

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Зайцев Петр Андреевич**

**Функционально-метагеномный анализ влияния стрессоров на природные и искусственные альго-бактериальные сообщества**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – *Соловченко Алексей Евгеньевич, доктор биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Ушакова Нина Александровна – доктор биологических наук, ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, лаборатория инновационных технологий, заведующая лабораторией, главный научный сотрудник*
- Колотилова Наталья Николаевна – доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра микробиологии, доцент*
- Плотников Андрей Олегович – кандидат медицинских наук, доцент, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН), Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, директор*

Защита диссертации состоится «04» марта 2025 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1

Тел. 8(495)939-35-46, e-mail: [nvkostina@mail.ru](mailto:nvkostina@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/3324>

Автореферат разослан «31» января 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.015.2, к.б.н.



Костина Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Альго–бактериальные сообщества (АБС) являются широко распространенной формой существования оксигенных фототрофных микроорганизмов (ОФМ), населяющих как природные, так и антропогенные экотопы [Kublanovskaya et al., 2019; Li et al., 2023]. АБС формируются с участием разных таксономических групп ОФМ. Как правило, АБС включают в себя гетеротрофных прокариот (бактерий и архей), простейших эукариот и микромицетов, вступающих в симбиотические взаимоотношения с ОФМ — эдификаторами таких сообществ [Chekanov et al. 2019; Kublanovskaya et al., 2020; de-Bashan et al., 2021]. Данные отношения могут быть представлены трофическими связями, обменом сигнальными молекулами, в АБС возможен и горизонтальный перенос генов [Ashraf et al., 2023]. Связанные такими отношениями организмы населяют фикосферу –пространство в непосредственной близости от поверхности клеток ОФМ, в котором присутствуют поверхностные структуры клеток эдификатора и формируются градиенты химических и физических параметров [Bell, Mitchell, 1972]. Изучение механизмов, по которым реализуются связи в АБС, открывает возможности для управления физиологическим состоянием АБС, что крайне актуально для решения задач экологической биоинженерии и фотобиотехнологии [Krohn-Molt et al., 2013; Chekanov et al., 2021].

Метагеномный подход обладает важными преимуществами при изучении микробных сообществ сложного состава. Так, он позволяет максимально полно выявить их полное и скрытое биоразнообразие, а также генетические особенности сообщества в состоянии, приближенном к нативному [Krohn-Molt et al., 2017]. Метагеномные исследования АБС лимитированы выбором методов секвенирования, а также доступностью алгоритмов обработки его результатов и эталонных баз данных. Двумя основными методами метагеномики являются секвенирование полного метагенома (англ. whole metagenome sequencing, WMS) и ампликонное секвенирование ДНК-баркодов, например гена 16S рРНК. Данные методы опираются на технологии секвенирования второго поколения (англ. next generation sequencing, NGS) и третьего поколения (англ. third generation sequencing, TGS), в частности Oxford Nanopore Technologies (ONT). Перспективным направлением биоинформатической обработки метагеномных данных является поиск метаболических путей для предсказания функционального потенциала микробных сообществ [Power et al., 2017; Liu et al., 2020; Golovchenko et al., 2023; Lavrentyeva et al., 2023]. Это позволяет находить наиболее перспективные сообщества для решения конкретных биотехнологических задач [Xiong et al., 2023]. Для корректного и эффективного функционально–метагеномного анализа АБС создают алгоритмы, учитывающие не только отдельные

вклады водорослевого и бактериального компонентов АБС, но и возможный синергетический эффект от их совместного присутствия [Cao et al., 2016].

Как в естественных, так и в лабораторных условиях АБС могут подвергаться воздействию стрессоров разной природы и вырабатывать механизмы устойчивости к ним. Изучение данных явлений представляет интерес в контексте разработки более совершенных решений для фотобиотехнологии – прикладного раздела биологии, занимающегося применением ОФМ для решения целого ряда биотехнологических задач, например, для очистки сточных вод от избытков биогенных элементов. Существенно, что осуществлять биологическую очистку сточных вод обычно приходится на фоне постоянных (например, избыток органики и биогенных элементов) либо внезапных стрессовых воздействий (экстремальные температуры окружающей среды, залповые сбросы, обогащенные опасными микрополлютантами, такими как лекарственные вещества и т. д.) [Chia et al., 2020; Li et al., 2023; Wang et al., 2023; Батаков и др., 2024]. Функционально–метагеномный анализ позволяет, среди прочего, оценивать потенциальную устойчивость и эффективность микробных сообществ, в т.ч. АБС, но до настоящего времени этот подход не получил широкого распространения из-за методических трудностей. Преодолению этих сложностей посвящена, в частности, данная работа.

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день АБС широко применяются для биоремедиации водоёмов, очистки сточных вод, а также для экологического мониторинга. Также показано, что лабораторные монокультуры ОФМ *de facto* являются сообществами, в которых симбиотические бактерии развиваются в фикосфере [Bell, Mitchell, 1972]. Исследования АБС зачастую включают метагеномный анализ с помощью технологий секвенирования 2-го поколения, но предметом исследований обычно является таксономический состав сообществ, тогда как оценка их функционального потенциала проводится редко.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы — сравнительное исследование влияния стрессоров на таксономическую структуру и функциональный статус компонентов альго-бактериальных сообществ (АБС) природных антропогенно-нарушенных экотопов и искусственных культивационных систем методами функциональной метагеномики.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Провести анализ таксономического состава и оценить функциональный потенциал микробиома АБС природных антропогенно-нарушенных экотопов и водоочистных сооружений методами метагеномики.
2. Проанализировать динамику изменения таксономического состава и функционального потенциала микробиома исследуемых АБС под действием модельных

стрессоров — высокой концентрации фосфата, присутствия лекарственных веществ (на примере антибиотика цефтриаксона и нестероидного противовоспалительного соединения диклофенака), иммобилизации на синтетических носителях.

3. Экспериментально оценить потенциал микробиома лабораторно культивируемых АБС в отношении биоизъятия экзогенного фосфата в искусственной системе для биотехнологической очистки сточных вод.

4. На основании данных о структуре и функциях природных АБС отобрать и сконструировать лабораторное АБС, перспективное для применения в целях биоизъятия неорганического фосфата из сточных вод.

**Объектами исследования** являлись природные АБС из водоочистных сооружений (ВОС) г. Звенигород и из эвтрофицированных экотопов вблизи апатитовых разработок предприятия АНОФ-2, лабораторные АБС культур ОФМ из коллекции кафедры биоинженерии, а также сточные воды из ВОС г. Звенигород после третичной ступени очистки.

**Предметом исследования** являлись таксономический состав и потенциал к биоизъятию неорганического фосфора компонентами АБС под действием стрессоров разного типа, а также потенциал к применению данных АБС для решения биотехнологической задачи очистки сточных вод.

**Научная новизна.** Впервые методами метагеномики получена оценка функционального потенциала к биоизъятию неорганического фосфора и устойчивости к действию лекарственных веществ для АБС из природных местообитаний и лабораторных культивационных систем. Проведено сравнительное функционально–метагеномное исследование АБС в серии «природное АБС водоёмов, эвтрофицированных фосфором — лабораторная культура этих АБС — АБС в системе очистки муниципальных сточных вод». Для этого впервые использована технологию секвенирования 3–го поколения на платформе Oxford Nanopore Technologies.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Известны различные пути взаимодействия компонентов микробиома АБС, однако генетические основы подобных взаимодействий, как и механизмы коэволюции микроорганизмов в данных системах требуют более глубокого изучения. Один из наиболее перспективных подходов к решению этой проблемы — использование методов метагеномики. Результаты таких исследований ценны для понимания принципов жизнедеятельности АБС как системы хологенома. АБС с выраженной способностью к биоаккумуляции фосфора являются перспективными биотехнологическими объектами для использования в системах биологической доочистки муниципальных стоков, обогащенных фосфатами из бытовой химии, а также промышленных стоков из разработок минеральных фосфатов. Понимание связи между таксономическим составом,

содержанием определенных генетических элементов и наблюдаемым фенотипом лежат в основе рационального конструирования эффективных АБС для экобиотехнологии.

Результаты, подходы к анализу и алгоритмы обработки данных, отработанные в ходе данного исследования включены в учебные занятия на кафедре биоинженерии биологического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках дисциплин: «Фотобиотехнология» для студентов 1 курса магистратуры, «Анализ микробных сообществ» для студентов 1 курса магистратуры, летней практики «Экологическая биоинженерия» на ББС им. Н.А. Перцова для студентов 1 курса магистратуры, «Структурная биотехнология» для студентов 4 курса бакалавриата.

