

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Зайцев Петр Андреевич

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

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Соловченко Алексей Евгеньевич

Москва — 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Альго-бактериальные сообщества (АБС) как инструмент для эффективной биоконверсии фосфора в экобиотехнологии	11
1.1.1. АБС как форма существования окислительных фототрофных микроорганизмов в природе	11
1.1.2. Влияние стрессоров на физиологию и биотехнологический потенциал АБС.....	19
1.1.3. АБС в естественных и искусственных водоёмах с высоким содержанием неорганического фосфора	24
1.1.4. Роль АБС в очистке муниципальных и промышленных стоков от избытка неорганического фосфора	29
1.1.5. Конструирование искусственных АБС для повышения эффективности очистки сточных вод от избытка неорганического фосфора	33
1.2. Функционально–метагеномный анализ АБС	38
1.2.1. Методы метагеномного секвенирования для изучения АБС	38
1.2.2. Функционально-метагеномный анализ микробных сообществ	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1. Материалы и объекты исследования	50
2.1.1. Сбор природных образцов АБС	50
2.1.2. Выделение и идентификация альгологически чистых культур ОФМ и бактерий фикосферы из АБС	53
2.1.3. Условия для культивирования АБС	55
2.2. Метагеномное секвенирование образцов АБС	61
2.2.1. Выделение нуклеиновых кислот для метагеномного секвенирования	61
2.2.2. Секвенирование библиотек локусов гена 16S рРНК на платформе NGS и первичная обработка данных	61
2.2.3. Секвенирование полного метагенома на платформе NGS и первичная обработка данных.....	62
2.2.4. Секвенирование полного метагенома на платформе Oxford Nanopore Technologies и первичная обработка данных.....	64
2.2.5. Расчёт индексов разнообразия.....	65
2.3. Функциональный анализ образцов на основе данных метагеномного секвенирования	66
2.3.1. Функциональный анализ результатов 16S рРНК ДНК-метабаркодинга на платформе NGS	66

2.3.2. Функциональный анализ результатов секвенирования полного метагенома на платформе NGS.....	69
2.3.3. Функциональный анализ результатов секвенирования полного метагенома на платформе ONT.....	70
2.4. Морфоструктурные методы.....	72
2.4.1. Оптическая светлопольная и флуоресцентная микроскопия ОФМ.....	72
2.4.2. Визуализация полифосфатов с помощью цитохимического окрашивания флуоресцентным красителем ДАФИ.....	72
2.4.3. Сканирующая электронная микроскопия.....	73
2.4.4. Просвечивающая электронная микроскопия.....	73
2.5. Физиолого-биохимические методы.....	75
2.5.1. Анализ фотосинтетической активности ОФМ в АБС путем регистрации кинетики индукции флуоресценции фотосистемы.....	75
2.5.2. Определение содержания пигментов.....	75
2.5.3. Измерение остаточного содержания макроэлементов в среде колориметрическими методами.....	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	77
3.1. Анализ таксономического состава и биоразнообразия АБС активного ила из ВОС.....	77
3.2. Анализ таксономического состава и функционального потенциала АБС активного ила ВОС под действием микрополлютантов.....	80
3.3. Анализ таксономического состава и биоразнообразия лабораторных АБС под действием модельных стрессоров.....	89
3.4. Анализ таксономического состава и биоразнообразия природных АБС из эвтрофицированных экотопов.....	92
3.5. Выделение ОФМ в альгологические монокультуры и анализ их потенциальной толерантности к избытку неорганического фосфора.....	116
3.6. Роль микробиома фикосферы лабораторного АБС в ответе на изменения режима фосфорного питания.....	127
3.7. Конструирование искусственного АБС для биоизъятия избытков фосфатов из сточных вод.....	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	135
ВЫВОДЫ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Альго–бактериальные сообщества (АБС) являются широко распространенной формой существования кислородных фототрофных микроорганизмов (ОФМ), населяющих как природные, так и антропогенные экотопы [Kublanovskaya и др., 2019; Li и др., 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 [Bashan de- и др., 2004; Chekanov, Kublanovskaya, Lobakova, 2019; Kublanovskaya и др., 2020a]. 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 фикиосферу — 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 и др., 2013; Chekanov и др., 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, Parkhill, De Oliveira, 2017; Liu и др., 2020; Golovchenko и др., 2023; Lavrentyeva и др., 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 и др., 2020; Li и др., 2023; Wang и др., 2023a; 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 технология 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 хологена. 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 лежит 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 двух 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 $p \leq 0.05$.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Альго-бактериальные сообщества (АБС) как инструмент для эффективной биоконверсии фосфора в экобиотехнологии

1.1.1. АБС как форма существования окисленных фототрофных микроорганизмов в природе

Окисленные фототрофные микроорганизмы (ОФМ), к которым относятся эукариотические одноклеточные или колониальные микроводоросли (из супергрупп Archaeplastida, Chromalveolata, Rhizaria и Excavata) и прокариоты из отдела Cyanophyta, обитают в естественных условиях в составе сообществ с другими видами микроорганизмов: микромицетами, протистами, бактериями и археями [Плотников и др., 2023; Heimann, Huerlimann, 2015; Allen, Ten-Hage, Leflaive, 2016; Sadiq и др., 2022; Lavrentyeva и др., 2023; Vale и др., 2023]. По определению Р. Уиттекера (1980 г.), сообществами являются системы взаимодействующих, дифференцированных по экологическим нишам, часто конкурирующих друг с другом видов. Для описания микробных сообществ часто используется понятие «микробиом». В составе сообществ ОФМ вовлекаются в сложную сеть взаимодействий со своими видами-партнерами. Эта сеть реализуется в виде трофических связей, обмена сигнальными молекулами и участия в структурной организации самого сообщества [Azam, Malfatti, 2007; Louati и др., 2023; Schäfer и др., 2002; Vale и др., 2023]. Основными партнёрами ОФМ в рамках АБС являются гетеротрофные бактерии, для которых ОФМ выступает как эдификатор сообщества — организм с сильно выраженной средообразующей способностью. Однако в ряде случаев ОФМ могут формировать отношения и друг с другом, например клетки эукариотических микроводорослей могут существовать в составе многокомпонентных пространственных структур, формируемых цианобактериями [Allen, Ten-Hage, Leflaive, 2016; Kublanovskaya и др., 2019; Kublanovskaya и др., 2020a; Kublanovskaya и др., 2020b].

Подобная форма существования ОФМ в составе сообществ широко распространена в живой природе, где она характерна как для разных биотопов, так и для разных таксономических групп ОФМ. Считается, что на долю АБС приходится до 50% всей первичной продукции в биосфере, что делает АБС «двигателями» биогеохимических циклов углерода и кислорода. При этом до 50% всего зафиксированного углерода в составе

АБС переходит в биомассу сопутствующих бактерий, что подчеркивает важность жизнедеятельности АБС для круговорота биогенных элементов [Louati и др., 2023].

Представители ОФМ встречаются в самых разных экотопах на планете, включая поверхности скал, почвы и расщелины, но наиболее распространены АБС в соленых и пресных водоемах, в составе планктона, перифитона и бентоса [Azam, Malfatti, 2007; Vale и др., 2023]. Хотя в водных экосистемах гетеротрофные бактерии являются наиболее многочисленной и метаболически активной группой организмов, именно ОФМ относятся к основным продуцентам, обеспечивающим фиксацию углерода. Кроме этого, при отмирании ОФМ под действием абиотических или биотических факторов из них формируются т.н. растворенное органическое вещество (РОВ) и частицы органического вещества (ЧОВ) [Плотников и др., 2023; Azam, Malfatti, 2007].

Среди ОФМ в составе планктонных АБС наиболее распространены разнообразные представители отделов Chlorophyta, Dinophyta, Cyanophyta и класса Bacillariophyceae [Azam, Malfatti, 2007; Belevich и др., 2020]. АБС в составе бентоса формируются вокруг нитчатых представителей отдела Chlorophyta (из родов *Spirogyra*, *Cladophora* и *Uronema*), классов Bacillariophyceae (роды *Nitzschia*, *Haslea*, *Phaeodactylum*) и Cyanophyceae (роды *Nostoc*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*) [Allen, Ten-Hage, Leflaive, 2016]. Обрастания перифитона формируются АБС с преобладанием представителей классов Bacillariophyceae (роды *Amphora*, *Diatoma*, *Gomphonema*, *Hannaea*), Chlorophyceae (рода *Zygnema*, *Closterium*, *Diademsis*, *Ulothrix*), Cyanophyceae (роды *Calothrix*, *Coelospharum*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*) [Vale и др., 2023]. Ряд исследований отмечает, что в составе АБС с данными представителями ОФМ обнаруживают определенные группы бактерий, в основном принадлежащие к классам Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, и Betaproteobacteria [Schäfer и др., 2002]. В морских АБС фиксируется присутствие бактерий из клад, ассоциированных с родами *Roseobacter* и *Bacteroides* — pp. *Ruegeria*, *Sulfitobacter*, *Roseobacter*, *Erythrobacter*, *Alteromonas*, а также pp. из группы *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) [Schäfer и др., 2002; Vale и др., 2023; Yang и др., 2021; Zhang и др., 2022]. Состав пресноводных бактерий АБС также представлен классами Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Sphingobacteria, Flavobacteria и Bacilli, а именно pp. *Flavobacterium*, *Roseomonas*, *Bacillus*, *Sediminibacterium*, *Sulfurimonas*, *Pedobacter*, *Limnobacter*, *Cetobacterium* и др. [Glöckner, Fuchs, Amann, 1999; Hanashiro и др.,

2019]. В перифитонных АБС среди бактерий преобладают представители семейств Comamonadaceae, Caulobacteraceae, Chitinophagaceae, Flexibacteraceae, Sphingomonadaceae, а также порядков Rhizobiales, Cytophagales, Rhodobacterales, Cellvibrionales, типа Verrucomicrobia и рода *Roseobacter* [Vale и др., 2023]. Примечательно, что несмотря на высокое обилие бактериальных видов в водных экосистемах, качественный и количественный состав одних и тех же таксонов в АБС может значительно различаться от свободноживущих, не связанных с ОФМ, микроорганизмов в окружающей среде [Azam, Malfatti, 2007].

Подобная неравномерность в распределении определенных групп бактерий в водных экосистемах, в первую очередь, связана с ролью ОФМ как первичных продуцентов. Формирующиеся в ходе их жизнедеятельности градиенты РОВ и ЧОВ влияют на видовое распределение микроорганизмов. Вокруг ОФМ формируются микрзоны с эвтрофными условиями для гетеротрофных микроорганизмов, тогда как в окружающей среде условия обитания преимущественно олиготрофные [Azam, Malfatti, 2007]. Определенные группы бактерий продуцируют ферменты, деградирующие клеточные структуры ОФМ и (или) ЧОВ, переводя их в состояние РОВ, доступного для других видов бактерий [Schäfer и др., 2002; Azam, Malfatti, 2007; Pinto и др., 2021]. Бактерии из групп Alphaproteobacteria и CFB отвечают за деградацию ЧОВ, формируемыми в водных экосистемах микроводорослями из классов Dinophyceae и Bacillariophyceae, обеспечивая реминерализацию азота, фосфора и железа (II) [Schäfer и др., 2002; Azam, Malfatti, 2007]. Также ОФМ могут продуцировать низкомолекулярные вещества, используемые бактериями в качестве субстрата, например диметилсульфониопропионат (англ. dimethylsulphonio propionate, DMSP), метаболизируемый бактериями кланды SAR11 и рода *Roseobacter* [Azam, Malfatti, 2007; Yang и др., 2021]. Попадание бактерий в микроокружения, формируемые клетками ОФМ, могут происходить как пассивно (с водными массами), так и активно, с участием движения бактерий, в том числе по градиенту веществ с помощью хемотаксиса [Azam, Malfatti, 2007; Louati и др., 2023].

Определенные группы бактерий также могут участвовать в создании условий для формирования АБС. Они могут выделять компоненты внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) и образовывать слизь за счёт внеклеточной ферментативной деградации структур ОФМ, которые служат средой для физического закрепления клеток ОФМ и

бактериопланктона. В планктонных и перифитонных АБС отмечена способность представителей pp. *Sulfitobacte*, *Sphingomonas*, *Alteromonas*, *Roseobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* к образованию компонентов ВПМ и создания условий для дальнейшей колонизации среды ОФМ: сперва представителями класса Bacillariophyceae, а далее — представителями классов Chlorophyceae и Cyanophyceae [Zhang и др., 2022; Vale и др., 2023]. Тенденции к подобному физическому контакту между компонентами АБС обуславливают их разные морфологические формы существования: агрегаты, флоккулы, однослойные пленки, многослойные маты [Kublanovskaya и др., 2020b; Vale и др., 2023]. Данные формы рассматриваются некоторыми авторами как частные случаи биопленок — сообществ микроорганизмов, объединенных ВПМ и формирующихся на границе раздела фаз, и способствующих росту, развитию и дальнейшему размножению [Nozhevnikova, Botchkova, Plakunov, 2015; Kublanovskaya и др., 2020b].

Для обозначения подобной микрзоны вокруг клеток ОФМ, в которой обитают бактериальные виды, был введен термин «фикосфера» — пространство в непосредственной близости от поверхности клеток микроводорослей, характеризующееся наличием поверхностных структур клеток, а также градиентами концентрации химических веществ и физических параметров, делающих фикосферу особенно благоприятной для других организмов [Bell, Mitchell, 1972; Krohn-Molt и др., 2017; Selivanova и др., 2024]. Название фикосферы, как и некоторые её особенности, имеет общие черты с ризосферой — прикорневой зоной растений, населенной микроорганизмами, также вступающими с растением в симбиотические отношения. К данным общим чертам относится [Louati и др., 2023]:

1. Фитопланктон, как и корни растений, значительно меняет физико-химические условия в своем ближайшем окружении;
2. В обеих системах важное место в заселении и поддержании стабильности бактериального состава занимает хемотаксис;
3. Существует филогенетическое сходство между группами бактерий, населяющими фикосферу и ризосферу, например общими для них являются представители класса Alphaproteobacteria.
4. Существует сходство между химическими веществами, которые выделяются базибионтом и эпибионтами в обеих системах.

В фикосфере ОФМ, как и в ризосфере растений, устанавливаются симбиотические взаимодействия между микроорганизмами: взаимопользные (мутуализм), полезно–нейтральные (комменсализм) или полезно–вредные (паразитизм) [Ramanap и др., 2016]. Приводя данную классификацию типов взаимодействий, необходимо отметить, что они не являются строго фиксированными в сообществе и могут переходить из одного в другой в соответствии с концепцией непрерывности микробиома, в зависимости от внешних условий: воздействия неблагоприятных факторов, наличия и обилия определенных субстратов и присутствие химических сигналов [Ewald, 1987]. Данные взаимодействия осуществляются целым набором молекулярных механизмов:

1. **Обмен субстратами.** В ходе темновой фазы фотосинтеза и последующих реакций пластического обмена ОФМ синтезируют низкомолекулярные соединения (меньше 1000 дальтон, например DMSP, аминокислоты, короткие карбоновые кислоты, короткие углеводы), из которых и формируется фракция РОВ для гетеротрофных микроорганизмов [Salcher, Posch, Pernthaler, 2013]. Также они являются источниками высокомолекулярных органических веществ (белков, полисахаридов), освобождающихся вследствие деградации клеток под действием вирусов и литических ферментов бактерий, формируя таким образом ЧОВ. Аэробные гетеротрофные бактерии используют продукт фотосинтеза — молекулярный кислород — в реакциях дыхания, снижая таким образом парциальное давление кислорода в фикосфере и активизируя первичные процессы фотосинтеза у ОФМ [Louati и др., 2023]. Гетеротрофные бактерии (например, pp. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Sediminibacterium* и др.) также способны осуществлять реминерализацию веществ, обеспечивая ОФМ биодоступными источниками необходимых биогенных элементов — фосфора и азота [Burkhardt и др., 2014; Qin и др., 2016; Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018].
2. **Выделение биологически активных веществ (БАВ).** Бактерии, обладающие весьма разнообразными метаболическими путями, способны продуцировать вещества, необходимые для роста ОФМ, например витамины (тиамин, кобаламин и биотин) и сидерофоры — обеспечивающие биодоступность ионов железа (III) вещества с сильно выраженной хелатирующей активностью. Во взаимодействиях между компонентами АБС может принимать участие набор

высоко и низкомолекулярных веществ — производные липидов, белки с мотивами «спираль–поворот–спираль» (англ. «helix–turn–helix»), амины и проч. [Krohn-Molt и др., 2013; Krohn-Molt и др., 2017; Vale и др., 2023]. Функционально эти молекулы могут относиться к группе фитогормонов (3-индолилуксусная кислота, абсцизовая кислота, цитокинины, этилены и гибберелины), медиаторов чувства кворума (англ. quorum sensing) (N-ацил-гомосеринлактон и др.), а также подавляющих рост компонентов АБС альгицидов и антибиотиков, например розеобактицид Б (англ. Roseobacticide B) или вещества трополонового ряда [Seyedsayamdost и др., 2011; Krohn-Molt и др., 2013; Krohn-Molt и др., 2017; Louati и др., 2023; Vale и др., 2023].

3. **Горизонтальный перенос генов** может устанавливаться между разными микроорганизмами внутри микробиома фикосферы. Хотя на протяжении долгого времени этот путь переноса генетического материала между эукариотическими клетками микроводорослей и прокариотическими клетками оставался неподтвержденным, в последние годы были зафиксированы случаи переноса генов биосинтетических путей (ферритин, витамины, компоненты ВПМ), а также генов, связанных с защитными механизмами клетки (антибиотикоустойчивость, образование биопленок) [Rosenberg, Zilber-Rosenberg, 2018; Ashraf, Ahmad, Lu, 2023; Li и др., 2023].

Как в ризосфере выделяют функциональную группу бактерий, стимулирующих рост растений (англ. plant growth promoting bacteria, PGPB), так и в фикосфере определяют группу бактерий, стимулирующих рост микроводорослей (англ. microalgae growth promoting bacteria, MGPB) [Palacios, López, Bashan de-, 2022]. Основными отличиями между двумя системами является то, что бактерии микробиома фикосферы, как правило, не вступают в эндосимбиотические отношения с клетками микроводорослей, а сама система фикосферы у водных АБС существует в более изменчивых физико–химических условиях [Louati и др., 2023; Vale и др., 2023].

В отношении цианобактерий — представителей ОФМ из класса Cyanophyceae — для описания особой зоны, окружающей цианобактериальные клетки и заселяемой гетеротрофными бактериями, в литературе иногда используется отдельный термин «цианосфера». Цианосферу населяют бактерии из филумов Actinobacteria, Bacteroidetes и

Proteobacteria, а именно из порядков Chitinophagales, Rhodobacterales, Sphingomonadales, Rhizobiales и Pseudomonales [Fuster и др., 2024]. Для цианосферы также отмечается схожесть таксономического состава с ризосферой высших растений, в частности присутствие рр. *Bosea* (сем. Bradyrhizobiaceae) и *Pseudarthrobacter* (сем. Microsoccaceae) [Zheng и др., 2023]. Между цианобактериями и гетеротрофными бактериями цианосферы также устанавливаются симбиотические отношения, основанные на фиксации атмосферного азота diaзотрофными цианобактериями, транспорте аминокислот, накоплении Р и его ассимиляцией [Pascualt и др., 2021]. Гетеротрофные бактерии, в свою очередь, способствуют формированию цианобактериальных биопленок, обеспечивают реминерализацию Р и могут служить источниками для горизонтального переноса генов, повышающих устойчивость АБС к воздействию антибиотиков и токсинов [Zhang и др., 2020; Nelson, Garcia-Pichel, 2021].

При выделении ОФМ из природных АБС в накопительную и чистую культуры также наблюдается частичное сохранение микробиома фикосферы. Данный микробиом может незначительно видоизменяться в ходе поддержания лабораторной культуры, приобретая новые компоненты из лабораторной среды, но при этом стабильно сохранять определенный набор микроорганизмов основного или основного (кóрового, от англ. *core* — ядро) в постоянных условиях [Kublanovskaya и др., 2020a]. Коровые микробиомы в лабораторных культурах разных ОФМ могут состоять из бактерий, также принадлежащих классам Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria и Betaproteobacteria, а также группе CFB [Schäfer и др., 2002; Krohn-Molt и др., 2013; Krohn-Molt и др., 2017; Yang и др., 2021; Zhang и др., 2022]. Некоторые виды бактерий, выделяемые в чистые культуры из микробиома лабораторных культур ОФМ, принадлежат к группе MGPB и обладают способностью к участию в процессах чувства кворума, например представители рр. *Pseudomonas*, *Alteromonas* и *Pseudoalteromonas* из клады *Roseobacter* [Krohn-Molt и др., 2013; Krohn-Molt и др., 2017; Dow, 2021; Zhang и др., 2022].

Взаимодействия в АБС могут быть значимыми с практической стороны [Seymour и др., 2017]. Практически показано, что добавление MGPB в аксенические культуры микроводорослей из рр. *Chlorella*, *Chlamydomonas* и *Euglena* увеличивает накопление биомассы и выход целевых процессов [Тоуама и др., 2018]. Практическое значение MGPB состоит в стимулировании роста ОФМ за счёт положительных трофических связей

(реминерализация биогенных элементов), снабжении кофакторами и витаминами, синтезе БАВ, либо в ферментативном гидролизе клеточной стенки ОФМ для эффективной интерконверсии ЧОВ и РОВ в сообществе (рис. 1) [Carrillo-Reyes, Barragán-Trinidad, Buitrón, 2016; Shetty и др., 2019; Iqbal и др., 2022]. Например, для очистки сточных вод все активнее используются биопленки из ОФМ и бактерий, в которых последние могут повышать биодоступность азота, что способствует не только накоплению биомассы ОФМ pp. *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Scenedesmus* и *Nannochloropsis*, но и в некоторых случаях увеличивает выход биосинтеза ценных липидов [Koreivienė и др., 2014; Leong и др., 2020; Arutselvan и др., 2021; Upadhyay и др., 2021].

Применение ОФМ для решения задач защиты окружающей среды (экобиотехнологии) основано именно на альгологически чистых культурах (альгологических монокультурах) и консорциумов, но не на аксеничных культурах (англ. axenic cultures). При этом АБС также являются перспективными системами для биотехнологического производства ценных соединений. Так, использование аксеничных культур в биотехнологии часто осложняется ухудшением показателей роста и производительности культуры, не говоря уже о расходах и технической сложности поддержания аксеничности в больших масштабах [Patel и др., 2017; Padmaperuma и др., 2018]. Эти обстоятельства стимулируют интерес к АБС и биоинженерии фикосферы, направленной на заселение ее МГРВ, специально отобранными для «разделения труда» между компонентами АБС. Ожидается, что этот подход снизит метаболическую нагрузку на клетки микроводоросли-производителя (ослабив ингибирование субстратом, снизив высокие энергетические затраты на синтез нужных ферментов и проч.), увеличит выход биомассы и обеспечит контроль численности популяции с помощью чувства кворума и варьирования доступности питательных веществ для ОФМ [Patel и др., 2017; Park и др., 2017; González-González, De-Bashan, 2021]. Конкретные примеры показывают значительное увеличение содержания хлорофилла, липидов и каротиноидов в смешанных культурах ОФМ и бактерий — «завсегдатаев» корового микробиома фикосферы: *Paracoccus haeundaensis* — *Lactobacillus fermentum*, *Characium* sp. — *Pseudomonas composti*, *Tetrademus obliquus* и *Coelastrella* sp. — *Variovorax paradoxus* [Berthold и др., 2019; Choi и др., 2021; Perera и др., 2021].

