiology* 87(3): 291-302. DOI: [10.7868/S0026365618030072](https://doi.org/10.7868/S0026365618030072)
- Zemskaya T.I., Bukin S.V., Lomakina A.V. et al. 2021. Microorganisms in the sediments of Lake Baikal, the deepest and oldest lake in the world. *Microbiology* 90(3): 298–313. DOI: [10.1134/S0026261721030140](https://doi.org/10.1134/S0026261721030140)
- Zhang J., Yang Y., Zhao L. et al. 2015. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau

freshwater lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(7): 3291–3302. DOI: [10.1007/s00253-014-6262-x](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6262-x)

Zhang X., Huang Y., Liu Y. et al. 2022. An ancient respiratory system in the widespread sedimentary archaea *Thermopfundales*. *Molecular Biology and Evolution* 39(10): msac213. DOI: [10.1093/molbev/msac213](https://doi.org/10.1093/molbev/msac213)

Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G. et al. 2019. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermopfundales* (MBG-D archaea) *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 13(4): 885–901. DOI: [10.1038/s41396-018-0321-8](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0321-8)

# The modern methods development for microbiological water quality assessment in lakes



Zolotarev V.A.\*, Kuznetsova E.V., Fedorov R.A.

*I.D. Papanin Institute for biology of inland waters RAS, Borok, Yaroslavl obl., 152742, Russia*

**ABSTRACT.** The functional diversity of free-living aquatic protozoans is discussed with respect to the feeding ecology, life strategies and water quality. Heterotrophic nanoflagellates (HNF) are known as most important grazers of bacteria in many aquatic ecosystems. Recent studies of flagellate feeding processes indicated that there are significant species-specific variability regarding the food uptake and food selection of bacterivorous flagellates. The Choanoflagellida have an essential role in microbial food webs contributing to a process of self-purification of water bodies as well as are used in monitoring systems. We show that diversity and relative abundance of ciliates and other protozoans can be used as indicators of toxic pollution and acidification. Multivariate statistics were used to design “the scale of toxicity” across a gradient of toxicant stress and organic compounds. A new index of periphyton flagellates (IPF) as indicator of the trophic status of a water-body and a simplified index for a sublethal toxicity assessment were developed.

**Keywords:** functional morphology, aquatic protists, heterotrophic nanoflagellates, ciliates, naked amoebae, index of periphyton flagellates, protozoan index of sublethal toxicity

**For citation:** Zolotarev V.A., Kuznetsova E.V., Fedorov R.A. The modern methods development for microbiological water quality assessment in lakes // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1180-1187. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1180

## 1. Introduction

At the beginning of the 21st century, the world is facing a global water quality crisis. The lack of wastewater management has a direct impact on the biological diversity of aquatic ecosystems, disrupting the fundamental integrity of our life support systems (Corcoran et al., 2010). The earliest detection of hazardous events in water supplies, and pollution prevention are the most cost-effective. Many biological early warning systems have been developed in recent years that evaluate the physiological and behavioral responses of whole organisms to water quality, cell-or tissue-based biosensors may be quite a bit less expensive (van der Schalie et al., 2001).

But the absolute cost is less important than the cost-benefit aspects. Physiological and behavioral responses of whole organisms usually most robust for acute toxicity, the more important for detecting hazardous events in aquatic ecosystems is long-term monitoring of sublethal, chronic toxicity.

The more favorable cost-benefit aspects could provide microbial communities due to the role of microbes as the basis of food webs and the primary agents for global biogeochemical cycles. These communities are forming a major part of microbial “loop”, transforming up to 90% of primary production (Finlay, 2002).

## 2. Materials and methods

Studies of microperiphyton communities were conducted in lakes of Karelia, the Rybinsk reservoir, Lake Baikal, Ladoga, acidic lakes of Darwin National Park, in temporal natural wetlands and in experimental microcosms. The basic problem in analysing aquatic ecosystems is their complexity. The difficulty of locating, quantifying and replicating habitat types at various stations along an environmental or pollution gradient has led many investigators to use artificial substrate samplers (Cairns, 1982). By far, the most commonly used artificial substrate has been glass slides (76 x 26

\*Corresponding author.

E-mail address: [forest753@gmail.com](mailto:forest753@gmail.com) (V.A. Zolotarev)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 28, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





mm), which have the advantage that they can be collected under water by placing them in a jar of water, then transported to the laboratory and placed on the stage of the microscope for direct observation. Glass slides were used to detect the more fragile attached protozoans in vital microperiphyton communities. These substrates were suspended in the water in a vertical position by means of plastic holders, nylon rope, floats and anchors. Samples were collected by placing exposed slides into jars under the water surface. Two or four replicate substrates were generally harvested from each site on a given day; samples were transported to the laboratory as soon as possible. Samples that could not be analysed immediately were stored at the ambient temperature of the sampling location. All initial identifications and measurements of protozoans were made on living samples usually in 3–5 h after collection. Usually, direct counting was done under the light microscope with 300x magnification, using phase contrast.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Holistic approach and integrity of aquatic ecosystems: some basic considerations

Scientists often use models to reduce the complexity of intractable problems and to increase their understanding of the natural world. According to M. Kamshilov (Kamshilov, 1979), every ecosystem is a kind of a biosphere model in small size, having appropriate integrity and reflecting the biotic circulation of the Earth. Any ecosystem is arranged fractally, the essentials of phenomena at one scale are repeated at all smaller or larger scales (Mandelbrot, 1982). Biodiversity of the whole aquatic ecosystem depends on the biodiversity of the microbial communities (Algae, Protozoa, Bacteria) at the basis of the trophic pyramid. The term ‘indicator species’ is usual in literature on bioindication of water quality, but we more tend to accept the term ‘indicator communities’, or ‘model communities’, that could be robust both for biological monitoring and ecotoxicology (Zolotarev, 2007).

Protists can be served as model organisms: from the ground-breaking work of Gause in the 1930s to modern studies, protists have acted as models to assess fundamental ecological issues. Periphyton communities that are formed on artificial substrates can be defined as “periphyton model communities” (PMC). There are all the main elements of the biotic circulation in the PMC: phototrophs producing organic matter, heterotrophs, decomposers, and the substrate with adsorbed chemicals. The chief functional role of substrate-associated protozoans appears to be the processing of dead organic matter and its associated bacterial flora. Metapopulations of microbial organisms smaller than 1 mm occur worldwide wherever their required habitats are realised. This is a consequence of ubiquitous dispersal driven by huge population sizes, and the consequently low probability of local extinction (Finlay, 2002).

#### 3.2. Advantages of microorganisms in biomonitoring

Microorganisms should be used in biomonitoring for several compelling reasons. (1) A cosmopolitan distribution facilitates comparisons of test results in geographically different regions. (2) Problems of scale are diminished. (3) Replicability is as good as, or better than, tests with larger organisms. (4) Environmental realism is higher than in tests using larger organisms. (5) The number of test species is dramatically increased when using microorganisms, thus displaying natural variability much better than tests with a limited array of larger organisms. (6) Testing with microorganisms is less likely to antagonize animal rights activists. (7) Validation of laboratory tests in field enclosures is facilitated and much less costly (Cairns, 2005).

#### 3.3. Feeding strategies of hydrobionts and water quality

New methods based on periphyton communities using polyurethane foam units (PFU) as artificial substrates, was included into the monitoring system of China and Korea, (Jiang et al., 2007). We have found more than 120 species of heterotrophic nanoflagellates and more than 90 species of ciliates and sarcodines inhabiting the PMC (glass slides) in different water-bodies (Zolotarev, 2007). The chief functional role of substrate-associated protozoans appears to be the processing of dead organic matter and its associated bacterial flora.

