

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 μm pore size – were studied for the first time using a complex of methods. The bacterial abundance in the femtoplankton fraction was 7×10^4 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 μm . 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 μm , cell volume less than 0.1 μm^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 (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 μm . 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- μm 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 μm) 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 μm . For counting UMB and FB, samples were passed through filters with a pore diameter of 0.2 μm , and then cells from filtrate were precipitated on polycarbonate filters with a pore diameter of 0.05 μm (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

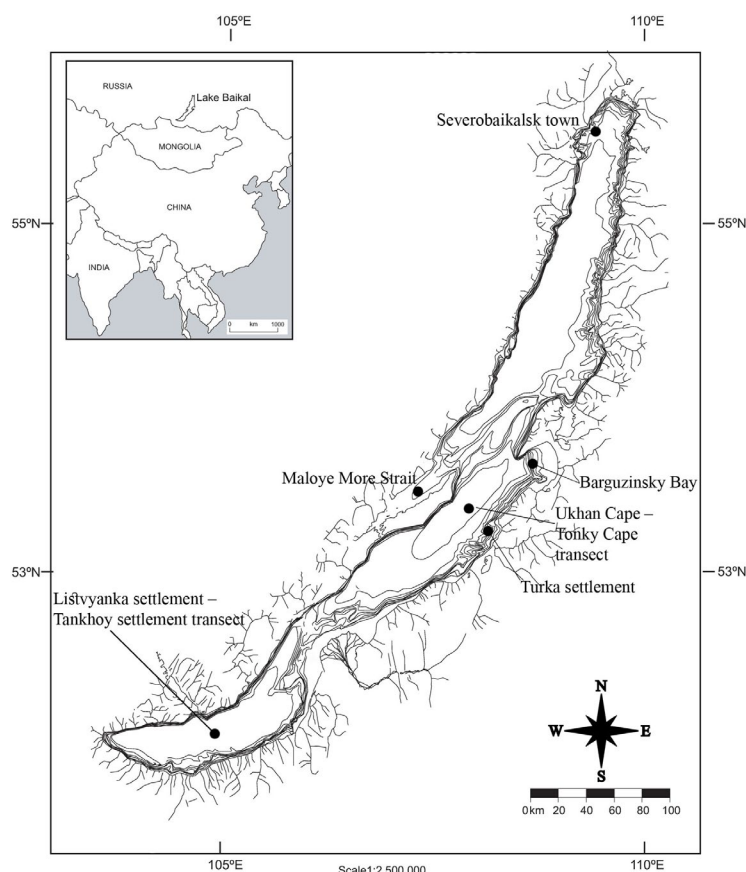


Fig.1. Map of Lake Baikal. Sites of sampling.

site were combined into an integral sample. Samples were then concentrated on polycarbonate filters with a pore diameter of 0.2 μm for fractions $>0.2 \mu\text{m}$ (bacterioplankton, BP) and on 0.05 μm 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 2.5×10^6 cells/mL. The number of small-cell bacteria in the fraction less than 0.2 μm in the 0-50 m layer averaged 7.0×10^4 cells/mL; the maximum (1.0×10^5 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 μm 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 μm 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 3×10^5 cells of bacteria with a volume of 0.1 μm^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 μm 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 μm (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,