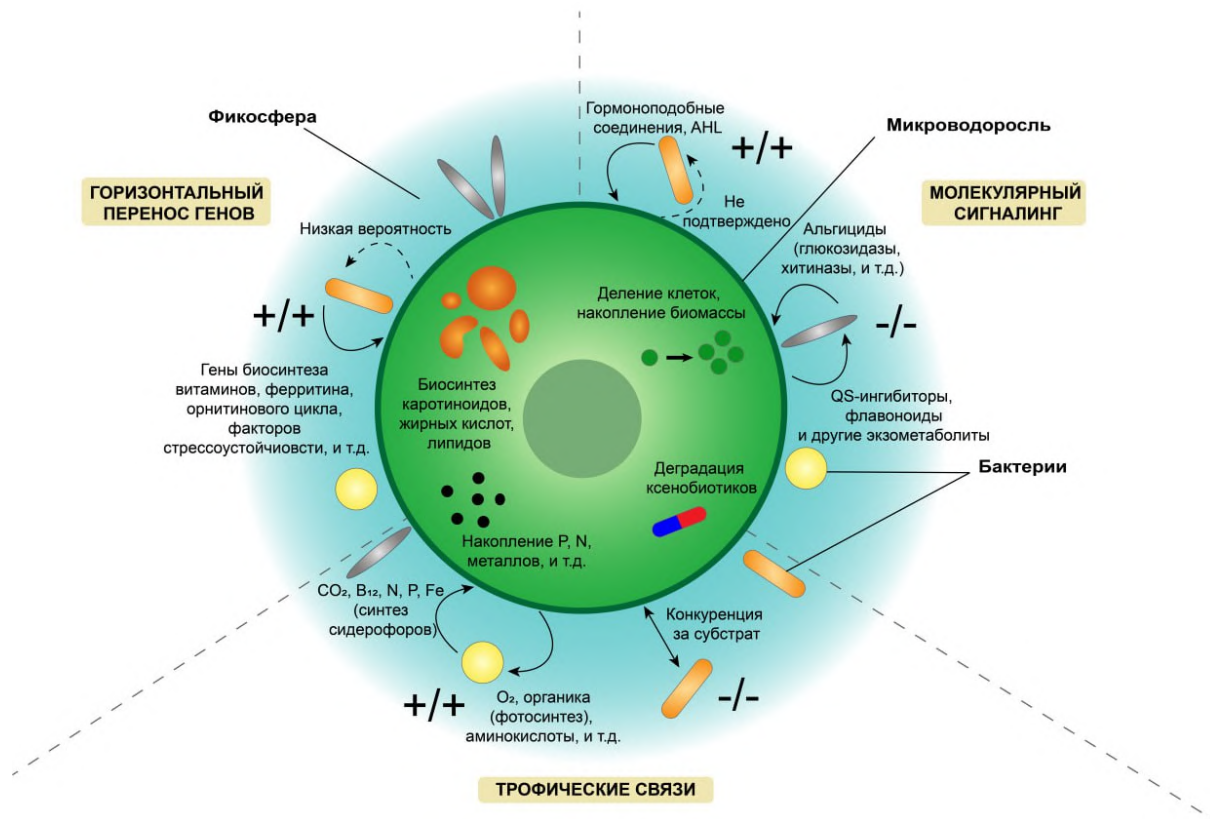


Рис. 1. Схематическое изображение фикосферы эукариотического ОФМ и механизмов взаимодействия трех типов. Стрелками показано направление механизма взаимодействия, пунктирными стрелками — еще не подтвержденный тип взаимодействия. Внутри клетки ОФМ отображены процессы, представляющие интерес для фундаментальных исследований и биотехнологии, на которые влияют альго-бактериальные взаимодействия.

1.1.2. Влияние стрессоров на физиологию и биотехнологический потенциал АБС

Факт стабильности состава корового микробиома, наблюдаемая у АБС из разных экосистем, в том числе при переходе от природных сообществ к лабораторным культурам ОФМ, рассматривается рядом авторов в контексте эволюционной теории. Симбиотические взаимодействия между организмами могут являться способом повышения приспособленности всей системы сообщества в целом за счёт взаимной стимуляции микроорганизмов с помощью межвидовых взаимодействий: обмена субстратами, секреции БАВ и горизонтального переноса генов [Gubelit, Grossart, 2020]. В отношении АБС применимы два принципа, используемые в эволюционной биологии [Gubelit, Grossart, 2020; Yuan, Meng, 2020; Vale и др., 2023]:

1. **Гипотеза Красной Королевы** — приспособление видов происходит за счёт конкуренции между ними в фикосфере. В результате происходит отбор тех из них, которые вырабатывают наиболее сильные симбиотические связи с эдификатором, роль которого играет ОФМ. Данная гипотеза хорошо описывает динамику планктонных АБС — агрегатов и флоккул, обитающих в относительно однородной среде с быстро меняющимися физико-химическими условиями.
2. **Гипотеза Чёрной Королевы** — приспособление происходит за счёт комплементарного распределения физиологических ролей между разными видами в АБС. Данная гипотеза лучше описывает динамику АБС в форме однослойных пленок и микробных матов, существующих в условиях более выраженных физико-химических градиентов и в которых происходит формирование ниш, занимаемых каждым видом.

Вообще говоря, АБС можно рассматривать как классический холобионт — метаорганизм, где определенные бактерии сохраняются и коэволюционируют с ОФМ. Такая коэволюция хологенома может быть выявлена сравнительной геномикой посредством поиска паттернов филосимбиоза (корреляции в дивергенции) в филогении эдификатора и симбионтов, совместная дивергенция доминирующих групп микробиома с ОФМ и метаболической комплементарности [Cooke и др., 2019]. Таким образом, холобионт может рассматриваться как объект воздействия стрессоров разной специфики на природные или лабораторные АБС.

Стрессором называют внутреннее или внешнее воздействие на живую систему, вызывающее стрессовый ответ и либо её акклимацию или адаптацию, либо истощение и гибель. Ответ живой системы на действие стрессоров осуществляется по трем категориям механизмов [Zhou, Wang, 2023]:

1. **«Эффект качелей»** (англ. seesaw effects) — отклонение системы от стационарного состояния и её колебания между состояниями, при которых может усиливаться проявление одних признаков, а других — ослабевать [Stocker, 1998]. Классическим примером эффекта «качелей» применительно к микробным системам является устойчивость метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* к бета-лактамам антибиотикам, которая

снижается в штаммах с повышающейся устойчивостью к гликопептидным и липопептидным антибиотикам (ванкомицину и даптомицину, соответственно) [Werth и др., 2013]. Такой же эффект наблюдается и на уровне экосистем, например в отрицательной взаимосвязи количества эмиссии оксида азота (I) и аммиака в атмосферу при удобрении почв азотными удобрениями, что усложняет контроль усвояемости данного элемента [Zhang и др., 2023].

- 2. Перекрестная толерантность** (англ. cross-tolerance) — механизм, при котором развивающаяся толерантность к одному стрессору придает толерантность и к другим стрессорам. Подобный механизм рассматривается как преадаптационная стратегия живых систем для упреждения негативного эффекта от многообразия стрессоров в динамично меняющейся окружающей среде [Rodgers, Gomez Isaza, 2023]. Для ОФМ отмечается кросс-толерантность между абиотическими и биотическими стрессорами, поскольку они зачастую инициируют одинаковые процессы — генерацию активных форм кислорода и выделение фитогормонов. Ответом на эти процессы может служить активность одних и тех же регуляторных ферментов и изменение экспрессии одних и тех же генов, что и создаёт предпосылки для перекрестной толерантности. Например, взаимосвязь осуществляющего контроль RedOx-состояния клетки фермента каталазы с фитогормоном — абсцизовой кислотой (англ. abscisic acid, ABA) — за счёт наличия в промоторных областях генов каталазы *Cat1*, *Cat2* и *Cat3* сайта связывания транскрипционных факторов из сигнального пути ABA [Pastori, Foyer, 2002; Ramegowda и др., 2020].
- 3. «Эффект памяти»** живой системы — влияние предшествующих событий и состояний системы на последующую динамику её ответа на действие стрессоров. Эффект памяти вносит инертность в данный процесс, не позволяя экосистемам резко меняться под действием флуктуаций внешней среды. Особенно выражено действие эффекта памяти в микробных сообществах микроорганизмов, в которых формирование симбиотических связей между видами вносит вклад в стабильность экосистемы [Baho и др., 2021; Khalighi и др., 2022]. Также этому способствует высокая степень изменчивости генома микроорганизмов (особенно прокариот), в результате которой при адаптации

сообщества к одному стрессору появляется избыточное число полезных генетических мутаций, создающее генетический резерв для адаптации к новому, незнакомому стрессору [Abreu, Mathur, Petrov, 2024].

Ранее в экологии стрессоры рассматривались как негативно влияющие факторы, но в настоящее время произошёл сдвиг парадигмы. Сейчас стрессоры являются важным фактором эволюции и формирования толерантности у микробных сообществ, в том числе АБС в водной среде. Так, фитопланктон водоёмов, в зоне постоянного или периодического действия биогенных, абиогенных или антропогенных стрессоров, может вырабатывать к ним толерантность, что выражается в стабильности фотосинтетических процессов ОФМ и сохранении морфо-структурной организации АБС [Mishra, Mandoli, Jha, 2008; Solovchenko и др., 2015; Kublanovskaya и др., 2020a; Baho и др., 2021; Lavrentyeva и др., 2023; Selivanova и др., 2024].

Формирование у АБС в разных экотопах, в частности в водоёмах, толерантности к ряду антропогенных стрессоров происходит в техносфере — части биосферы, изменённой человеком в ходе его хозяйственной деятельности. К таким стрессорам относят повышение содержания тяжёлых металлов (серебра, кадмия, кобальта, хрома, меди, железа, марганца, свинца и цинка) и биогенных элементов (углерод, фосфор, азот, сера) вследствие вымывания соединений данных элементов при разработке полезных ископаемых [Kashulin и др., 2019; Widiastuti и др., 2023]. Тяжёлые металлы способны вызывать ингибирование ряда клеточных процессов у ОФМ и остальных микроорганизмов за счёт взаимодействия с активными центрами ферментов и связывания других молекул, и представляют угрозу для водоёмов и почв [Капило и др., 2023; Terekhova и др., 2021; Widiastuti и др., 2023]. Однако было показано, что продолжительное существование в таких условиях приводит к формированию толерантности у ОФМ и других организмов из АБС (грибы, протисты, бактерии) за счёт механизмов транспорта, секвестрации и детоксикации, конвертирующих ионы тяжёлых металлов в метаболически инертные частицы, изолированные в особых компартментах клетки [Wilk-Woźniak и др., 2011; Baselga-Cervera и др., 2020; Chakravorty и др., 2023; Fedoseeva и др., 2023]. Помимо химических элементов и соединений, токсичных для клеток в относительно высоких концентрациях, антропогенными стрессорами для АБС также являются попадающие в окружающую среду микрополлютанты: фармацевтические препараты и дезинфицирующие агенты из стоков медицинских учреждений, биологически

активные кормовые добавки с животноводческих ферм, а также обильно детектируемый в последние годы микро- и нанопластик [Chia и др., 2021; Hitchcock, 2022; Батаков и др., 2024; Grzegorzec, Wartalska, Kowalik, 2024]. Толерантность АБС к подобным микрополлютантам также формируется с участием биохимических путей деградации данных соединений микроорганизмами сообществ. Примером может быть путь, включающий ферменты полиэтиленгидролазы (англ. PETase) и гидролазы моно(2-гидроксиэтил)терефталевой кислоты (англ. MHETase) для биodeградации микропластика [Ajala и др., 2022; Buchholz и др., 2022; Cui и др., 2022; Patil и др., 2022]. Помимо этого, механизмом толерантности АБС может выступать формирование биопленки, позволяющей ОФМ снизить интенсивность фотосинтеза и других метаболических процессов, создающей естественную преграду для химических соединений и сорбирующей и на компонентах ВПМ [Nozhevnikova, Botchkova, Plakunov, 2015; Kublanovskaya и др., 2020a; Kublanovskaya и др., 2020b].

Несмотря на способность АБС как целостной системы адаптироваться к стрессорам и стабильно осуществлять основные процессы жизнедеятельности, накопительный эффект стрессоров может постепенно влиять на образование биомассы и таксономический состав микробиома АБС [Stocker, 1998; Vaho и др., 2021; Khalighi и др., 2022]. Наглядным примером этого являются природные водоёмы, расположенные близ месторождений апатитовых руд, а также резервуары на ВОС, подверженные постоянному воздействию стрессора в виде избытка неорганического фосфора [Kashulin и др., 2019; Kashulin, Kashulina, Bekkelund, 2021; Romanis, Pearson, Neilan, 2021].

Помимо накопительного эффекта от постоянного или периодического воздействия стрессоров, существуют ситуации, в которых АБС внезапно подвергаются действию новых стрессоров, что нарушает стационарное равновесие системы и инициирует новый виток адаптации. Необходимо отметить, что данное явление не стоит путать с возмущением экосистемы (англ. ecological disturbance), после которого система не приспособливается, а возвращается к исходному состоянию [Borics, Várbíró, Padisák, 2013]. Возникновение нового стрессора в экосистеме может приводить к разным эффектам в функционировании АБС, как например формирование кросс-толерантности между старым стрессором и новым, или наоборот — к потере толерантности к прежнему стрессору и адаптации к новому в соответствии с «эффектом качелей». Существует предположение, что микробные сообщества из экотопов с выраженными стрессорами имеют больший потенциал адаптации

к другим стрессорам, делая их перспективными системами для применения в биотехнологии: в биоремедиации экосистем, выделении ценных штаммов для промышленных задач, и как источник молекулярных конструкций для биоинженерии [Charlesworth, Burns, 2016; Baselga-Cervera и др., 2020; Chebotaryova и др., 2023].

1.1.3. АБС в естественных и искусственных водоёмах с высоким содержанием неорганического фосфора

АБС в естественных пресноводных и солёных водоёмах участвуют в биогеохимических циклах не только углерода и кислорода, но и других макроэлементов (P, N, S) и микроэлементов (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Co и др.), и зависят от их концентрации и биодоступности в среде. Микроорганизмы в АБС обладают выраженной способностью к биохимической адаптации в ответ на изменение данных условий. Это связывают с пластичностью метаболизма, эволюционно возникшей в ответ на значительные геохимические трансформации на планете в разные геологические эпохи Земли [Lobus, Kulikovskiy, 2023]. Но даже несмотря на это, состояние АБС в водоёмах всё равно определяется содержанием азота и фосфора, согласно предложенному Редфилдом соотношению химических элементов в водной среде (C:N:P) [Redfield, 1958; Lobus, Kulikovskiy, 2023]. Пути получения азота в АБС разнообразны и сводятся не только к поглощению и ассимиляции данного элемента в форме нитрата (NO_3^-), нитрита (NO_2^-) и аммония (NH_4^+), но включают и фиксацию атмосферного азота (N_2). Внешним источником фосфора в водных экосистемах является только процесс его мобилизации из минералов, в ходе которого фосфор проходит через ряд стабильных соединений с низкой биодоступностью (гидроксиапатит ($[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$), ортофосфат кальция ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), ортофосфат магния ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$)), прежде чем переходит в форму растворенного неорганического фосфора (англ. dissolved inorganic phosphorus, DIP) — равновесной смесью дигидрофосфата (H_2PO_4^-), гидрофосфата (HPO_4^{2-}) и ортофосфата (PO_4^{3-}). Другими источниками фосфора в водоёмах являются процессы жизнедеятельности, а также его высвобождение из мертвых организмов, в результате чего в среде образуется пул растворенного органического фосфора (англ. dissolved organic phosphorus, DOP). Однако для поглощения фосфора клеткой требуется его конверсия из органической в неорганическую форму в ходе энергозатратных процессов гидролиза ферментами щелочной фосфатазой, фосфодиэстеразами и фитазами, что делает данный элемент более

«дорогим» и сильнее лимитирующим жизнедеятельность АБС по сравнению с азотом [Herbes, Allen, Mancy, 1975; Lobus, Kulikovskiy, 2023].

В определенных условиях в водоёмах может происходить процесс эвтрофикации — насыщение водоёмов биогенными элементами, сопровождающееся ростом биологической продуктивности. Как следствие, происходит интенсивное размножение видов ОФМ, имеющих конкурентные преимущества при резком повышении биодоступности фосфора и (или) азота. Данное явление также известно как «цветение» водоёмов (англ. harmful algal bloom, НАВ). Эвтрофикация является большой проблемой для административно-хозяйственной деятельности человека, поскольку приводит к нарушению экологического равновесия, чрезмерному развитию ОФМ и индукции у них синтеза токсичных соединений, приводящих водоём в непригодное для деятельности состояние. Среди ОФМ цианобактерии способны продуцировать особенно широкий спектр токсинов (цианотоксины), разнообразных по химической природе и токсикологическому эффекту: гепатотоксины (микроцистины — производные аминокислот), нейротоксины (алкалоиды анатоксин и сакситоксин) и дерматотоксины (лингбиатоксины, аплизиатоксины, дебромоеаплизиадоксин) [Romanis, Pearson, Neilan, 2021]. Экологическое значение активного синтеза цианотоксинов заключается в конкуренции за доступные источники биогенных элементов, возникающие при эвтрофикации водоёмов. Необходимо отметить, что эвтрофикация может происходить как в силу естественных причин — в ходе постепенного накопления осадков мертвой органики, так и вследствие антропогенного воздействия хозяйственной деятельности человека [Akinawo, 2023; Lobus, Kulikovskiy, 2023].

Различные соединения фосфора интенсивно используются человеком в производстве удобрений, кормовых и пищевых добавок, моющих средств и других технологических процессах. При этом большая часть потребления фосфора (около 80%) приходится именно на удобрения, в 2011 году оно составляло 20 Мт фосфора. Добыча фосфора для происходит путём разработки залежей фосфорных минералов, наиболее распространенными из которых являются апатиты ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$), а также ксенотимы (YPO_4) и монациты ($(\text{Ce,La,Nd,Th})\text{PO}_4$). При разработке данных минералов используется вода для очистки от примесей, в результате чего обильно образуются сточные воды, обогащенные металлами и растворенным неорганическим фосфором. Попадание данных вод в окрестные водоёмы приводит к их интенсивной эвтрофикации, примером чего является обстановка в

озере Большая Имандра в Мурманской области, находящегося в окрестности апатито-нефелиновой обогатительной фабрики (АНОФ-2) [Holtzman, Lehman, 1998; Moiseenko и др., 2009; Kashulin и др., 2019]. Экологический мониторинг оз. Б. Имандра показал, что с момента начала разработок фосфорных руд в 1930 гг. максимальное количество общего растворенного фосфора в воде увеличилось в 17 раз с 10 мкг/л до 176 мкг/л к 1990 гг., после чего снизилось до 68 мкг/л в ходе ревитализации в начале 2000 гг. [Moiseenko и др., 2009]. Помимо роста содержания фосфора, в воде также возростала концентрация нитратов, что связано с использованием азотсодержащих взрывчатых веществ при разработке месторождений [Kashulin и др., 2019]. Биоразнообразие водоёма, наоборот, снижалось в ходе процесса эвтрофикации и вернулось на исходные значения при ревитализации, но видовой состав АБС претерпел значительные изменения.

В пред-индустриальный период среди ОФМ в фитопланктоне преобладали представители класса Bacillariophyceae, представители порядка Desmidiales из рр. *Cosmarium* и *Staurastrum*, а также виды *Ceratium hirundinella*, *Quadrigula closterioides*, *Botryococcus braunii*, *Coelosphaerium naegelianum*, а также представители класса Cyanophyceae *Coelosphaerium naegelianum*, *Anabaena lemmermannii*; в перифитоне ОФМ были представлены эукариотическими зелёными водорослями из рр. *Spirogyra*, *Chlorococcus* и *Oocystis*, а также цианобактериями из рр. *Nostoc*. В индустриальный период было отмечено значительное увеличение биомассы зеленых водорослей, среди которых большую представленность получили организмы из рр. *Scenedesmus* и *Pandorina*, на фоне уменьшения количества представителей диатомовых водорослей [Moiseenko и др., 2009; Kashulin и др., 2019]. Также отмечается, что в результате эвтрофикации в оз. Б. Имандра большую представленность получили цианобактерии рр. *Dolichospermum*, *Pseudanabaena*, *Nostoc*, *Chloroidium*, *Paulinella*, *Synechococcus*, *Planktothrix*, и *Phormidium*, АБС которых организуются в цианобактериальные маты [Kashulin, Kashulina, Bekkelund, 2021]. Наряду с изменением качественного и количественного состава фототрофных компонентов микробиома АБС в оз. Б. Имандра, эвтрофикация также повлияла на развитие актиномицетов, сапрофитных, денитрифицирующих и фосфат-солубилизирующих бактерий [Вандыш, Кашулин, Черепанов, 2014]. В ходе исследований процессов «цветения» воды в озере отмечают, что на пике данного явления численность эукариотических ОФМ достигает не более 34%, после чего снижается и уступает развитию

бактерий из групп Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Chlorobi, Chloroflexi и Planctomycetes. Примечательным является тот факт, что процессы «цветения» в оз. Б. Имандра могут происходить даже вне оптимальных значений соотношения Редфилда, в условиях образующегося дефицита азота и фосфора. Это возможно за счёт представленности в АБС микроорганизмов с выраженной способностью к диазототрофии и поглощению фосфора — механизмов, предоставляющих эволюционное преимущество в условиях данного экотопа [Kashulin, Kashulina, Bekkelund, 2021]. Данные обстоятельства, вкуче с по-прежнему высокими значениями растворенного общего фосфора, указывают на продолжение эвтрофикации оз. Б. Имандра даже вопреки усилиям по ревитализации водоёма. Помимо самого озера, эвтрофикации подвержены также и другие водоёмы, окружающие комплекс апатито-нефелиновых разработок в Хибинах, такие как оз. Большой Вудьявр, оз. Сейдозеро, р. Белая, р. Жемчужная и более мелкие водоёмы, использующиеся как отстойники сточных вод апатитовых разработок [Kashulin и др., 2019].

Помимо использования естественных водоёмов вблизи объектов промышленной или муниципальной инфраструктуры, человек создает искусственные водоёмы для своих целей. К ним относят некоторые типы водохранилищ, пруды и резервуары, используемые для запасаания воды, разведения аквакультур и водоплавающих птиц, а также для мероприятий по очистке вод от избытка биогенных элементов (включая фосфор и азот). Данные водоёмы также подвержены эвтрофикации вследствие прямого поступления в них соединений данных элементов или в результате побочного эффекта от других процессов (например, жизнедеятельности аквакультур), что сопровождается формированием АБС, способных не только существовать в условиях избыточных концентраций азота и фосфора, но и эффективно использовать их для своих метаболических потребностей. В искусственных водоёмах небольших размеров, с незначительными отличиями в зависимости от географического положения, развиваются представители ОФМ из отделов Dinophyta, Bacillariophyta, Euglenophyta, но более всего из отделов Chlorophyta и Cyanophyta, причем как по разнообразию, так и по относительному количеству. Среди Chlorophyta наиболее часто в данных условиях встречаются организмы из pp. *Micractinium*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus*, *Ankistrodesmus* и *Chlamydomonas*, а среди Cyanophyta — pp. *Microcystis*, *Oscillatoria* и *Planktothrix* [Бугранова, Цупикова, 2016; Sutherland, Turnbull, Craggs, 2017]. При избытке фосфора и азота, а также в условиях низкой интенсивности

перемешивания в прудах могут развиваться нитчатые зеленые водоросли из рр. *Cladophora*, *Oedogonium*, *Hydrodictyo* и *Spirogyra* [Cattaneo и др., 2013].