**Методы и методология исследования.** Работа проведена с использованием современных методов культивирования ОФМ и метагеномики, а также морфо-физиологических и биохимических методов оценки состояния микроорганизмов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Экотопы с повышенным содержанием неорганического фосфора являются источниками АБС с выраженной толерантностью к этому биогенному элементу и высоким потенциалом в отношении его биоаккумуляции.
2. Воздействие на АБС лекарственных веществ изменяет таксономическую структуру АБС в сторону развития антибиотикоустойчивых видов, что повышает риски для здоровья и может приводить к снижению потенциала для биоизъятия неорганического фосфора.
3. Бактерии в фикосфере фосфат-толерантной зеленой микроводоросли *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 также участвуют в биоизъятии фосфора, способствуя повышению толерантности *M. simplicissimum* к высоким уровням экзогенного фосфата.
4. Технологии секвенирования 3-го поколения (в частности, ONT) имеют преимущества перед технологиями 2-го поколения (NGS) в плане функционально-метагеномного анализа АБС, обеспечивая более высокое разрешение при таксономическом профилировании и возможность прямого функционального профилирования без классических этапов ресурсозатратного биоинформатического анализа.

**Личный вклад автора** состоит в анализе релевантных данных из литературных источников, планировании экспериментальных исследований, самостоятельном их проведении либо существенном участии во всех представленных экспериментах, обработке данных и подготовке публикаций. Все работы, включая отбор образцов и опыты с установками на водоочистных сооружениях, выполнены лично автором или с его участием.

**Степень достоверности результатов.** Для каждого исследования выполнено не менее трех независимых культивационных экспериментов в трех биологических повторностях (если не указано иное). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних значений и дисперсии стандартной ошибки среднего ( $\bar{M} \pm SE$ ), достоверность различия средних оценивали по *t*-критерию Стьюдента при уровне значимости  $p < 0.05$ .

**Апробация работы** была проведена на следующих конференциях: Всероссийская конференция с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019) – стендовые доклады, BioTech 2020 & 8th Czech-Swiss Symposium with Exhibition (Прага, 2020) – устный доклад, Международная конференция студентов и аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021) – устный доклад, научная конференция «Ломоносовские чтения» (Москва, 2021 и 2023) – устные доклады, Молодежная школа-конференция «Экстремофильные микроорганизмы и их сообщества» (Москва, 2023) – устный доклад, VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения» (Апатиты, 2024) – устный доклад, Международный конгресс микробиологических обществ IUMS 2024 (Флоренция, 2024) – стендовый доклад, VII Всероссийская научная конференция с международным участием «Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии» (Владивосток, 2024) – устный доклад.

**Публикации.** По результатам работы опубликовано 8 печатных работ: из них 7 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus и RSCI) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность: сотрудникам кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ: своему научному руководителю — д.б.н. Соловченко А.Е. — за руководство, помощь и поддержку в проведении всего исследования; д.б.н., доц. Лобаковой Е.С. — за ценные рекомендации и административную поддержку исследования; к.б.н. Зайцевой А.А., к.б.н. Федоренко Т.А., и Дольниковой Г.А. — за предоставление и помощь в выделении культур микроорганизмов, а также всему коллективу кафедры за помощь в освоении использованных в работе методов и ценные советы, и особо – Шурыгину Б.М. – за системное администрирование вычислительного сервера и помощь в настройке алгоритмов для биоинформатического анализа; сотрудникам химического факультета МГУ: д.х.н. Зверевой М.Э., Родину В.А. – за помощь в проведении секвенирования на платформе Oxford Nanopore Technologies; Бондаренко Г.Н. – за конструирование установок для культивирования и помощь в их эксплуатации; коллективу Общефакультетской

лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за доступ к оборудованию ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»), и особо — Моисеенко А.В. – за помощь в освоении методов аналитической электронной микроскопии.

Данное исследование было финансово поддержано грантами РФФИ №21-74-20004, №23-44-00006; Минобрнауки №075-15-2021-1396, №075-15-2021-1011, №05.616.21.0125; РФФИ №18-29-25050мк; проектом НОШ МГУ №23-Ш04-45.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий ссылки на 275 источников, из них 270 на иностранном языке. Работа иллюстрирована 35 рисунками, содержит 20 таблиц.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Введение.** Во введении кратко изложена актуальность темы работы, научная новизна и практическая ценность работы, сформулирована цель и задачи исследования.

**Обзор литературы.** В обзоре литературы раскрывается определение АБС и описываются особенности их состава и жизнедеятельности. Рассматриваются природные и антропогенные местообитания АБС, и связанные с ними типы стрессоров. Дается описание применения природных и сконструированных АБС в экобиотехнологии. Приводится обзор современного состояния области метагеномики: платформ секвенирования, алгоритмов обработки данных и методов анализа, в том числе в контексте функциональной аннотации метагеномных данных.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Объекты исследования: места сбора и условия культивирования**

*Сбор природных АБС.* Сбор АБС с мест добычи апатитов проводился в окрестностях апатит-нефелиновой обогатительной фабрики АНОФ-2 АО «Апатит» в 2018 году. Сбор проводился в прибрежной зоне постоянных водоёмов: на берегу озера Большая Имандра и в водоёмах рядом с хвостохранилищем АНОФ-2 (рис. 1).





Рис. 1. АБС апатитовых разработок: карта расположения водоёмов и точек пробоотбора АБС (а), общий вид апатит-нефелинового карьера АНОФ-2 с водоёмами вокруг него и указанием точек отбора АБС (б), вид берега озера Б. Имандра с флоккулами и обрастаниями АБС (в), вид берега прудов с флоккулами АБС (г).

Сбор проб АБС активного ила проводили из вторичных отстойников водочистных сооружениях г. Звенигород (ООО «Звенигородский городской водоканал») в июне-августе 2020–2021 гг. (рис. 2а).

Альгологические монокультуры ОФМ были выделены из природных АБС, собранных в окрестностях АНОФ-2 и поддерживались в периодической стационарной культуре на среде ВГ-11, содержащей 40 мг/л фосфата ( $P_i$ ), при освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>/с и комнатной температуре.

*Культивирование АБС.* Для моделирования стресса, связанного с резким повышением концентрации экзогенного  $P_i$ , АБС активного ила инкубировали 14 сут. в проточном желобе (13 × 1 м, скорость подачи третичного эфлюента — 10 л/мин, содержание  $P_i$  — 9,29±0,93 мг/л; рис. 2б).

Для моделирования стресса, связанного с воздействием лекарственных веществ на АБС активного ила при разных концентрациях  $P_i$ , АБС инкубировали в стерильных культивационных матрасах (40 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>/с, комнатная температура) в течение 1 месяца в присутствии антибиотика цефтриаксона (ЦТА) (5 мкг/л) либо диклофенака (ДФ) (5 мкг/л), с добавлением  $K_2HPO_4$  и  $KNO_3$  (50 и 100 мг/л, соответственно) либо без него. Контролем служили образцы АБС, инкубируемые без добавок.

Моделирование влияния фосфорной эвтрофикации проводили, инкубируя АБС активного ила ВОС и АБС из мест добычи апатитовых руд в стеклянных колбах

в стационарных условиях (40 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>/с, комнатная температура) в течение 1 месяца в стандартной среде BG-11 (40 мг/л P<sub>i</sub>) и повышенным содержанием P<sub>i</sub> (200 мг/л P<sub>i</sub>). В этих экспериментах структуру АБС сравнивали как между природными и лабораторными сообществами, так и между экотопами.

Для оценки влияния иммобилизации на способность АБС к поглощению P<sub>i</sub> из сточных вод использовали альгологическую монокультуру зелёной микроводоросли *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056, иммобилизованную на синтетическом полимерном носителе «хитозан С600» (получен от НИЦ «Курчатовский институт»). На обеих сторонах пластин хитозана (10 × 7 × 1 см) иммобилизовали по 25 мл суспензии *M. simplicissimum* (содержание хлорофилла — 25 мг/л). Носитель с клетками инкубировали в нестерильном тонкослойном каскаде (рис. 2в) при 120 мкмоль квантов ФАР/м<sup>2</sup>/с в циркулирующем потоке (30 л/мин) сточных вод ВОС г. Звенигород после третичной очистки в течение четырех циклов по 7 суток, в конце каждого цикла добавляли свежую порцию эфлюента (5 л).



Рис. 2. Сбор АБС активного ила на водоочистных сооружениях Звенигородского водоканала: сбор активного ила из вторичных отстойников (а), внешний вид установки проточного желоба, в которую подаётся сточная вода после третичной очистки (б), внешний вид установки тонкослойного каскада с иммобилизованной культурой *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056.

### Метагеномное секвенирование образцов АБС

Выделение метагеномной ДНК проводили с помощью набора DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу производителя, с предварительным трехкратным замораживанием в жидком азоте и гомогенизацией биомассы с помощью пластикового гомогенизатора в пробирке. Для образцов для секвенирования на платформе Oxford Nanopore Technologies этапы интенсивного перемешивания в протоколе заменялись на бережное перемешивание переворачиванием пробирки.