Choanoflagellates (collared flagellates) are the typical periphytic protozoans characterized by an ovoid or spherical cell body 3-10 µm in diameter with a single apical flagellum surrounded by a collar. Movement of the flagellum creates water currents that can trap bacteria and detritus against the collar providing filter-feeding. Choanoflagellates have a huge impact on the food chain, aiding the flow of carbon from primary producers to higher trophic levels (including ourselves!). They comprise 5-40% of heterotrophic nanoflagellates and may filter between 10% and 25% of coastal surface water each day (King, 2005). The feeding strategies of the protozoa were used to assign species to functional, trophic groups.

The most widely distributed species at the initial stages of colonisation of glass slides (pioneer species) in different lakes and other water-bodies were the colonial choanoflagellates (*C. botrytis*), dominant in mesosaprobic waters.

So, *C. botrytis* can be served as a model organism. In mesosaprobic waters the species diversity of microperiphyton and the abundance of the colonial choanoflagellates are maximal (from 1000 cells per sq. cm to 50,000 cells per sq. cm), in oligosaprobic and polysaprobic waters the species diversity and abundance of choanoflagellates decreased.

Vagile bodonids feeding by active hunting, dominant in polysaprobic waters. In polysaprobic waters the abundance of the bodonids and other vagile flagellates rapidly increased (from 1000 cells per sq. cm to 10,000

cells per sq. cm), in oligosaprobic environments is minimal. A new simplified index of periphyton flagellates (IPF) as an indicator of the trophic status of a water-body was developed:

$$IPF = Sa/Sv \quad (1)$$

where Sa – the number of attached nanoflagellate species, Sv - the number of vagile species.

The index takes the greatest value in oligosaprobic waters (1.0–3.0), in mesosaprobic waters (0.3–1.0), and lowest in polysaprobic waters (0–0.3). A close correlation ( $r$ ) between IPF and dissolved organic matter and water colour was detected ( $r$  ranged from -0.823 to -0.744). The value of Sf (the number of all flagellates species) highly correlated with primary productivity and pH on the other side ( $r$  ranged from -0.929 to -0.758).

### 3.4. Multispecies toxicity testing: Index of sublethal toxicity

Difficulties in making accurate, ecosystem-level predictions of environmental effects of chemicals, mixtures and effluents based solely on the results of sampling single species have necessitated the development of more environmentally realistic methods (Cairns, 2002; 2005). But usually such complicated monitoring programs are very expensive. Model communities, smaller in size and less complicated, could be employed as the possible alternative.

The development of multispecies toxicity tests has provided a good basis for making the first step in developing comprehensive validation procedures. The end points utilized in many of these laboratory multispecies toxicity tests (such as colonization, respiration, detritus processing and the like) also occur in natural systems and involve higher levels of biological organization than single species.

Periphyton biodiversity and relative abundance of ciliates and other protozoans can be used also as indicators of toxic pollution and acidification. Naturally derived periphyton communities were collected from the natural water-body and transported to the laboratory for use in designed experiments. Also new simplified index for a sublethal toxicity assessment (IST) was developed:

$$IST = Ns/Na \quad (2)$$

where Ns is the abundance of Sessilida (attached ciliates), Na is the abundance of Amoebozoa, it takes the minimal value in polluted waters (1.0 - 0). Multivariate statistics were used to design the model of microbial communities development across a gradient of toxicant stress and organic compounds (Fig., Zolotarev, 1988; 2007).

## 4. Conclusion

“Ecosystem health” is the well-known term in ecology (Costanza, 2012, Kruse, 2019). New information technologies could be employed for international project using robotics for microscale methods development.

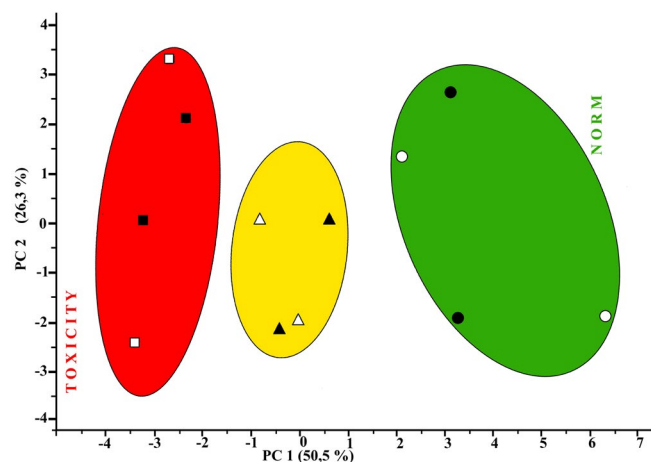


Fig. Principal components (1, 2) based on protozoan model community detecting a sublethal toxicity.

Entering the information age requires integrative methodology that employs a holistic view of the multiple stresses and interactions in complex aquatic ecosystems. Microscale testing methods and the earliest pollution prevention are the most cost-effective. So, microperiphyton communities can be very useful indicators of the water quality. Their ability to rapidly colonise artificial substrates, the cosmopolitan distribution and other advantages, provide an assessment capability not generally available for higher organisms. Biodiversity and relative abundance of protozoans at PMC can be used as indicators of toxic pollution, trophic status and nanoparticles. For the foreseeable future, with the development of online eco-sensors and “ecorobots”, a major application of microscale methods will be to predict, developing the new integrated standards, as a “Dow Jones” for water quality. As implications of the work, we developed some new methods (two patents (Zolotarev, 1986; 1991) and project of the Automated Biomonitoring International Network (<http://biomonitoring.narod.ru>). Future on-line aquatic monitoring systems will undoubtedly continue a trend towards miniaturization, utilization of advanced data acquisition and communication techniques (van der Schalie et al., 2001). It can be concluded that the use of modern digital technologies in the near future may find the widest application in various areas of ecological research and biological monitoring.

## Acknowledgements

Authors greatly appreciate the advice of Dr. Alexander Mylnikov, Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, and Dr. Alexander Railkin, St. Petersburg State University.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

Artificial Substrates. 1982. In: Cairns J. (Ed.). Michigan: Ann Arbor Science Publishers.

Cairns J. 2002. Ecotoxicology and sustainable use of the planet. *Toxicology and Industrial Health* 4: 161–170.

Cairns J. 2005. Biomonitoring: the crucial link between natural systems and society. *Mankind Quarterly* 3: 289–308.

Costanza R. 2012. Ecosystem health and ecological engineering. *Ecological Engineering* 45: 24–29.

Finlay B. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063.

Jiang J., Wu S., Shen Y. 2007. Effects of seasonal succession and water pollution on the protozoan community structure in an eutrophic lake. *Chemosphere* 66(3): 523-532.

Kamshilov M.M. 1979. Evolution of Biosphere. Moscow: Nauka. (in Russian)

King N. 2005. Choanoflagellates. *Current Biology* 15(4): 113–114.

Kruse M. 2019. Ecosystem health indicators? In B. Fath (Ed.). *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier: 407–414.

Mandelbrot B.B. 1982. The Fractal geometry of nature. San Francisco: Freeman W.H.

Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assessment. 2010. In: Corcoran E., Nellemann C., Baker E. et al. (Eds) UN-HABITAT, GRID. URL: [www.grida.no](http://www.grida.no)

Van der Schalie W.H., Shedd T.R., Knechtges P.L. et al. 2001. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors Bioelectronics* 16: 457–465.

Zolotarev V.A. 1986. Method for water quality assessment. SU Patent 1237137. (in Russian)

Zolotarev V.A. 1988. Periphyton heterotrophic flagellates of inland water-bodies. D. Phil. Thesis. Moscow University. (in Russian)

Zolotarev V.A. 1991. Method for water toxicity testing. SU Patent 1489371. (in Russian)

Zolotarev V.A. 2007. Water quality monitoring in wetland ecosystems using microbial model communities. *International Journal of Water* 3(3): 231–242.