Параллельно с развитием ОФМ в АБС эвтрофицированных искусственных водоёмах устанавливается определенный состав бактерий, грибов, архей и простейших, занимающих соответствующие трофические ниши. Наиболее представленными в АБС данных экотопов являются группы *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* [Qin и др., 2016]. Разложение и биодegradация высокомолекулярной органики преимущественно осуществляется представителями бактерий рр. *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Aerobacter* и *Cellulomonas*. Определенными группами бактерий и грибов также обеспечивается азотный цикл в подобных водоёмах: аммонификация (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. и *Micrococcus* sp.), нитрификация и денитрификация (рр. *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Aspergillus* и *Vibrio*), в том числе анаэробное окисление аммония — анаммокс (рр. *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*). Фосфорный цикл в таких водоёмах связан, в первую очередь, с деятельностью в составе АБС фосфат-солюбилизирующих бактерий и грибов из рр. *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Penicillium* и *Aspergillus*, выделяющих в среду органические и неорганические кислоты (например, азотистую и серную кислоты), которые мобилизуют фосфаты из нерастворимых гидроксиапатитов и ортофосфатов кальция, присутствующих в осадках искусственных водоёмов [Qin и др., 2016; Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018]. Также при эвтрофикации подобных водоёмов могут развиваться метаногенные археи, стимулирующие процессы нитрификации и денитрификации, а в отдельных случаях — развитие ОФМ в составе АБС [Płaza и др., 2021; Lian и др., 2024]. Помимо ОФМ, в таких биотопах ассимиляция растворенных биогенных элементов может осуществляться пурпурными и зелеными несерными бактериями в аноксигенных условиях, например при формировании сложно стратифицированных микробных матов. В таком случае, данные микроорганизмы способны вносить дополнительный вклад в утилизацию нутриентов наряду с АБС [Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018; Cerruti и др., 2020].

1.1.4. Роль АБС в очистке муниципальных и промышленных стоков от избытка неорганического фосфора

К искусственным водоёмам, постоянно находящимся под действием стрессоров в виде избытка биогенных элементов и для которых всегда существует риск эвтрофикации, относят водоёмы водоочистных сооружений (ВОС). Они представляют из себя комплекс специализированных сооружений, служащих для очистки сточных вод от соединений до значений предельно допустимых концентрации (ПДК). По происхождению антропогенные сточные воды подразделяют на муниципальные (хозяйственно-бытовые), технические (промышленные) и сельскохозяйственные. В свою очередь, устройство ВОС может варьировать от природы сточных вод и от принадлежности государственным или частным организациям, однако они организованы схожим образом и состоят из трех основных этапов очистки (рис. 2) [Kesari и др., 2021]:

1. **Первичная очистка** осуществляет механическое отделение крупных твердых объектов и взвешенных частиц в двух последовательных фильтрах — проволочном клиновидном фильтре и песколовке. Также иногда на данном этапе устанавливают «жироловки» для удаления гидрофобных соединений. В конце первичного этапа вода отстаивается в первичных отстойниках для удаления взвешенных частиц за счёт их оседания.
2. **Вторичный этап** очистки носит название «биологический» и осуществляется с помощью сообществ активного ила, состоящих из простейших, бактерий, архей, беспозвоночных животных и ОФМ в виде цианобактерий и нитчатых зелёных водорослей. Данные сообщества, как правило, организованы в флокулы или агрегаты и осуществляют аэробные или анаэробные реакции с растворенными соединениями азота и фосфора. Технически данные процессы могут быть реализованы в резервуарах с аэробными или анаэробными условиями — аэротенках и метантенках, соответственно, а также в более сложных системах «искусственных болот» (англ. Constructed wetlands), микробных топливных элементов (англ. Microbial fuel cells), биофильтров из иммобилизованных микроорганизмов, или реакторов с анаэробным слоем ила с восходящим потоком (англ. Up-flow anaerobic sludge blanket, UASB). Обогащенная фосфором и азотом

биомасса далее осаждается во вторичных отстойниках и либо возвращается в исходные резервуары, либо используется для других приложений.

3. **Третичный этап** — доочистка сточных вод, реализация которой возможна разными физическими (центрифугирование, фильтрация, сорбция), химическими (экстракция, электрохимические реакции) или биологическими методами. Целью данного последнего этапа является обеспечить очистку сточных вод от примесей на 99%. Кроме того, на данном этапе производится дезинфекция сточных путем обработки физическими методами (ультрафиолет, ультразвук, озон) или химическими агентами (гипохлоритом, хлором), либо их комбинацией. Дезинфекция, с одной стороны, предотвращает попадание в окружающую среду и дальнейшее распространение потенциально патогенных микроорганизмов, попавших со стоками из медицинских учреждений и других очагов их циркуляции. С другой стороны, дезинфекция предотвращает вынос из ВОС микроорганизмов — компонентов активного ила и других участников процессов биологической очистки, которые могли бы нарушить экологический

Способность активного ила ВОС к изъятию растворенного неорганического фосфора определяется, в первую очередь, наличием в составе данного сообщества такой функциональной группы микроорганизмов, как полифосфат-аккумулирующие организмы (ПАО), способными запасать ортофосфат в виде цепочек полифосфатов (ПФ) [Acevedo и др., 2014; Tagaue и др., 2016]. Хотя способность к синтезу ПФ универсальна, у отдельных организмов она более выражена, что делает их более приспособленными к обитанию в среде ВОС и практически ценными для процессов биологической очистки. Среди наиболее распространенных и значимых представителей ПАО в активном иле ВОС выделяют: *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, рр. *Tetrasphaera* (*T. australiensis*, *T. japonica*, *T. elongate*, *T. jenkinsii*), *Ca. Phosphoribacter*, *Dechloromonas*, *Ca. Obscuribacter*, *Acinetobacter* и *Acinetobacteria* [Qiu и др., 2019; Izadi, Izadi, Eldyasti, 2020]. Данные организмы являются ключевыми участниками процесса усиленного биологического удаления фосфора (англ. enhanced biological phosphorus removal, EBPR) [Albertsen и др., 2012; Law и др., 2016; Izadi, Izadi, Eldyasti, 2020]. Тогда как в аэробных условиях ассимиляция фосфора идёт с эффективностью 0,02 мг(фосфора)/мг(биомассы), а степень удаления составляет 15–25% от

его общего количества, в ходе EBPR эффективность ассимиляции многократно возрастает до 0,15 мг(фосфора)/мг(биомассы) [Izadi, Izadi, Eldyasti, 2020]. баланс природных водоёмов.

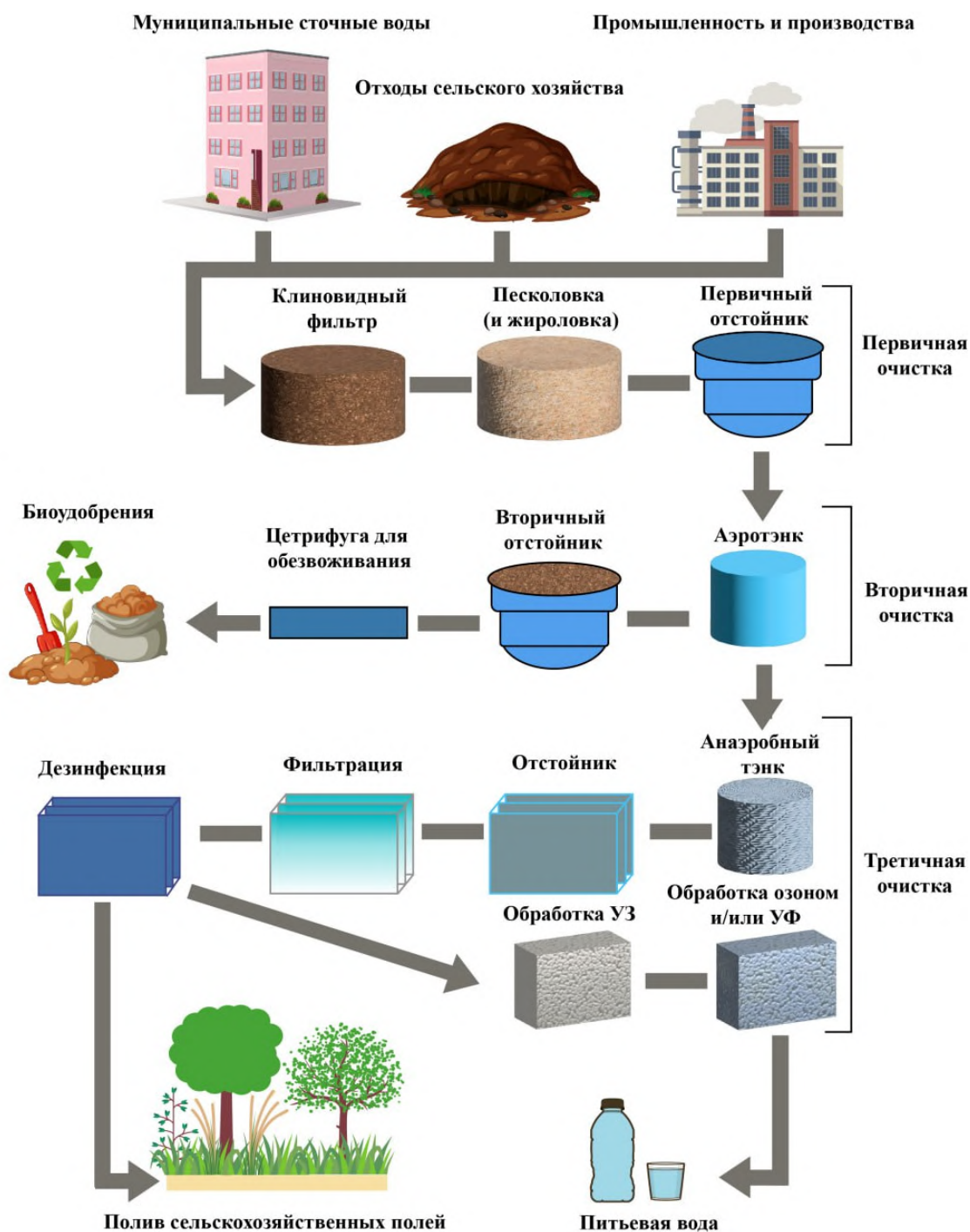


Рис. 2. Схема устройства ВОС в виде трех ступеней очистки, составляющих их блоков, механизмов доочистки и вариантов вторичного использования продуктов очистки [Kesari и др., 2021].

Процесс EBPR применяется на этапе вторичной очистки и основан на определенной конфигурации резервуаров ВОС, при которых сперва сточные воды инкубируются с активным илом в анаэробной среде, после чего попадают в аэробные условия. В анаэробных условиях ПАО активного ила осуществляют ассимиляцию короткоцепочечных жирных кислот, которые образуются в результате реакций брожения другими бактериями активного ила, и формируют молекулы полигидроксиалканоатов (наиболее представленными из них являются полигидроксибутират и полигидроксивалерат). Во время последующей аэробной фазы происходит катаболизм полигидроксиалканоатов, а высвобожденная энергия используется для активного транспорта фосфатов внутрь клеток и синтеза полифосфатов. Во время данных процессов в активном иле происходит конкуренция за субстрат между ПАО и другой группой организмов со схожими метаболическими реакциями — гликоген-аккумулирующие организмы (ГАО) [Law и др., 2016; Izadi, Izadi, Eldyasti, 2020]. Получая конкурентные преимущества перед ПАО под действием флуктуаций внешних факторов, ГАО способны эффективно использовать короткоцепочечные жирные кислоты, не внося при этом существенного вклада в удаление фосфора из сточных вод [Acevedo и др., 2014; Law и др., 2016]. Это, вместе с техническими сложностями EBPR, оставляют открытым вопрос о развитии более совершенных биотехнологических решений для очистки сточных вод.

Помимо ПАО, в активном иле ВОС присутствуют и другие организмы, которые могут вносить вклад в процессы изъятия фосфора из сточных вод. Среди микроорганизмов активного ила стоит отметить одноклеточные, колониальные и особенно нитчатые ОФМ отдела Cyanophyta из pp. *Microcystis*, *Pseudoanabaena*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Limnothrix*, *Nostoc*, *Synechocystis* и *Synechococcus*. Хотя присутствие данных микроорганизмов в экосистеме сточных вод бывает внешне незримо, нарушение функционирования ВОС и последующая эвтрофикация приводят к интенсивному развитию данных цианобактерий [Eikelboom, 1975; Romanis, Pearson, Neilan, 2021]. Это сопровождается синтезом и накоплением в сточных водах цианотоксинов, выносимых с конечным эффлюентом в окружающую среду. Таким образом, несмотря на утилизацию биогенных элементов среды в пользу увеличения цианобактериальной биомассы, результатом является появление в стоках новых опасных соединений, что снижает потенциальный положительный вклад данных цианобактерий в процесс очистки. Однако кроме цианобактерий в сточных водах ряда ВОС были обнаружены следовые количества ОФМ из отдела Chlorophyta, в частности

р. *Chlorella*, изоляты которых были способны к почти полному удалению фосфора из сточных вод в лабораторных опытах [Nuramkhaan и др., 2019; Lima и др., 2022].

Для эукариотических зеленых микроводорослей в целом отмечается высокий потенциал к биоизъятию фосфора вследствие ряда их свойств: способности переводить растворенный органический фосфор в неорганический, высокой ёмкости клеток для фосфора (накопление его до 4–7% от массы сухого веса), возможности к синтезу разных фосфор-содержащих включений (в том числе ПФ) и их распределению по разным клеточным компартментам [Solovchenko и др., 2016; Solovchenko и др., 2019; Asaad, Amer, 2024]. Также было показано, что при добавлении к биомассе активного ила выращенной культуры штамма *Chlorella* sp., ранее выделенного из тех же сточных вод, удаётся достигнуть не только высокой степени изъятия фосфора (до 96%), но и формирования более стабильной формы сообщества — гранулярного альго-бактериального ила (англ. microalgal–bacterial granular sludge — MBGS) [Ji, Liu, 2021]. Добавление биомассы *Chlorella* sp. стимулирует активность бактерий pp. *Acinetobacter*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Pseudomonas* и *Bacillus* со способностью к бактериальному синтезу компонентов ВПМ, а также активность нитчатых грибов и протистов, являющихся первичной матрицей для закрепления компонентов активного ила [Nuramkhaan и др., 2019; Kesari и др., 2021; Celis de и др., 2024]. Всё это дополнительно способствует агрегации клеток и формированию стабильного АБС, которое может эффективно удалять биогенные элементы из сточных вод.

1.1.5. Конструирование искусственных АБС для повышения эффективности очистки сточных вод от избытка неорганического фосфора

Искусственные АБС, получаемые при смешивании микроорганизмов с целевыми свойствами, демонстрируют высокий потенциал и рассматриваются на сегодняшний день как перспективные биотехнологические решения для очистки сточных вод. Однако формирования искусственных АБС на основе автохтонных ОФМ — полученных из того же биоценоза ВОС — существенно ограничивает эффективность данной биотехнологической разработки. Это может быть связано с низким биоразнообразием эукариотических микроводорослей в составе активного ила на разных ВОС, сложностью выделения некоторых из них в альгологически-чистые культуры, а также сложностью подбора условий их культивирования для наработки биомассы для получения целевого АБС. С другой стороны, более перспективными могут быть культуры аллохтонных ОФМ — полученных

из других местообитаний — с хорошо изученными свойствами и находящимися в доступе на хранении в международных коллекциях. Наиболее широко применяемыми, согласно литературным данным, являются штаммы микроводорослей из рр. *Chlorella* и *Micractinium* (семейство Trebouxiophyceae), *Scenedesmus*, *Tetradesmus* и *Desmodesmus* (сем. Scenedesmaceae), *Chlamydomonas* (сем. Chlamydomonadaceae), *Chlorococcum* (сем. Chlorococcaceae), *Euglena* (тип. Euglenozoa) [Gonçalves, Pires, Simões, 2017; Aditya и др., 2022]. В системах для биологической доочистки сточных вод данные микроорганизмы могут использоваться либо в комбинации с автохтонными сообществами активного ила того или иного ВОС, либо с другими конкретными организмами для формирования (и конструирования) АБС с нужными свойствами. К таким организмам, в первую очередь, относят бактерий со способностью вступать в мутуалистические отношения с микроводорослью в условиях данного биотехнологического процесса, а именно: MGP-бактерии из сем. Rhodobacteraceae и Rhizobiaceae, аммонификаторы и нитрификаторы из рр. *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*, соответственно, а также фосфат-солубилизующие бактерии из рр. *Bacillus* и *Paenibacillus* [Dong и др., 2022; Nagarajan и др., 2022; Mawadah, Prabaningtyas, 2024]. Получающиеся в результате подобного конструирования искусственные АБС обладают высокой стабильностью в процессах очистки сточных вод, что выражается в увеличении биоразнообразия мутуалистических бактерий в данном сообществе в ходе всего процесса: представители сем. Sphingobacteriaceae, Cytophagaceae и р. *Sediminibacterium* из филума Bacteroidetes; сем. Sphingomonadaceae, Rhizobiaceae и Caulobacteraceae из филума Alphaproteobacteria; сем. Alcaligenaceae, Rhodocyclaceae, Comamonadaceae и р. *Hydrogenophaga* из Betaproteobacteria [Toyama и др., 2018; Toyama и др., 2019]. При конструировании искусственных АБС для очистки сточных вод также могут использовать более одного вида ОФМ, смешивая одноклеточных микроводорослей из рр. *Chlorella*, *Micractinium*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum* и *Euglena*, а также нитчатых водорослей из рр. *Spirogyra* (отдел Charophyta), *Rhizoclonium* и *Ulothrix* (отдел Chlorophyta). В отличие от альго-бактериальных взаимодействий взаимовыгодного характера в подобных АБС, трофические отношения между разными ОФМ, как правило, являются конкуренцией за биогенные элементы в среде, что однако приводит к более интенсивному биоизъятию фосфора из сточных вод — до 100% от исходного количества [Gonçalves, Pires, Simões, 2017]. Отдельно стоит отметить работы по конструированию

искусственных АБС на основе смешанных лабораторных культур эукариотических микроводорослей с цианобактериями из рр. *Planktothrix*, *Lyngbya*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Synechococcus* [Gonçalves, Pires, Simões, 2017; Vasilieva и др., 2022]. В частности, нитчатые цианобактерии в данной системе могут выступать в виде матрицы для иммобилизации клеток микроводорослей и структурирования всего сообщества.

Для конструирования искусственных АБС активно используют вспомогательные биоинженерные инструменты, такие как биodeградируемые и биосовместимые природные или синтетические полимерные носители, которые служат для иммобилизации ОФМ и других микроорганизмов, предотвращая их диссоциацию в потоке жидкости и облегчая последующий сбор биомассы, в том числе на ВОС [Hu и др., 2021; Vasilieva и др., 2021; Nan, Zhang, Ho, 2023]. Такие носители являются аналогом сложных стратифицированных структур, образуемых АБС в природных экотопах или на самих ВОС. Помимо биосовместимости, основными требованиями к таким носителям для конструирования АБС являются: проницаемость для света и растворенных газов, стабильная сорбция на них микроорганизмов, пористость с достаточным местом для пролиферации клеток, низкая себестоимость и простота в применении. Также большим преимуществом является биodeградируемость носителя под действием абиотических условий или энзиматической активности микроорганизмов. Использование носителей для иммобилизации компонентов АБС приводит к явным положительным эффектам в ходе биотехнологической очистки сочных вод [Shen, Gao, Li, 2017]. В частности, в носителях происходит более равномерное распределение светового потока в биомассе АБС и, как следствие, снижается фотоингибирование клеток и повышается эффективность целевых метаболических процессов [Martin и др., 2021; Nan, Zhang, Ho, 2023; Vasilieva и др., 2023a]. В контексте очистки сточных вод от избытков биогенных элементов и различных микрополлютантов такие носители могут являться эффективным сорбирующим материалом, что вносит вклад в степень изъятия и понижает токсичное действие на микроорганизмы АБС. Иммобилизация клеток АБС на биodeградируемых носителях рассматривается некоторыми авторами как необходимый этап, инициирующий дальнейшее формирование клетками собственного ВПМ и постепенное замещение им деградирующих фрагментов исходной матрицы [Bergmaier, Champagne, Lacroix, 2005; Efremenko и др., 2022; Hou и др., 2024]. Данный взгляд опирается на существующее представление альго-бактериальной биопленки

как адаптивной стратегии организмов-участников в ответ на неблагоприятные условия среды [Kublanovskaya и др., 2020a; Ennaceri и др., 2023]. Поэтому со стороны биоинженерии и конструирования АБС носители рассматриваются как инструмент для формирования стабильных форм микробных сообществ, которые одновременно решают задачи изъятия целевых соединений из сточных вод. Среди используемых сегодня в этой области носителей синтетические (губки из полиуретана, поливинилиденфторида, полиакрилонитрила или полисульфона) являются менее предпочтительными, чем из природных материалов, ввиду потенциальной токсичности для некоторых организмов АБС и стоимости их получения [Han, Zhang, Ho, 2023]. К природным материалам можно отнести как полученные непосредственно из окружающей среды био-матрицы (плоды люффы, фрагменты кукурузных початков, багасса от сахарного тростника, куски хлопковой ткани), так и выделенные из организмов субстанции для приготовления носителей (агар и агароза, хитозан, желатин, альгинаты) [Garbowski и др., 2020; Hu и др., 2021; Martin и др., 2021; Vasilieva и др., 2021; Han, Zhang, Ho, 2023]. Большим потенциалом обладает материал хитозан, получаемый из хитина членистоногих и грибов, и обеспечивающий высокую степень иммобилизации клеток АБС, сорбцию биогенных элементов на своей поверхности, а также способный стимулировать биопленкообразование у микроорганизмов [Vasilieva и др., 2021; Vasilieva и др., 2022; Vasilieva и др., 2023a]. Носители для иммобилизации могут производиться в разных формах, в зависимости от необходимого формата культивирования, но наиболее распространенными являются носители в форме пластин определенной толщины и в форме взвеси частиц. Иммобилизованные на пластинах АБС формируют при культивировании структуры, похожие на биопленки и микробные маты, в то время как вокруг частиц сорбентов может идти формирование флоккул, близких по структуре к MBGS [Ji, Liu, 2021; Ji, Shi, Yilmaz, 2022; Wang и др., 2023c].

Выбор состава микроорганизмов и подбор носителей для иммобилизации связан также с тем, какую систему культивирования АБС предполагается применять в каждом конкретном случае. Традиционно, форматы выращивания ОФМ представляют двумя типами [Cai, Park, Li, 2013; Grivalský и др., 2019]:

1. **Закрытые или полужакрытые системы** — фотобиореакторы (ФБР). Среди них выделяют тонкослойные пластинчатые ФБР и колоночные ФБР из стекла, которые способны обеспечить высокий уровень продуктивности за счёт

оптимального освещения клеток ОФМ и их интенсивного перемешивания. Данные системы широко используются в лабораторных исследованиях, однако из-за сложного устройства и стоимости материалов являются непрактичными при масштабировании процесса на реальном производстве. Еще одним видом закрытых систем являются мешки из полипропилена, действующие по схожему с колоночными ФБР принципу, более удобные в применении, но и менее эффективно осуществляющие перемешивание клеток. На сегодняшний день, большинство биотехнологических предприятий, где принципиальным является именно закрытое культивирование, в том числе для сохранения стерильности культур, отдают предпочтение ФБР с мешками [Cai, Park, Li, 2013].