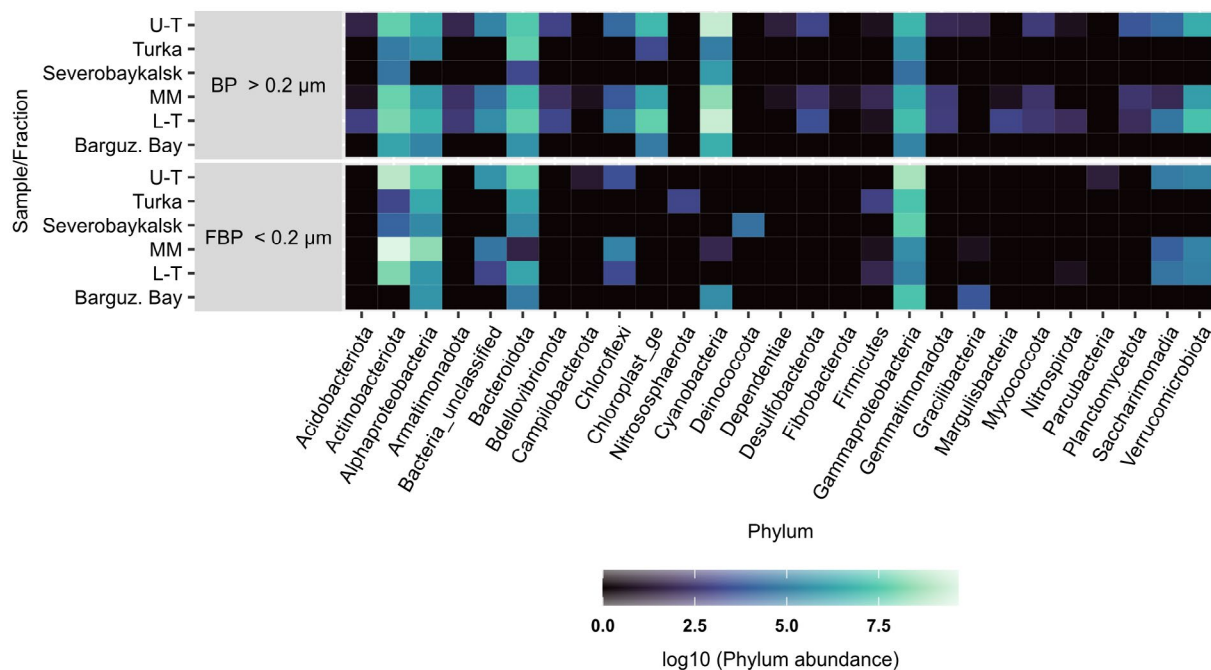


Fig.2. Bacterial abundance heatmap at the levels of phylum and some classes (alpha- and gammaproteobacteria) in two fractions of Lake Baikal water samples: $> 0.2 \mu\text{m}$ (BP – large-sized bacterioplankton), $< 0.2 \mu\text{m}$ (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky 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).

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^3) 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).

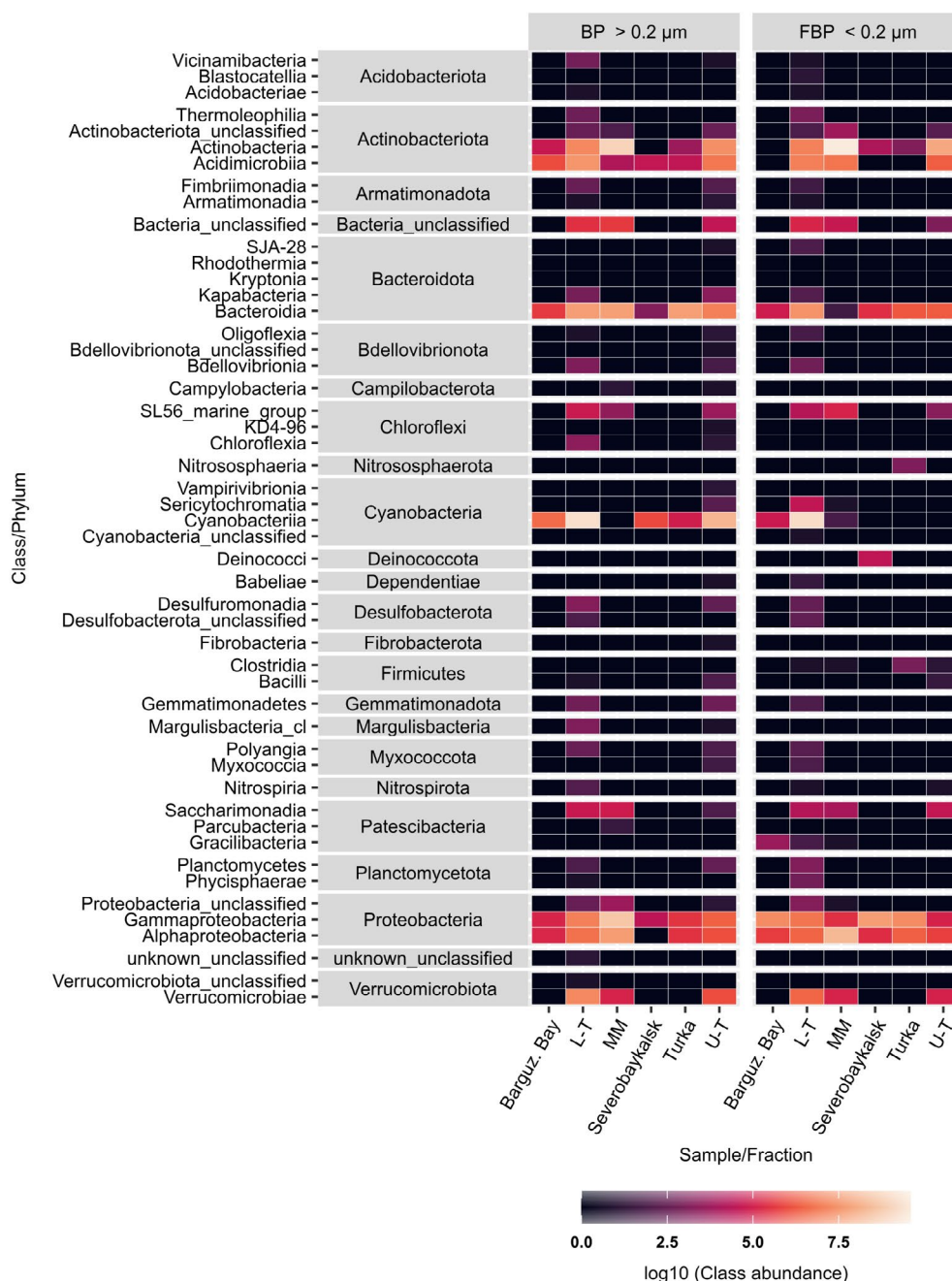


Fig.3. Bacterial abundance heatmap at the levels of phylum and classes in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaikalsk – 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