# Разработка современных микробиологических методов оценки качества вод в озерах

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Золотарев В.А.\* , Кузнецова Е.В., Федоров Р.А.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742 п. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Обсуждается функциональное разнообразие свободноживущих водных простейших по отношению к экологии питания, жизненным стратегиям и качеству воды. Гетеротрофные нанофлагелляты известны как наиболее эффективные потребители бактерий во многих водных экосистемах. Недавние исследования питания жгутиконосцев показали, что существуют значительные видоспецифичные различия выбора пищи бактериотрофных форм. Хоанофлагелляты играют важную роль в микробных пищевых сетях, способствуя процессу самоочищения водоемов, их также используют в системах мониторинга. Нами показано, что разнообразие и относительное обилие инфузорий и других простейших могут быть применены в качестве показателей токсичности и закисления водоемов. Методы многомерной статистики использованы для разработки модели развития сообществ простейших («шкалы токсичности») в градиенте токсического стресса. Разработаны новые показатели трофического статуса водоемов (индекс перифитонных флагеллят) и упрощенный индекс сублетальной токсичности.

**Ключевые слова:** функциональная морфология, водные протисты, гетеротрофные нанофлагелляты, инфузории, голые амебы, индекс перифитонных флагеллят, протозойный индекс сублетальной токсичности

Для цитирования: Золотарев В.А., Кузнецова Е.В., Федоров Р.А. Разработка современных микробиологических методов оценки качества вод в озерах // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1180-1187. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1180

## 1. Введение

Среди глобальных проблем начала 21 века особое место занимает ухудшение качества воды, связанное с быстрой урбанизацией и ростом производства и потребления (Corcoran et al., 2010). Наиболее экономически эффективна ранняя диагностика опасных воздействий на экосистемы. В современных системах оценки качества воды городских водопроводных станций используются обычно физиологические и поведенческие реакции организмов на стрессовые воздействия, биосенсоры на основе биологических тканей или клеток могут стоить намного дешевле (van der Schalie et al., 2001). Однако, соотношение цена – эффективность может быть более существенно, чем абсолютная стоимость установки. Физиологические и поведенческие реакции отдельных организмов обычно используют для оценки острой токсичности, но оценка менее токсичных, сублетальных и хронических воздействий отражает экологические риски для экосистемы в

целом. Более рентабельны методы мониторинга с использованием сообществ микробной трофической сети, поскольку они, трансформируя до 90% первичной продукции, являются неотъемлемой ступенью в потоке энергии водных экосистем и глобальных биогеохимических циклов (Finlay, 2002).

## 2. Материалы и методы

Сбор материала производили на Рыбинском водохранилище и озерах Верхней Волги, а также на озерах Карелии, на Байкале и экспериментальных микрокосмах. Основные проблемы при исследовании водных экосистем - это их сложность и трудности выбора репрезентативных станций отбора проб. Многие исследователи решают подобные проблемы путем использования искусственных субстратов (Cairns, 1982). Мы использовали в качестве субстрата стеклянные пластины стандартного размера (76 x 26 мм), обычно некоррозионные предметные стекла для микроскопов. Выбор субстрата обуслов-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [forest753@gmail.com](mailto:forest753@gmail.com) (В.А. Золотарев)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 28 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





лен необходимостью прижизненных наблюдений за мелкими (обычно до 10 мм) организмами, легко повреждаемыми при каком-либо концентрировании проб. Пластмассовые штативы с закрепленными в них стеклянными пластинами для изучения перифитонных сообществ погружают на заданные глубины на шнурах, связанных с поплавком и якорем. Пластины обрастания вынимают из кассет и помещают в баночки (100-250 мл) под поверхностью воды, затем доставляют в лабораторию. Количественный учет жгутиконосцев производят под микроскопом с фазовоконтрастным устройством, при увеличении 300х.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Холистический подход и целостность водных экосистем

Модели часто используются в науке для упрощения сложных проблем и лучшего понимания процессов, протекающих в природе. Любая экосистема может быть представлена в виде модели биосферы в уменьшенном масштабе, отражающий биотический круговорот Земли с определенной долей целостности (Камшилов, 1979). Фрактальность экосистем проявляется в моделях с изменением реального масштаба, отражая основные функции, они демонстрируют самоподобие при изменении численности сообщества (Mandelbrot, 1982).

Всемирно известные работы нашего соотечественника Гаузе (30х годов) положили начала использованию простейших в качестве модельных организмов для исследования фундаментальных экологических законов. Основание пищевых сетей водоемов составляют микробные сообщества (водоросли, простейшие, бактерии), определяя биоразнообразие экосистемы в целом. Биологический мониторинг водоемов основан главным образом на концепции индикаторных видов, более интегральную картину качества воды могут давать методы, основанные на «индикаторных сообществах», или «модельных сообществах» (Zolotarev, 2007).

Специфические группы гидробионтов, формирующиеся на искусственных субстратах, мы назвали модельными сообществами перифитона (МСП), здесь присутствуют основные элементы биотических циклов: фототрофы, гетеротрофы, утилизаторы органики, а также субстрат с адсорбированными веществами. Основная функциональная роль субстрат-ассоциированных простейших заключается в переработке растворенных органических веществ и детрита, а также сопутствующих бактерий.

#### 3.2. Преимущества использования микроорганизмов в биомониторинге

Микроорганизмы размером менее 1 мм являются космополитами, т.е. обитают везде, где существуют подходящие условия для их обитания. Их называют также убиквидами (буквально: «повсе-

местно распространенными»), поскольку их популяции обладают огромными размерами, и, следовательно, низкой вероятностью полного исчезновения в данной экосистеме (Finlay, 2002).

Есть несколько веских причин для использования микроорганизмов в биомониторинге: 1) космополитное распространение облегчает сравнение результатов тестирования в разных географических регионах; 2) проблемы масштаба уменьшаются – как в пространственном, так и временном (смена поколений) аспектах; 3) число повторностей и достоверность тестов легко увеличить; 4) экологический реализм выше, чем в тестах с использованием более крупных организмов; 5) количество тестируемых видов резко возрастает при использовании микроорганизмов, отражая тем самым естественную изменчивость гораздо лучше, чем тесты с ограниченной выборкой более крупных организмов; 6) работы с микроорганизмами не вызывают протеста у борцов за права животных; 7) валидация лабораторных тестов в полевых микро- и мезоэкосистемах легко выполнима и гораздо дешевле (Cairns, 2005).

#### 3.3. Пищевые стратегии гидробионтов и качество воды

В настоящее время методы с использованием сообществ микроперифитона на искусственных субстратах успешно работают в государственной системе мониторинга водных ресурсов Китая, а также используются в США, Корее и других странах (Jiang et al., 2007).