2. **Открытые культивационные системы** — искусственные пруды (англ. artificial ponds), тэнки (англ. tanks), пруды и желоба с циркуляцией жидкости (англ. raceway ponds), наклонные каскадные системы (англ. sloping cascades). Тогда как в большинстве подобных систем эффективность прироста биомассы остается невысокой (не более 1 г (с. в.)/сут./м²) из-за слабого перемешивания биомассы в большой толще жидкости, её очевидным преимуществом является простота устройства и низкая стоимость [Grivalský и др., 2019].

В контексте задач по биоизъятию избытков биогенных элементов с помощью АБС из сточных вод на ВОС активно применяются именно открытые культивационные системы, в основном пруды или желоба с циркулирующей жидкостью, а в некоторых случаях и более совершенные наклонные каскадные системы (рис. 3) [Cai, Park, Li, 2013]. Модификацией последних являются тонкослойные каскады (англ. thin-layer cascades, TLC), для которых решена проблема недостаточного перемешивания в следствие того, что инкубация АБС происходит не в большой толще воды, а в тонком слое (не более 5 см, чаще 1–1,5 см) [Grivalský и др., 2019; Schädler и др., 2020; Ranglová и др., 2021]. Это позволяет повысить удельную плотность освещения ОФМ в АБС, а также увеличить объем проходящей через биомассу сточной воды с избытком фосфора и азота, что в итоге увеличивает метаболические возможности клеток для биоизъятия данных элементов. Поскольку принцип каскадов заключается в многократной циркуляции одного и того же объема сточной воды с биомассой АБС, то удастся достигнуть близкого к полному удаления фосфора и азота из воды [Morillas-España и др., 2021]. Таким образом, тонкослойные

каскады потенциально являются наиболее подходящей системой для раскрытия всех преимуществ сконструированных АБС, иммобилизованных на тонких носителях, что обеспечивает и высокую плотность омываемой средой биомассы, и простоту манипуляции с ней, и дополнительно обеспечивает сорбцию элементов на самом носителе.

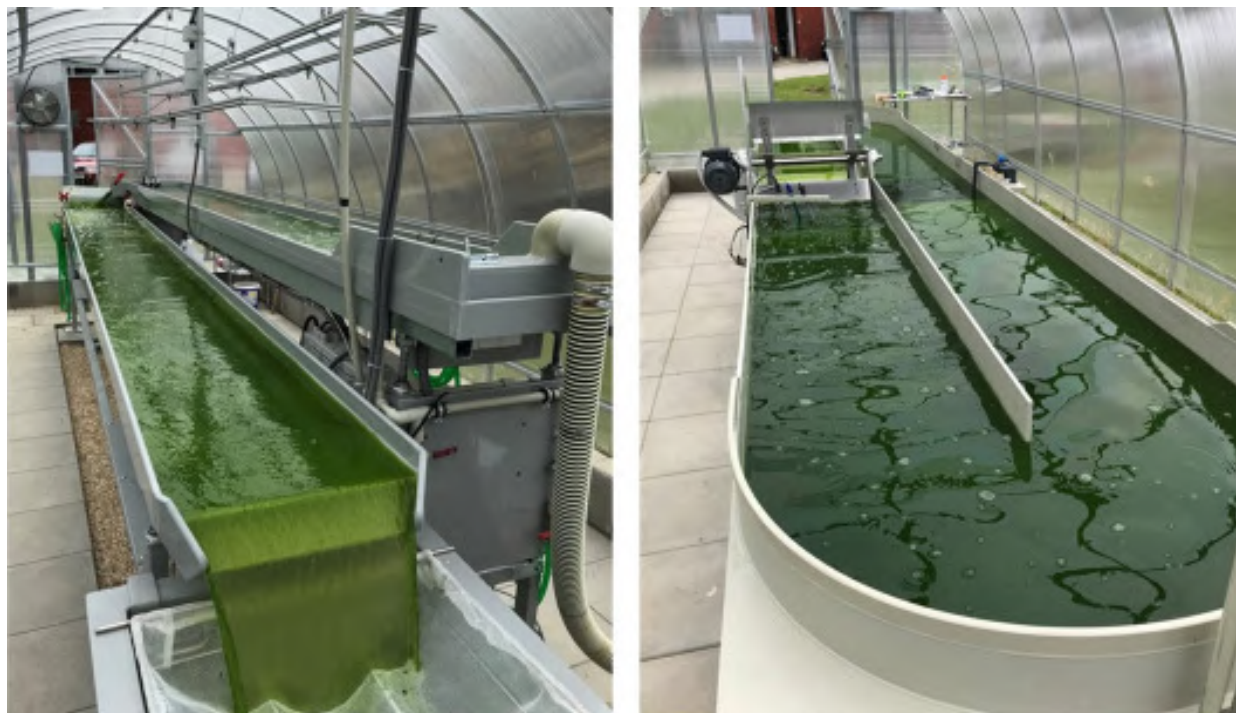


Рис. 3. Открытые культивационные системы для очистки сточных вод с помощью АБС: тонкослойный каскад (а) и желоб с циркулирующей жидкостью (б) — сконструированные в центре биотехнологии ALGATECH (Тршебонь, Чехия) [Ranglová и др., 2021].

1.2. Функционально–метагеномный анализ АБС¹

¹Материалы, изложенные в данном параграфе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. **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, Q2).

1.2.1. Методы метагеномного секвенирования для изучения АБС

Метагеномный подход становится все более распространенным в исследованиях микробных сообществ, дополняя классические микробиологические методы выделения и культивирования микроорганизмов для их идентификации, которые требуют больших трудозатрат и времени, а также не позволяют изучать некультивируемые формы. Это особенно актуально для бактериальных симбионтов ОФМ в природных и искусственных АБС.

Как правило, метагеномные исследования АБС направлены на то, чтобы ответить на три практических вопроса:

1. Какие организмы образуют сообщество (к каким таксонам они принадлежат)? Этот вопрос решается с помощью молекулярных идентификаторов или ДНК-баркодов (англ. DNA-barcode), уникально соответствующих организмам разной таксономической принадлежности. Для ДНК-баркодинга производится подбор геномных локусов для обеспечения требуемого уровня точности идентификации штаммов бактерий и ОФМ. В то время как локуса гена *16S pPHK* обычно достаточно для идентификации большинства гетеротрофных видов бактерий в фикосфере ОФМ, надежная идентификация самих ОФМ требует более расширенного набора локусов [Lebonah и др., 2014]. Так, для эукариотических микроводорослей используются фрагменты ядерных генов (*18S pPHK*, и внутренние транскрибируемые спейсеры nuITS1 и nuITS2), хлоропластных генов (*rbcL*, *tufA* и *cp23S*), а также гена субъединицы I митохондриальной цитохром с оксидазы (COI) [Hadi и др., 2016; Zou и др., 2016; Ballesteros и др., 2021]. Среди них ген *tufA*, кодирующий пластидный фактор элонгации, в настоящее время является наиболее точным ДНК-баркодом для идентификации родов и видов в классе Chlorophyceae [Vieira и др., 2016]. Для идентификации Cyanophyta обычно используются ген *16S pPHK* и ITS между генами *16S pPHK* и *23S pPHK*, а также функциональные гены: ген большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcL*), группа генов фиксации атмосферного азота (*nif*), или ген субъединицы РНК-полимеразы (гены *rpoB/C/D*) [Mishra, 2020; Ballesteros и др., 2021]. CBOL (Консорциум по ДНК-баркодированию живых

организмов) рекомендует последовательное применение не менее двух ДНК-баркодов для надежной идентификации таксонов ОФМ [Pawlowski и др., 2012].

2. Каков потенциальный функциональный профиль (экологическая функция) сообщества? Возможные физиологические и другие особенности сообщества определяются списком функциональных ортологов, представленных в геномах видов, образующих это сообщество. Более или менее определенный набор генетических детерминант может быть составлен для любого основного фенотипического признака, выраженного на уровне сообщества. Типичные примеры включают (но не ограничиваются) нитрификацию (*amo*, *nxr*, *hao* и т. д.), денитрификацию (*nar*, *nar* и *nirS* и т. д.) и поглощение фосфата с его последующим накоплением в форме полифосфата (гены *pho*, *PSR1*, *PTC1*, *ppk*, *ppk2* и т. д.) [Wang и др., 2023b; Xiong и др., 2023]. Следуя концепции обратной экологии, такие наборы генов могут быть основой метаболической реконструкции роли АБС в экосистеме [Сао и др., 2016]. Этот подход также может раскрыть много информации о биотехнологическом потенциале сообщества, которая может быть полезна, например, для предварительного скрининга *in silico*.
3. Каковы возможные взаимодействия между организмами, образующими сообщество? Этот вопрос связан с генами, кодирующими информацию о механизмах альго-бактериальных взаимодействий в фикосфере (рис. 1). Это гены путей биосинтеза и рецепции фитогормонов (гены *NPR* и *SAR*), альгицидов (гены *NRPSs* и *PKS*), ингибиторов роста (*glysS*, *gph* и *act*), а также рецепторов и регуляторных ферментов, участвующих в ответе на данные сигнальные молекулы [Dow, 2021; Astafyeva и др., 2022; Santo и др., 2022].

Технической основой метагеномного анализа являются технологии секвенирования второго поколения (англ. next generation sequencing, NGS) и третьего поколения (англ. third generation sequencing, TGS), обеспечивающие значительный объём данных, возможность секвенирования нескольких образцов за один запуск (мультиплексирование), высокое покрытие генома и глубину секвенирования. Сравнительная характеристика современных платформ для метагеномного секвенирования представлена в Таблице 1. Хотя метагеномные исследования на платформах NGS широко распространены, в силу исторических причин и преимуществ данной технологий, для них выделяют общие

ключевые недостатки: сложность анализа данных вследствие короткой длины секвенируемых фрагментов (100–250 п.о.) и наличие обязательных этапов полимеразной цепной реакции (ПЦР) при пробоподготовке, которые вносят случайные ошибки в сами последовательности ДНК из-за особенностей работы ДНК-полимеразы и создают риски систематической ошибки из-за избирательного обогащения определенных частей генома и/или определенных микроорганизмов. Альтернативными, быстро развивающимися последнее десятилетие, являются технологии TGS, которые позволяют не только секвенировать длинные одиночные молекулы без необходимости усреднения сигналов от группы молекул и без необходимой преамплификации препарата ДНК [Edwards и др., 2016; Zhang и др., 2021]. Исходно менее точные, чем другие технологии секвенирования, для TGS удалось снизить уровень ошибок до приемлемых 0–5% с помощью современных протоколов пробоподготовки и алгоритмов анализа данных на основе алгоритмов глубинного обучения [Jain и др., 2018; Rang, Kloosterman, Ridder de, 2018]. Отдельно стоит отметить технологию нанопорового секвенирования, успешно реализованную в виде коммерчески доступной технологии компанией Oxford Nanopore Technologies (ONT) [Berkovich и др., 2024].

Преимущество нанопорового секвенирования, помимо общих с остальными технологиями TGS, состоит в сравнительно скромных требованиях к материальному обеспечению для осуществления пробоподготовки и постановки секвенирования, что делает данный метод перспективным для широкого круга фундаментальных и прикладных исследований АБС даже в полевых условиях: экспресс-мониторинга водоёмов, поиска неизвестных новых или уже описанных видов, анализа биоразнообразия и функциональная аннотация сообществ [Edwards и др., 2016; Parker и др., 2017].

Метагеномный анализ с использованием перечисленных выше технологий реализуется в виде двух методов. Метод полного метагеномного секвенирования (англ. whole metagenome sequencing, WMS) является золотым стандартом для метагеномных исследований микробных сообществ из-за большого количества данных, позволяющего провести полноценный геномный анализ сообщества. Это включает в себя и точную таксономическую идентификацию микроорганизмов, и поиск набора генов определенной функции, и построение метаболических моделей в масштабе метагенома всего сообщества [Belcour и др., 2020; Zorrilla и др., 2021; Kuppa Baskaran и др., 2023].

Таблица 1. Сравнительная характеристика платформ NGS и TGS, наиболее широко применяемых в настоящее время для метагеномного секвенирования.

Поколение	Принцип секвенирования — название платформы	Описание принципа секвенирования	Отличительные преимущества	Недостатки	Примечания
Второе поколение секвенирования (NGS)/ Секвенирование синтезом	Пиросеквенирование — Roche/454	Измерение флуоресцентного сигнала при использовании энергии связи высвободившегося пирофосфата люциферазой	Сравнительно длинные чтения (300–500 п.о.)	- Ошибки при прочтении гомополимерных участков - Отсутствие одной из цепей ДНК	- Преимущество для ДНК-метабаркодинга за счёт длины - Хорошо различает однонуклеотидные замены
	Секвенирование с флуоресцентными нуклеотидами (англ. dye sequencing) — Illumina	Секвенирование синтезом с инкорпорированием флуоресцентно-меченных нуклеотидов	- Самая высокая производительность - Самая низкая стоимость за 1 нуклеотид - Самая большая точность	- Короткая длина чтений (до 250 п.о.) - Сложность секвенирования длинных палиндромных участков	Наличие дополнительного этапа ПЦР в ходе мостиковой амплификации
	Секвенирование с помощью комбинаторного заякаривающегося зонда (англ. combinatorial probe anchor synthesis, cPAS) — BGI/MGI	Секвенирование при синтезе комплементарной цепи по механизму катящегося кольца (англ. rolling circular amplification, RCA)	Такие же, как у платформы Illumina	- Короткая длина чтений - Сравнительно новая технология	Определенные модели секвенаторов способны генерировать наибольший объем данных
Третье поколение секвенирования (TGS)	Секвенирование одиночных молекул в реальном времени (англ. single-molecule real-time sequencing, SMRT) — PacBio	Секвенирование синтезом по матрице заиклизованных молекул ДНК в индивидуальных лунках ячейки, с помощью флуоресцентно-меченных нуклеотидов	- Высокая скорость секвенирования - Длинные фрагменты (до 10 ⁵ п.о.)	- Самая дорогая из платформ - Сравнительно низкая точность	Имеет возможность повторного многократного секвенирования молекул в лунках, что устремляет точность к показателям NGS
	Нанопоровое секвенирование — Oxford Nanopore Technology (ONT)	Нативное секвенирование молекул при прохождении через биоорганическую пору и за счет регистрации изменения проводимости	- Длинные чтения (до 10 ⁶ п.о.) - Регистрация модифицированных нуклеотидов	- Сравнительно низкая точность	Портативные модели и несложные протоколы делают платформу доступной для <i>in situ</i> анализа

Биоинформатическая обработка и анализ данных WMS представлена двумя основными подходами. Первым и наиболее распространенным является сборка метагеномно-собранных геномов (англ. metagenome-assembled genome, MAG), представленная последовательными шагами применения определенных алгоритмов — пайплайном (англ. pipeline): контроль качества (FastQC), фильтрация и триммирование чтений (Filter DNA, Trimmomatic, NanoFilt, Porechop), сборка контигов из чтений (SPAdes, MEGAHIT, Minimap2, Flye, Wengan), биннинг — получение MAG (MetaBAT2, MaxBin2), таксономическая классификация MAG (Kraken2, DIAMOND), проверка степени полноты и контаминации MAG (CheckM), структурная аннотация генов в MAG (BUSCO, Augustus). Хотя применение пайплайнов для получения MAG лучше адаптировано для прокариотических видов, в настоящее время наблюдается тенденция разработки алгоритмов для эукариотических микроорганизмов, включая микроводоросли. Такие инструменты, как EukRep и Tiara, используют методы машинного обучения и глубинного обучения для классификации подмножеств метагеномных чтений, которые связаны с эукариотическими микроводорослями (в том числе с ее пластидами и митохондриями) в целом метагеноме, а затем извлекают и осуществляют их сборку [West и др., 2018; Karlicki, Antonowicz, Karnkowska, 2022]. Степень полноты и контаминации являются двумя основными характеристиками MAG, которые оцениваются с помощью анализа генов маркеров с одной копией (англ. single copy marker genes, SCMG). Для проверки качества эукариотических MAG используются либо определенные наборы эукариотических SCMG (алгоритмы BUSCO и CEGMA), или проводится динамический выбор подходящего набора SCMG для улучшенной оценки, например, с помощью алгоритма EukCC [Saary, Mitchell, Finn, 2020]. Однако на сегодняшний день пайплайны получения качественных MAG для эукариотических ОФМ показывают хороший результат для ограниченного набора таксонов, что не позволяет полноценно применять их в метагеномике АБС [Saary, Mitchell, Finn, 2020; Saini и др., 2023]. Наиболее значимые результаты достигнуты данным подходом в рамках крупных международных проектов Tara Oceans Expedition и Microbial Atlas [Delmont и др., 2022]. Альтернативным направлением в обработке и анализе данных WMS является прямой анализ метагеномных чтений или результатов первичной сборки, без получения MAG. Примерами подобных алгоритмов являются: филогенетическое профилирование на основе прямого поиска ДНК-баркодов в чтениях с помощью алгоритмов без выравнивания [Inskoop

и др., 2013; Patil, McHardy, 2013], выравнивание ДНК-баркодов и других генов против чтений для идентификации (BLAST, MEGAN, TAXAssign) [Huson и др., 2007; Inskeep и др., 2013], классификация на основе поиска набора k-меров соответствующих генов (Kraken2, MetaPhlan 4) [Alneberg и др., 2014; Blanco-Míguez и др., 2023].

В отличие от WMS, метод таксономического профилирования микробных сообществ, или ДНК-метабаркодинг (англ. DNA-metabarcoding), основан на секвенировании ампликонов ДНК-баркодов, определяющих таксономическую принадлежность микроорганизмов. Разные варианты метода ДНК-метабаркодинга определяются локусами, которые используются для каждой конкретной группы организмов. ДНК-метабаркодинг по локусу гена *16S рРНК* широко используется для анализа АБС и выявления ранее неизвестных сообществ [Pushpakumara и др., 2023]. Для идентификации эукариотических ОФМ выполняется ДНК-метабаркодинг по локусам гена *18S рРНК*, ITS или функциональных генов *rbcL* и *tufA* [Sauvage и др., 2016; Turk Dermastia и др., 2023]. Гены *16S* и *23S рРНК* также используются для идентификации микроводорослей в качестве пластидных и митохондриальных рибосомных локусов, которые могут служить одновременно для идентификации и эукариотических, и прокариотических компонентов АБС [Kezlya, Tseplik, Kulikovskiy, 2023]. До недавнего времени метод ДНК-метабаркодинга был прочно основан на секвенировании с коротких чтений на платформах NGS. Однако к их серьезным недостаткам относится короткая длина прочтения, которая ограничивает таксономическое разрешение. Ограничения платформ NGS в 300–500 п.н. (для Roche/454) и 150–300 п.н. (для Illumina) позволяют считывать только часть фрагмента локуса ДНК-баркода, необходимого для идентификации. Регионы V3-V4 гена *16S рРНК* являются наиболее популярным вариантом для профилирования прокариотического состава микробиомов, хотя другие регионы, например V2-V3, также могут обеспечивать высокую специфичность и таксономическое разрешение [Bukin и др., 2019]. При этом, между таксономическим разрешением и выявлением биоразнообразия сообществ существует противоречие, поскольку повышенная специфичность приводит к потере определенных групп организмов при анализе. При обработке данных ДНК-метабаркодинга, для повышения точности определения таксонов и снижения вклада артефактов пробоподготовки в результат анализа, в большинстве случаев прибегают к использованию алгоритмов денойзинга (англ. «denoising») или фильтрации, например

dada2, которые осуществляют кластеризацию или усреднение последовательностей с наибольшим сходством [Callahan и др., 2016]. В результате подобной обработки получают последовательности ASV (amplicon sequence variant) или OUT (operational taxonomic unit), для которых далее и проводят таксономическую классификацию и другие этапы анализа. Таким образом, повышается точность за счет слияния чтений с потенциально незначимыми отличиями в последовательности в одну наиболее вероятную, но при этом существует риск потери полезной информации о существовании в образце мало представленных и уникальных таксонов.

Развитие технологии секвенирования длинных чтений на платформах TGS позволяет считывать ДНК-баркоды полной длины и, таким образом, устраняет проблему таксономического разрешения [Kerkhof и др., 2017; Portik, Brown, Pierce-Ward, 2022]. Экспериментальные и биоинформатическое моделирование показали, что длинные чтения ДНК-баркодов также способствуют выявлению большего разнообразия изучаемого сообщества, по сравнению с NGS [Jamu и др., 2020; Huggins и др., 2022; Lemoinne и др., 2023; Szoboszlay и др., 2023]. Это особенно актуально для природных АБС морских и пресноводных экосистем, которые обычно обладают высоким биоразнообразием [Wang и др., 2022]. Таксономического профилирование по длинным чтениям в АБС р. *Ulva* показало снижение биоразнообразия микробиома, но увеличение относительной численности MGPB pp. *Sulfitobacter* и *Roseobacter* при переходе от природных сообществ к лабораторным культурам [Loos van der и др., 2021]. Нанопоровое секвенирование кластеров рибосомных генов длиной более 3 тыс. п.о., содержащих гены *18S rRNA*, ITS и частично *28S rRNA*, позволило идентифицировать почти полный список видов, включая токсичные микроводоросли отдела Dinophyta из pp. *Alexandrium*, *Gonyaulax*, *Prorocentrum* и *Lingulodinium* [Hatfield и др., 2020]. А анализ прокариотического состава природных АБС динофлагеллят методом нанопорового секвенирования выявил ассоциации между определенными видами микроводорослей и бактериями вида *Alexandrium tamarense* *Roseobacter* sp. [Shin и др., 2018].