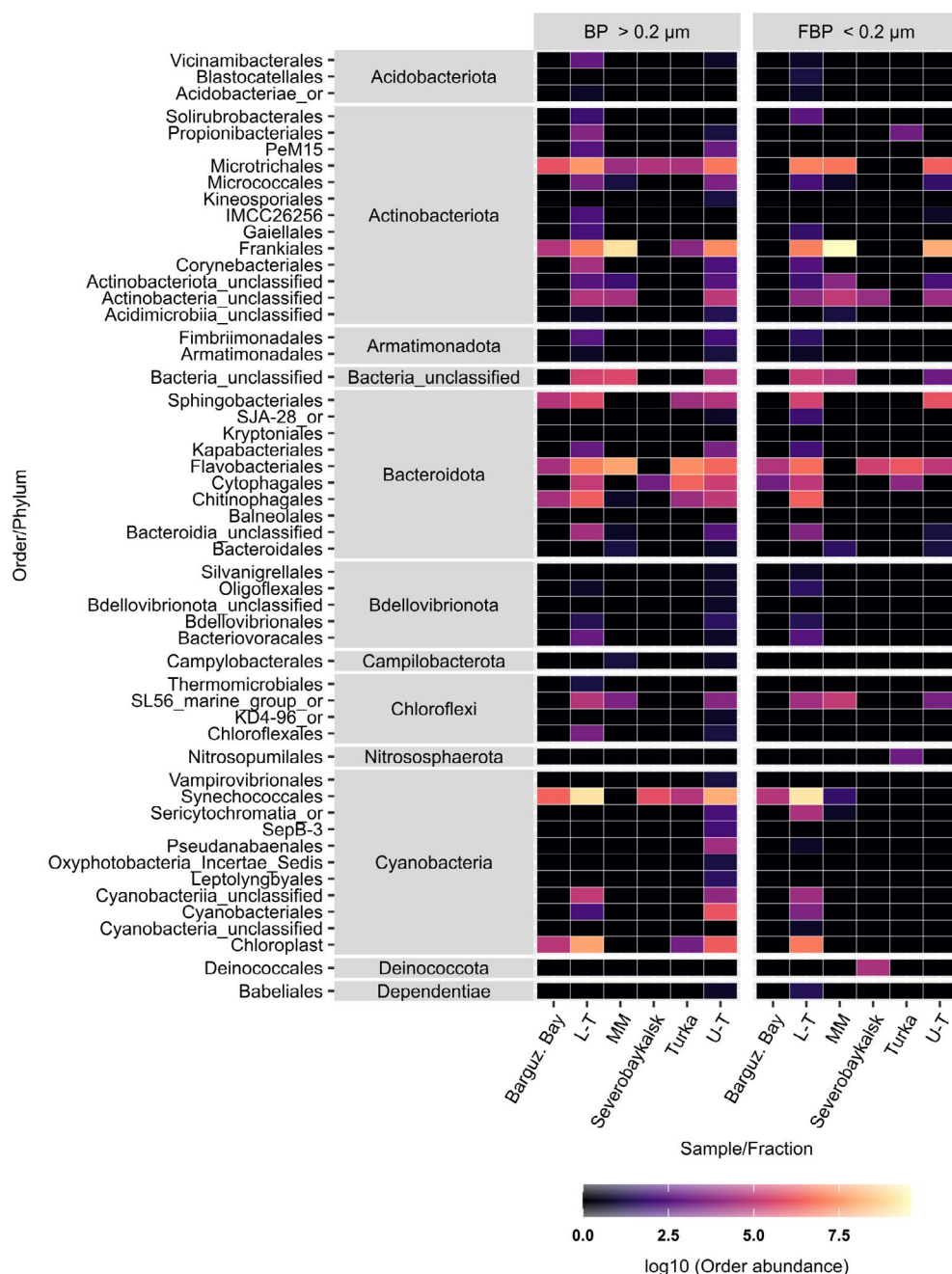


Fig.4A. Bacterial abundance heatmap at the levels of orders in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaykalsk – near the 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 Caulobacterales, Rhodobacterales, 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