Профилирование АБС по локусу 16S рРНК выполняли с помощью ампликонного секвенирования гипервариабельного фрагмента V4 гена 16S рРНК (далее – 16S рРНК ДНК-метабаркодинг). Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК с

гипервариабельным участком V4 и приготовление библиотек для секвенирования осуществляли с использованием олигонуклеотидных праймеров F515 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') и R806 (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с получением парного-концевых чтений (2 × 300 п.н.). Демультимплексирование образцов и удаление адаптеров проводили в ПО Illumina (Illumina, США). Процедуры деноизинга, объединения последовательностей, восстановления исходных флотипов (ASV, Amplicon sequence variant), удаления химерных прочтений, и таксономической классификации полученных ASV выполняли в программной среде R с использованием программных пакетов dada2, phyloseq и DECIPHER, а также базы данных SSU 16s rRNA SILVA (релиз 132).

*Секвенирование полного метагенома на платформах NGS* проводили на приборе SURFSeq 5000 (GeneMind, Китай) с использованием набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300cycles (GeneMind, Китай). Полногеномная амплификация ДНК была проведена при помощи набора WGA Classic (Raissol, Россия). Приготовление библиотек ДНК для секвенирования было проведено с использованием набора Universal Plus DNA library Prep Kit for Illumina (Vazyme, Китай). Для таксономической классификации проводили объединение прямых и обратных чтений NGS, после чего применяли алгоритм на базе k-мерного подхода таксономической классификации MetaPhlan 4.

*Секвенирование полного метагенома на платформе Oxford Nanopore Technologies* проводили по технологии Oxford Nanopore Technologies (ONT, Великобритания) по протоколу Native barcoding genomic DNA (SQK-LSK109) на секвенаторе MinION (ONT, Великобритания) с использованием ячейки R9.4.1 (ONT, Великобритания). Для преобразования первичных данных использовали программу Guppy basecaller (ONT, Великобритания). Таксономическую классификацию полученных чтений проводили в онлайн-сервисе BugSeq (<https://bugseq.com>).

Для таксономических профилей рассчитывали индексы  $\alpha$ -разнообразия Шеннона и Симпсона, а также индекса  $\beta$ -разнообразия Мориситы согласно [Horn, 1966].

#### **Функциональный анализ АБС по данным метагеномики**

Функциональную аннотацию результатов 16S рРНК ДНК-метабаркодинга на платформе NGS проводили с помощью алгоритма PICRUSt2 по представленности путей метаболизма неорганических элементов (по базе данных MetaCyc).

Функциональную аннотацию результатов WMS на платформе NGS проводили по алгоритму на базе k-мерного подхода HUMAnN 3 по представленности путей метаболизма неорганических элементов (по базе данных MetaCyc).

Функциональную аннотацию результатов WMS на платформе ONT проводили путем сопоставления эталонных профилей путей биоаккумуляции фосфора с последовательностями в метагеноме с помощью алгоритма BLAST.

### **Микроскопические методы**

*Оптическая светлопольная и флуоресцентная микроскопия.* Морфологический анализ АБС проводили методом оптической микроскопии в светлопольном режиме на микроскопе Leica DM2500 (Leica, Германия) с фотокамерой DFC 7000T того же производителя. Клетки эукариотических микроводорослей визуализировали по аутофлуоресценции хлорофилла *a* на том же фотомикроскопе с использованием возбуждающего света от лампы НХР 120 и фильтра D (355–425 нм) того же производителя. Цитохимическое окрашивание полифосфатов проводили раствором флуоресцентного красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ, DAPI). Эмиссию флуоресценции детектировали в диапазоне 455–700 нм.

*Сканирующую электронную микроскопию* проводили после фиксации по ранее опубликованному протоколу [Gorelova et al., 2015] и высушивании в критической точке CO<sub>2</sub> в сушильной установке НСР-2 (Hitachi, Япония) и напыления золотом с палладием на ионно-напылительной установке IB Ion Coater (Eiko, Япония) и в микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония).

*Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).* Элементный анализ включений в клетках АБС проводили методом ПЭМ (энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, ЭДРС) полутонких (200–250 нм) срезов на аналитическом электронном микроскопе JEOL-2100 (JEOL, Япония), оснащенном светлопольным детектором для работы в режиме сканирующей ПЭМ (СПЭМ) (JEOL, Япония) и рентгеновским кремний-дрейфовым детектором X-Max с активной площадью кристалла 80 мм<sup>2</sup> (Oxford Instruments, Великобритания).

### **Физиолого-биохимический анализ альго-бактериальных сообществ**

*Состояние фотосинтетического аппарата* оценивали путем анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* с использованием РАМ-флуориметра FluorCam FC 800-C (Photon Systems Instruments, Чешская Республика) по значению максимального потенциального квантового выхода фотосистемы II.

*Анализ содержания пигментов* проводили спектрофотометрически в экстрактах в диметилсульфоксиде (ДМСО) на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis (Agilent Technologies, США).

*Остаточное содержание P<sub>i</sub> в среде* определяли с применением хромогенной реакции с образованием молибденового синего на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Швейцария) [Ota, Kawano, 2017].

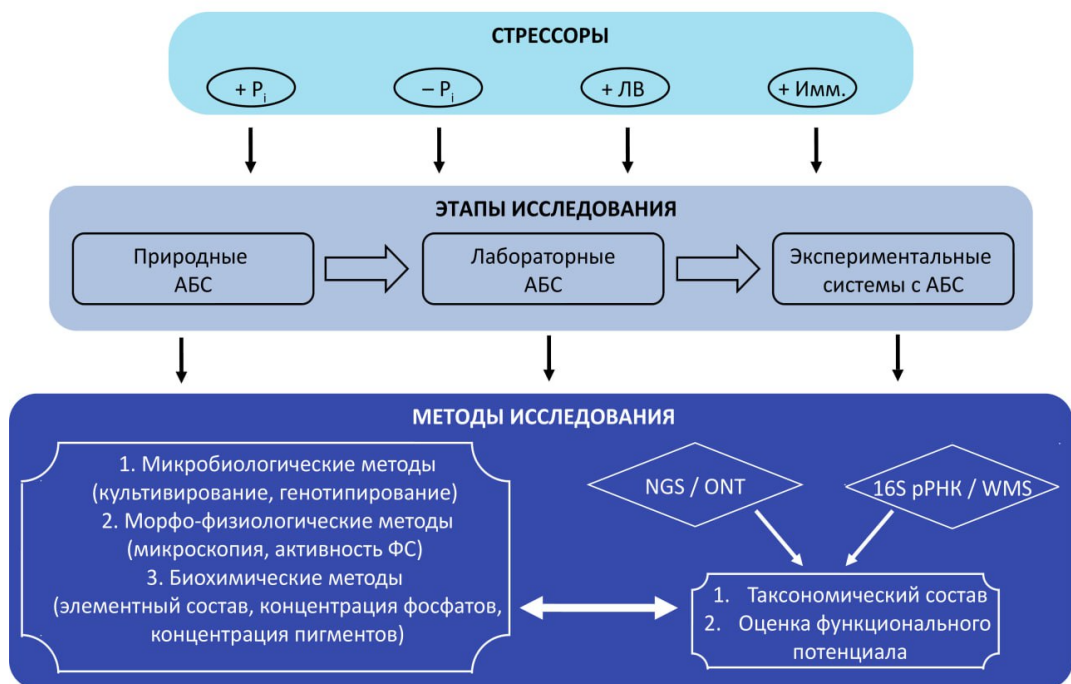


Рис. 3. Стратегии исследований. Обозначения: ЛВ – лекарственные вещества, Имм. – иммобилизация, ФС – фотосинтез, 16SpPHK – ДНК-метабаркодирование по локусу 16SpPHK

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ таксономического состава и биоразнообразия природных АБС

Большинство современных методов очистки сточных вод, особенно муниципальных, основаны на биопроцессах с использованием активного ила (АБС), формирующегося естественным путем на водоочистных сооружениях. Эффективность (полнота и скорость) очистки очевидным образом зависит от функционального статуса этого АБС, а стабильность — от таксономической и морфологической структуры. Так, чем разнообразнее составляющие АБС компоненты, тем больше вероятность того, что оно сохранит функциональность в неблагоприятных условиях (при действии стрессоров, таких как резкие колебания содержания биогенных элементов в поступающих сточных водах либо при появлении в их составе опасных микрополлютантов, таких как антибиотики и другие лекарственные вещества).

В настоящей работе моделировали воздействие на АБС активного ила смены режима культивирования со стационарного на проточный с целью увеличения полноты изъятия  $P_i$ . При этом наблюдали изменение морфологической структуры АБС с заменой фототрофной доминанты АБС - нитчатых цианобактерий (рис. 4в-е) на нитчатые эукариотные микроводоросли. Замена эдификатора сообщества сопровождалось существенным увеличением представленности гетеротрофных прокариот (рис. 4а, д, е). Это согласуется с современными представлениями о росте конкурентного преимущества микроводорослей перед цианобактериями при повышении



биодоступности такого биогенного элемента как фосфор [Briddon et al., 2022; Liepina-Leimane et al., 2024].