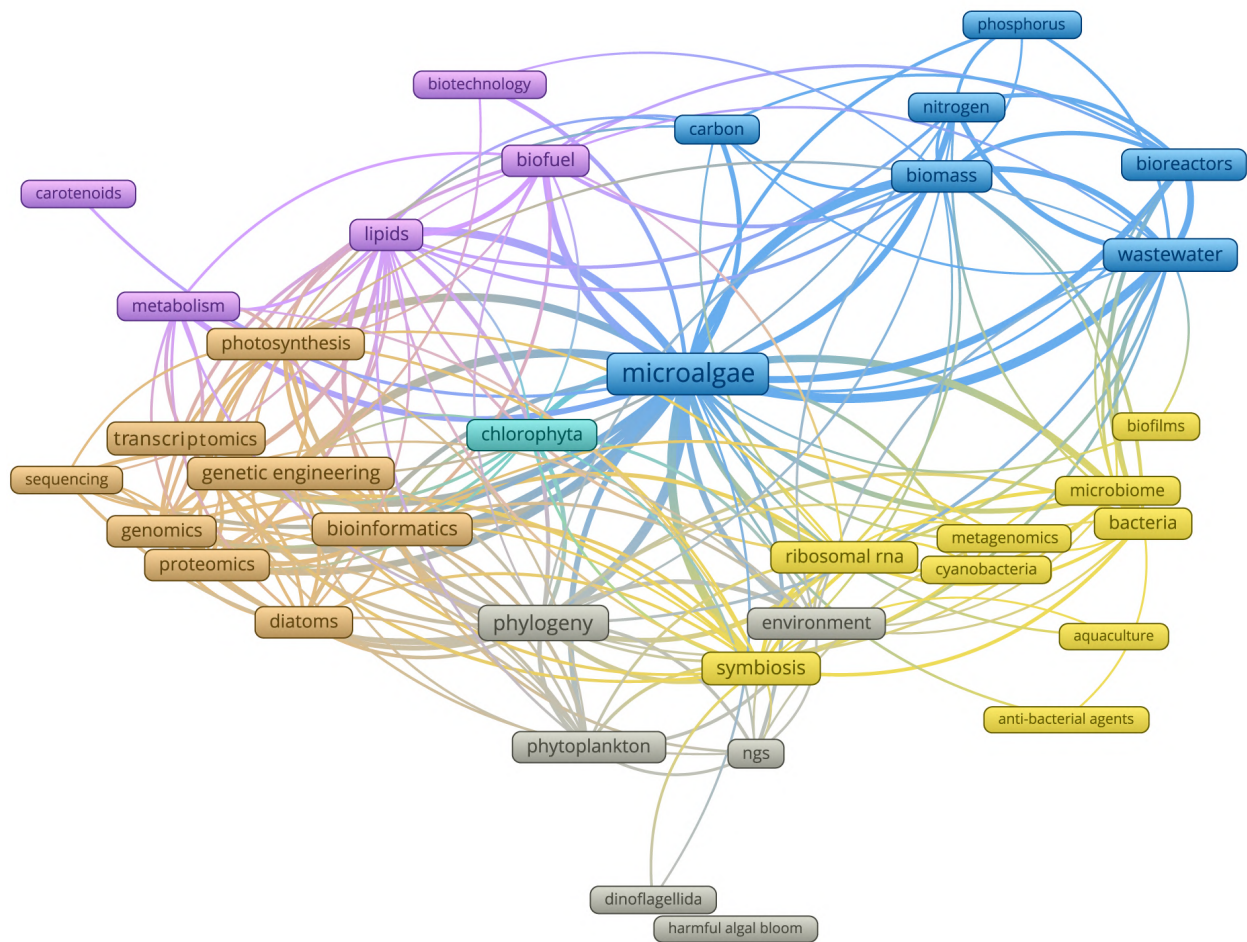


Рис. 4. Карта совместного появления ключевых слов в англоязычных публикациях, связанных с геномикой ОФМ. Наибольшее количество связей (ребер) находится в кластере методов молекулярной биологии (коричневый) и идет к узлу «symbiosis» кластера темы метагеномики (желтый), что свидетельствует о растущем внимании к альго-бактериальным взаимодействиям. В то же время узлы «metagenomics» и «microbiome» имеют немногочисленные и тонкие ребра с кластерами фотобиотехнологии (фиолетовый и синий соответственно), что подчеркивает будущий потенциал метагеномных исследований для практического применения водорослей.

1.2.2. Функционально-метагеномный анализ микробных сообществ

Подход функционально-метагеномного анализа микробных сообществ ставит своей целью выявление потенциала микроорганизмов к осуществлению той или иной экологической функции в экосистеме, на основании которой можно осуществлять целевой поиск биотехнологически значимых штаммов микроорганизмов или экологического мониторинга. Под экологической функцией подразумевается процесс, или набор процессов, влияющий на отношения между биотическими и абиотическими компонентами

экосистемы. Так, экологическая функция фосфат-сольбилизирующих микроорганизмов состоит в высвобождении нерастворенного неорганического фосфора, необходимого продуцентам экосистемы [Duhamel, 2024]. Тогда как ПАО, имеющие выраженное преимущество в борьбе за ценный и потенциально лимитированный ресурс [Solovchenko и др., 2016; Solovchenko и др., 2019], обеспечивают его возвращение в биогеохимический цикл экосистемы, чем с одной стороны предотвращают эвтрофикацию водоемов и нарушение экологического баланса, а с другой могут снижать стрессовое воздействие от избыточных концентраций экзогенного фосфата на другие организмы [Duhamel, 2024]. В контексте (мета-)геномного анализа основной функции принято считать набор генов или семейства генов, кодирующих в (мета-)геноме искомым метаболический путь. На сегодняшний день существует ряд баз данных, интегрирующих информацию о метаболических путях и клеточных процессах: последовательности биохимических реакций в них, названиях белков-ферментов или регуляторов, названиях и последовательностях соответствующих генов. Примерами таких баз являются онлайн-сервисы MetaCyc (рис. 5), KEGG, UniProt [Caspi и др., 2020; Kanehisa и др., 2025].

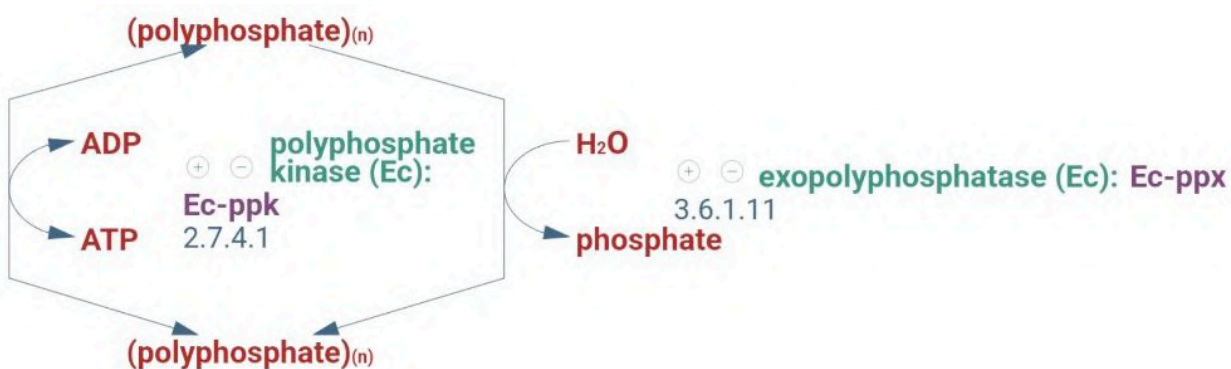


Рис. 5. Схема метаболического пути полифосфатов в микроорганизмах из базы данных MetaCyc («polyphosphate metabolism», MetaCyc ID — PWY-8138), с указанием: направления биохимических реакций, участников реакций (красные), названия ферментов (зеленый), названия гена (фиолетовый), а также 4-значного шифра классификации ферментов.

Функционально-метагеномный анализ опирается на существующие методы и подходы метагеномики: секвенировании полного метагенома и ДНК-метабаркодинге. Функционально-метагеномный анализ микробных сообществ по данным ДНК-метабаркодинга основан на алгоритмах прогнозирования и оценки представленности метаболических путей по таксономическому составу. Это направление представлено алгоритмами PICRUSt2 и Tax4Fun2, основным принципом которых является сравнение

полученных при метагеномном анализе наборов ASV или OTU с референсными базами данных, состоящими из MAG с готовой функциональной аннотацией. При нахождении соответствия таксонов формируется список из всех релевантных метаболических процессов, с указанием относительной представленности этого метаболического процесса исходя из содержания соответствующих таксонов [Liu и др., 2020]. Несмотря на очевидную простоту выполнения и низкие требования по ресурсам, данные алгоритмы напрямую зависят от полноты и качества референсных баз данных. В настоящее время базы данных метаболических путей (например, MetaCyc и KEGG) по-прежнему в меньшей степени ориентированы на исследования природных сообществ микроорганизмов, особенно АБС. Помимо этого, для данного метода необходимы подробные базы данных с функционально-аннотированными MAG микроорганизмов, выделенных из АБС, что также пока мало представлено. Основным недостатком данного подхода является то, что он не учитывает вклад эукариотических ОФМ — эдификаторов — в оценку функционального потенциала АБС. Тем не менее, данный подход продемонстрировал возможности для изучения метаболического потенциала в АБС, например: поиск бактерий с потенциалом для реминерализации азота и фосфора для биоремедиации почвы [Zarezadeh и др., 2019], выявление наличия межвидовых взаимодействий у альгицидных бактерий и ОФМ [Van Le и др., 2022], и анализ динамики функционального потенциала АБС при биоизъятии азота из сточных вод [Auge и др., 2021].

Второе направление функционально-метагеномного анализа микробных сообществ строится на секвенировании полного метагенома сообщества (WMS) с помощью технологий 2-го и 3-го поколений секвенирования. Также как и при таксономическом анализе, здесь существуют два подхода: основанный на сборке метагеномно-собранных геномов (MAG) и прямом анализе метагеномных чтений («assembly-free approach») [Pinto, Bhatt, 2024]. Хотя сборка MAG для эукариотических микроорганизмов из сложных природных сообществ само по себе является нетривиальной задачей, для небольшого набора модельных ОФМ (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Coelastrella*) существуют успешные примеры применения данных пайплайнов, конечными этапами которых являются получение функциональной аннотации MAG с помощью таких алгоритмов, как InterProScan [Saini и др., 2023; Shetty и др., 2019]. Данный подход позволяет получить качественную информацию о функциональных возможностях сообщества как суммы всех проанализированных MAG, а также дополнить ее количественной информацией при

картировании сырых метагеномных чтений на гены искомой функции. Данный подход пока не получил широкого распространения ввиду высоких требований по количеству и качеству полученных метагеномных чтений, потребности в больших вычислительных мощностях для работы алгоритмов сборки, а также курируемых и пополняемых баз геномных данных эукариотических ОФМ. Несмотря на это, подход функционального анализа MAG продемонстрировал себя при анализе сравнительно небогатых по биоразнообразию сообществ фикосферы лабораторных культур ОФМ, применяемых для очистки сточных вод от избытка азота и в системах для деградации кукурузного силоса. В обоих системах функционально-метагеномный анализ позволил сделать выводы о вкладе альго-бактериальных взаимодействий в продуктивность и стабильность культур [Wirth и др., 2019; Wirth и др., 2020]. В настоящее время актуальным и популярным становится еще один алгоритм функциональной аннотации antiSMASH (англ. the antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell), осуществляющий поиск метаболических путей, в первую очередь ассоциированных с биосинтезом антибиотиков, в метагеномных образцах. В литературе известны примеры его успешного применения для анализа микробиома фикосферы ОФМ из отдела *Dynophyta*, а именно функциональной роли представителей *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* и *Planctomyces* в альго-бактериальных взаимодействиях [Rambo и др., 2020].

Однако более многообещающим подходом для функциональной аннотации метагеномных образцов АБС является т.н. «assembly-free approach» [Pinto, Bhatt, 2024]. Он использует алгоритмы и программы HUMAnN, eggNOG-mapper, BLAST, DIAMOND и MMseqs2 для прямого поиска в метагеномных чтениях наборы генов всех представленных функций микроорганизмов сообщества сразу или из определенного функционального профиля – набора генов определенного семейства и/или искомого метаболического пути [Franzosa и др., 2018]. Данный подход показал себя анализе АБС как в природных водоемах, например при поиске метаболических путей связанных с биосинтезом пигментов [Sierra и др., 2022], так и при анализе водоочистных сооружений и мониторинге развития патогенных представителей Protozoa [Mthethwa-Hlongwa и др., 2024].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и объекты исследования

2.1.1. Сбор природных образцов АБС

Сбор проб, содержащих альго-бактериальные сообщества (АБС) активного ила, проводился на водоочистных сооружениях города Звенигород ООО «Звенигородский городской водоканал» в июне-августе 2020–2021 гг. Пробы отбирались из заполненных сточными водами трёх вторичных отстойников в общую чистую нестерильную ёмкость (рис. 6а). Пробы АБС представляли собой биомассу с нитчатymi элементами, коричневого цвета с зелёными прожилками (рис. 6б). Сбор биомассы активного ила и постановка эксперимента с ней проводили в один и тот же день.

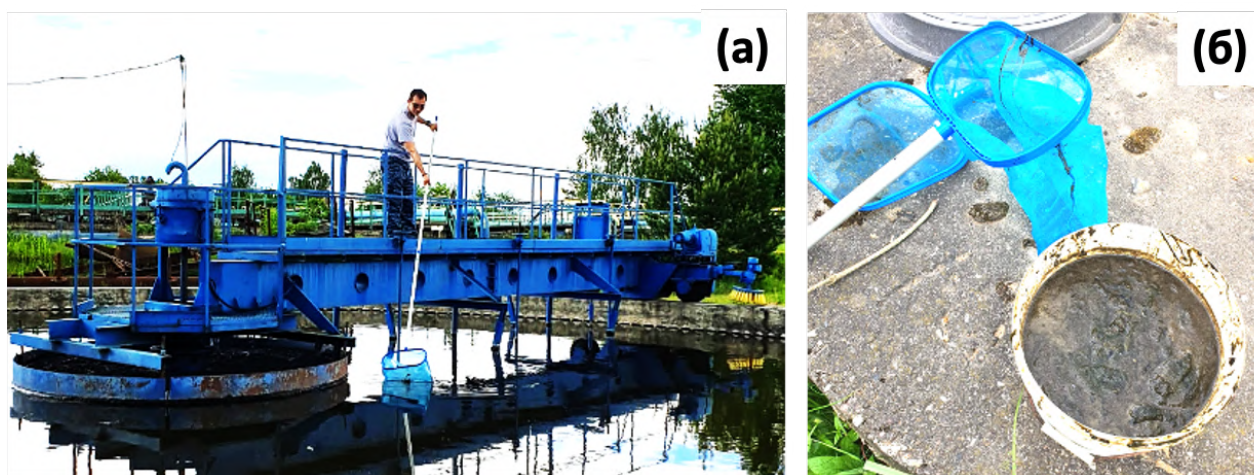


Рис. 6. Сбор АБС активного ила на водоочистных сооружениях Звенигородского водоканала. процесс сбора АБС активного ила из вторичных отстойников (а), внешний вид АБС активного ила водоочистных сооружений (б).

Сточные воды для работы с АБС собирали на водоочистных сооружениях в июне-августе 2020–2021 гг. после ступени третичной очистки: после блока доочистки, но до блока обеззараживания. Сточные воды собирались в чистые нестерильные ёмкости и хранились в тёмном месте при комнатной температуре до использования. Состав биогенных элементов в сточных водах указан в Таблице 2.

Таблица 2. Состав сточных вод после ступени третичной очистки ВОС г. Звенигород.

Показатель	Ед. измерения	Значение	ПДК
Водородный показатель	ед. рН	7,54 ± 0.20	6,5–8,5
Аммонийный азот	мг N/л	0,29 ± 0.07	0,40
Нитрит-ион	мг N/л	< 0,06	0,08
Нитрат-ион	мг NO ₃ ⁻ /л	30,02	40,0
Фосфат-ион	мг PO ₄ ³⁻ /л	15,25 — 1,53	0,05–0,15
Анионные ПАВ	мг/л	0,404 ± 0,129	0,5
Хлорид-ион	мг Cl ⁻ /л	114,60 — 11,46	300,0
Сульфат-ион	мг SO ₄ ²⁻ /л	55,21 — 5,52	100
Нефтепродукты	мг/л	0,005 ± 0,03	0,05
Железо общее	мг/л	0,136 ± 0,049	0,10
Взвешенные вещества	мг/л	144,2 ± 17,3	+ 0,75 к фону
Бихроматная окисляемость (ХПК)	мг O ₂ /л	17,6–5,3	5,0

*По данным аккредитованной аналитической лаборатории «Центр сертификации и экологического мониторинга агрохимической службы комбината “Московский”»

Сбор АБС апатитовых разработок проводился в окрестностях апатит-нефелиновой обогатительной фабрики АНОФ-2 АО «Апатит» в 2018 году. Сбор проводился в прибрежной зоне озера Большая Имандра (67°40'23.2"N, 33°12'26.4"E), а также в двух постоянных и одном временном водоеме рядом с хвостохранилищем АНОФ-2 (67°38'1"N, 33°16'44"E) (рис. 7). Были отобраны жидкие пробы, содержащие флоккулы и биопленки АБС в стерильную ёмкость, в которой хранились при освещении 40 мкмоль квантов ФАР (фотосинтетически активной радиации)/м²/с и при температуре 4°С.



Рис. 7. АБС апатитовых разработок: карта расположения водоёмов и точек пробоотбора АБС (а), общий вид апатит-нефелинового карьера и хвостохранилища АНОФ-2 с водоёмами вокруг него (б), вид берега озера Б. Имандра с флоккулами и обрастаниями АБС (в), вид берега прудов с флоккулами АБС (г).

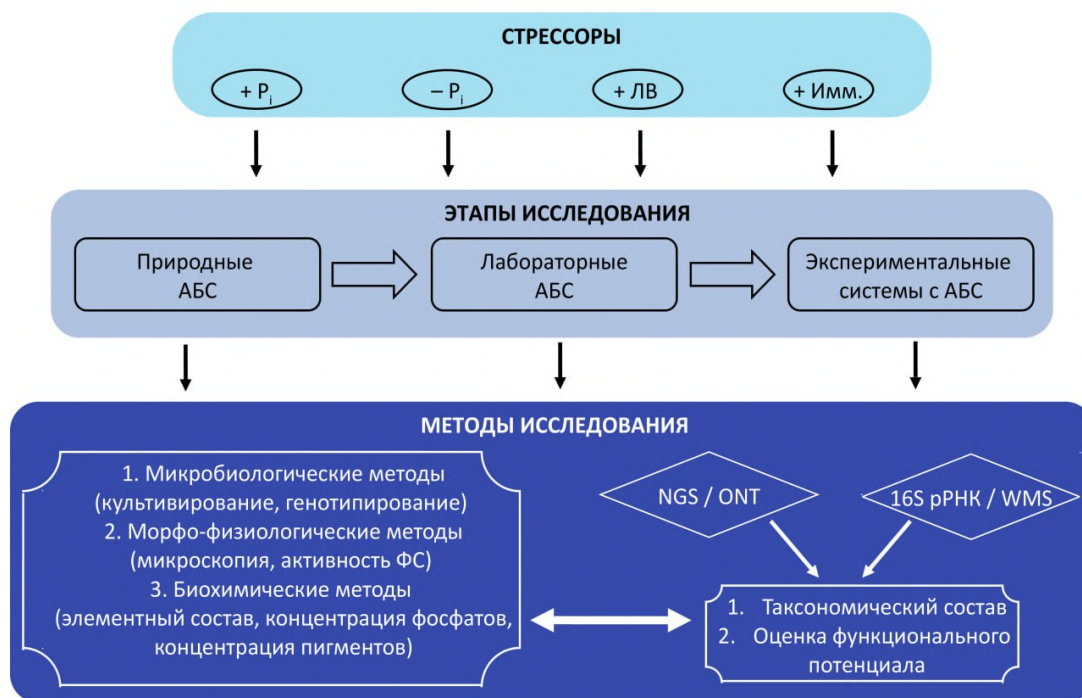


Рис. 8. Стратегия исследования. ЛВ — лекарственные вещества, Имм. — иммобилизация, ФС — фотосинтез, 16S рРНК –ДНК-метабаркодинг по локусу *16S рРНК*.

2.1.2. Выделение и идентификация альгологически чистых культур ОФМ и бактерий фикосферы из АБС

Образцы сообществ из природных АБС помещались в вентилируемые культивационные матрасы емкостью 100 мл (ТРР, Швейцария) с селективной питательной средой для фототрофных микроорганизмов BG-11 (г/л: $\text{NaNO}_3 = 1,50$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,04$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,075$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,05$, лимонная кислота = 0,006, цитрат железа-аммония = 0,006, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,001$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 0,02$, раствор микроэлементов BG-11) [Stanier и др., 1971] с целью получения накопительных культур, для дальнейшего выделения альгологически чистых культур ОФМ.

Фрагменты флоккул и биопленок проб помещали на чашки Петри с твердой средой BG-11, содержащей 2% агара. Для более равномерного распределения материала по поверхности чашек Петри материал растирали с помощью стерильного стеклянного шпателя. Инкубацию проводили в течение месяца в люминостате, при постоянном освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с и температуре 22–24°C до появления отдельных окрашенных в зеленый цвет микроколоний. После этого из единичных колоний материал отбирали при помощи микроманипулятора и переносили на чашки Петри с той же средой, посев производили методом штриха. Для получения альгологически чистых культур микроводорослей проводили 3 пассажа. Полученные культуры помещали в жидкую среду BG-11 в стеклянные конические колбы с рабочим объемом 150 мл и поддерживали в коллекции кафедры в периодической стационарной культуре при дневном освещении (примерно 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с) и при температуре 22–24°C.

Для выделения бактерий из АБС культур ОФМ готовили разведения культуры 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и для каждого разведения наносили по 0,025 мкл суспензии на чашки Петри с твердой средой Эванса (2,15 г/л KH_2PO_4 , 3,4 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ г/л, 40 мг/л MgSO_4 , 30 мг/л FeSO_4 , 40 мг/л CaCl_2 , 2 г/л дрожжевого экстракта). Для более равномерного распределения материала по поверхности чашек Петри материал растирали с помощью стерильного стеклянного шпателя. Инкубацию проводили при температуре 22–24°C до появления отдельных микроколоний. После этого из единичных колоний материал

отбирали при помощи микроманипулятора и переносили на чашки Петри с той же средой, посев производили методом штриха.

Выделение и очистка ДНК из биомассы культур изолятов ОФМ и бактерий фикосферы проводили с использованием готового коммерческого набора Diatom DNA Prep 200 (Галарт Диагностикум, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для выделения геномной ДНК из ОФМ осадок биомассы дополнительно помещали в пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия), замораживали в жидком азоте с последующей гомогенизацией с помощью пестика для данных пробирок (SSIBio Corp., США), операцию повторяли трижды. Для молекулярно-филогенетической идентификации эукариотических ОФМ получали фрагменты геномной ДНК, содержащие последовательности внутренних транскрибируемых спейсерных участков 1 и 2 (ITS1, ITS2) ядерного рибосомального кластера генов, а также ген 5,8S рРНК (ITS1-5,8S *pPHK*-ITS2 фрагмент) при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием пары праймеров 5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAA-3' и 5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' [Ismagulova и др., 2018]. Для молекулярно-филогенетической идентификации прокариотических ОФМ и изолятов бактерий фикосферы получали фрагменты геномной ДНК, содержащие последовательности гена *16S pPHK* с помощью пары праймеров 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' [Wilson, Blitchington, Greene, 1990]. Контроль качества и разделение амплифицированных фрагментов ДНК осуществляли электрофоретически в 1% (по массе) агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,2 нг/мл) в 0,5×ТАЕ-буфере (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ ЭДТА, рН 7,4). Продукты ЦПР выделяли из агарозного геля с использованием коммерческого набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя и секвенировали на автоматическом секвенаторе Abi Prism 310 (PerkinElmer Inc., США) в обоих направлениях.

Для молекулярно-филогенетического анализа ОФМ поиск гомологичных последовательностей вели с помощью алгоритма BLAST онлайн сервиса GenBank NCBI [Altschul и др., 1997]. Анализ выполняли в программе MEGA 7.0. Множественное выравнивание проводили по алгоритму MUSCLE (параметры выравнивания устанавливали по умолчанию) [Edgar, 2004]. Филогенетическое дерево строили с помощью алгоритма

ближайших соседей (NJ) [Saitou, Nei, 1987]. Воспроизводимость структуры дерева проверяли методом bootstrap-анализа (1000 повторностей) [Felsenstein, 1985].

