

# 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)