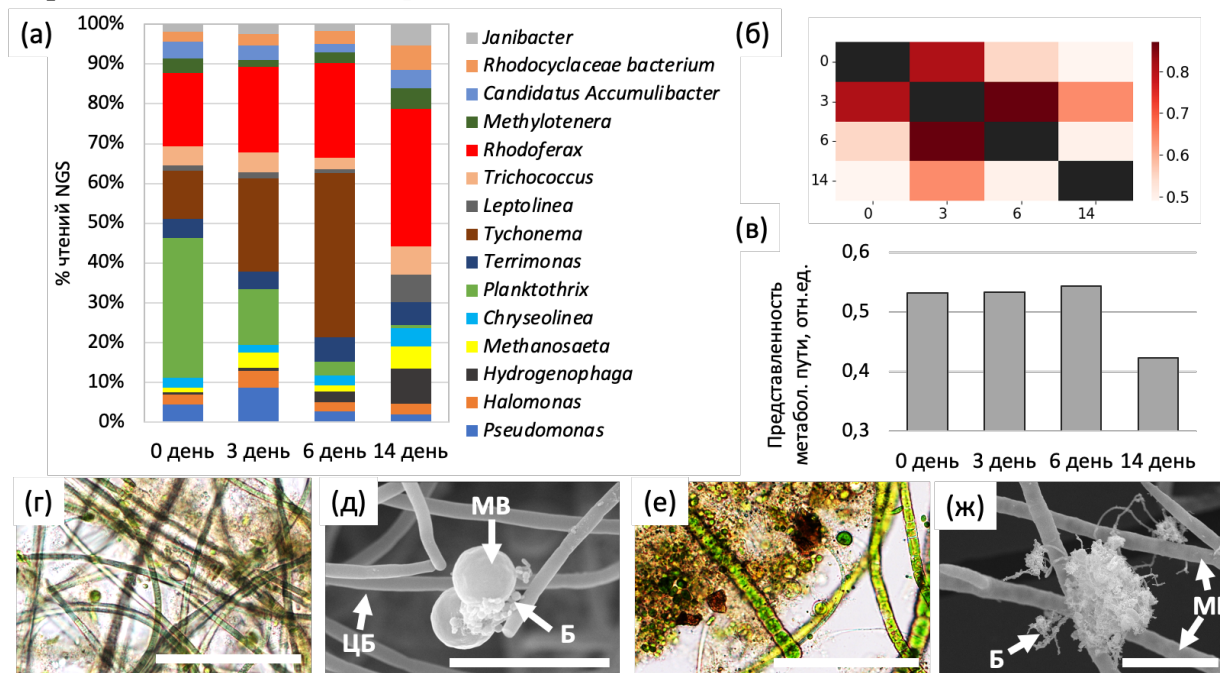


Рис. 4. Динамика структуры АБС активного ила при переходе от роста во вторичных отстойниках к росту при повышенной биодоступности фосфата: таксономический состав микробиома на уровне родов по данным 16S рРНК-метабаркодинга по технологии NGS (а), тепловая карта значений индекса β-разнообразия Мориситы (б), рассчитанная представленность путей метаболизма элементов минерального питания по алгоритму PICRUSt2 (в), морфологическая структура АБС в начале (г, д) и в конце инкубации (е, ж). Обозначения: микроводоросли (МВ), цианобактерии (ЦБ) и бактерии (Б). Масштабный отрезок для г, е, ж – 30 мкм, для д – 15 мкм.

Значения индекса Мориситы, рассчитанные по метагеномным данным, также выявили значительные изменения прокариотической составляющей АБС активного ила в ходе двухнедельного культивирования (рис. 4б). При этом АБС содержало полифосфат-аккумулирующие бактерии из рр. *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Candidatus Accumilibacter* и *Rhodocyclaceae bacterium* в течение всего периода наблюдений.

По данным о динамике морфологической структуры, в АБС активного ила снижалась представленность типичных для сточных вод цианобактерий рр. *Planktothrix* и *Tychonema*, не обладающих выраженной способностью к накоплению полифосфатов. Одновременно со снижением представленности цианобактерий и ростом представленности нитчатых микроводорослей в метагеноме АБС активного ила росла представленность бактерий, способных быть первичными продуцентами

(рис. 4а), например метаногенов из рода *Methanosaeta* и пурпурных несерных бактерий рода *Rhodofera*.

Неуклонный рост концентраций опасных микрополлютантов, таких как антибиотики и другие лекарственные вещества, в муниципальных сточных водах увеличивает риски для эффективности очистки сточных вод традиционными биологическими методами [Shipingana et al., 2022]. В этой связи исследовали воздействие распространенных лекарственных веществ — цефтриаксона (ЦТА) и диклофенака (ДФ) — на АБС активного ила водоочистных сооружений.

Инкубация АБС активного ила в течение 1 месяца в присутствии лекарственных веществ в концентрации 5 мг/л вызывала изменение таксономического состава АБС. Так, инкубация с диклофенаком приводила к изменению фототрофного компонента сообществ — представителей класса Cyanobacteria. Инкубация с цефтриаксоном также снижала представленность цианобактерий в пользу представителей эукариотических микроводорослей. При этом было установлено, что, несмотря на изменения в таксономической структуре АБС, цефтриаксон и диклофенак в исследованной концентрации не влияли на биоизъятие  $P_i$  из сточных вод (рис. 5а). Однако анализ репертуара и обилия генетических элементов, связанных с поглощением и ассимиляцией фосфора, выполненный по алгоритму PICRUSt2, показал, что невзирая на сохранение темпов изъятия  $P_i$ , потенциальная способность АБС к изъятию биогенных элементов, в частности, фосфора, при инкубации с лекарственными веществами проявляла тенденцию к снижению (рис. 5б).

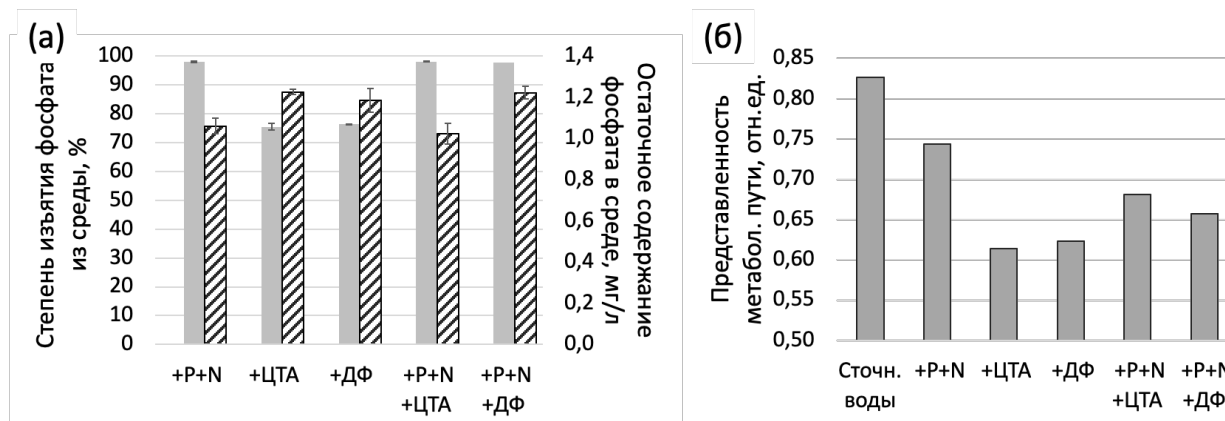


Рис. 5. Функциональная характеристика АБС активного ила ВОС при инкубации в сточных водах с добавлением биогенных элементов и (или) лекарственных веществ: серый – степень биоизъятия фосфата из сточных вод и остаточное штрих – содержание фосфата в сточных водах (а); рассчитанная представленность путей метаболизма неорганических нутриентов по алгоритму PICRUSt2 (б).

Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно-нарушенных биотопов считается богатым источником микроорганизмов, адаптированных к антропогенным стрессорам, например к высоким уровням различных загрязнителей [Schaedig et al., 2023]. Соответственно, поиск новых штаммов, обеспечивающих эффективную очистку от загрязнений, целесообразно проводить путем скрининга АБС в подобных местах. В случае фосфорной эвтрофикации таковыми могут считаться водоёмы, расположенные в окрестностях апатитовых разработок, откуда и отбирали образцы исследованных в данной работе АБС. Для повышения эффективности биоизъятия фосфата нативными (автохтонными) АБС водоочистных сооружений можно использовать ОФМ, как раз выделяемые из аллохтонных (из других местообитаний) АБС, существующих в эвтрофицированных водоёмах.