В перифитоне пресноводных экосистем на искусственных субстратах (стекла обрастания) нами выявлено более 120 видов и форм гетеротрофных нанофлагеллят, более 70 видов инфузорий и около 27 видов и форм саркодовых (Zolotarev, 2007). Основная функциональная роль простейших перифитона состоит в переработке детрита и сопутствующих бактерий. Хоанофлагелляты (воротничковые жгутиконосцы) - типичные представители простейших перифитона, играют существенную роль в жизни водоемов, обладая широкой экологической валентностью, большой скоростью размножения и являясь активными бактериофагами. Они имеют яйцевидную или сферическую форму клетки 3-10 мкм в диаметре, с апикальной стороны один жгутик, окруженный воротничком. Наблюдая в световой микроскоп, можно заметить определенные токи жидкости, которые возникают вследствие биения жгутика. Движение жидкости направлено таким образом, что увлекаемые ими бактерии и детрит прилипают к наружной поверхности тентакул (цитоплазматических выростов, окружающих жгутик), создавая иллюзию плотного воротничка. Хоанофлагелляты составляют существенную долю гетеротрофных нанофлагеллят (5-40%), они играют особую роль в процессах самоочищения водоемов, отфильтровывая до 25% поверхностных вод ежедневно (King, 2005). Мы учитывали пищевые стратегии простейших для выделения особых функцио-

нальных групп (экоморфотипов), или экобиоморф. Колониальные хоанофлагелляты (*Codonosiga botrytis*) являются «пионерными видами» перифитона, т.е. заселяют искусственные субстраты на ранних стадиях колонизации, доминируют в мезосапробных зонах.

Как уже отмечено выше, хоанофлагелляты отличаются высокой скоростью размножения, поэтому необходимо использовать сукцессионный подход, отбор проб микроперифитона следует производить два-три раза в неделю. Такая методика позволила нам создать графическую модель развития хоанофлагеллят в различных сапробных зонах (Рис.) и получить патент на «Способ биологической оценки качества воды» (Золотарев, 1986). Таким образом, вид *Codonosiga botrytis* может быть представлен как модельный организм, поскольку он обычно доминирует в начальной стадии обрастания, называемой также первичной сукцессией перифитона. В биоиндикации существенное значение имеет проблема «физиономичности индикаторов», их характерного «облика», легко доступного для обнаружения и наблюдений, хоанофлагелляты отвечают и этому требованию. Количество неприкрепленных нанофлагеллят также может служить показателем сапробности.

Это еще раз говорит о важности учета морфофункциональных особенностей организмов при использовании индексов разнообразия, более стабильны эти показатели для группы неприкрепленных флагаеллят. Показатели числа видов и видового разнообразия простейших перифитона принимают минимальные значения как в олиго-, так и в полисапробных зонах, что характерно и для других групп гидробионтов. На основе многолетних исследований нами предложен новый показатель органического загрязнения - индекс перифитонных флагаеллят:

$$IPF = Ss/Sm \quad (1)$$

где  $Ss$  – число видов сессильных (прикрепленных) нанофлагаеллят,  $Sm$  - число видов мобильных (неприкрепленных) форм. Индекс принимает наивысшие значения в олиготрофных водах (1,0 - 3,0); равномерно снижается с увеличением загрязнения в мезотрофных водах (0,3 - 1,0); в полисапробных зонах убывает до 0.

### 3.4. Мультивидовое биотестирование и разработка индекса сублетальной токсичности

Ряд современных исследователей (Cairns, 2002; 2005) считают неестественным такое положение дел, когда много времени тратится на разработку различных «стандартных» токсикологических методов, а главный вопрос - в какой мере лабораторные тесты на видовом уровне соответствуют процессам, происходящим в экосистемах, остается неразрешенным. Возникают возражения, что при огромном разнообразии водных экосистем невозможно определить эффект небольших антропогенных воздействий.

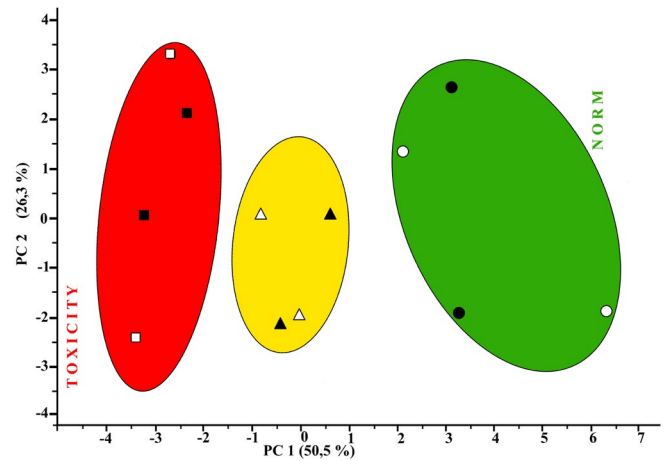


Рис. Модель изменения протозойных сообществ в градиенте сублетальной токсичности (первая и вторая главные компоненты).

Работы последних лет показали, что токсикологические тесты на уровне сообществ - возможная альтернатива. В качестве критерия токсичности Кейрнс с соавторами используют не показатели смертности, а динамические функции - процессы колонизации и сукцессии. Применение таких методов позволяет одновременно тестировать множество видов, обычных для района исследований. Если бы экосистемы функционировали как простая сумма составляющих видов, результаты воздействия токсикантов можно было бы предсказать по реакции наиболее чувствительных видов. Но благодаря иерархической организации реальных экосистем, их сложность находится в экспоненциальной зависимости от числа составляющих элементов. Недостаток «экологического реализма» простых биотестов обусловлен несколькими причинами: (1) в естественных условиях виды не живут в изоляции; (2) предпочитаемые тест - объекты не могут быть распространены во всех экосистемах; (3) токсические вещества обычно претерпевают изменения в реальной экосистеме; (4) токсические вещества чаще встречаются в комплексе. Для установления реальной опасности токсических веществ необходим исходный экспериментальный материал, относящийся к процессам, происходящим в экосистемах на надорганизменном уровне, т.е. на уровне взаимодействия сосуществующих популяций.

В токсикологических экспериментах мы также использовали МСП и методы многомерной статистики для создания модели развития микробных сообществ в градиенте токсичности и органических веществ, разработали новый упрощенный показатель - индекс сублетальной токсичности:

$$IST = Ns/Na \quad (2)$$

где  $Ns$  - численность Sessilida (прикрепленных инфузорий),  $Na$  - численность Amoebozoa (лобозных амеб), индекс принимает минимальные значения в более токсичных водах (1,0 - 0). На основе проведенных экспериментов в микрокосмах нами также получен патент на «Способ оценки токсичности воды» (Золотарев, 1991). Индексы разнообразия отдельных функциональных групп простейших

также являются хорошими количественными показателями для биомониторинга. Наиболее точен интегральный статистический показатель, вычисляемый методом главных компонент (Рис., по Золотарев, 1988; 2007).

#### 4. Выводы

«Здоровье экосистем» – устоявшийся уже термин в научной литературе (Costanza, 2012, Kruse, 2019, и др.), и современные методы биомониторинга должны соответствовать международной практике. Более того, через системы искусственного интеллекта (ИИ) они должны соответствовать и современным понятиям индивидуального здоровья человека и «здоровое общество». Микро-методы биомониторинга и биотестирования наиболее рентабельны для ранней диагностики антропогенных воздействий на водоемы.

Таким образом, методы с применением сообществ микроперифитона обладают целым рядом свойств, ценных для биомониторинга, выгодно отличаясь от многоклеточных аналогов отсутствием региональных барьеров, быстрой реакцией на подострые воздействия стрессовых факторов, позволяют различать трофность водоемов и влияние токсичных веществ, а также наночастиц. Нами разработан проект создания нового поколения биосенсоров (эко-сенсоров и экороботов) и автоматизированной информационной сети биомониторинга водоемов на основе МСП (<http://biomonitoring.narod.ru>).

В дальнейшей разработке систем он-лайн мониторинга водной среды, несомненно, будет продолжаться тенденция к миниатюризации, использованию передовых методов сбора данных и коммуникационных технологий, интегральных стандартов, наподобие «Доу Джонс» для качества воды (van der Schalie et al., 2001). Можно сделать вывод, что используемые современные цифровые технологии в ближайшем будущем могут найти самое широкое применение в различных направлениях экологических исследований и биомониторинге.

#### Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность д.б.н. А.П. Мыльникову, Институт биологии внутренних

вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, и проф. А.И. Раилкину, Санкт-Петербургский государственный университет.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Золотарев В.А. 1986. Способ биологической оценки качества воды. Патент 1237137 РФ.
- Золотарев В.А. 1988. Бесцветные жгутиконосцы перифитона внутренних водоемов. Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва: МГУ
- Золотарев В.А. 1991. Способ оценки токсичности воды. Патент 1489371 РФ.
- Камшилов М.М. 1979. Эволюция биосферы. Москва: Наука.
- Artificial Substrates. 1982. In: Cairns J. (Ed.). Michigan: Ann Arbor Science Publishers.
- Cairns J. 2002. Ecotoxicology and sustainable use of the planet. *Toxicology and Industrial Health* 4: 161–170.
- Cairns J. 2005. Biomonitoring: the crucial link between natural systems and society. *Mankind Quarterly* 3: 289–308.
- Costanza R. 2012. Ecosystem health and ecological engineering. *Ecological Engineering* 45: 24–29.
- Finlay B. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063.
- Jiang J., Wu S., Shen Y. 2007. Effects of seasonal succession and water pollution on the protozoan community structure in an eutrophic lake. *Chemosphere* 66(3): 523–532.
- King N. 2005. Choanoflagellates. *Current Biology* 15(4): 113–114.
- Kruse M. 2019. Ecosystem health indicators? In B. Fath (Ed.). *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier: 407–414.
- Mandelbrot B.B. 1982. *The Fractal geometry of nature*. San Francisco: Freeman W.H.
- Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assessment. 2010. In: Corcoran E., Nellemann C., Baker E. et al. (Eds). UN-HABITAT, GRID. URL: [www.grida.no](http://www.grida.no)
- Van der Schalie W.H., Shedd T.R., Knechtges P.L. et al. 2001. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors Bioelectronics* 16: 457–465.
- Zolotarev V.A. 2007. Water quality monitoring in wetland ecosystems using microbial model communities. *International Journal of Water* 3(3): 231–242.

# Microperiphyton development in lakes and reservoirs



Zolotarev V.A.\*, Stroinov Ya.V., Kosolapova N.G.

I.D. Papanin Institute for biology of inland waters RAS, Borok, Yaroslavl obl., 152742, Russia

**ABSTRACT.** Biofilms play an important role in the material flux of lakes and other aquatic ecosystems, but little is known about the mechanisms controlling their community structure under natural conditions. In the present study, we focused on the use of artificial substrates for the life strategies of microbial communities investigation. Heterotrophic nanoflagellates (HNF) are known as most important grazers of bacteria in the biofilm communities. The Choanoflagellida have an essential role in microbial food webs contributing to a process of self-purification of water bodies as well as sponge choanocytes, filtering large water volumes. Effects of Cyanobacteria and other pathogenic microorganisms on sponges are very similar to the same effects on Choanoflagellida and HNF in the early phase of biofilm colonization. Standard microbial biofilms (model communities) can serve for ecorobots development.

**Keywords:** biofilms, microbial communities, early warning indicators, artificial substrates, model communities, standardization, ecorobots

**For citation:** Zolotarev V.A., Stroinov Ya.V., Kosolapova N.G. Microperiphyton development in lakes and reservoirs // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1188-1195. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1188

## 1. Introduction

The microbial components of aquatic food webs (bacteria, microalgae, heterotrophic and mixotrophic flagellates, and ciliates) can often be important, and sometimes dominant, part of aquatic ecosystems. Heterotrophic flagellates have been recognized as consumers of suspended as well as of attached bacteria (Boenigk and Arndt, 2002). The abundance of individuals in microbial species is so large that dispersal is rarely restricted by geographical barriers. Given their ubiquitous nature, the quantitative and behavioural trophodynamics of protozoans is undoubtedly central to their ecological significance and to the flow energy and materials through the microbial food web (Finlay, 2002). HNF, as the most important grazers of bacteria in biofilm communities, generally contain a diverse community of species significantly differing in their feeding behaviour and other ecological properties. Recent studies of flagellate feeding processes indicated that there are significant species-specific differences and individual variability regarding the food uptake and food selection of bacterivorous flagellates (Boenigk and Arndt, 2002). Variability of bacterivory is discussed regarding the prevailing feeding modes and the feed-

ing microhabitat, respectively. The Choanoflagellida is peculiar group interesting in different aspects such as evolutionary, ecological, and practical. They have an essential role in microbial food webs contributing to a process of self-purification of water bodies as well as are used in monitoring systems (Caron et al., 2012).

## 2. Materials and methods

We have found more than 120 species of heterotrophic nanoflagellates and more than 90 species of ciliates and sarcodines inhabiting the PMC (glass slides) in different water-bodies (Zolotarev, 2007). Studies of microperiphyton communities were conducted in lakes of Karelia, the Rybinsk reservoir, Lake Baikal, Ladoga, acidic lakes of Darwin National Park, in temporal natural wetlands and in experimental microcosms. The basic problem in analysing aquatic ecosystems is their complexity. The difficulty of locating, quantifying and replicating habitat types at various stations along an environmental or pollution gradient has led many investigators to use artificial substrate samplers (Cairns, 1982). By far, the most commonly used artificial substrate has been glass slides (76 x 26 mm), which have the advantage that they can be collected under water by

\*Corresponding author.

E-mail address: [forest753@gmail.com](mailto:forest753@gmail.com) (V.A. Zolotarev)

**Received:** August 02, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.





placing them in a jar of water, then transported to the laboratory and placed on the stage of the microscope for direct observation. Glass slides were used to detect the more fragile attached protozoans in vital microperiphyton communities. These substrates were suspended in the water in a vertical position by means of plastic holders, nylon rope, floats and anchors. Samples were collected by placing exposed slides into jars under the water surface. Two or four replicate substrates were generally harvested from each site on a given day; samples were transported to the laboratory as soon as possible. Samples that could not be analysed immediately were stored at the ambient temperature of the sampling location. All initial identifications and measurements of protozoans were made on living samples usually in 3–5 h after collection. Usually, direct counting was done under the light microscope with 300x magnification, using phase contrast.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Artificial substrates and initial stage of colonization

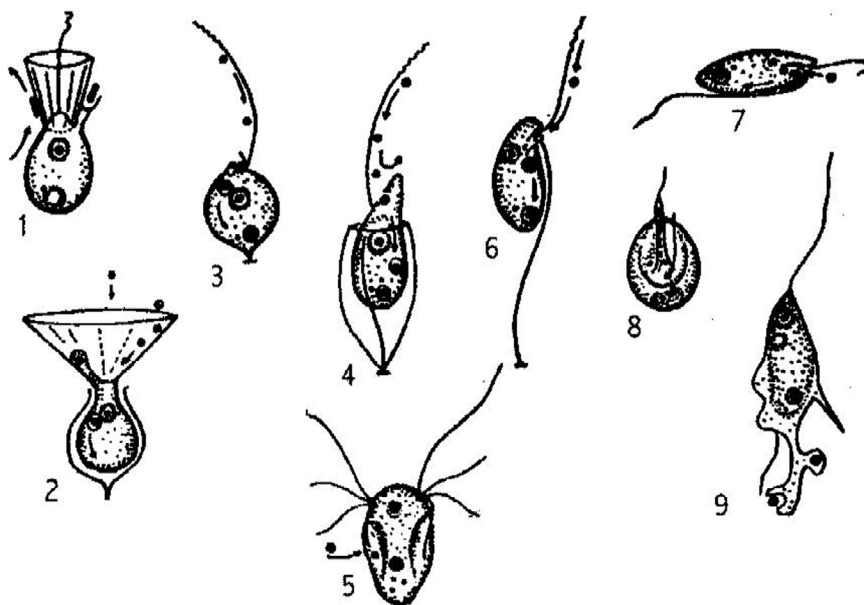
The chief functional role of substrate-associated protozoans appears to be the processing of dead organic matter and its associated bacterial flora. Food consumption of HNF is often aided by specialised feeding organelles which is of importance especially for the detachment of closely attached bacteria. There are differences in the mobility of the HNF also on the substrates which affects the feeding on bacteria (e.g. bodonids and cercozoans, Fig. 1). Bacterivorous organisms should be able to optimize their food uptake by searching for patches of high bacterial abundances. This may explain HNF survival in oligotrophic environments such as lakes. Choanoflagellates are unicellular eukaryotes that are ubiquitous in aquatic habitats. They