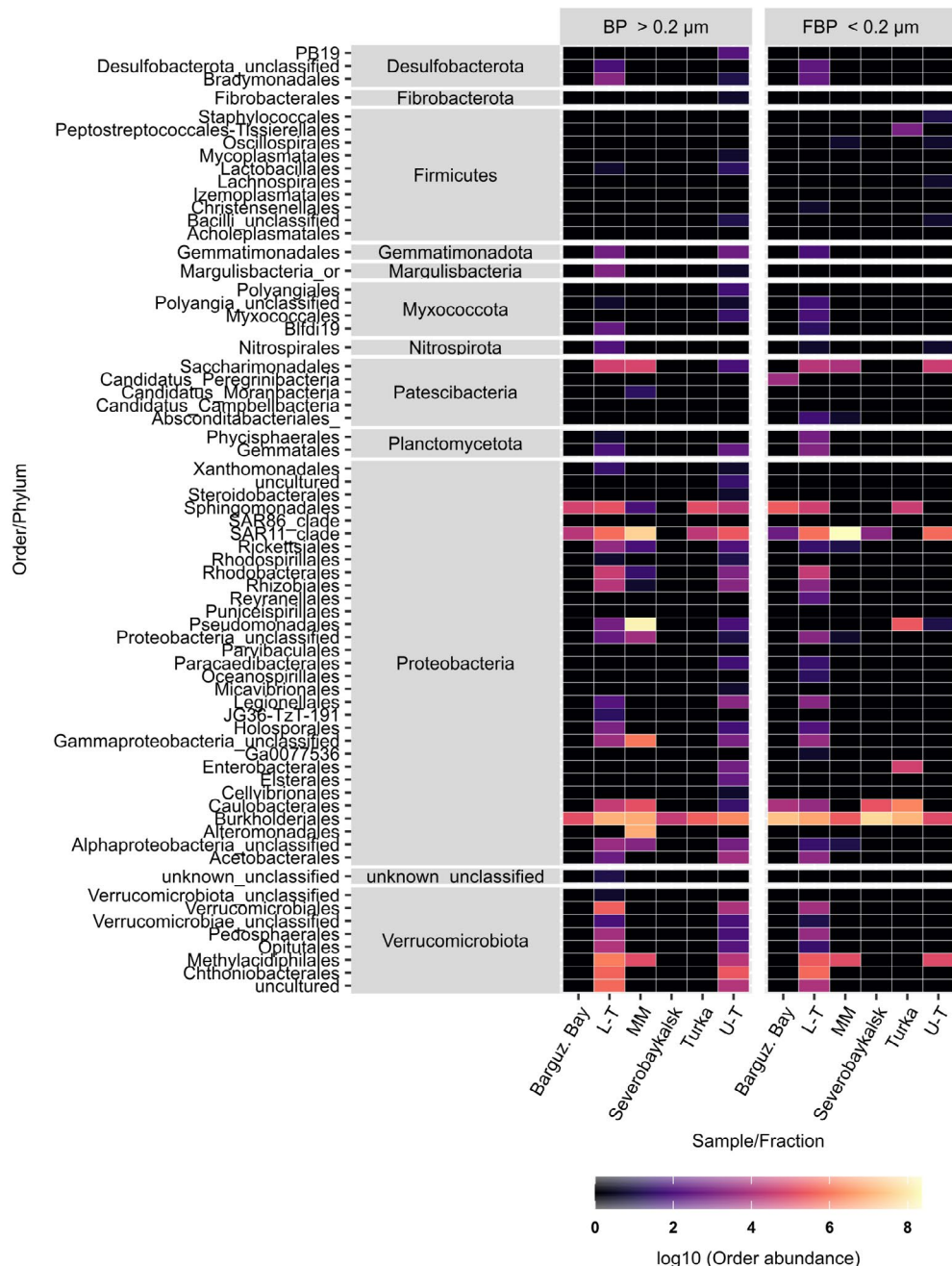


Fig.4B. Bacterial abundance heatmap at the levels of orders in two fractions of Lake Baikal water samples: > 0.2 μm (BP – large-sized bacterioplankton), < 0.2 μm (FBP – femtobacterioplankton). Sampling stations: Barguz. Bay – Barguzinsky Bay, Turka – near the Turka settlement, Severobaikalsk – near the 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. (Caulobacteriales) 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 11.3×10^4 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 CO₂ 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*'.

Patescibacteria. Uncultured, with some exceptions, bacteria with relatively small cell sizes (~0.7 µm (Albertsen et al., 2013) and genomes (<~1 Mb) represent the CPR/Patescibacteria 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 Planktophilia 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 CO₂ 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 7×10^4 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 мкм³, 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 (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/). 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).

