

# Colourless sulphur bacteria in the ecosystem of Lake Baikal



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



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 Zmeinyy 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

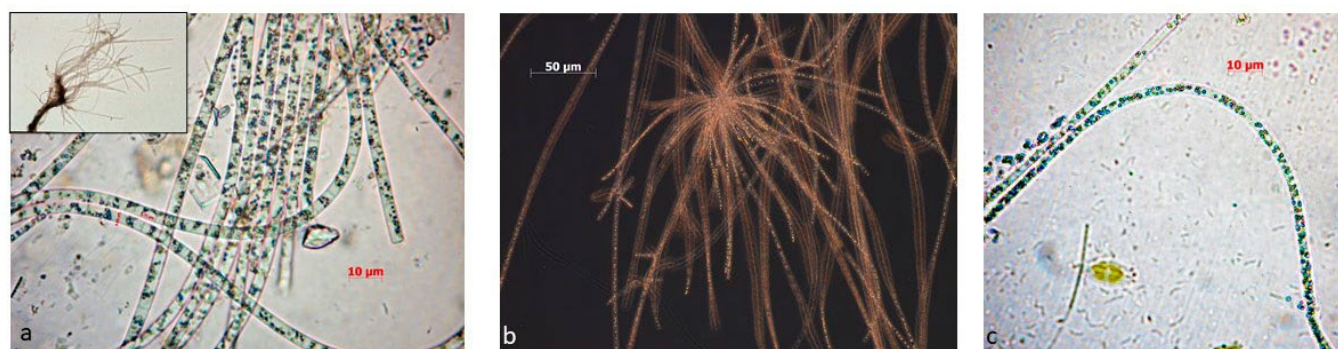
The study was carried out within the State assignment 0279-2021-0006 (121032300223-1) and with the support of the Russian Science Foundation (22-14-00084). Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (FSBSI ARRIAM, St. Petersburg). All calculations were performed with HPC-cluster «Akademik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

### Conflict of interests

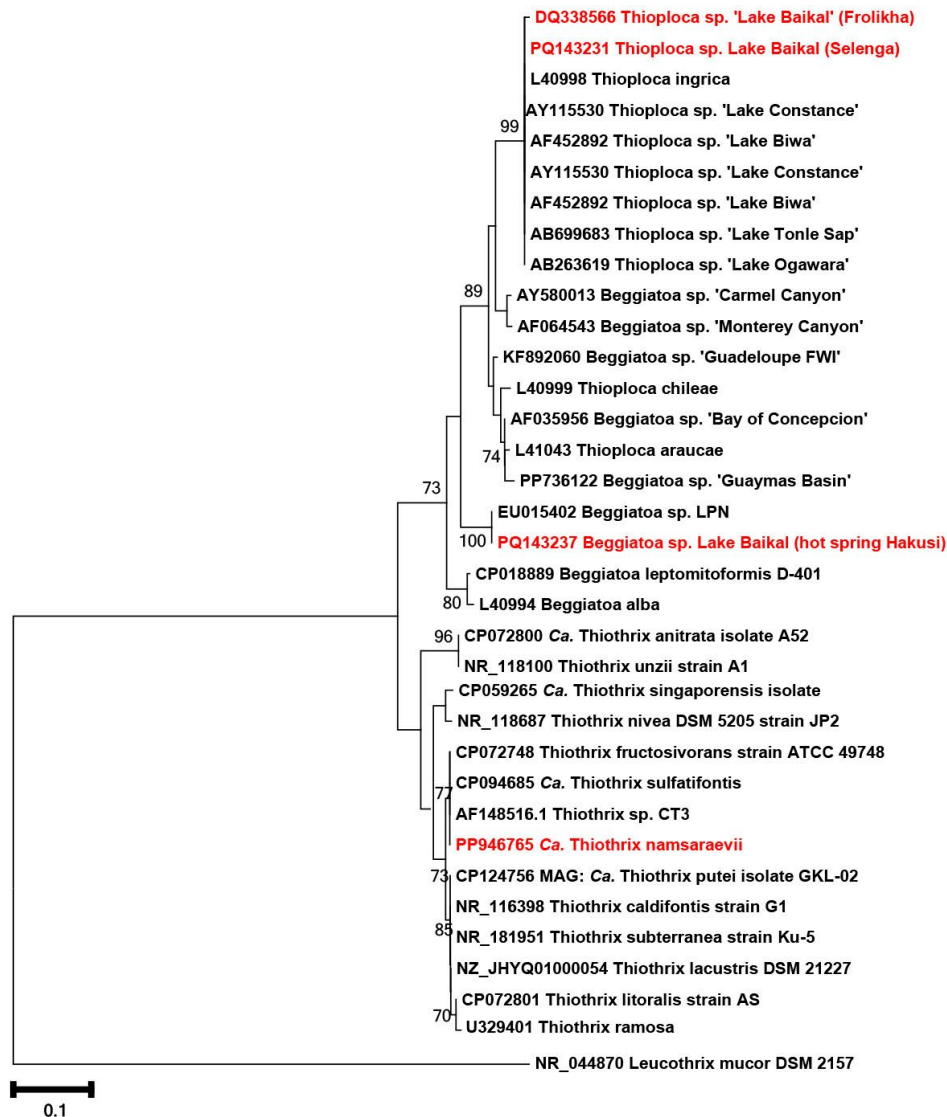
The authors declare no conflicts of interest.