Результаты 16S рРНК ДНК-метабаркодинга АБС из апатитовых разработок (рис. 1) показали схожесть таксономической структуры образцов из всех исследованных водоёмов, за исключением «временного водоема». Для него наблюдали относительно низкие значения индекса Шеннона и высокие значения индекса Симпсона, что свидетельствовало о пониженном биоразнообразии и более выраженном доминировании отдельных групп микроорганизмов. Оценка степени сходства сообществ по индексу Мориситы также показала, что сильнее всего от остальных отличались АБС «залива» и «пруда II» (рис. 6а), в связи с чем подробнее исследовали их функциональный потенциал к биоаккумуляции фосфатов (рис. 6б).

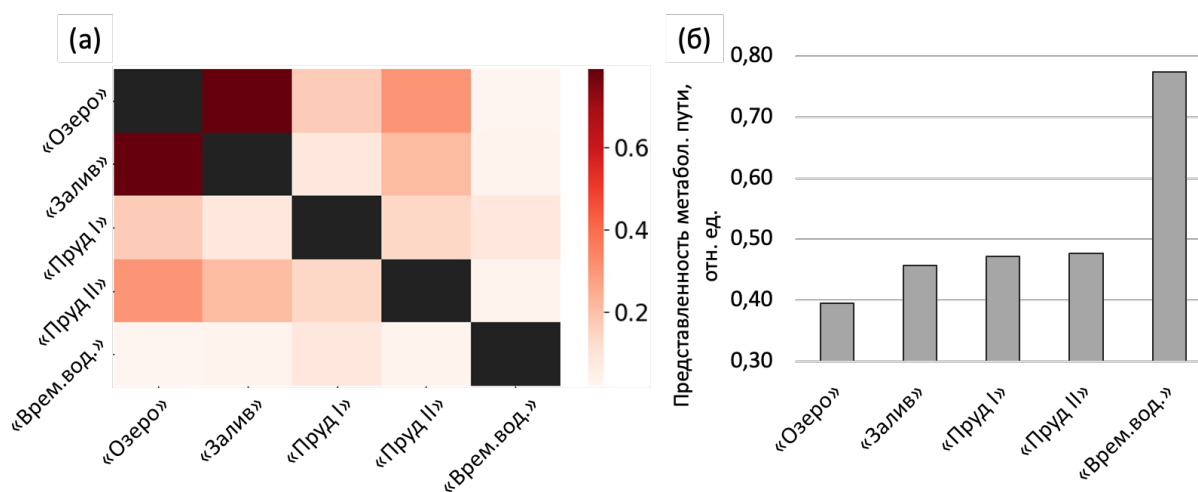


Рис.6. Сравнение АБС апатитовых разработок на основе данных 16S рРНК ДНК-метабаркодинга на платформе NGS: тепловая карта значений индекса  $\beta$ -разнообразия Мориситы (а), рассчитанная представленность путей метаболизма неорганических нутриентов по алгоритму PICRUSt2 (б).



Несмотря на высокий потенциал «временного водоема», его низкое биоразнообразие указывает на временный нестабильный характер данной системы. Среди оставшихся сообществ для данной задачи были выбраны «залив» и «пруд II», представляющие экотопы разной природы, но при этом наиболее похожие друг на друга.

Сравнительную оценку потенциальной способности исследованных АБС к биоизъятию  $P_i$  из сточных вод аллохтонными и автохтонными сообществами, полученную в результате метагеномного анализа, дополняли анализом влияния избытков  $P_i$  на микробиом АБС в культивационных экспериментах, моделирующих залповые сбросы («спайки») фосфатов со сточными водами. Установлено, что повышение концентрации экзогенного  $P_i$  сильнее влияет на микробиом АБС активного ила ВОС, чем на микробиом АБС апатитовых разработок (рис. 7). Несмотря на рост биоразнообразия АБС в условиях фосфорной эвтрофикации, из АБС активного ила исчезали исходно присутствовавшие в нем цианобактерии и полифосфат-аккумулирующие бактерии. В то же время структура АБС апатитовых разработок не претерпела значительных изменений, в них сохранялись исходно обитавшие там представители МГРВ-бактерий (бактерий, стимулирующих рост микроводорослей) из рр. *Brevundimonas*, *Bosea* и *Rhizobium* [Kim et al., 2014].

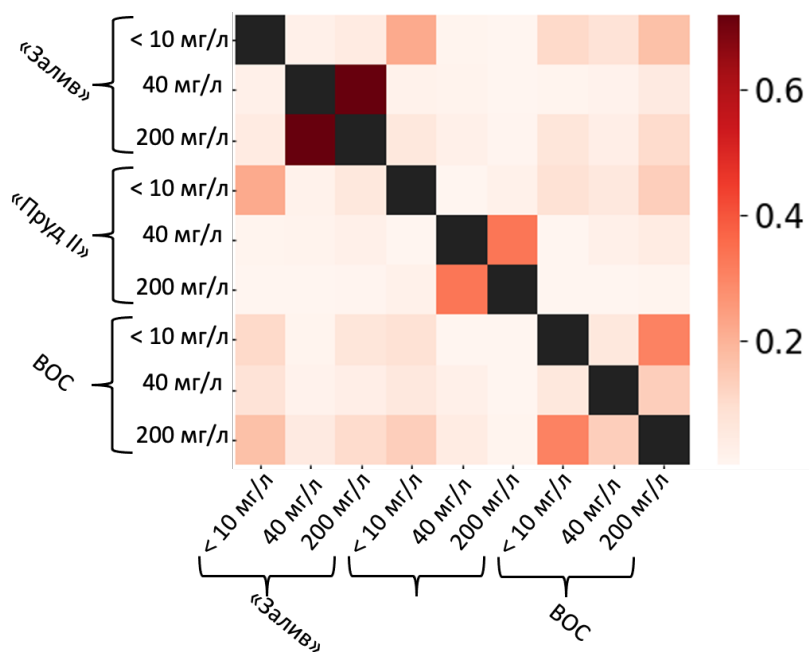


Рис. 7. Сравнение динамики таксономического состава микробиома АБС активного ила ВОС и апатитовых разработок при инкубации с повышенными концентрациями  $P_i$  в среде (10, 40, 200 мг/л) – тепловая карта значений индекса  $\beta$ -разнообразия Мориситы, рассчитанная по данным WMS на платформе ONT).

При инкубации АБС активного ила и апатитовых разработок в условиях фосфорной эвтрофикации было обнаружено, что в первом происходит развитие нитчатых микроводорослей, способных к внутриклеточному накоплению полифосфатов (рис. 8а); в АБС «залива» из апатитовых разработок в наблюдали активный рост зелёных микроводорослей, а в АБС «пруда II» – активный рост цианобактерий, также обладающих выраженной способностью к аккумуляции полифосфатов (рис. 8а). Функциональный анализ результатов секвенирования WMS на платформе ONT показал последовательный рост представленности генов, связанных с толерантностью к избыткам экзогенного  $P_i$ , у АБС из образцов ВОС и «залива», причем у последнего происходит наибольший рост представленности искомым генов в метагеномных чтениях эукариотических ОФМ, что также подчеркивает значение данной функциональной группы для целевого фенотипа (рис. 8б). Данные результаты дополнительно подтверждают возможность использования АБС из экотопов апатитовых разработок как источника штаммов микроводорослей для создания искусственных сообществ с целью очистки сточных вод от избытков фосфатов.