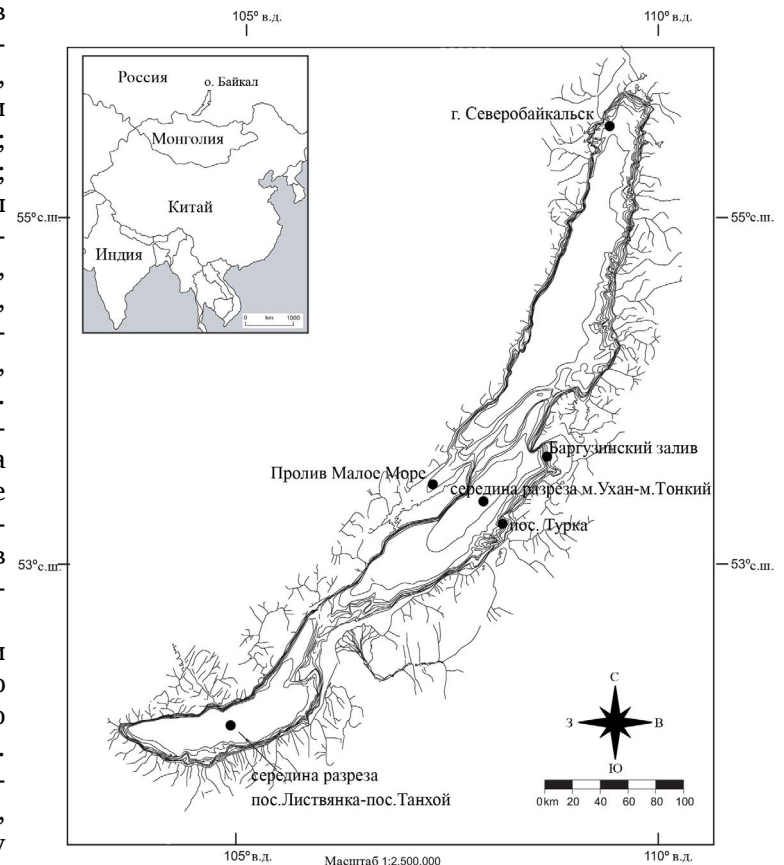


Рис.1. Карта озера Байкал. Места отбора проб.

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 2.5×10^6 кл/мл в слое 0-50 м. Численность бактерий во фракции размером менее 0.2 мкм в слое 0-50 м составила в среднем 7.0×10^4 кл/мл, на исследуемых станциях максимум 1.0×10^5 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 кислых 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 3.0×10^5 клеток бактерий селеноидной формы и объемом менее 0.1 мкм³ 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 мкм³ 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-

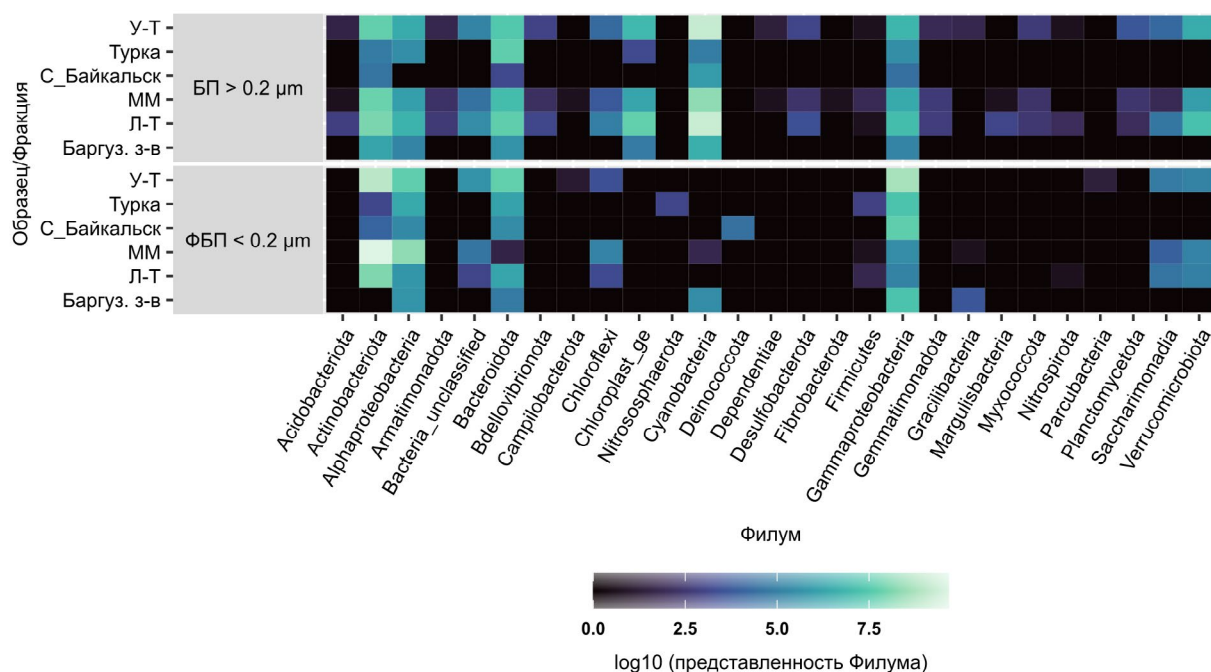


Рис.2. Тепловая карта представленности бактерий на уровне филумов и классов (альфа- гаммапротеобактерии) в двух фракциях бактериопланктона оз. Байкал: более 0.2 мкм (крупноразмерный бактериопланктон, БП) и менее 0.2 мкм (фемтобактериопланктон, ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. 3-в – Баргузинский залив, 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).