### 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 Zmeinyy (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 рРНК байкальская *Thioploca* sp. входит в кластер пресноводных представителей этого рода из различных озер и идентична виду *T. ingrica*. 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 рРНК байкальская бактерия наиболее сходна виду *Thioploca ingrica* (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 эпибиотических сообществ. Метабаркодирование по гену 16S рРНК 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 филаментов. 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

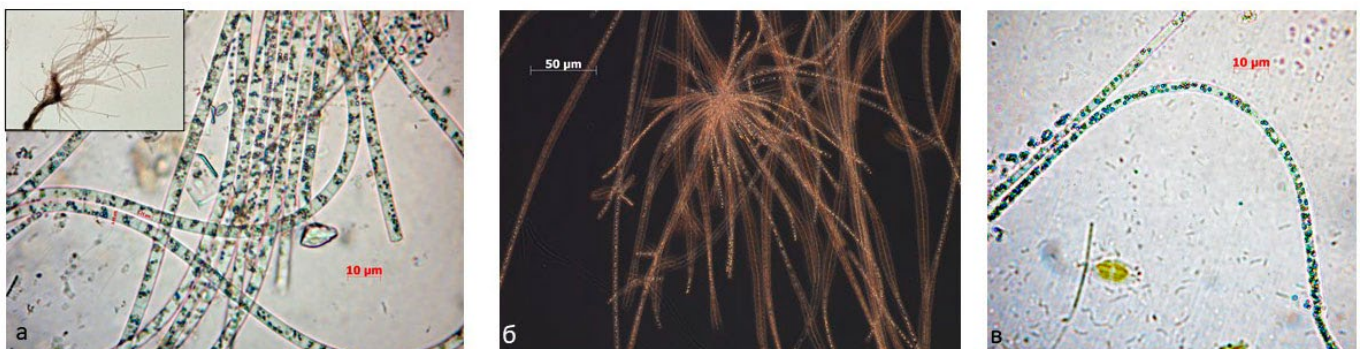
В озере Байкал обнаружены БСБ трех родов *Thioploca*, *Thiothrix* и *Beggiatoa*, обитающие в различных экотопах, в зонах градиента окислительно-восстановительного потенциала, концентраций сульфат иона. Они различаются морфологически (наличие/отсутствие чехла, форма клеток и способность к движению) и 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

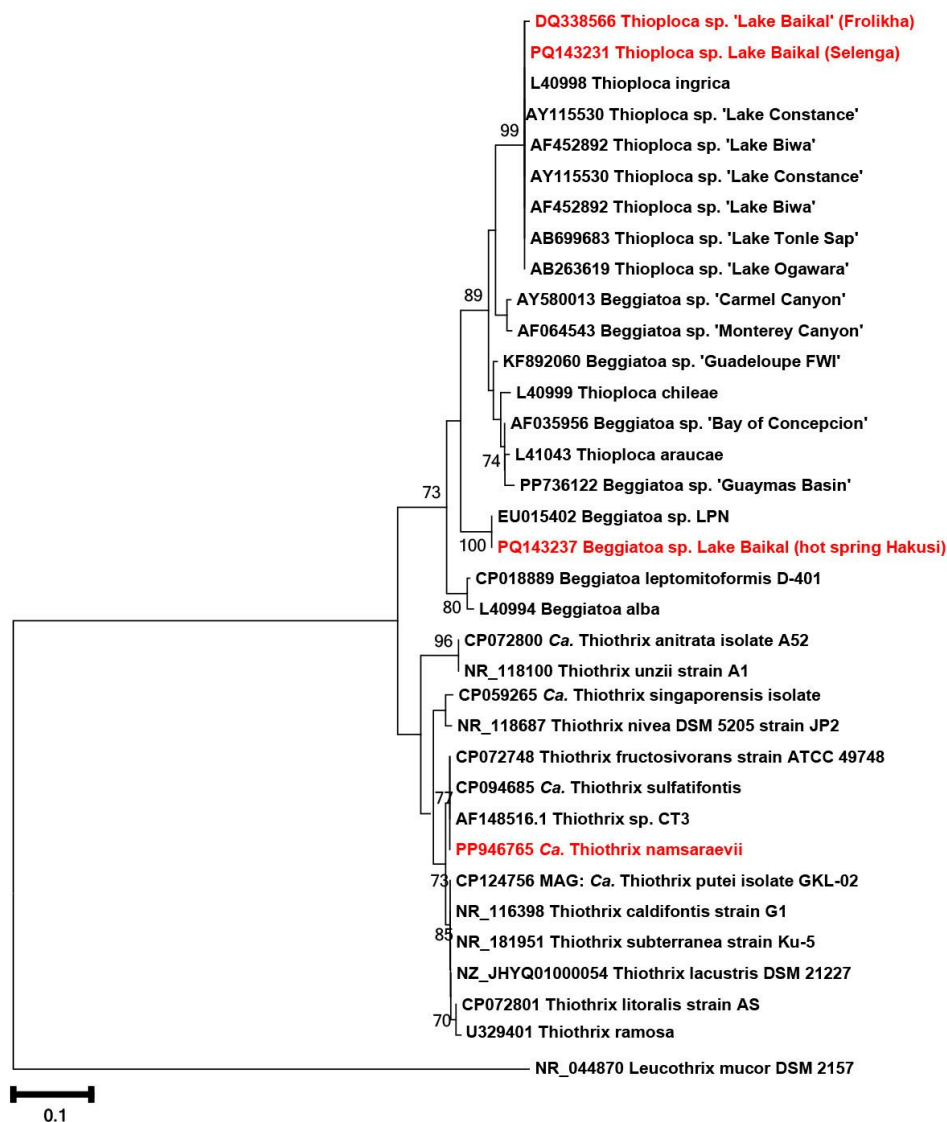
Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания ЛИН СО РАН № 0279-2021-0006 (121032300223-1) и гранта РФФ 22-14-00084. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург). Биоинформатические расчеты проводились на вычислительном кластере «Академик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

*Thiiothrix* 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. Thiiothrichaceae 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)