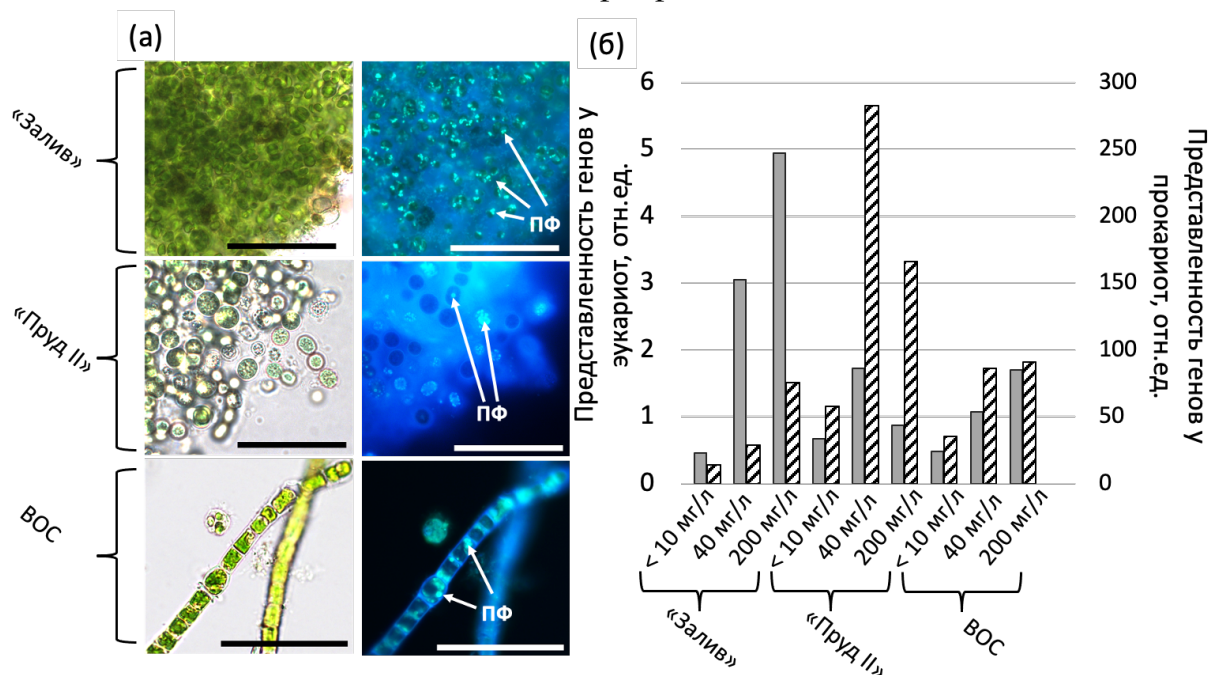


Рис. 8. Сравнение потенциала к фосфор толерантности микробиома АБС активного ила ВОС и апатитовых разработок при инкубации с повышенными концентрациями  $P_i$  в среде: микроскопирование АБС с визуализацией полифосфатов (ПФ) для концентраций  $P_i$  200 мг/л (а), обилие генов, связанных с биоаккумуляцией фосфора, рассчитанные по данным WMS на платформе ONT: серый – гены в эукариотах, штрих – гены в прокариотах (б). Масштабный отрезок для а – 10 мкм.

Из исследованных АБС методом накопительной культуры на средах с повышенным содержанием  $P_i$  были выделены альгологические монокультуры микроводорослей *Chlamydomonas applanata*, *Desmodesmus armatus*, *Micractinium simplicissimum*, а также микроводоросль *Micractinium inermum* и цианобактерии *Cylindrospermum* sp., *Nodosilinea* sp.

Микроорганизмы, перспективные для очистки сточных вод различной природы, должны быть устойчивы к резким и значительным по амплитуде изменениям концентрации загрязнителей [Briddon et al., 2022]. В этой связи был выполнен скрининг полученных изолятов ОФМ по толерантности культур к повышенным концентрациям экзогенного  $P_i$  (40 и 200 мг/л) с мониторингом функциональной активности фотосистемы II, динамики накопления биомассы и полифосфатов. Штамм *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 оказался наиболее толерантным к исследованному стрессору и наиболее способным к аккумуляции полифосфатов (рис. 9а,б).

Также был проанализирован ответ *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 на резкое повышение концентрации  $P_i$  в среде после стресса, вызванного длительным фосфорным голоданием. Установлено, что, несмотря на высокую толерантность к экзогенному  $P_i$ , клетки *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 повреждаются и гибнут в результате резкого повышения концентрации  $P_i$  в среде после периода голодания. Принимая во внимание изменения морфологии и химического состава включений клеток *M. simplicissimum*, а также опубликованные в литературе данные, можно думать, что причиной гибели микроводоросли в этих условиях является накопление высоких количеств короткоцепочечных полифосфатов, предположительно нарушающих фолдинг белков и смещающих равновесие реакций (де)фосфорилирования центрального метаболизма [Achbergerova, Nahalka, 2011].

Эти события сопровождалась характерными изменениями микробиома фикосферы *M. simplicissimum*, где MGPB-бактерии из pp. *Rhizobium*, *Brevundimonas*, *Chryso bacterium* и замещались другими MGPB из pp. *Variovorax* и *Bosea*, а также сапрофитными бактериями из pp. *Sediminibacterium* и *Caulobacter*.

По всей видимости, вышеописанные изменения отражают влияние стресса, испытываемому микроводорослью-эдификатором АБС, на микробиом её культуры. В целом, акклимация АБС к резким изменениями доступности  $P_i$  в среде проявлялась в пролиферации бактерий из родов, участвующих в минерализации органики отмерших клеток, мобилизации фосфора и его депонировании в бактериальных клетках в виде полифосфатов. Последнее предположение было подтверждено ультраструктурными исследованиями методом аналитической ПЭМ в комбинации с элементным анализом методом ЭДРС, выявившими массовое накопление полифосфатов в клетках бактерий, населяющих фикосферу *M. simplicissimum* (рис. 9в-г).

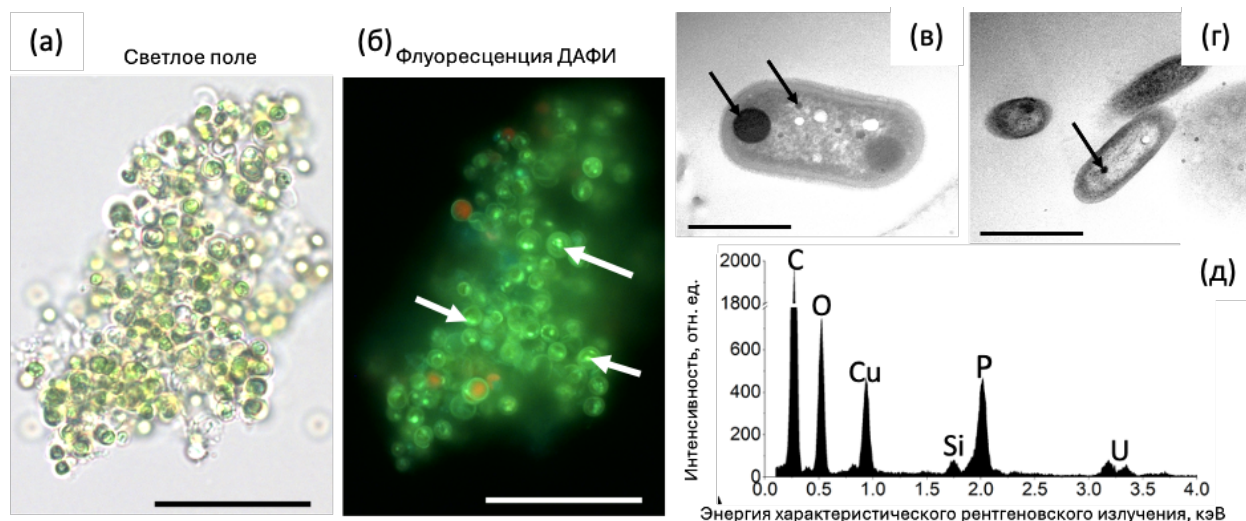


Рис. 9. Характеристика АБС культуры *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056: биоаккумуляция полифосфатов в клетках культуры (а, б), фосфорсодержащие включения в клетках бактерий фикоферы *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 (в, г), спектр ЭДРС включений в бактериальных клетках. Обозначения: стрелки – полифосфаты. Масштабные отрезки: а, б – 20 мкм, в, г – 1 мкм.

Практическая реализация биологической очистки сточных вод с применением культур ОФМ и АБС сталкивается с трудностями из-за выноса клеток микроорганизмов из очистных сооружений и, как показано выше, недостаточной толерантностью клеток к вариации состава сточных вод. Во многом эти трудности удается преодолеть путем иммобилизации клеток на биосовместимых носителях, но при использовании данного подхода необходимо учитывать возможное влияние иммобилизации на физиологическое состояние и структуру АБС [Garbowski et al., 2020; Vasilieva et al., 2021]. В этой связи оценивали влияние иммобилизации на хитозане С600 (см. Материалы и методы) на микробиом АБС модельной лабораторной монокультуры одноклеточной зелёной водоросли *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 [Vasilieva et al., 2022] при инкубации в присутствии 20 мг/л антибиотика ЦТА и альгологической монокультуры *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 в проточной замкнутой системе с циркуляцией сточных вод из водоочистных сооружений.

После первой недели инкубации у иммобилизованных монокультур *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 наблюдали снижение биоразнообразия микробиома и рост доминирования отдельных прокариот, однако после второй недели инкубации значения показателей биоразнообразия и выраженности доминант выравнивались между образцами независимо от статуса иммобилизации и присутствия антибиотика. После второй недели инкубации значения индекса сходства Мориситы увеличивались для всех АБС, вовлеченных в эксперимент, по сравнению с первой неделей

(рис. 10). При этом иммобилизованные монокультуры по таксономической структуре АБС сильнее всего отличались от остальных образцов, что демонстрирует значительный потенциал иммобилизации на носителе в плане модуляции структуры микробиома альгологических монокультур. Так, иммобилизация приводила к росту представленности MGPB-бактерий из pp. *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Shinella*, *Devosia*, *Sphingomonas* и др. Большая представленность pp. *Variovorax* и *Stenotrophomonas* в иммобилизованных культурах может быть связана с конкурентными преимуществами данных микроорганизмов, способных не только проявлять устойчивость к спектру антибиотиков, но и образовывать биоплёнки, а также продуцировать хитиназы, осуществляющих биodeградацию хитозана для мобилизации содержащегося в нем азота [Jankiewicz, Brzezinska, 2015].