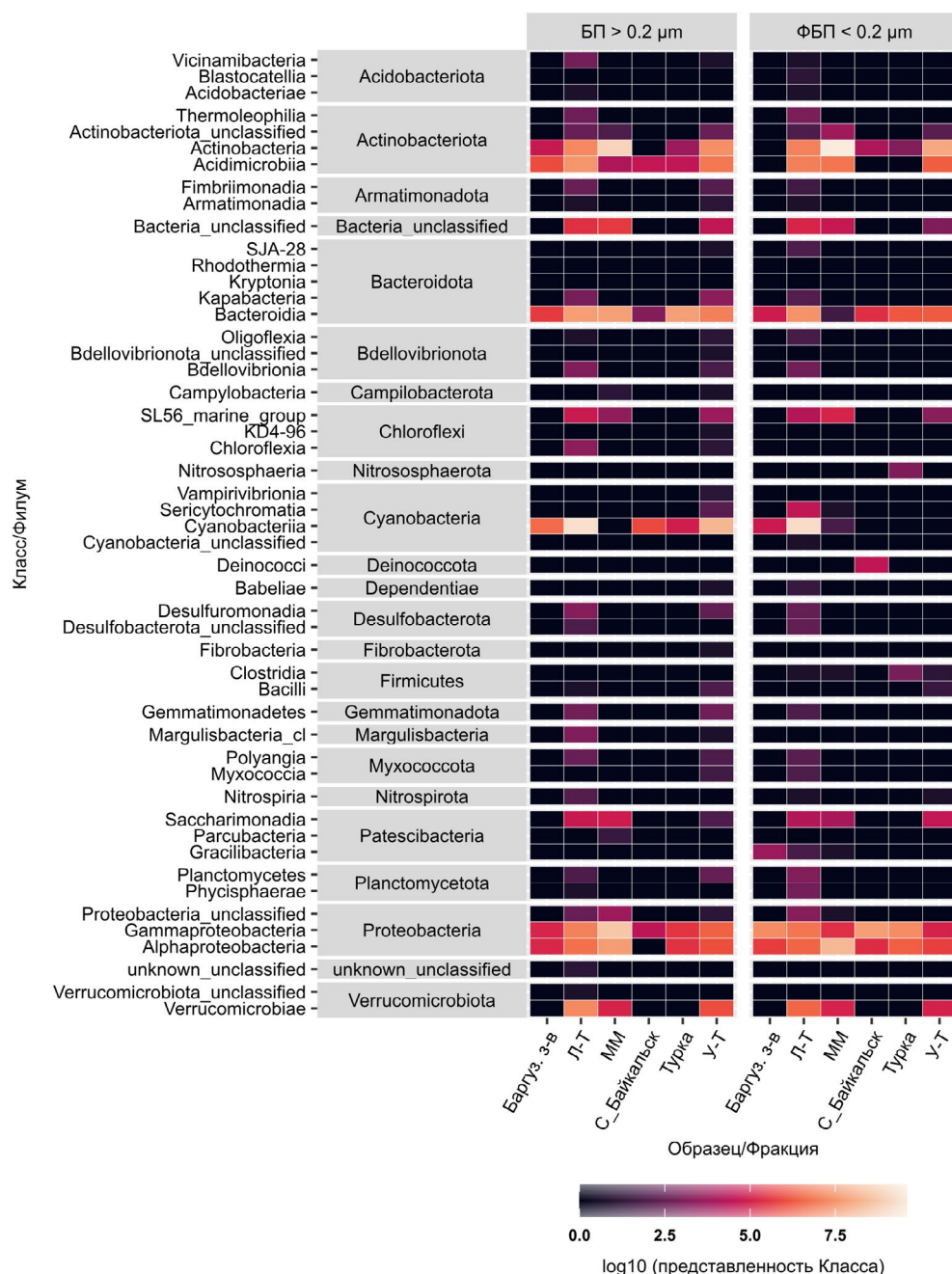


Рис.3. Тепловая карта представленности бактерий на уровне классов в двух фракциях бактериопланктона оз. Байкал: более 0.2 мкм (БП – крупноразмерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП – фемтобактериопланктон). Станции отбора проб: Баргуз. 3-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – 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