Для молекулярно-филогенетического анализа бактерий фикосферы поиск гомологичных последовательностей вели с помощью алгоритма BLAST онлайн сервиса GenBank NCBI, для корректной идентификации использовали последовательности типовых штаммов [Altschul и др., 1997]. Выравнивания полученных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 с использованием алгоритма MUSCLE и параметрами, выставленными по умолчанию. Филогенетические деревья строили в той же программе на основе методов «присоединения ближайших соседей» (Neighbor-Joining, NJ) [Saitou, Nei, 1987] и «максимального правдоподобия» (Maximum likelihood, ML) [Aldrich, 1997]. Для второго метода проводился поиск модели с наименьшим значением информационного критерия Акаике (AIC) на основе дерева, построенного с помощью NJ алгоритма. В качестве внешних групп для построения деревьев использовали последовательности типовых штаммов *Cellvibrio japonicus* и *Escherichia coli*. Точность топологии построенных деревьев оценивали при помощи bootstrap-теста (1000 повторностей) [Felsenstein, 1985].

2.1.3. Условия для культивирования АБС

Моделирование стресса, связанного с переходом от инкубации АБС в олиготрофных условиях на условия минимальной среды с увеличением биодоступности фосфата. Проводили культивирование в нестерильной проточной системе, установленной после блока доочистки, но до блока обеззараживания. Для данного эксперимента сконструировали установку, являющуюся проточным жёлобом длиной 13 метров и шириной 1 метр (рис. 9). В данный жёлоб поместили полипропиленовую сетку с ячейками площадью 4 мм². Сетка уложили таким образом, что она образовывала вертикальные складки через каждые 25 см, благодаря которым происходит задержка крупных частиц биомассы и продолжается свободный ток воды. В данный жёлоб подавали вода после ступени доочистки со скоростью 10 л/мин, содержащая 9,29±0,93 мг/л ортофосфата (данные предоставлены администрацией ООО «Звенигородский городской водоканал»). В каждую складку сетки в проточной системе помещали 300 мл сырой биомассы АБС активного ила и распределяли по всей ширине складки. Проточную систему запускали в июне 2020 г. и в августе 2021 г. продолжительностью 14 суток. В начале и в конце эксперимента проводился

морфологический анализ образца методами оптической светлоразносной и флуоресцентной микроскопии, а также сканирующей электронной микроскопии. Также на 0, 3, 7 и 14 суток эксперимента проводили отбор проб биомассы для выделения метагеномной ДНК для последующего метагеномного анализа.



Рис. 9. Внешний вид установки проточного жёлоба, в которую подаётся сточная вода после ступени доочистки.

Моделирования стресса, связанного с воздействием лекарственных веществ на АБС активного ила в условиях стандартной и повышенной для сточных вод концентрации фосфата. Инкубацию проводили в стационарных условиях, аналогичных условиям во вторичных отстойниках, в стерильных пластиковых культуральных матрасах с фильтром (ТРР, Швейцария), при освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с и при комнатной температуре в течение 31 суток. В каждый матрас добавляли по 5 мл сырой биомассы АБС активного ила и доводили до 40 мл сточными водами, отобранными после третичной ступени очистки (табл. 2). В часть матрасов добавляли антибиотик цефтриаксон (ЦТА) (Биосинтез, Россия) в конечной концентрации 5 мкг/л, или препарат диклофенак (ДФ) (Немофарм а.д., Сербия) в конечной концентрации 5 мкг/л. Для каждого из вариантов антибиотиков также проводили культивирование с и без добавления дополнительных источников неорганического фосфора (P_i , англ. inorganic phosphorus) в форме K_2HPO_4 и нитрата в форме KNO_3 в конечной концентрации 50 и 100 мг/л, соответственно (табл. 3).

В ходе эксперимента проводили мониторинг состояния фотосинтетического аппарата ОФМ АБС путем регистрации быстрых и стационарных индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* на 0, 1, 3, 7, 11, 14, 17, 23, 31 сутки [Solovchenko и др., 2022]. На 31 сутки проводили отбор проб биомассы для выделения метагеномной ДНК для

последующего метагеномного анализа и для морфологического анализа методом оптической светлорольной микроскопии, а также проводили отбор проб культуральной жидкости для определения остаточного содержания фосфата спектрофотометрическим методом на основе хромогенной экспресс-реакции с молибденовым синим [Ota, Kawano, 2017].

Таблица 3. Дизайн эксперимента по моделированию стресса, связанного с воздействием лекарственных веществ на АБС активного ила

Экспериментальный вариант	Добавки (конечная концентрация, мг/л)
Контроль	—
+P+N	K ₂ HPO ₄ (50), KNO ₃ (100)
+ЦТА	ЦТА (5)
+ДФ	ДФ (5)
+P+N+ЦТА	K ₂ HPO ₄ (50), KNO ₃ (100), ЦТА (5)
+P+N+ДФ	K ₂ HPO ₄ (50), KNO ₃ (100), ДФ (5)

Анализ таксономического состава и биоразнообразия лабораторных АБС под действием модельных стрессоров — антибиотика ЦТА и иммобилизации на синтетическом носителе. АБС на основе штамма микроводоросли *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047, использованный в качестве модельной микроводоросли, был получен из Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН (УНУ КМЦ IPPAS ИФР РАН). Синтетический полимерный носитель хитозан С600 (синтезирован и получен от НИЦ «Курчатовский институт»). Предкультура *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 выращивали при 20–23 °С в шейкере-инкубаторе Innova-44R (New Brunswick, США) при 120 об/мин в колбах емкостью 0,75 л с 0,3 л модифицированной Р-обогащенной среды BG-11 — BG-11_М (г/л: NaNO₃ = 0,74, KNO₃ = 0,9, K₂HPO₄ = 0,181, KH₂PO₄ = 0,089, MgSO₄·7H₂O = 0,075, CaCl₂·2H₂O = 0,036, лимонная кислота = 0,006, цитрат железа-аммония = 0,006, Na₂EDTA·2H₂O = 0,001, Na₂CO₃ = 0,02, раствор микроэлементов BG-11) при 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с.

Для получения суспендированных культур использовали равные аликвоты *Lobosphaera* sp. предкультуру осаждали центрифугированием (5 мин, 1000×g) и ресуспендировали до концентрации хлорофилла 1,5 мг/л в среде BG-11_M или в той же среде с добавлением ЦТА до конечной концентрации 20 мг/л и помещали в вентилируемые культивационные матрасы емкостью 100 мл (TRP, Швейцария). Имобилизацию клеток проводили следующим образом. Группу аликвот предварительной культуры осторожно ресуспендировали в BG-11_M и равномерно наносили пипеткой на поверхность хитозановых дисков для имобилизации клеток (конечная концентрация хлорофилла составляла около 24 мкг/диск), хитозановые диски с прочно прикрепленными клетками *Lobosphaera* sp. помещали в колбы для культивирования с вентилируемой крышкой объемом 100 мл (TRP, Швейцария), содержащие среду BG-11_M с добавлением 20 мг/л ЦТА (Биосинтез, Россия) или BG-11_M без антибиотика.

Матрасы с суспендированными или имобилизованными клетками *Lobosphaera* sp. культивировали в течение 14 дней на шейкере-инкубаторе Innova-44R при 120 об/мин при 20–23 °C и 40 мкмоль ФАР/м²/с. На 7 и 14 сутки эксперимента проводили отбор проб биомассы для выделения метагеномной ДНК для последующего метагеномного анализа.

Моделирование влияния фосфорной эвтрофикации на АБС активного ила проводили в сравнении с сообществами апатитовых разработок. Культивирование проводили в стерильных стеклянных конических колбах Эрленмейера объемом 250 мл, в стационарных условиях, при освещении примерно 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с и при 20–23°C в течение 28 суток. В каждую колбу добавляли 10 мл сырой биомассы соответствующего альго-бактериального сообщества и доводили до 100 мл средой BG-11. Культивирование каждого из типов сообществ проводили в среде со стандартным и повышенным содержанием неорганического фосфата P_i: 40 мг/л и 200 мг/л, соответственно. Во втором случае к среде добавляли P_i в форме смеси K₂HPO₄ и KH₂PO₄ до конечной концентрации и 200 мг/л. На 28 сутки эксперимента проводили отбор проб биомассы для выделения метагеномной ДНК для последующего метагеномного анализа, а также для морфологического анализа методом оптической светлопольной микроскопии. Качественную оценку накопления полифосфатов в клетках микроорганизмов АБС проводили цитохимическим методом с помощью оптической флуоресцентной микроскопии на препарате, окрашенном красителем ДАФИ.

Моделирование стресса при резком повышении концентрации P_i в среде после длительного фосфорного голодания. АБС на основе штамма микроводоросли *Micractinium simplicissimum* IPPAS С-2056. Предкультура выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 300 мл модифицированной среды BG-11к (г/л: $KNO_3 = 1,50$, $K_2HPO_4 = 0,04$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O = 0,075$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O = 0,05$, лимонная кислота = 0,006, цитрат железа-аммония = 0,006, $Na_2EDTA \cdot 2H_2O = 0,001$, $Na_2CO_3 = 0,02$, раствор микроэлементов BG-11) [Lobakova и др., 2022], в стационарных условиях, при освещении примерно 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с и при 20–23°C Для получения культур *M. simplicissimum*, обедненных фосфором, клетки предкультуры собирали центрифугированием (1000 g, 5 мин), дважды промывали средой BG-11к, не содержащей фосфора, и ресуспендировали в той же среде до концентрации хлорофилла и содержания биомассы 25 мг/л и 0,4 г/л, соответственно. 400 мл клеточной суспензии заливали в стеклянные колонки для фотобиореактора (ФБР) объемом 0,6 л (внутренний диаметр 4 см). Колонки инкубировали в ФБР — водяной бане с контролируемой температурой при 27°C с постоянным барботированием смесью 5% CO₂: 95% воздуха, приготовленной и подаваемой со скоростью 300 мл/мин. Воздух, пропущенный через бактериальный фильтр 0,22 мкм (Merck-Millipore, США) и чистый (99,999%) CO₂ из баллонов. Использовалось непрерывное освещение 40 мкмоль квантов ФАР/м²/с.

Культуры считались голодными по фосфору (имеющими минимальную квоту клеток по фосфору), когда биомасса культуры не увеличивали последовательно в течение трех дней и демонстрировала снижение содержания хлорофилла. Чтобы убедиться, что недостаток фосфора был единственным ограничивающим фактором, культуру с недостатком фосфора разбавляли средой BG-11к, чтобы поддерживать их оптическую плотность при 678 нм (пик поглощения хлорофилла *a*) ниже 1,5 единиц, контролируя периодически остаточное содержание нитрата. Для восстановления фосфорного питания к суспензии голодной по фосфору культуры добавляли P_i в форме смеси K_2HPO_4 и KH_2PO_4 до конечной концентрации P_i 1,5 г/л, после чего проводили инкубация при тех же условиях в течение еще 14 дней. На 0, 1, 3, 10 и 14 сутки эксперимента проводили отбор проб биомассы для выделения метагеномной ДНК для последующего метагеномного анализа.

Анализа влияния иммобилизации на способность АБС к поглощению фосфатов из сточных вод. АБС на основе штамма микроводоросли *Micractinium simplicissimum* IPPAS С-2056 иммобилизовали на синтетическом полимерном носителе хитозан С600

(синтезирован в НИЦ «Курчатовский институт»). Для иммобилизации использовали десять пластин хитозана С600 размером 7 см на 10 см, предварительно отмытых в водопроводной воде три раза для удаления остатков едких химических веществ, используемых при синтезе. Иммобилизацию проводили путём нанесения на каждую сторону пластины 25 мл суспензии микроводорослей с плотностью, соответствующей содержанию общего хлорофилла 25 мг/л, после чего оставляли изделия пропитаться суспензией в течение 1 часа. Культивирование проводили в нестерильной открытой системе, являющейся тонкослойным каскадом, перекачивающим воду по закрытому циклу и создающим освещение 120 мкмоль квантов ФАР/м²/с (Рис. 10). Глубина потока составляла примерно 1–2 см, скорость потока составляла примерно 30–40 л/мин.

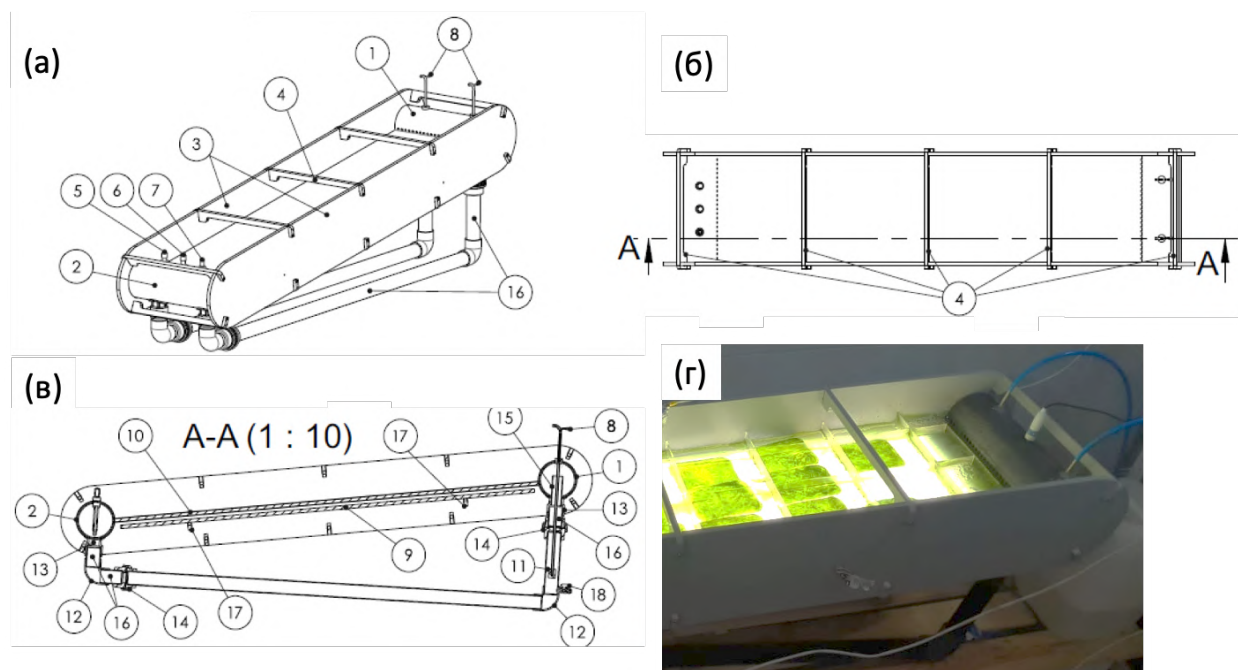


Рис. 10. Тонкослойный каскад: сборочный чертёж — общий вид (а), вид сверху (б), вид сбоку (в), а также изображение работающей установки с АБС (г). Обозначения: 1 — резервуар верхний, 2 — резервуар нижний, 3 — боковая пластина, 4 — ребро жёсткости, 5 — датчик температуры, 6 — датчик рН, 7 — датчик O₂, 8 — инжектор, 9 — световая панель, 10 — панель светопрозрачная, 11 — распылитель, 12 — уголок, 13 — седёлка, 14 — муфта, 15 — горловина эрлифта, 16 — сегмент обводной трубы, 17 — упор световой панели, 18 — сливной кран.

Культивирование проводили с использованием воды с ВОС после третичной степени очистки (табл. 2). В проточную систему одновременно добавляли 5 литров сточных вод и инкубировали в присутствии иммобилизованной культуры в течение 1 недели. Были поставлены 4 последовательных цикла данной инкубации. На протяжении каждого цикла проводили отбор проб культуральной жидкости для определения

остаточного содержания фосфата спектрофотометрическим методом на основе хромогенной экспресс-реакции с молибденовым синим через 5 и 30 минут, далее через 1, 2 и 3 часа, далее через 1, 3 и 5 суток. В конце каждого цикла проводили мониторинг состояния фотосинтетического аппарата микроводоросли путем регистрации быстрых и стационарных индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a*, а также проводили отбор проб биомассы для метагеномного анализа и для количественного определения содержания хлорофиллов и каротиноидов.

2.2. Метагеномное секвенирование образцов АБС

2.2.1. Выделение нуклеиновых кислот для метагеномного секвенирования

Для выделения геномной ДНК из эксперимента отбирали 100-200 мг осадка биомассы АБС в пробирки объёмом 1,5 мл (Eppendorf, Германия), замораживали при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранили в течение месяца. Для каждой из трёх биологических повторностей соответствующего экспериментального варианта были отобраны по одной повторности. Непосредственно перед выделением ДНК пробирки с биомассой замораживали в жидком азоте с последующей гомогенизацией с помощью пестика для данных пробирок (SSIBio Corp., США), операцию повторяли трижды. Выделение метагеномной ДНК из полученного гомогената проводили с помощью набора DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу производителя. Для тех аликвот образцов, которые предназначались для секвенирования полного метагенома на платформе Oxford Nanopore Technologies, этапы интенсивного перемешивания в протоколе заменялись на бережное перемешивание переворачиванием пробирки.

2.2.2. Секвенирование библиотек локусов гена *16S pPHK* на платформе NGS и первичная обработка данных

Аmplификацию фрагмента гена *16S pPHK* с гипервариабельным участком V4 и приготовление библиотек для секвенирования осуществляли, как описано ранее [Kublanovskaya и др., 2019] с использованием олигонуклеотидных праймеров F515 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') и R806 (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') [Bates и др., 2011]. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (part number MS-102-3003, Illumina, США) для парного-концевого чтения (2×300 п.н.). Для каждого образца получали суммарно

не менее 20 тыс. чтений. Первоначальную обработку полученных данных, а именно, демультимплексирование образцов и удаление адаптеров, проводили в ПО Illumina (Illumina, США). Исследования методом *16S рРНК* ДНК-метабаркодинга проведены с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

Дальнейшие 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 [Callahan и др., 2016], phyloseq [McMurdie, Holmes, 2013] и DECIPHER [Wright, 2016], а также базы данных SSU 16s rRNA SILVA (релиз 132) [Caronaso и др., 2010]. При анализе результатов ДНК-метабаркодинга из образцов удаляли неклассифицированные чтения, чтения пластидной и митохондриальной ДНК, а также те таксономические группы, которым соответствовало одно непарное чтение.

При анализе таксономического состава проводили объединение экспериментальных повторностей, с суммированием количества чтений для всех ASV. Расчет индексов α -разнообразия выполняли для каждой повторности отдельно, после чего находили среднее значение и дисперсия стандартной ошибки среднего.

2.2.3. Секвенирование полного метагенома на платформе NGS и первичная обработка данных

Для проведения секвенирования полного метегенома проводили объединение аликвот каждой экспериментальной повторности в один образец. Контроль качества препарата ДНК проводили спектрофотометрически с использованием прибора NanoDrop One/One^c (Thermo Fisher Scientific, США). Очистку ДНК проводили с использованием набора Smart beads (Raissol, Россия).

Приготовление библиотек ДНК для секвенирования проводили с использованием набора Universal Plus DNA library Prep Kit for Illumina (Vazyme, Китай). Качество приготовленных библиотек оценивали на приборе Qsep400 (BiOptic, Тайвань) с использованием картриджа High Sensitivity Cartridge Kit (BiOptic, Тайвань). Концентрацию готовых библиотек измеряли при помощи SpectraQ HS (Raissol, Россия). Секвенирование проводили на приборе SURFSeq 5000 (GeneMind, Китай) с использованием набора

SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300cycles (GeneMind, Китай). Для каждого образца получали суммарно не менее 100 млн. чтений.

Для таксономической классификации для каждого образца объединяли файлы прямых и обратных чтений формата FASTQ в командной строке ОС Linux с помощью команды *cat*. Для анализа полученного файла с объединенными чтениями использовали алгоритм таксономической классификации на базе k-мерного подхода MetaPhlAn 4 (Metagenomic Phylogenetic Analysis, версия 4.1.1) (рис. 11) [Blanco-Míguez и др., 2023]. Анализ проводили с использованием базы данных таксономических маркеров алгоритма MetaPhlAn — *mpa_vJun23_CHOCOPhlAnSGB_202403*, и базы данных метаболических путей MetaСус (версия 24) [Caspi и др., 2020].

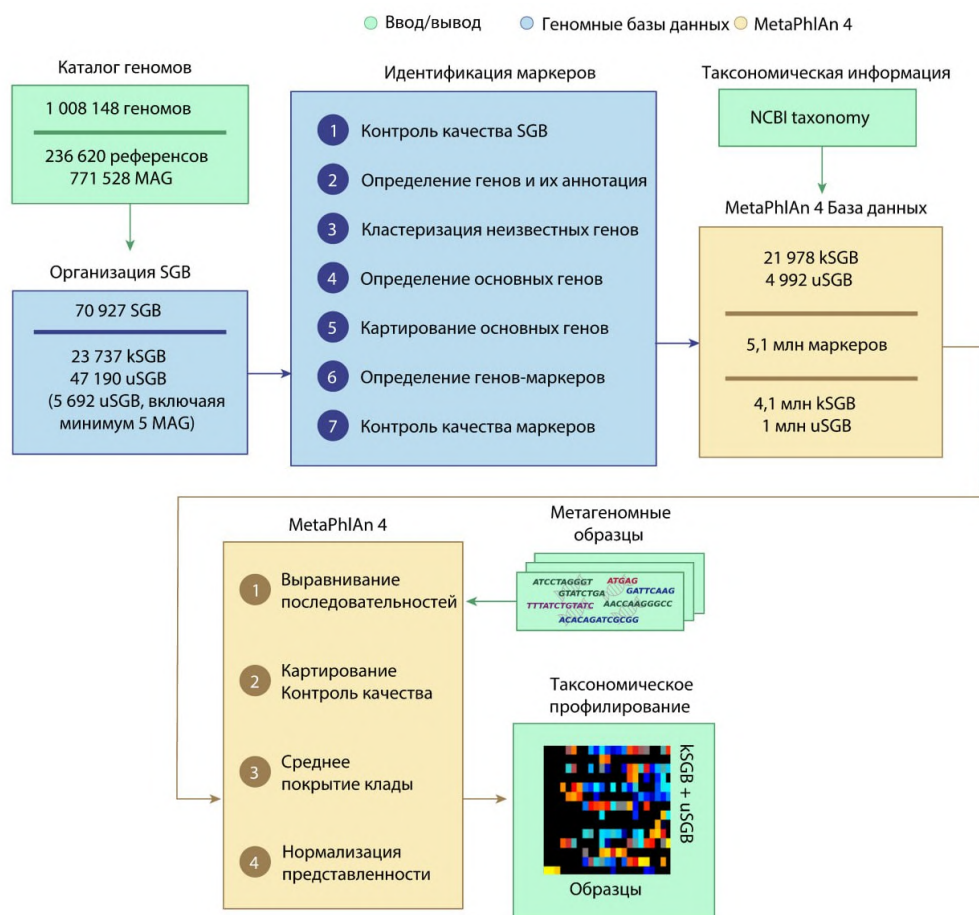


Рис. 11. Схема алгоритма MetaPhlAn 4 для таксономической классификации результатов секвенирования полного метагенома на платформе NGS. Обозначения: MAG — metagenome-assembled genome, SGB — species-level genome bins (геномные бины на уровне вида), kSGB — known SGB (классифицированные SGB), uSGB — unknown SGB (неклассифицированные SGB). Изображение адаптировано из Blanco-Míguez и др. 2023.