have a single flagellum that creates a flow toward a collar filter composed of filter strands that extend from the cell. Choanoflagellates are single celled or colonial HNF, these organisms are widely distributed geographically, some species may be entirely pelagic but most are particularly associated with suspended debris or solid surfaces (Carrias et al., 1998). Recognised as primarily filter feeding bacterivores, the choanoflagellates occupy a vital niche in the microbial loop.

#### 3.2. Functional diversity and model communities: some basic considerations

Biologists usually apply models to reduce the unsolvable problems of complicated systems in of the natural world. The most widely distributed species at the initial stages of colonisation in biofilms (pioneer species) in different lakes and other water-bodies were the colonial choanoflagellates (*Codonosiga botrytis*), dominant in mesosaprobic waters. So, *C. botrytis* can be served as a model organism. In mesosaprobic waters the species diversity of microperiphyton and the abundance of the colonial choanoflagellates are maximal (from 1000 cells per sq. cm to 50,000 cells per sq. cm), in oligosaprobic and polysaprobic waters the species diversity and abundance of choanoflagellates decreased. By undulating their flagella, choanoflagellates generate local water currents to propel themselves through their aquatic environments and to collect bacteria and detritus on the walls of their collars. Although their collars are nearly undetectable by light microscopy, the flow of water can be discerned as bacterial prey swirl helplessly toward their choanoflagellate predators (King, 2005).

The term ‘indicator species’ is very usual in literature on biological monitoring, but the term ‘indicator communities’, or ‘model communities’, could be



**Fig.1.** Feeding of different bacterivorous nanoflagellates (derived from Zhukov, 1993) by filter-feeding (1, choanoflagellate *Monosiga*), sedimentation (2, choanoflagellate *Choanoeca perplexa*), interception feeding (3, chrysomonad *Spumella*; 4, bicosoecid *Bicosoeca*; 5, diplomonad; 6 bodonid *Bodo saltans*), raptorial feeding by a pharynx (7, bodonid) or by pseudopod like structures (8, apusomonad *Apusomonas*; 9, cercozoan *Cercomonas*) (after Boenigk and Arndt, 2002).

more suitable for a wide range of bioassays (Zolotarev, 2007). Periphyton communities that are formed on artificial substrates can be defined as “periphyton model communities” (PMC). Protists can be served as model organisms, reflecting all the main elements of the biotic circulation in the PMC: phototrophs producing organic matter, heterotrophs, and decomposers, they have acted as models to assess fundamental ecological issues.

### 3.3. The hydrodynamics of filter feeding and choanoflagellate/sponge transition

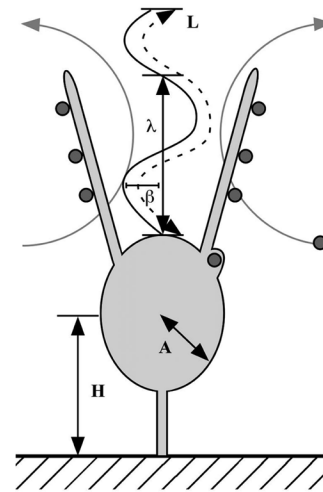
This is important to these purely heterotrophic organisms that rely exclusively on prey captured from a very dilute suspension, requiring them to daily clear a volume of water corresponding to one million times their own body volume. Choanoflagellates are equipped with a single flagellum that creates a flow toward the collar filter where bacteria-sized prey are retained on the microvilli tentacles (Fig. 2., after Pettitt et al., 2002). Movement of the flagellum creates water currents that can trap bacteria and detritus against the collar providing filter-feeding. Choanoflagellates have a huge impact on the food chain, aiding the flow of carbon from primary producers to higher trophic levels (including ourselves!). They comprise 5-40% of heterotrophic nanoflagellates and may filter between 10% and 25% of coastal surface water each day (King, 2005).

Choanoflagellates are filter feeders and an important component of microbial foodwebs (Carrias et al., 1998), and sensitive as sponges (Belikov et al., 2019). They share ancestry with animals and have remarkably common characteristics with the choanocytes of sponges (Cavalier-Smith, 2017). During the past century, choanoflagellates have been the subject of numerous studies with the goal of understanding the evolution of multicellularity in animals. Sponges evolved thus from a craspedid-like stem choanoflagellate (Cavalier-Smith, 2017).

## 4. Conclusions

The age of discovery is not over for protistology. The extent of protistan diversity is vast and still not fully characterized, but genetic approaches are providing new tools for identifying and quantifying abundances and for delving deeply into the taxonomic composition of natural, complex assemblages (Caron et al., 2012).

There are all the main elements of the biotic circulation in the PMC: phototrophs producing organic matter, heterotrophs, decomposers, and the substrate with adsorbed chemicals. New methods based on periphyton communities using polyurethane foam units (PFU) as artificial substrates, was included into the monitoring system of China and Korea, (Gu et al., 2023; Jiang et al., 2007). We must remember our responsibility for the Lake Baikal, explore AI and machine learning enabling new ecological capabilities and knowledge in ecorobots and other emerging techniques.



**Fig. 2.** Cross sectional diagram of filter feeding in choanoflagellates, showing some of the measures used in this paper.  $H$  is the mid-point of the cell above a boundary,  $A$  is the radius of the cell protoplast and  $L$  the length of the flagellum. Grey lines show direction of fluid flow, grey spheres indicate the manner and sites of bacterial capture and ingestion (after Pettitt et al., 2002).

## Acknowledgements

Authors greatly appreciate the advice of Dr. Alexander Mylnikov, Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, and Dr. Alexander Railkin, St. Petersburg State University.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Artificial Substrates. 1982. In: Cairns J. (Ed.), Michigan: Ann Arbor Science Publishers.
- Belikov S., Belkova N., Butina T. et al. 2019. Diversity and shifts of the bacterial community associated with Baikal sponge mass mortalities. *PLoS ONE* 14(3): e0213926.
- Boenigk J., Arndt H. 2002. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 465-480.
- Caron D.A., Countway P.D., Jones A.C. et al. 2012. Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science* 4: 467-493.
- Carrias J.-F., Amblard C., Quiblier-Lloberas C. et al. 1998. Seasonal dynamics of free and attached heterotrophic nanoflagellates in an oligomesotrophic lake. *Freshwater Biology* 39: 91-101.
- Cavalier-Smith T. 2017. Origin of animal multicellularity: precursors, causes, consequences—the choanoflagellate/sponge transition, neurogenesis and the Cambrian explosion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 372: 20150476.
- Finlay B. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061-1063.
- Gu S., Zhang P., Luo S. et al. 2023. Microbial community colonization process unveiled through eDNA-PFU Technology in mesocosm ecosystems. *Microorganisms* 11: 2498.

Jiang J., Wu S., Shen Y. 2007. Effects of seasonal succession and water pollution on the protozoan community structure in an eutrophic lake. *Chemosphere* 66(3): 523-532.