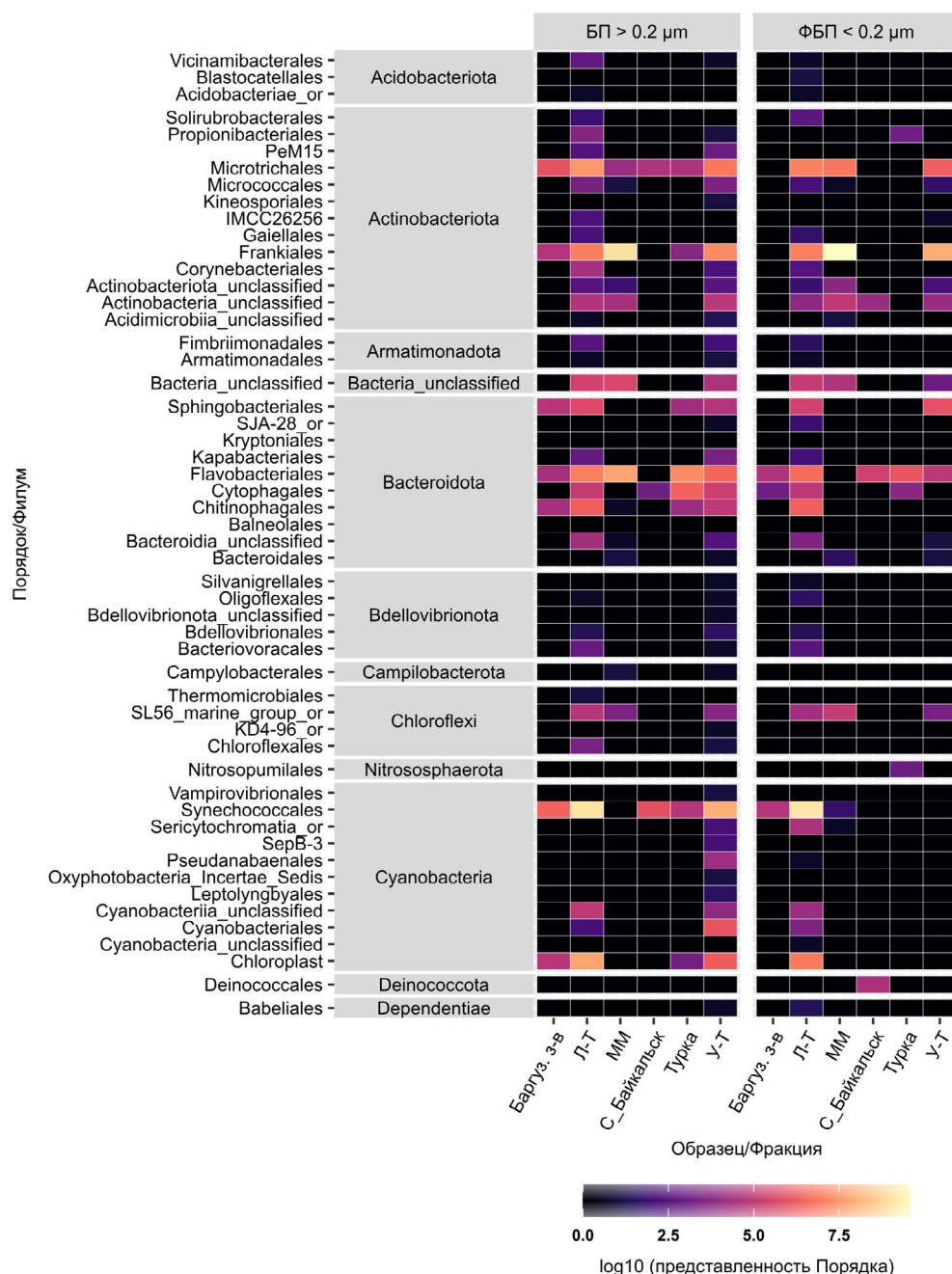


Рис.4А. Тепловая карта представленности бактерий на уровне порядков: более 0.2 мкм (БП – крупноразмерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. 3-з – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, Л-Т – центральная станция разреза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

‘*Ca. Nanopelagicus hibericus*’ из Цюрихского озера (Neuenschwander et al., 2018). ‘*Ca. Nanopelagicus hibericus*’ характеризовался чрезвычайно малыми размерами клеток (объем 0.012 мкм³) 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,