2.2.4. Секвенирование полного метагенома на платформе Oxford Nanopore Technologies и первичная обработка данных

Нанопоровое секвенирование образцов проводили на платформе секвенирования геномной ДНК 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). Первый этап включает в себя репарацию ДНК и подготовку концов к лигированию баркодов и адаптеров с помощью набора NEBNext Companion Module for Oxford Nanopore Technologies Ligation Sequencing E7180S (NEB, США). Очистка ДНК проводится на магнитных частицах Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, США). На втором этапе добавляли уникальные баркоды из набора Native barcoding Expansion 1–12 (EXP-NBD104) (ONT, Великобритания) и проводили реакцию лигирования с использованием лигазы Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB, США). Повторяли очистку ДНК на магнитных частицах Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, США). После очистки меченые баркодами образцы объединяли в эквимольных количествах. На третьем этапе с использованием лигазы Quick T4 DNA Ligase (NEB, США) проводили лигирование адаптеров из набора SQK-LSK 109 (ONT, Великобритания). По протоколу проводили очистку на магнитных частицах Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, США) с промывками буфером для удержания длинных фрагментов ДНК и этапами элюции с использованием буфера из набора SQK-LSK 109 (ONT, Великобритания), в итоге получая готовую библиотеку ДНК-образцов. На последнем этапе библиотеку подготавливали к запуску по протоколу с использованием набора SQK-LSK 109 (ONT, Великобритания) и загружали раствор библиотеки в ячейку R9.4.1 (ONT). Ячейку помещали в прибор и начинали процесс секвенирования. По набору данных запуск на секвенаторе останавливали. Ячейку промывали реагентами из набора Flow Cell Wash Kit (ONT, Великобритания). Первичные данные нанопорового секвенирования, записанные в формате FAST5 были переведены в формат FASTQ. Преобразование первичных данных и демультимплексирование проводили в ходе первичной обработки данных в программе Guppy basecaller (ONT, Великобритания). Все данные с качеством $Q < 8$, полученном из оценки программой Guppy basecaller, убрали из дальнейшего анализа.

Для таксономической классификации для каждого образца объединяли файлы чтений формата FASTQ в командной строке ОС Linux с помощью команды *cat*.

Объединенный файл с чтениями в формате FASTQ загружали в онлайн-сервис BugSeq, где выполняли таксономическую классификацию с использованием базы данных «NCBI nt» и указывая тип образца как «environmental» (рис. 12) [Fan, Huang, Chorlton, 2021].

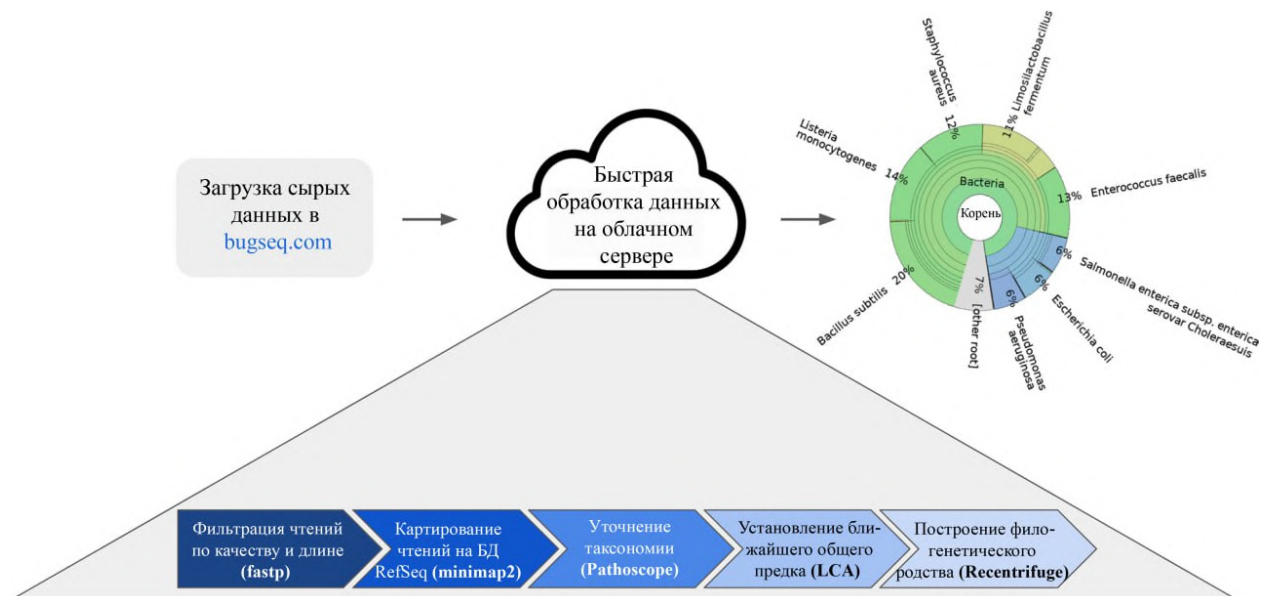


Рис. 12. Схема алгоритма таксономической классификации для таксономической классификации результатов секвенирования полного метагенома на платформе ONT, реализованного в онлайн-сервисе BugSeq. В скобках приводятся название алгоритмов, используемых BugSeq на отдельных шагах.

2.2.5. Расчёт индексов разнообразия

Расчёт индексов α -разнообразия Шеннона (1) и Симпсона (2), а также индекса β -разнообразия Мориситы (3) проводили по формулам, описанным в [Horn, 1966]:

$$H = \sum_{i=1}^N (-p_i \ln(p_i)), \quad (1)$$

$$D = \sum_{i=1}^N p_i^2, \quad (2)$$

Где где p_i — доля коротких чтений, соответствующих таксону i от общего количества коротких чтений образца, N — общее количество таксонов в образце.

$$\chi_{ij} = \frac{2 \sum_{k=1}^S (n_k^i n_k^j)}{\left(\frac{\sum_{k=1}^S (n_k^i)^2}{(N^i)^2} + \frac{\sum_{k=1}^S (n_k^j)^2}{(N^j)^2} \right) N^i N^j}, \quad (3)$$

Где N_i и N_j — общее количество таксонов в образцах i и j , соответственно; S — количество таксонов, общих для образцов i и j , n_{ki} и n_{kj} — количество коротких чтений, соответствующее одинаковым таксонам k в образцах i и j , соответственно.

Визуализацию значений индексов разнообразия проводили с помощью алгоритма на языке программирования Python (версия 3.7.1) с использованием библиотеки Matplotlib.

2.3. Функциональный анализ образцов на основе данных метагеномного секвенирования

2.3.1. Функциональный анализ результатов *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS

Функциональную аннотацию результатов *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга проводили с помощью алгоритма PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States, версия 2.0) [Douglas и др., 2020]. Для анализа использовали файлы, полученные в результате таксономического анализа, описанного в п. 2.2.2.: файл формата BIOM с количеством чтений для каждого ASV и файл формата FASTA с нуклеотидными последовательностями каждого ASV (рис. 13).

Для оценки потенциала толерантности сообществ в исследуемых образцах к избытку биогенных элементов проводили подсчет представленности путей метаболизма азота и фосфора среди всех метаболических путей, найденных алгоритмом PICRUSt2. Для этого составили функциональный профиль из путей метаболизма азота и фосфора (табл. 4), в котором выписали их кодификаторы на уровне суперклассов из базы данных MetaCyc. Проводили поиск данных путей в анализируемых образцах и рассчитывали суммарную долю их значений представленности в процентном отношении от представленности всех метаболических путей, найденных с помощью алгоритма PICRUSt.

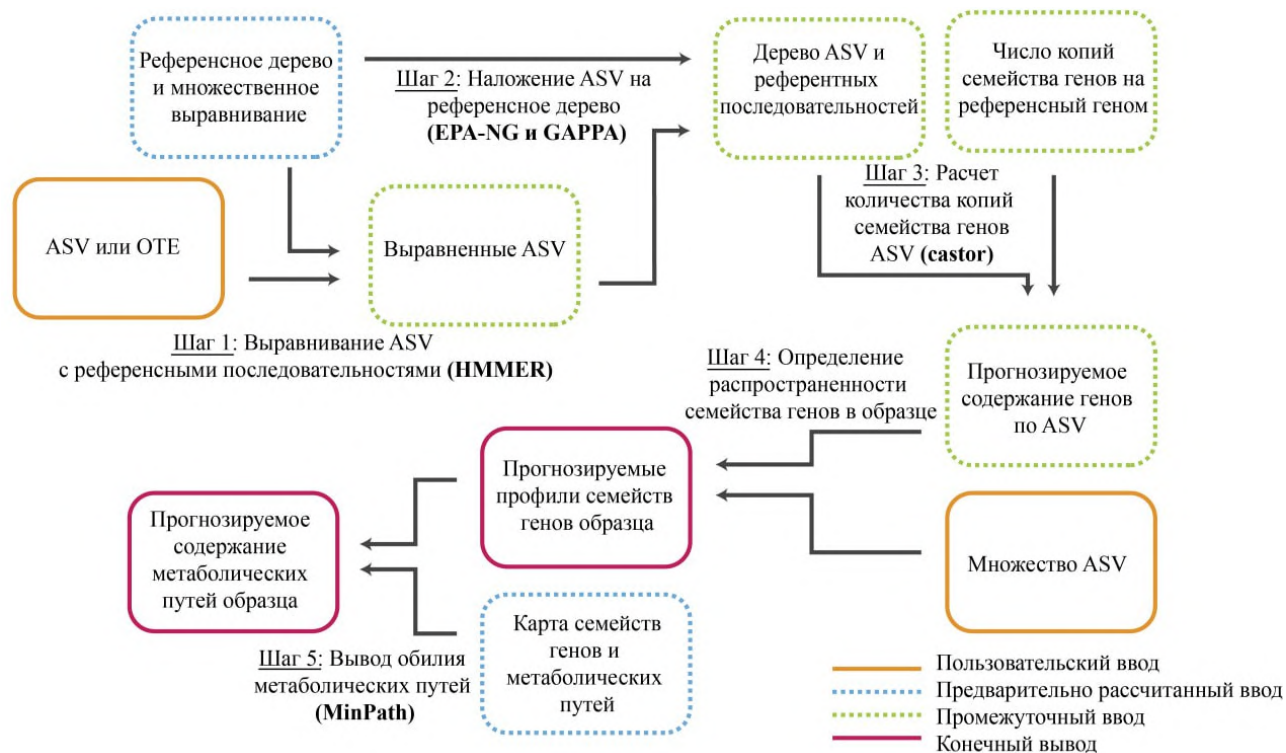


Рис. 13. Схема алгоритма PICRUSt2 для функциональной аннотации результатов *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. В скобках приводятся название алгоритмов, используемых PICRUSt2 на отдельных шагах. Схема адаптирована из Douglas и др. 2020.

Таблица 4. Функциональный профиль из путей метаболизма азота и фосфора на основе классификации базы данных MetaCyc.

Метаболические пути фосфора		Метаболические пути азота	
MetaCyc ID	Название	MetaCyc ID	Название
PWY-6839	Биосинтез 2-аминоэтилфосфоната	PWY-4984	Цикл мочевины
PWY-8067	Биосинтез метилфосфоната	PWY-7683	Нитрит-редукция
PWY-8129	Биосинтез фосфоната	CYANCAT-PWY	Деградация цианата
PWY-8465	Деградация (1R)-(2-амино-1-гидроксиэтил) фосфоната	PWY-7387	Деградация гипотаурина
PHOSPHONOTASE-PWY	Деградация 2-аминоэтилфосфоната I	PWY-1263	Деградация таурина I
PWY-6832	Деградация 2-аминоэтилфосфоната II	PWY-1264	Деградация таурина II
PWY-7447	Деградация 2-аминоэтилфосфоната III	TAURINEDEG-PWY	Деградация таурина III
PWY-7805	Деградация аминометилфосфоната	PWY0-981	Деградация таурина IV

Метаболические пути фосфора		Метаболические пути азота	
MetaCyc ID	Название	MetaCyc ID	Название
PWY-7804	Деградация глифосата I	PWY0-1573	Нитрат-редукция VIIIb (диссимиляционная)
PWY-7806	Деградация глифосата II	PWY-6748	Нитрат-редукция VII (денитрификация)
PWY-7807	Деградация глифосата III	PWY0-1321	Нитрат-редукция III (диссимиляционная)
PWY-5491	Деградация диэтилфосфата	PWY-381	Нитрат-редукция II (ассимиляционная)
PWY0-1533	Деградация метилфосфоната I	PWY-5674	Нитрат-редукция IV (диссимиляционная)
PWY-8066	Деградация метилфосфоната III	PWY0-1581	Нитрат-редукция IX (диссимиляционная)
PWY-7399	Деградация метилфосфоната III	DENITRIFICATION-PWY	Нитрат-редукция I (денитрификация)
PWY-8124	Деградация триметил-2-аминоэтилфосфоната	PWY0-1352	Нитрат-редукция VIII (диссимиляционная)
P483-PWY	Деградация фосфоацетата	PWY0-1584	Нитрат-редукция X (диссимиляционная, в периплазме)
PWY-8138	Метаболизм полифосфатов	PWY490-3	Нитрат-редукция VI (ассимиляционная)
PWY-6348	Поглощение фосфата	PWY-5675	Нитрат-редукция V (ассимиляционная)
		PWY-7576	Фиксация азота II (флаводоксин)
		N2FIX-PWY	Фиксация азота I (ферредоксин)
		PWY-6523	Нитрит-зависимое анаэробное окисление метана
		PWY-7084	Денитрификация
		PWY-7082	Нитрификация IV (автотрофы)
		AMMOXID-PWY	Нитрификация I (аэробы)
		PWY-2242	Нитрификация III
		P303-PWY	Нитрификация II (анаэробы)
		PWY-6964	Ассимиляция аммиака II
		PWY-6963	Ассимиляция аммиака I
		GLNSYN-PWY	Биосинтез L-глутамин I

2.3.2. Функциональный анализ результатов секвенирования полного метагенома на платформе NGS

Функциональную аннотацию результатов секвенирования полного метагенома на платформе NGS проводили по алгоритму на базе k-мерного подхода HUMAnN 3 (HMP Unified Metabolic Analysis Network, версия 3.9) (рис. 14) [Beghini и др., 2021]. Для анализа использовали файлы формата FASTQ с объединенными прямыми и обратными чтениями, получение которых описано в п. 2.2.3. Анализ проводили с использованием базы данных таксономических маркеров алгоритма MetaPhlAn — `mpa_vOct22_CHOCOPhlAnSGB_202212`, базы данных семейств генов, объединенных по функциям — `uniref90_201901b_es_filtered`, базы данных метаболических путей MetaCyc (версия 24), а также вспомогательного алгоритма MinPath (версия 1.2).

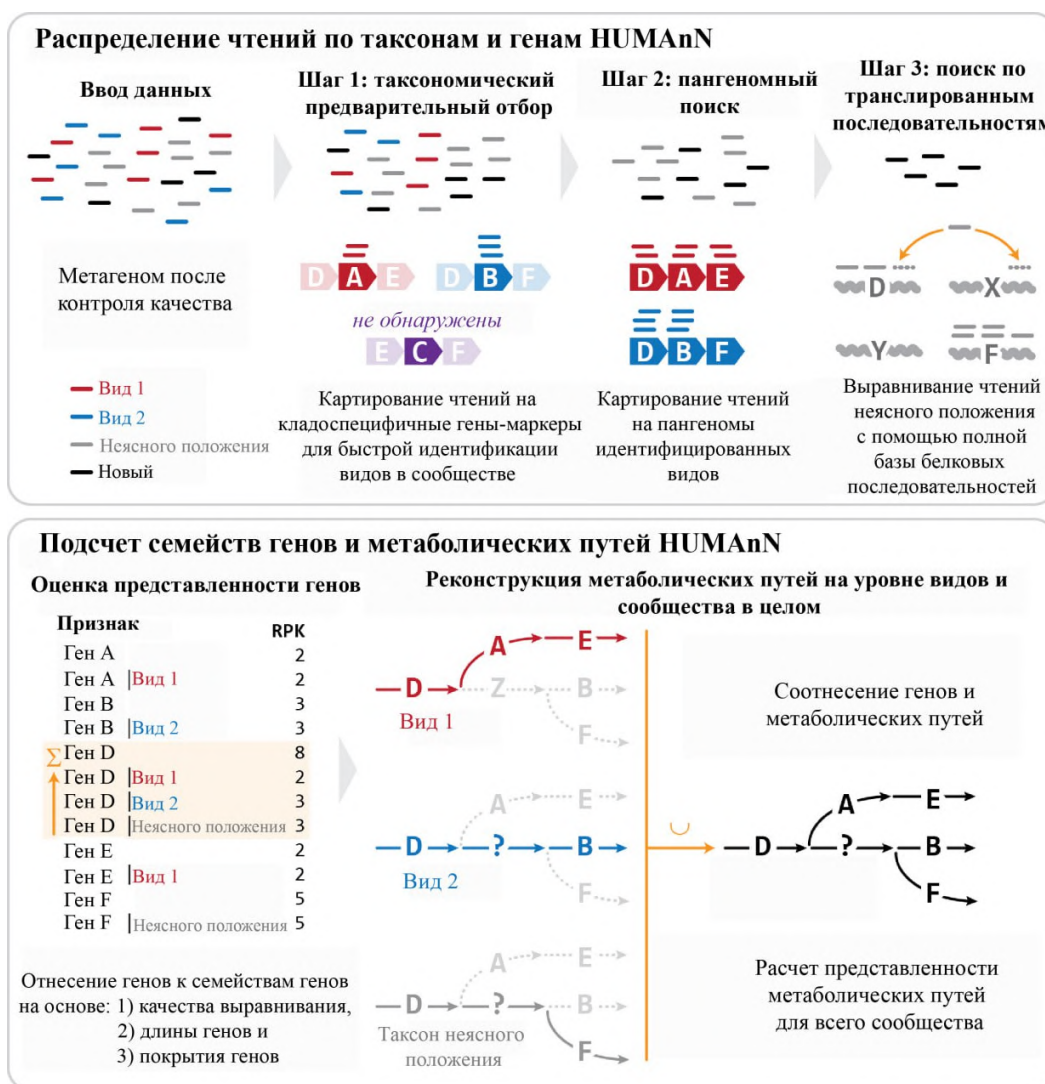


Рис. 14. Алгоритм HUMAnN 3, адаптировано из <https://github.com/biobakery/biobakery/wiki/humann3>.

Для оценки потенциала толерантности сообществ в исследуемых образцах к избытку биогенных элементов проводили подсчет представленности путей метаболизма азота и фосфора среди всех метаболических путей, найденных алгоритмом HUMAnN 3. Для этого использовали функциональный профиль из путей метаболизма азота и фосфора, составленный ранее (табл. 4). Проводили поиск данных путей в анализируемых образцах и рассчитывали суммарную долю их значений представленности в процентном отношении от представленности всех метаболических путей, найденных с помощью алгоритма HUMAnN 3.

2.3.3. Функциональный анализ результатов секвенирования полного метагенома на платформе ONT

Для функциональной аннотации результатов секвенирования полного метагенома на платформе ONT проводили поиск в них последовательностей генов, кодирующих ферменты и белки метаболического пути биоаккумуляции фосфора и биосинтеза полифосфатов. Для этого создавали функциональные профили из нуклеотидных последовательностей искомым генов и их метаданных: идентификатора в базе данных NCBI, название гена, название организма, из генома которого взят ген. Поиск набора генов из геномов прокариот проводили по ключевому слову «polyphosphate» в базе данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, версия 111.0) [Kanehisa и др., 2025]. Поиск набора генов из геномов эукариотических ОФМ проводили по литературным источникам. В качестве наиболее полного и описанного набора были выбраны гены из генома представителей рода *Chlamydomonas*, являющегося хорошо изученной классической моделью изучения фосфорного питания в микроводорослях (табл. 5) [Oyserman и др., 2016; Plouviez и др., 2021; Slocombe и др., 2023]. Поиск эталонных последовательностей проводили в базе данных NCBI GenBank и формировали из них файл формата FASTA. Для прокариотических и эукариотических организмов формировали отдельные функциональные профили с использованием автоматизации (скриптов на языке Python с использованием библиотек Beautiful Soup и pandas).

Таблица 5. Функциональный профиль эталонных последовательностей генов биоаккумуляции фосфора в эукариотических ОФМ, использованный в работе.

Название гена	Функция, закодированная в геноме <i>Chlamydomonas</i>
<i>PSR1</i>	Регулятор транскрипции при фосфорном голодании
<i>LBP1</i>	Фосфатаза
<i>PTC1</i>	Транспортер P_i с низкой аффинностью, сенсинг P_i
<i>PTA1, PTA2, PTA3, PTA4</i>	Семейство $H^+ / P_i P_i$ -транспортеров
<i>PTB1, PTB2, PTB3, PTB4, PTB5, PTB6, PTB7, PTB8, PTB9, PTB12</i>	Семейство $Na^+ / P_i P_i$ -транспортеров
<i>RHOX, RHO1, RHOD</i>	Щелочная фосфатаза
<i>MPA1, MPA2, MPA8, MPA9, MPA11, MPA13</i>	Металлофосфоэстераза (кислая фосфатаза)
<i>VTC1, VTC4, Cre09.g402812, Cre01.g005500</i>	Вакуолярный транспортный шаперон
<i>CAX1, CAX2, CAX3, CAX4, CAX5</i>	Катионный антипортер
Ген Ca^{2+} -ATPase	Кальций-транспортная АТФаза
<i>RYR1</i>	Ca^{2+} -канал
Ген $V-H^+$ -Ppase	$V-H^+$ -пирофосфатаза
<i>ATPvA1, ATPvA2, ATPvA3, ATPvB, ATPvD2, ATPvF, ATPvG, ATPvH, ATPvC, ATPvD1, ATPvL1, ATPvL2</i>	Вакуолярная H^+ -АТФаза

Сопоставление функциональных профилей с полученным метагеномом проводили средствами алгоритма BLAST путем выравнивания последовательностей из подготовленных профилей с последовательностями метагеномных чтений каждого АБС. Для этого из последовательностей метагеномных чтений формировали внутреннюю базу данных с помощью команды *makeblastdb*. Затем последовательно провели сравнение нуклеотидных последовательностей по шести рамкам считывания, транслируя их в аминокислотные последовательности, с помощью команды *tblastx*, отдельно с каждым из функциональных профилей — прокариотическим и эукариотическим.

Выдачу BLAST анализировали с помощью скрипта на языке Python, осуществляющим: 1) фильтрацию по значениям *e_value*, 2) расчёт для каждого организма значения степени соответствия заданному функциональному профилю по формуле (4), 3)

нормирование расчетных значений и вычисление интегрального значения степени соответствия АБС функциональному профилю.

$$T = \frac{\sum_{k=1}^n b_i p_i}{m}, \quad (4)$$

где T — интегральное значение степени соответствия микробиома заданному функциональному профилю, b — bit score (по выдаче BLAST), p — %identity (по выдаче BLAST), n — число совпадений с элементами профиля для данного метагеномного образца, m — число чтений в данном метагеномном образце.