King N. 2005. Choanoflagellates. *Current Biology* 15(4): 113-114.

Pettitt M.E., Orme B.A.A., Blake J.R. et al. 2002. The hydrodynamics of filter feeding in choanoflagellates. *European Journal of Protistology* 38: 313-332.

Zhukov B.F. 1993. Atlas of freshwater heterotrophic flagellates (biology, ecology, taxonomy). Rybinsk: Russian Academy of Sciences, 157 p. (in Russian)

Zolotarev V.A. 2007. Water quality monitoring in wetland ecosystems using microbial model communities. *International Journal of Water* 3(3): 231-242.

# Развитие микроперифитона в озерах и водохранилищах

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Золотарев В.А.\*, Стройнов Я.В., Косолапова Н.Г.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742 п. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н

**АННОТАЦИЯ.** Микроперифитон играет важную роль в потоке органических веществ озер и других водных экосистем, но мало что известно о механизмах, контролирующих структуру их сообществ в естественных условиях. В настоящем исследовании мы сосредоточились на использовании искусственных субстратов для исследования жизненных стратегий микробных сообществ. Гетеротрофные нанофлагелляты (ГНФ) известны как наиболее важные потребители бактерий в биопленочных сообществах. Хоанофлагелляты играют важную роль в микробных пищевых сетях, способствуя процессам самоочистки водоемов, подобно хоаноцитам губок, фильтрующих большие объемы воды. Воздействия цианобактерий и других патогенных микроорганизмов на губок аналогичны таким же воздействиям на хоанофлагеллят и ГНФ на ранних этапах колонизации субстратов. Стандартные микробные биопленки (модельные сообщества) можно использовать для разработки экороботов.

**Ключевые слова:** микроперифитон, микробные сообщества, индикаторы раннего предупреждения, искусственные субстраты, модельные сообщества, стандартизация, экороботы

Для цитирования: Золотарев В.А., Стройнов Я.В., Косолапова Н.Г. Развитие микроперифитона в озерах и водохранилищах // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1188-1195. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1188

## 1. Введение

Микробные компоненты водных пищевых сетей (бактерии, микроводоросли, гетеротрофные и миксотрофные жгутиконосцы, инфузории) часто могут быть важной, а иногда и доминирующей частью водных экосистем. Гетеротрофные жгутиконосцы являются основными потребителями планктонных, а также прикрепленных бактерий (Boenigk and Arndt, 2002). Обилие особей в видах микроорганизмов настолько велики, что их распространение редко ограничивается географическими барьерами. Космополитное распространение, количественная и поведенческая трофодинамика простейших, несомненно, имеют решающее значение для присущей им экологической роли и для потока энергии и материалов через микробную пищевую сеть (Finlay, 2002). ГНФ как наиболее существенные потребители бактерий в сообществах биопленок, как правило, содержат разнообразные группы видов, существенно различающихся своим пищевым поведением и другими экологическими свойствами. Недавние исследования процессов питания жгути-

коносцев показали, что существуют значительные видоспецифичные различия и индивидуальная изменчивость относительно потребления и выбора пищи бактериотрофными жгутиконосцами (Boenigk and Arndt, 2002). Вариабельность бактериотрофного питания коррелирует с преобладающими способами питания и трофностью микросреды соответственно. Хоанофлагеллиды (воротничковые) – своеобразная группа ГНФ, интересная в разных аспектах - эволюционных, экологических и практических. Они играют важную роль в микробных пищевых сетях, способствуют процессам самоочистки водоемов, а также используются в биомониторинге (Caron et al., 2012).

## 2. Материалы и методы

Нами обнаружено более 120 видов ГНФ, а также более 90 видов инфузорий и саркодовых, заселяющих искусственные субстраты (стеклянные пластины) в водоемах разного типа (Zolotarev, 2007). Сбор материала производили на Рыбинском водохранилище и озерах Верхней Волги, а также на

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [forest753@gmail.com](mailto:forest753@gmail.com) (В.А. Золотарев)

Поступила: 02 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





озерах Карелии, на Байкале и в экспериментальных микрокосмах. Основные проблемы при исследовании водных экосистем - это их сложность и трудности выбора репрезентативных станций отбора проб. Многие исследователи решают подобные проблемы путем использования искусственных субстратов (Cairns, 1982). Мы использовали в качестве субстрата стеклянные пластины стандартного размера (76 x 26 мм), обычно некоррозионные предметные стекла для микроскопов. Выбор субстрата обусловлен необходимостью прижизненных наблюдений за мелкими (обычно до 10 мм) организмами, легко повреждаемыми при каком-либо концентрировании проб. Пластмассовые штативы с закрепленными в них стеклянными пластинами для изучения перифитонных сообществ погружают на заданные глубины на шнурах, связанных с поплавком и якорем. Пластины обрастания вынимают из кассет и помещают в баночки (100-250 мл) под поверхностью воды, затем доставляют в лабораторию. Количественный учет жгутиконосцев производят под микроскопом с фазовоконтрастным устройством, при увеличении 300х.

### 3. Результаты и обсуждение

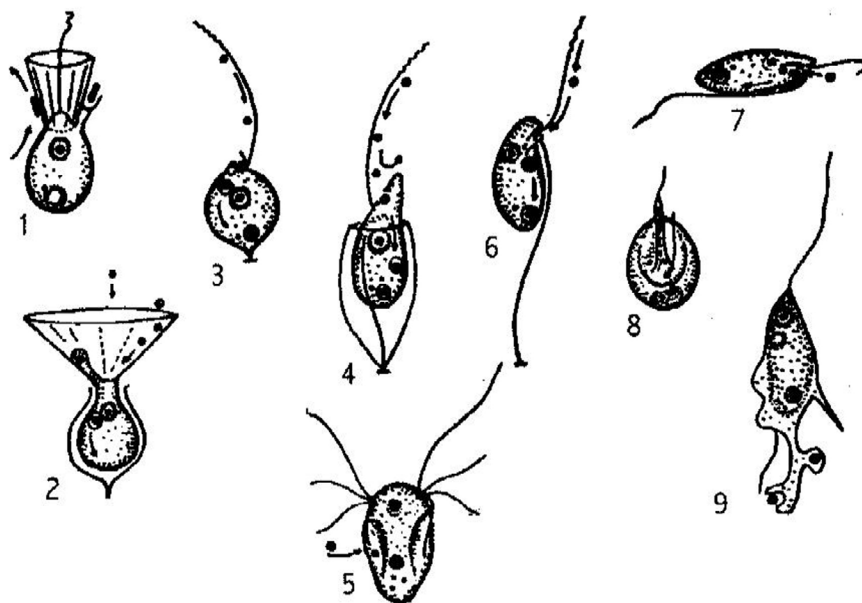
#### 3.1. Искусственные субстраты и начальная стадия колонизации

Основная функциональная роль связанных с субстратом простейших заключается в переработке мертвой органики и связанной с ним бактериальной флоры. Потребление пищи ГНФ часто обеспечивается специализированными пищевыми органеллами, что особенно важно для отделения от субстратов прочно прикрепленных бактерий. Существуют различия в способах движения

ГНФ на субстратах, которые обеспечивают питание бактериями (например, у бодонид и церкомонад, Рис. 1). Бактериотрофные организмы должны иметь возможность оптимизировать потребление пищи путем поиска участков с высоким содержанием бактерий. Это может объяснить выживание ГНФ в олиготрофной среде, такой как озера. Хоанофлагелляты — одноклеточные и колониальные эукариоты, повсеместно распространенные в водных экосистемах. У них есть единственный жгутик, который создает поток к фильтру-воротничку, состоящему из расширяющихся нитей фильтра из клетки. Хоанофлагелляты широко распространены распространены географически, некоторые виды могут быть полностью пелагическими, но большинство из них ведет прикрепленный образ жизни на взвешенных частицах детрита или твердых поверхностях (Carrías et al., 1998). Общепризнанные фильтраторы-бактериофаги, хоанофлагелляты занимают жизненно важную нишу в микробной петле.