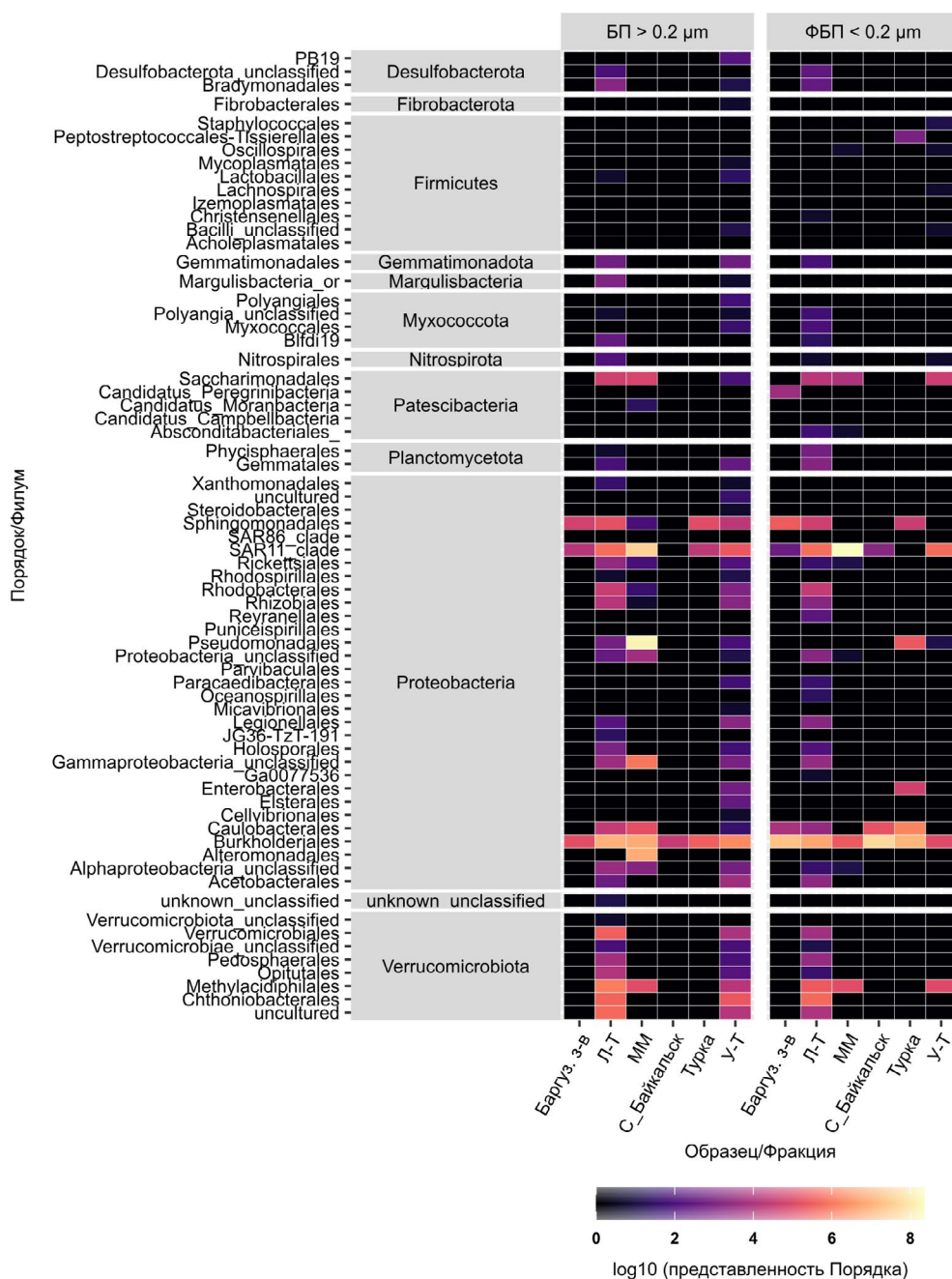


Рис.4Б. Тепловая карта представленности бактерий на уровне порядков: более 0.2 мкм (БП – крупноразмерный бактериопланктон) и менее 0.2 мкм (ФБП). Станции отбора проб: Баргуз. з-в – Баргузинский залив, Турка – вблизи пос. Турка, С-Байкальск – вблизи г. Северобайкальск, Л-Т – центральная станция разреза 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 крупноразмерной 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.

Gammaaproteobacteria включали 12 порядков, ультрамелкие формы бактерий найдены среди порядков Alteromonadales, Burkholderiales, Enterobacteriales, 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 PnecC и PnecD) 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 11.3×10^4 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 Enterobacteriales 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; Chiriac 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 CO₂ через цикл Кальвина-Бенсона-Бассема и содержат группу NiFe-гидрогеназ, которые обеспечивают электронами RuBisCO (West-Roberts et al., 2021; Chiriac et al., 2023). Бактерии линии Chloroflexi SL56 было предложено классифицировать как кандидатный род ‘Ca. Limnocyclus’ в составе порядка ‘Ca. Limnocyclus’ и класса ‘Ca. Limnocyclus’ (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 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., 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 Khubsugol (Hövs göl), 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 CO₂ 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.