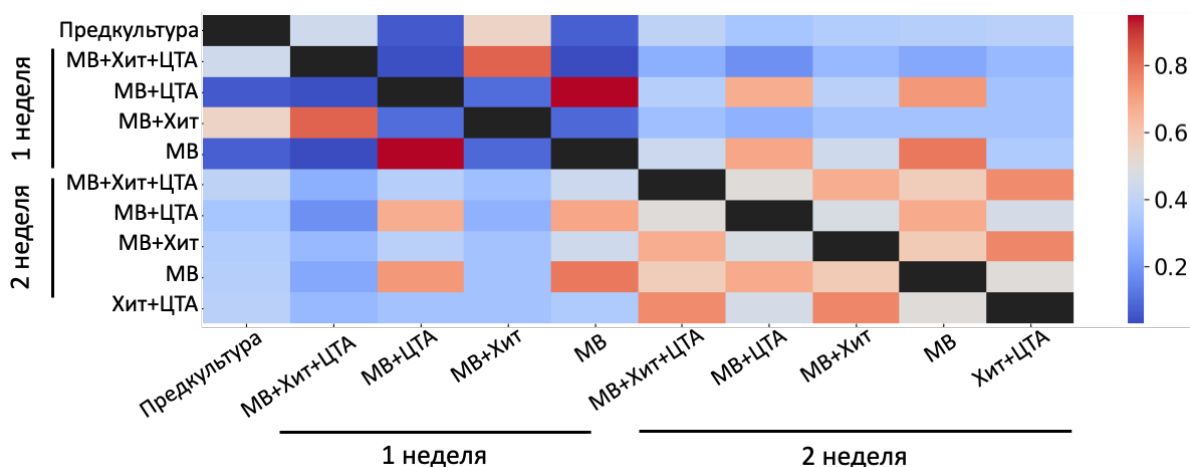


Рис. 10. Динамика таксономического состава микробиома АБС на базе *Lobosphaera sp. IPPAS C-2047 (MB)* в иммобилизованном состоянии (Хит) и в суспензионной культуре, с добавлением антибиотика цефтриаксона (ЦТА) (16S рРНК-метабаркодинг, NGS) – тепловая карта значений индекса  $\beta$ -разнообразия Мориситы.

Объективную оценку способности АБС, формирующегося на базе *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 и иммобилизованного на хитозане С600, к биоизъятию  $P_i$  из сточных вод водоочистных сооружений проводили в ходе культивационных экспериментов в проточном замкнутом фотобиореакторе каскадного типа. Показано, что данное АБС способно к снижению  $P_i$  до уровня ниже ПДК и предела количественной оценки  $P_i$  за неделю, причем данная способность сохранялась в ходе как минимум четырех циклов культивирования (рис. 11а). При этом не выявлено значительного увеличения биомассы клеток АБС; это позволяет предположить, что поглощенный  $P_i$  накапливается внутри клеток сообщества, очевидно, в форме полифосфатов (рис. 11б). Анализ полного метагенома выявил тенденцию к

росту представленности в микробиоме данной культуры носителей генов эффективного фосфорного метаболизма — обитателей фикосферы *M. simplicissimum*, в частности pp. *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Devosia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* и *Brevundimonas*.

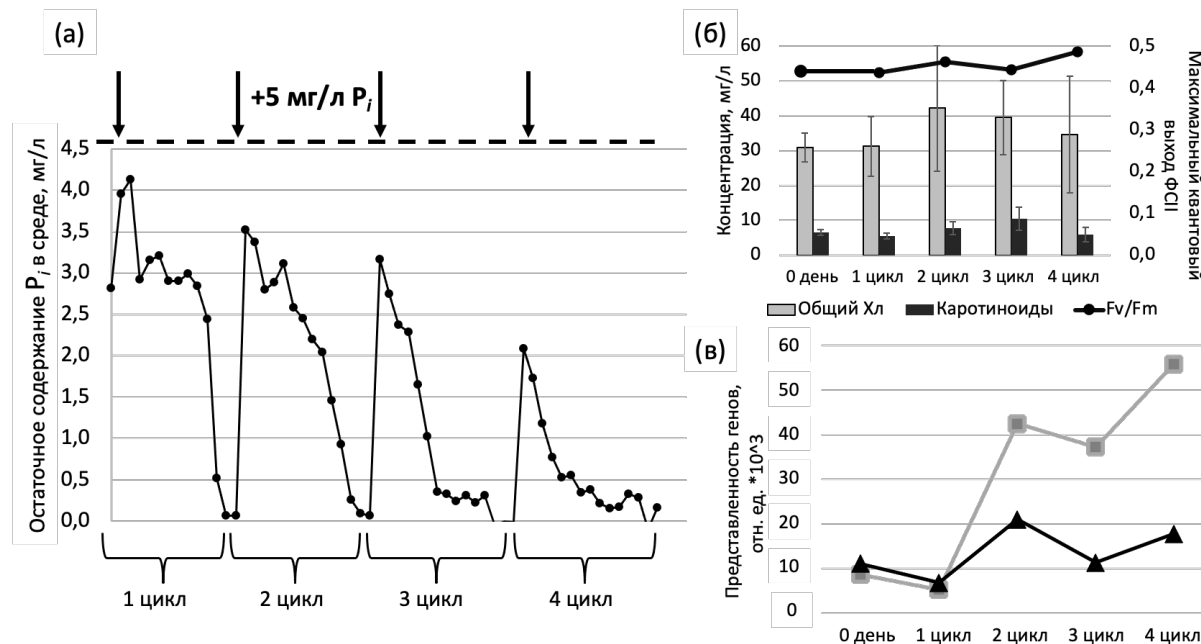


Рис. 11. Динамика биоизъятия  $P_i$  из третичных стоков водоочистных сооружений иммобилизованным АБС на базе *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 в проточной замкнутой системе в течение 4 недельных циклов: остаточное содержание  $P_i$  в среде (а), динамика содержания пигментов и активности фотосистемы II (б), оценка обилия генов, связанных с метаболизмом фосфора, в метагеноме АБС: черный – гены в эукариотах, серый – гены в прокариотах (в).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что действие неблагоприятных факторов различной природы на отдельные виды фотоавтотрофных микроорганизмов в аксеничной культуре изучено относительно полно, действие стрессоров на сложные сообщества микроорганизмов во многом остается малоизученным. Решение этой проблемы затруднено существованием сложной сети связей между видами, составляющими сообщества. Появление и бурное развитие доступных методов метагеномного анализа на платформах высокопроизводительного секвенирования вызвало прорыв в биологии сообществ, а появление следующего поколения технологий секвенирования, основанных на получении длинных прочтений генома, ещё больше расширило горизонты в этой области. Однако поиск более эффективных способов применения этих новых мощных инструментов пока ещё далек от завершения, и потому настоящая работа

преследовала цель сравнительного анализа структуры и функциональных особенностей АБС из природных местообитаний и искусственных культивационных систем при действии неблагоприятных факторов (стрессоров) методами метагеномики.

Особняком по своей важности и актуальности стоит проблема эффективного использования человеком биогенного элемента — фосфора, незаменимого для хранения и передачи энергии и информации в живой клетке. Пригодные для промышленной добычи фосфорсодержащие минералы являются конечным и невозобновляемым ресурсом, крайне неравномерно распределенным между странами Земли. При этом эффективность использования этого стратегического ресурса остается низкой, и современные биотехнологии, основанные на культивировании фототрофных и гетеротрофных микроорганизмов, считаются одним из наиболее перспективных методов извлечения фосфора из бросовых ресурсов, таких как сточные воды. Однако использование этих технологий подвержено риску из-за возможного присутствия в сточных водах опасных микрополлютантов, к которым относятся лекарственные вещества, в особенности антибиотики. Всё это обусловило выбор в качестве модельных стрессоров, действующих на АБС, варьирующую биодоступность неорганического фосфата и присутствие антибиотика в концентрации, сопоставимой с уровнями, обнаруживаемыми в муниципальных, промышленных и больничных сточных водах.

Результаты настоящего исследования являются следующим шагом к пониманию связи между направленными изменениями таксономической структуры сообществ при изменении условий их обитания и наблюдаемыми фенотипическими (физиолого-биохимическими) проявлениями. Так, опираясь на известные сведения о жизнедеятельности организмов, выявленных в составе АБС, возможно прогнозировать потенциальный функциональный профиль этого сообщества, а изучение целых метагеномно собранных геномов позволило сделать эти прогнозы существенно детальнее и точнее. В целом, эти подходы позволили подробно сравнить АБС из антропогенно нарушенных природных местообитаний и культивационных систем (промышленных и лабораторных) в условиях повышенного содержанием неорганического фосфора ( $P_i$ ). В частности, показано, что АБС активного ила является нестабильной системой, уязвимой для неблагоприятных воздействий: его микробиом значительно изменялся как при резком изменении условий инкубации и биодоступности  $P_i$ , так и при комбинированном стрессе (при воздействии лекарственных веществ).