#### 3.2. Функциональное многообразие и модельные сообщества: некоторые основные аспекты

Биологи обычно применяют модели для упрощенного понимания сложных систем в мире природы. Наиболее широко распространенный вид на начальных этапах колонизации субстратов («пионерные виды» перифитона) в различных водоемах - колониальные хоанофлагелляты *Codonosiga botrytis*, доминирующие в разнотипных водоемах, этот вид может служить модельным организмом. В мезосапробных водах видовое разнообразие микроперифитона и численность колониальных хоанофлагеллят максимальны (от 1000 клеток на кв. см



**Рис.1.** Питание различных бактериотрофных нанофлагеллят (по Жуков, 1993): фильтрация (1, хоанофлагелляты, *Monosiga*), седиментация (2, хоанофлагелляты, *Choanoecca perplexa*), «перехватывающее» питание (3, хризомонады, *Sputella*; 4, бикозоэциды, *Bicosoeca*; 5, дипломонады; 6, бодониды, *Bodo saltans*), хищное питание глоткой (7, бодониды), или псевдоподиальное (8, апусомонады, *Apusomonas*; 9, церкомонады *Cercomonas*), (по Boenigk and Arndt, 2002).

до 50 000 клеток на кв. см), в олигосапробных и полисапробных водах видовое разнообразие и численность хоанофлагеллят уменьшается. Движением жгутиков хоанофлагелляты генерируют локальные потоки воды, чтобы собирать бактерии и детрит на стенках воротничков. Хотя их воротнички почти не обнаруживаются при световой микроскопии, поток воды можно различить по круговым траекториям частиц детрита и взвешенных бактерий (King, 2005).

Биологический мониторинг водоемов основан главным образом на концепции индикаторных видов, более интегральную картину качества воды могут давать методы, основанные на «индикаторных сообществах», или «модельных сообществах» (Zolotarev, 2007). Специфические группы гидробионтов, формирующиеся на искусственных субстратах, мы назвали модельными сообществами перифитона (МСП), здесь присутствуют основные элементы биотических циклов: фототрофы, гетеротрофы, утилизаторы органики, а также субстрат с адсорбированными веществами.

### 3.3. Гидродинамика фильтрационного питания и вопросы эволюции хоанофлагелляты/губки

Важно отметить, что для этих чисто гетеротрофных организмов, которые полагаются исключительно на пищу, пойманную из очень сильно разбавленной суспензии, что требует ежедневной фильтрации определенного объема воды, соответствующего объему их тела, увеличенного в миллион раз. Единственный жгутик хоанофлагеллят создает поток к воротничковому фильтру, где задерживается добыча размером с бактерию на щупальцах микроворсинок (Рис. 2. (по Pettitt et al., 2002)). Фильтрационное питание хоанофлагеллят составляет огромный вклад в пищевую цепь, способствуя потоку углерода от первичных производителей на более высокие трофические уровни (Carrias et al., 1998). Они составляют существенную долю гетеротрофных нанофлагеллят (5-40%), и играют особую роль в процессах самоочищения водоемов, отфильтровывая до 25% поверхностных вод ежедневно (King, 2005).

Кроме важного вклада в микробные пищевые сети хоанофлагеллят, аналогичная роль в озере Байкал принадлежит губкам, и современные заболевания губок (Belikov et al., 2019) мы можем сравнить с влиянием токсичных цианобактерий на микроперифитон. Удивительно общие характеристики отмечены генетиками у хоанофлагеллят с хоаноцитами губок. В прошлом столетии хоанофлагелляты были предметом многочисленных исследований с целью понять эволюцию многоклеточности у животных (Cavalier-Smith, 2017, и др.).

## 4. Выводы

Эпоха открытий для протистологии продолжается. Велико многообразие протистов, но генетические подходы предоставляют новые инструменты

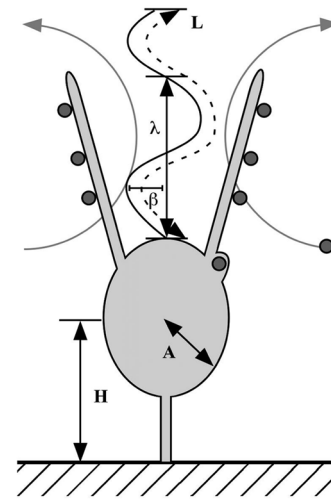


Рис.2. Схема поперечного сечения фильтрационного питания хоанофлагелляты: H — середина ячейки над границей, A — радиус протопласта клетки и L - длина жгутика. Серые линии показывают направление потока жидкости, серые линии сферы указывают способ и место захвата бактерий (по Pettitt et al., 2002).

для идентификации и глубокого изучения сложных природных систем (Caron et al., 2012). Модельные сообщества перифитона также являются одним из инструментов таких исследований, поскольку здесь присутствуют все основные элементы биотического круговорота: фототрофы, продуцирующие органическое вещество, гетеротрофы, редуценты, и субстрат с адсорбированными химическими веществами. Новые методы на основе сообществ перифитона с использованием пенополиуретановых блоков (PFU) в качестве искусственных субстратов, были включены в систему мониторинга в Китае и Южной Корее (Gu et al., 2023, Jiang et al., 2007). Мы должны помнить о своей ответственности за Байкал, включать в исследования искусственный интеллект, разрабатывать экороботы и другие новые технические возможности.

## Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность д.б.н. А.П. Мыльникову, Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, и проф. А.И. Раилкину, Санкт-Петербургский государственный университет.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Жуков Б.Ф. 1993. Атлас пресноводных гетеротрофных жгутиконосцев (биология, экология, таксономия). Наука: Рыбинск  
 Artificial Substrates. 1982. In: Cairns J. (Ed.), Michigan: Ann Arbor Science Publishers.

Belikov S., Belkova N., Butina T. et al. 2019. Diversity and shifts of the bacterial community associated with Baikal sponge mass mortalities. *PLoS ONE* 14(3): e0213926.

Boenigk J., Arndt H. 2002. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 465-480.

Caron D.A., Countway P.D., Jones A.C. et al. 2012. Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science* 4: 467–493.

Carrias J.-F., Amblard C., Quiblier-Lloberas C. et al. 1998. Seasonal dynamics of free and attached heterotrophic nanoflagellates in an oligomesotrophic lake. *Freshwater Biology* 39: 91–101.

Cavalier-Smith T. 2017. Origin of animal multicellularity: precursors, causes, consequences—the choanoflagellate/sponge transition, neurogenesis and the Cambrian explosion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 372: 20150476.

Finlay B. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063.

Gu S., Zhang P., Luo S. et al. 2023. Microbial community colonization process unveiled through eDNA-PFU Technology in mesocosm ecosystems. *Microorganisms* 11: 2498.

Jiang J., Wu S., Shen Y. 2007. Effects of seasonal succession and water pollution on the protozoan community structure in an eutrophic lake. *Chemosphere* 66(3): 523-532.

King N. 2005. Choanoflagellates. *Current Biology* 15(4): 113–114.

Pettitt M.E., Orme B.A.A., Blake J.R. et al. 2002. The hydrodynamics of filter feeding in choanoflagellates. *European Journal of Protistology* 38: 313–332.

Zolotarev V.A. 2007. Water quality monitoring in wetland ecosystems using microbial model communities. *International Journal of Water* 3(3): 231–242.