Интересной особенностью этого АБС оказалось видимое отсутствие изменений функциональности (АБС сохраняли способность к поглощению  $P_i$  и при инкубации с лекарственными веществами), но метагеномный анализ выявил выраженный



тренд на снижение представленности генов-детерминантов способности к трансформации и внутриклеточному запасанию поглощенного  $P_i$ , что следует считать началом деградации потенциала АБС к в отношении биоизъятия фосфора. Очевидная причина этого явления — замещение полифосфат-аккумулирующих бактерий организмами с выраженной устойчивостью к антибиотикам. В этой связи необходимо подчеркнуть необходимость мониторинга скрытого разнообразия микроорганизмов в установках для биотехнологической очистки, в которые возможен сброс сточных вод с антибиотиками (особенно сточных вод городов и животноводческих комплексов). Это позволит снизить риски неконтролируемого распространения антибиотикорезистентных «суперпатогенов».

Напротив, АБС из водоемов, соседствующих с апатитовыми разработками, продемонстрировали стабильность своего микробиома под действием повышенных концентраций  $P_i$  в среде, а также значительное разнообразие и богатство микроорганизмов с выраженным потенциалом к накоплению полифосфатов. Среди ОФМ, выделенных из этих сообществ, был обнаружен представитель зеленых водорослей — *M. simplicissimum*, устойчивый к чрезвычайно высоким уровням экзогенного  $P_i$ , близким к пределу растворимости соответствующих солей. Показано, что в накоплении полифосфатов монокультурой *M. simplicissimum* активно участвуют бактерии, населяющие фикосферу этой микроводоросли. Данный организм, депонированный в коллекцию IPPAS с присвоением идентификатора С-2056, может считаться весьма перспективным для конструирования биотехнологий, обеспечивающих изъятие и повторное использование фосфора из бросовых ресурсов с попутной очисткой сточных вод от избытков этого ценного биогенного элемента, что было подтверждено в циклических экспериментах в проточном фотобиореакторе с иммобилизованной культурой.

## ВЫВОДЫ

1. АБС из загрязненных фосфатами экотопов (водоемов вблизи апатитовых разработок и водоочистных сооружений) состояли из ОФМ (микроводорослей и цианобактерий) и бактерий, обладающих высоким потенциалом к биоизъятию фосфата из среды и накоплению в клетках полифосфатов.
2. АБС водоочистных сооружений при воздействии высоких (до 200 мг/л) концентраций фосфата, вызывающих стресс у исследованных микроорганизмов, претерпевало масштабные изменения в таксономической структуре с заменой исходных эдификаторов (с одних представителей цианобактерий на других и на микроводоросли) при сохранении потенциала к биоизъятию фосфата.
3. Действие лекарственных веществ цефтриаксона и диклофенака в концентрации 5 мкг/л на АБС из водоочистных сооружений не снижали скорость биоизъятия



фосфата, но снижали потенциал сообщества к дальнейшему биоизъятию, а также изменяли таксономическую структуру, вызывая рост представленности бактерий – носителей антибиотикорезистентности – *Staphylococcus epidermis*, *S. haemolyticus*, представителей рр. *Sphingorhixis* и *Sphingomonas*.

4. Воздействие высоких концентраций фосфата (до 200 мг/л) на АБС из водоемов вблизи апатитовых разработок приводило к развитию фототрофных микроорганизмов и бактерий из рр. *Rhizobium*, *Brevundimonas* и *Bosea*, стимулирующих рост ОФМ, что повышало потенциальную способность к накоплению полифосфатов в биомассе и стабильность сообщества.

5. Микробиом фикосферы микроводоросли *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, выделенной из АБС загрязненных фосфатами водоёмов, вносит вклад в её толерантность к высоким (до 1,5 г/л) концентрациям фосфата в среде, поглощая его и накапливая в клетках в виде полифосфатов.

6. Микроводоросль *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 обеспечивала практически полное биоизъятие фосфата из сточных вод водоочистных сооружений в тонкослойном каскаде за 7 суток культивирования на протяжении четырех последовательных циклов. При этом микробиом иммобилизованной культуры *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 демонстрировал рост потенциальной способности к накоплению полифосфатов и реминерализации фосфора при участии бактерий из рр. *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter* и *Sediminibacterium*.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова**

1. Solovchenko A.E., Vasilieva S.G., **Zaitsev P.A.**, Lukyanov A.A., Skripnikova E.V., Antal T.K. Approaches to rapid screening of pharmaceutical xenobiotic effects on microalgae via monitoring of photosynthetic apparatus condition // *Journal of Applied Phycology*. – 2022. – Vol. 34. – P. 353–361. DOI: 10.1007/s10811-021-02660-4 (JIF: 3.2; SJR: 0.612, Q 2); Вклад автора в печатных листах: (0,93/0,3). Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.
2. Lobakova E., Gorelova O., Selyakh I., Semenova L., Scherbakov P., Vasilieva S., **Zaitsev P.**, Shibzukhova K., Chivkunova O., Baulina O., Solovchenko A. Failure of *Micractinium simplicissimum* phosphate resilience upon abrupt re-feeding of its phosphorus-starved cultures // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 10. – 8484. DOI: 10.3390/ijms24108484 (JIF: 5.6; SJR: 1.154, Q1); (1,6/0,4)
3. Vasilieva S., Lukyanov A.A., Antipova C., Grigoriev T., Lobakova E., Chivkunova O., Scherbakov P., **Zaitsev P.**, Gorelova O., Fedorenko T., Kochkin D.,

- Solovchenko A. Interactive Effects of Ceftriaxone and Chitosan Immobilization on the Production of Arachidonic Acid by and the Microbiome of the Chlorophyte *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 13. – 10988. DOI: 10.3390/ijms241310988 (JIF: 5.6; SJR: 1.154, Q1); (1,55/0,39)
4. Васильева С.Г., **Зайцев П.А.**, Баулина О.И., Лобакова Е.С., Соловченко А.Е., Горелова О.А. Потенциал микроводоросли *Micractinium simplicissimum* irpas c-2056 для “зеленого” синтеза наночастиц марганца, железа и фосфора // *Российские нанотехнологии*. – 2023. – Т. 18, № 1. – С. 53-62. DOI: 10.56304/S1992722323010168 (РИНЦ: 0,628); (0,95/0,4) [Vasilieva S.G., **Zaytsev P.A.**, Baulina O.I., Lobakova E.S., Solovchenko A.E., Gorelova O.A. *Potential of the microalgae Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 for the “green” synthesis of manganese, iron, and phosphorus nanoparticles // *Nanobiotechnology Reports*. – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 47-55. DOI: 10.1134/S2635167623010160 (JIF: 0.5; SJR: 0.19, Q 4)]
  5. **Zaytsev P. A.**, Shurygin B. M., Rodin V. A., Panova T. V., Zvereva M. I., Skripnikova E. V., Solovchenko A. E. Comparative metagenomics for monitoring the hidden dynamics of the algal-bacterial wastewater community under the influence of drugs // *Nanobiotechnology Reports*. - 2024. - Vol. 19, № 3. – 393-407. DOI: 10.1134/S2635167624600470 (JIF: 0.5; SJR: 0.17, Q 4); (1,45/1,25)
  6. **Zaytsev P.A.**, Rodin V.A., Zaytseva A.A., Zvereva M.I., Solovchenko A.E. Advances of high-throughput sequencing for unraveling biotechnological potential of microalgal-bacterial communities // *Journal of Applied Phycology*. – 2024. – Vol. 36 – P. 1901–1919. DOI:10.1007/s10811-024-03267-1 (JIF: 3.2; SJR: 0.612, Q 2); (2,47/2,3)
  7. Solovchenko A., Selyakh I., Semenova L., Scherbakov P., Zaytseva A., **Zaytsev P.**, Fedorenko T., Alam M.A., Jingliang X., Lukyanov A., Mikhaylova E., Lobakova E. A local or a stranger? Comparison of autochthonous vs. allochthonous microalgae potential for bioremediation of coal mine drainage water // *Chemosphere*. – 2024. – 143359. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2024.143359 (JIF: 7,7; SJR: 1.727, Q 1); (1,42/0,3)

#### **Прочие публикации:**

1. Kublanovskaya A.A., Zaytsev P.A., Chekanov K.A., Osipova A.A., Solovchenko A.E., Lobakova E.S. Formation of the phosphate-resistant communities of microalgae and bacteria in the subpolar waters // *Limnology and Freshwater Biology*. – 2020. – № 4. – 993-994. DOI: 10.31951/2658-3518-2020-A-4-993 (РИНЦ: 0,285); (0,19/0,08)