2.4. Морфоструктурные методы

2.4.1. Оптическая светлопольная и флуоресцентная микроскопия ОФМ

Морфологический анализ АБС проводили при помощи световой микроскопии в светлопольном режиме на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия), снабженном фотокамерой DFC 7000T того же производителя. Визуализацию клеток эукариотических микроводорослей проводили с помощью регистрации аутофлуоресценции хлорофилла *a*. Флуоресцентные изображения получали на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с фотокамерой Leica DFC700T. Флуоресценцию возбуждали излучением УФ-лампы HXP 120 (Leica Microsystems, Германия), оснащенной фильтром D того же производителя, в диапазоне 355–425 нм. Эмиссию флуоресценции детектировали в диапазоне 455–700 нм.

2.4.2. Визуализация полифосфатов с помощью цитохимического окрашивания флуоресцентным красителем ДАФИ

Для визуализации полифосфатов в клетках ОФМ в АБС использовали раствор флуоресцентного красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ, англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; Sigma-Aldrich, США), растворенного в диметилсульфоксиде 1 мг/мл. 10 мкл исходного раствора ДАФИ добавляли к 90 мкл суспензии клеток АБС, инкубировали 20 мин в темноте, после чего клетки осаждали центрифугированием (8000 g, 5 мин) и заменяли супернатант на стерильную водопроводную воду эквивалентного объема. Флуоресцентные изображения получали на микроскопе Leica DM2500 как описано выше в п. 2.4.1.

2.4.3. Сканирующая электронная микроскопия

Поверхность клеток изучали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Фиксация и обезвоживание клеток были выполнены согласно протоколу, описанному у Gorelova и др., 2015. Сначала клетки были зафиксированы в 2% (масса : объем) растворе глутарового альдегида, приготовленного на 0,1 М буфере какодилата натрия (рН 7,4), при комнатной температуре в течение получаса. Далее была проведена пост-фиксация клеток в 1% (по массе) растворе тетраоксида осмия, приготовленного на том же буфере, в течение 4 часов. Для этого зафиксированные образцы клеток обезвоживали в серии водных растворов этилового спирта возрастающих концентраций от 30 до 96% (по объему), затем переносили в ацетон и высушивали в критической точке CO₂ в сушильной установке НСР-2 (Hitachi, Япония). Затем поверхность образцов напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке IB Ion Coater (Eiko, Япония) и исследовали в микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении 60-20000х и ускоряющем напряжении 15 кВ, в Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.4.4. Просвечивающая электронная микроскопия

Ультраструктурную организацию клеток и элементный анализ клеточных включений в образцах АБС анализировали с помощью традиционной просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) ультратонких (менее 70 нм) срезов и аналитической ПЭМ (аПЭМ) полутонких (200–250 нм) срезов, соответственно. Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 5 мин) и фиксировали стандартно по протоколу описанному у Gorelova и др., 2015, используя последовательно 2% (по объему) раствор глутарового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере (рН 6,8–7,2 в зависимости от рН культуры) в течение 30 мин и 1% (по массе) раствор тетраоксида осмия в том же буфере в течение 4 ч при комнатной температуре.

Обезвоживание фиксированных образцов проводили в серии водных растворов этилового спирта возрастающих концентраций от 30 до 96% (по объему) и троекратно в 100% этиловом спирте (Sigma-Aldrich, США). Последнюю процедуру обезвоживания сочетали с контрастированием 2% (по массе) раствором уранилацетата в абсолютном этиловом спирте (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее

образцы заключали в эпоксидную смолу Araldite (Sigma-Aldrich, США), проводили полимеризацию при 56°C и получали срезы заданной толщины на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) с помощью алмазного ножа Ultra 45 (DiATOME, Швейцария). Срезы монтировали на медные сеточки для электронной микроскопии с ультратонкой подложкой из формвара (Ted Pella, США). Для изучения ультраструктуры методом ПЭМ ультратонкие срезы дополнительно контрастировали раствором цитрата свинца [Reynolds, 1963]. Изображения по методу ПЭМ получали на электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) в Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Элементный анализ полутонких срезов проводили методом аПЭМ с использованием энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС), как описано ранее в Shebanova и др., 2017. Анализ проводили на аналитическом электронном микроскопе JEOL-2100 (JEOL, Япония), оснащенным светлопольным детектором для работы в режиме сканирующей ПЭМ (СПЭМ) (JEOL, Япония) и рентгеновским кремний-дрейфовым детектором X-Max с активной площадью кристалла 80 мм² (Oxford Instruments, Великобритания) в Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Энергодисперсионные рентгеновские спектры от выбранных точечных или зональных участков образца регистрировали в диапазоне энергий рентгеновского излучения от 0 до 10 кэВ в режиме светлопольной СПЭМ. Время набора сигнала для одного спектра составляло 120 секунд. Регистрацию и обработку энергодисперсионных спектров проводили в режиме “Point&ID” в программе INCA (Oxford Instruments, Великобритания).

Полученные спектры приводили в диапазоне 0,1–4,0 кэВ, в который входят наиболее интенсивные пики всех биологически значимых элементов, включая С ($K\alpha = 0,28$ кэВ), О ($K\alpha = 0,53$ кэВ), Р ($K\alpha = 2,01$ кэВ), N ($K\alpha = 0,39$ кэВ), Са ($K\alpha = 3,69$ кэВ) и Mg ($K\alpha = 1,25$ кэВ). В спектрах ЭДРС, приведенных в указанном диапазоне, всегда присутствовали полосы характеристического рентгеновского излучения углерода и кислорода — основных химических элементов органических соединений биологических образцов и эпоксидной смолы, используемой в процедуре пробоподготовки. Также в спектрах выявлялся пик меди (Cu, $L\alpha = 0,93$ кэВ) — основного компонента сеточек, на которые монтировали срезы перед их аПЭМ-анализом, осмия (Os, $M\beta = 1,91$ кэВ) и урана (U, $M\alpha = 3,16$ кэВ, $M\beta = 3,34$ кэВ),

использованных при фиксации клеток. Присутствие пика кремния (Si, $K\alpha = 1,74$ кэВ) в спектрах относится к элементам аппаратного фона.

2.5. Физиолого-биохимические методы

2.5.1. Анализ фотосинтетической активности ОФМ в АБС путем регистрации кинетики индукции флуоресценции фотосистемы

Состояние фотосинтетического аппарата оценивали путем анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* с использованием импульсного флуориметра FluorCam FC 800-C (Photon Systems Instruments, Чехия). Регистрацию параметров для ОФМ проводили непосредственно в культивационных матрасах после адаптирования образцов в темноте в течение 15 минут [Solovchenko и др., 2022]. Для регистрации кривых использовали протокол “NPQ” производителя: интенсивность насыщающей вспышки 4000 мкмоль квантов ФАР/м²/с; диапазон длин волн возбуждающего света 400–450 нм; детекция при 620 нм; время вспышки 2 с. При обработке изображений для каждого образца вручную выделяли область интереса, с которой получали среднее значение флуоресценции после вычета флуоресценции от окружающего фона. Для оценки состояния фотосинтетического аппарата ОФМ вычислялись параметры максимального потенциального квантового выхода фотосистемы II (5), вычисляемое по формуле:

$$Q_y = \frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}, \quad (5)$$

где Q_y — максимальный потенциальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II, F_0 и F_m — минимальный и максимальный уровень флуоресценции хлорофилла *a* после насыщающей вспышки, соответственно.

2.5.2. Определение содержания пигментов

Анализ содержания пигментов в образцах проводили в экстрактах, полученных путем инкубирования клеток с диметилсульфоксидом (ДМСО). Для этого отбирали аликвоты культуры объемом 2 мл. Далее центрифугировали в течение 10 минут на скорости 14200 об./мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), удаляли супернатант и добавляли к осадку 2 мл ДМСО. Затем проводили инкубирование суспензии при 70°C в течение 10 минут при перемешивании на орбитальном термошейкере (800 об./мин), после центрифугирования в течение 10 минут на скорости 14200 об./мин на центрифуге Minispin

(Erpendorf, Германия) удаляли осадок. Далее к раствору добавляли еще 2 мл ДМСО и повторяли инкубирование при тех же условиях. Концентрации хлорофиллов *a* и *b*, а также суммарную концентрацию каротиноидов в полученных экстрактах определяли спектрофотометрически в стандартных кварцевых кюветах с длиной оптического пути, равной 1 см. Спектры поглощения в видимой и ближней ИК-области ($\lambda = 450\text{--}800$ нм) регистрировали на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Расчеты концентраций хлорофиллов *a* (6) и *b* (7) и суммарной концентрации каротиноидов (8) в полученных экстрактах проводили по уравнениям из Solovchenko и др., 2010:

$$C_{\text{хла}}(\text{мг/л}) = 13,44 D_{666} - 4,85 D_{650}, \quad (6)$$

$$C_{\text{хлб}}(\text{мг/л}) = 24,58 D_{650} - 6,65 D_{666}, \quad (7)$$

$$C_{\text{кар}}(\text{мг/л}) = \frac{1000 D_{480} - 1,29 C_{\text{хла}} - 53,76 C_{\text{хлб}}}{220}, \quad (8)$$

где $C_{\text{хла}}$, $C_{\text{хлб}}$, $C_{\text{кар}}$ — концентрации хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в экстракте соответственно (в мг/л). D_{λ} — оптическая плотность при соответствующей длине волны λ в нм.

2.5.3. Измерение остаточного содержания макроэлементов в среде колориметрическими методами

Для определения остаточной концентрации P_i в среде по методу, описанному у Ota, Kawano, 2017, с готовили реагент, содержащий 1,2 г парамолибдата аммония $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; Sigma Aldrich, США), 12 г антимоилтартрата калия $(\text{K}_2\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6)_2$; Sigma Aldrich, США), 32 мл разбавленной серной кислоты (концентрированная серная кислота : бидистиллированная вода = 1 : 1), бидистиллированную воду (до 100 мл). Измерение проводили в 96-луночном прозрачном планшете с плоским дном (Erpendorf, Германия). В лунку добавляли 200 мкл культуральной жидкости, содержащей P_i , 8 мкл реагента парамолибдата аммония, 2 мкл 7,2% (масса : объем) раствора аскорбиновой кислоты $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; Sigma Aldrich, США). После этого раствор инкубировали 20 минут при комнатной температуре и регистрировали значение оптической плотности при $\lambda = 880$ нм на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Швейцария). Расчет концентрации P_i проводили по формуле (9):

$$C_{P_i}(\text{мг/л}) = \frac{3 D_{880}}{0,13}, \quad (9)$$

где C_{P_i} — концентрация P_i в среде (в мг/л), D_{880} — оптическая плотность при длине волны 880 нм.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ²

3.1. Анализ таксономического состава и биоразнообразия АБС активного ила из ВОС

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

²Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в 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);
2. Lobakova E., Gorelova O., Selyakh I., Semenova L., Scherbakov P., Vasilieva S., **Zaytsev 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);
3. Vasilieva S., Lukyanov A.A., Antipova C., Grigoriev T., Lobakova E., Chivkunova O., Scherbakov P., **Zaytsev 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);
4. Васильева С.Г., **Зайцев П.А.**, Баулина О.И., Лобакова Е.С., Соловченко А.Е., Горелова О.А. Потенциал микроводоросли *Micractinium simplicissimum* ipras 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); [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);
6. 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).

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).

Моделирование воздействия на АБС активного ила ВОС смены режима культивирования со стационарного на проточный с целью увеличения полноты изъятия P_i проводили в установке проточного желоба на территории ВОС г. Звенигород. Анализ динамики изменения микробиома АБС активного ила проводили методом *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS (рис. 15а). Отдельные таксоны микроорганизмов выявлялись в составе АБС на протяжении всего периода инкубации, но их относительная представленность изменялась. Так, в АБС активного ила снижали представленность типичных для сточных вод цианобактерий pp. *Planktothrix* и *Tychonema*, не обладающих выраженной способностью к биоизъятию экзогенного P_i и накоплению полифосфатов. Одновременно со снижением представленности цианобактерий и ростом представленности нитчатых микроводорослей (рис. 15г–ж) в метагеноме АБС активного ила росла представленность бактерий, способных быть первичными продуцентами, например метаногенов из рода *Methanosaeta* и пурпурных несерных бактерий рода *Rhodofera*x. При этом АБС содержало полифосфат-аккумулирующие бактерии из pp. *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Candidatus Accumulibacter* и *Rhodocyclaceae bacterium* в течение всего периода наблюдений.

Хотя значения индексов α -разнообразия Шеннона и Симпсона не показали существенной разницы между АБС на разных временах инкубации (табл. 6), рассчитанные значения индекса Мориситы выявили значительные изменения прокариотической составляющей АБС активного ила в ходе двухнедельного культивирования (рис. 15б).

Таблица 6. Значения индексов α -разнообразия АБС активного ила при переходе от роста во вторичных отстойниках к росту при повышенной биодоступности фосфата, в разные дни инкубации (0, 3, 6, 14), рассчитанные по данным *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. Средние арифметические величины ($n = 3$) с соответствующими значениями стандартного отклонения.

Индексы α -разнообразия	0 день	3 день	6 день	14 день
Шеннона	2,10±0,05	2,23±0,17	1,93±0,13	2,21±0,11
Симпсона	0,19±0,02	0,16±0,05	0,24±0,04	0,17±0,03

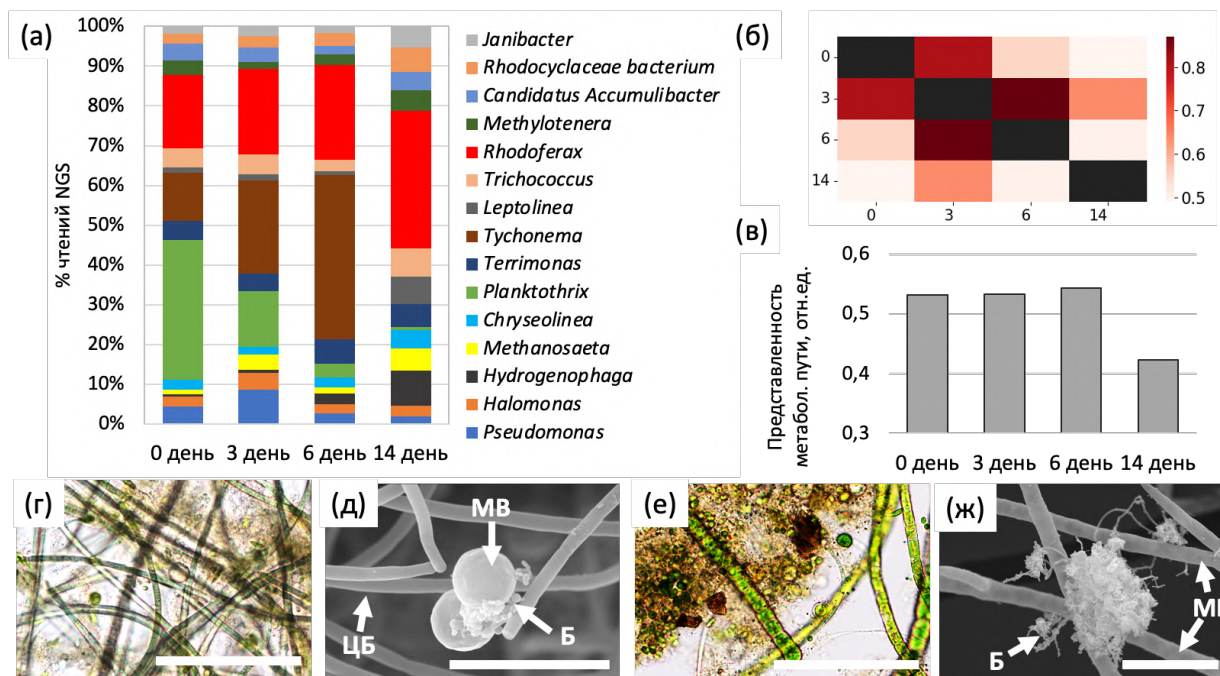


Рис. 15. Динамика структуры АБС активного ила при переходе от роста во вторичных отстойниках к росту при повышенной биодоступности фосфата, в разные дни инкубации (0, 3, 6, 14): таксономический состав микробиома на уровне родов по данным *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS (а), тепловая карта 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.

Функциональный анализ результатов *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS в исследуемом АБС показал снижение потенциала сообщества к поглощению и ассимиляции элементов минерального питания (рис. 15б). Данный параметр считается ключевым компонентом такой фенотипической черты, как способность АБС к биоизъятию фосфора из среды [Acevedo и др., 2014; Solovchenko и др., 2016; Tarayre и др., 2016; Solovchenko и др., 2019].

Таким образом, при перемещении АБС активного ила ВОС из резервуаров вторичной очистки в систему для доочистки с большим током жидкости, олиготрофными условиями среды и повышенной биодоступностью фосфата, наблюдали изменение морфологической структуры АБС с заменой его «фототрофной доминанты» (эдификатора) — нитчатых цианобактерий — на нитчатые эукариотические микроводоросли. Замена эдификатора сообщества сопровождалось существенным увеличением представленности

гетеротрофных бактерий. Это согласуется с современными представлениями о росте конкурентного преимущества микроводорослей перед цианобактериями при повышении биодоступности фосфора [Briddon и др., 2022; Liepina-Leimane и др., 2024]. Полученные результаты также делают актуальным анализ эффективности и стабильности данной системы под действием более интенсивных стрессоров.

3.2. Анализ таксономического состава и функционального потенциала АБС активного ила ВОС под действием микрополлютантов

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, Shivaraju, Yashas, 2022], см. также раздел 1.1.4). В этой связи исследовали воздействие лекарственных веществ (ЛВ), часто встречающихся в сточных водах, — цефтриаксона (ЦТА) и диклофенака. (ДФ) — на АБС активного ила водоочистных сооружений [Shipingana, Shivaraju, Yashas, 2022; Kathi и др., 2023].

Для всех исследованных образцов были получены данные *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS, по которым был определён таксономический профиль АБС (табл. 7). Таксономический состав образцов имел много общих родов не только между собой, но и с контрольным образцом сточных вод без добавки биомассы.

Для АБС были характерны следующие особенности: в образцах, инкубированных с лекарственными веществами (+ДФ, +ЦТА), наблюдали замещение цианобактерий рода *Limnothrix* представителями родов *Leptolyngbya* и *Nodosilinea*; в образцах, инкубированных без добавки макроэлементов, развивались цианобактерии рода *Leptolyngbya*; в образце ДФ+N+P цианобактерии рода *Leptolyngbya* замещались представителями рода *Nodosilinea*; в образцах с ЦТА были шире представлены бактерии из класса Alphaproteobacteria (роды *Shingomonas*, *Brevundimonas* и *Roseomonas*), а разнообразие цианобактерий было, наоборот, сужено (до рода *Pseudoanabaena*). В целом, представители класса Cyanobacteria были шире представлены в образцах с ДФ, но при инкубации сообщества с ЦТА их представленность снижалась, что согласуется с результатами морфофизиологического анализа образцов (рис. 16а).

Таблица 7. Таксономический состав микробиома активного ила ВОС к концу месяца инкубации в сточных водах с добавлением биогенных элементов и (или) ЛВ, описанный по данным *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS.

Класс	Род	Сточн. воды	+P+N *	+ЦТА	+ДФ	+P+N +ЦТА	+P+N +ДФ
Acidimicrobiia	<i>Actinobacterium</i>	1,8	4,9	1,2	1,2	4,2	1,7
Actinobacteria	<i>Microcella</i>	4,4	9,7	1,7	2,7	3,2	4,0
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0,2	2,1	13,3	7,7	19,0	9,9
	<i>Roseobacter</i>	9,4	4,6	3,3	2,3	4,1	2,8
	<i>Roseomonas</i>	0,0	0,8	6,6	0,7	4,5	1,2
	<i>Brevundimonas</i>	3,8	1,2	2,3	0,5	2,6	0,3
Bacteroidia	<i>Aquiflexum</i>	20,0	2,0	6,0	4,0	5,0	1,0
Cyanobacteriia	<i>Nodosilinea</i>	0,0	2,3	27,4	0,5	20,0	17,4
	<i>Pseudanabaena</i>	1,4	12,8	0,0	21,9	0,0	23,9
	<i>Leptolyngbya</i>	0,0	0,0	8,4	33,5	1,6	0,1
	<i>Cyanobium</i>	32,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
	<i>Limnothrix</i>	0,0	21,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Gammaproteobacteria	<i>Silanimonas</i>	24,6	38,1	28,8	23,2	34,5	35,6
Planctomycetes	<i>Roseimaritima</i>	2,0	0,5	1,0	1,6	1,1	2,0

* Обозначения см. в табл. 3.

Представители Alphaproteobacteria из родов *Shingomonas*, *Brevundimonas* и *Roseomonas* известны своей толерантностью к разным группам антибиотиков и других ЛВ, участием в их деградации в разных системах, а также наличием патогенных видов с антибиотикоустойчивым фенотипом [Dias и др., 2015; Gallardo-Altamirano и др., 2021; Gao и др., 2022]. Примечательно развитие в образцах с ЛВ без добавок макроэлементов (+ДФ, +ЦТА) цианобактерий рода *Leptolyngbya*, которые характерны для сточных вод с высоким уровнем загрязнения широким спектром органических и неорганических компонентов [Eikelboom, 1975; Furtado и др., 2009; Romanis, Pearson, Neilan, 2021]. Возможно, попадание в сточные воды ЛВ запускает отбор микроорганизмов в ВОС не только по частному признаку антибиотикоустойчивости, но и по общей устойчивости к токсикантам.

Оценка влияния инкубации с ЛВ на биоразнообразие микробных компонентов АБС показала, что присутствие ЛВ не оказывало значимого влияния на индекс биоразнообразия Шеннона и индекс видового разнообразия Симпсона (табл. 8). Это не позволяет делать предварительные выводы о сдвиге в структуре сообщества на фоне селективного давления со стороны ЛВ, требуя более детального анализа таксономической структуры сообществ и их физиологического состояния.

Таблица 8. Значения индексов α -разнообразия АБС активного ила ВОС к концу месяца инкубации в сточных водах с добавлением биогенных элементов и (или) ЛВ, рассчитанные по данным *16S rRNA* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS, средние арифметические величины ($n = 3$) с соответствующими значениями стандартного отклонения.

Индексы α -разнообразия	Сточные воды	+P+N*	+ЦТА	+ДФ	+P+N +ЦТА	+P+N +ДФ
Шеннон	2,75±0,07	2,58±0,22	2,77±0,22	2,61±0,17	2,96±0,17	2,50±0,01
Симпсон	0,13±0,02	0,16±0,04	0,12±0,04	0,18±0,05	0,11±0,02	0,16±0,01

*Обозначения см. в табл. 3.

По завершении инкубации АБС с исследованными ЛВ оценивали способность сообществ к биоизъятию P_i из сточных вод. Измерение остаточного содержания P_i в образцах культуральной жидкости показало, что сообщества утилизировали большую часть исходно содержащегося в сточных водах P_i . На первый взгляд, кажется парадоксальным, что процент изъятия оказался меньше (70%) в случае низкого исходного содержания P_i (5 мг/л), а при повышении исходной концентрации P_i до уровня 50 мг/л он достигал 95% (рис. 16а). Однако в случае низкой исходной концентрации P_i компоненты сообщества могли испытывать стресс из-за недостатка биодоступного азота, что могло снижать способность к поглощению P_i [Solovchenko и др., 2019]. Следует также отметить, что предел чувствительности использованного нами метода определения P_i составляет 1 мг/л, поэтому точное определение остаточных концентраций P_i порядка 1–2 мг/л (а, следовательно и процента биоизъятия) в случае культур с низким содержанием P_i затруднительно [Ota, Kawano, 2017].

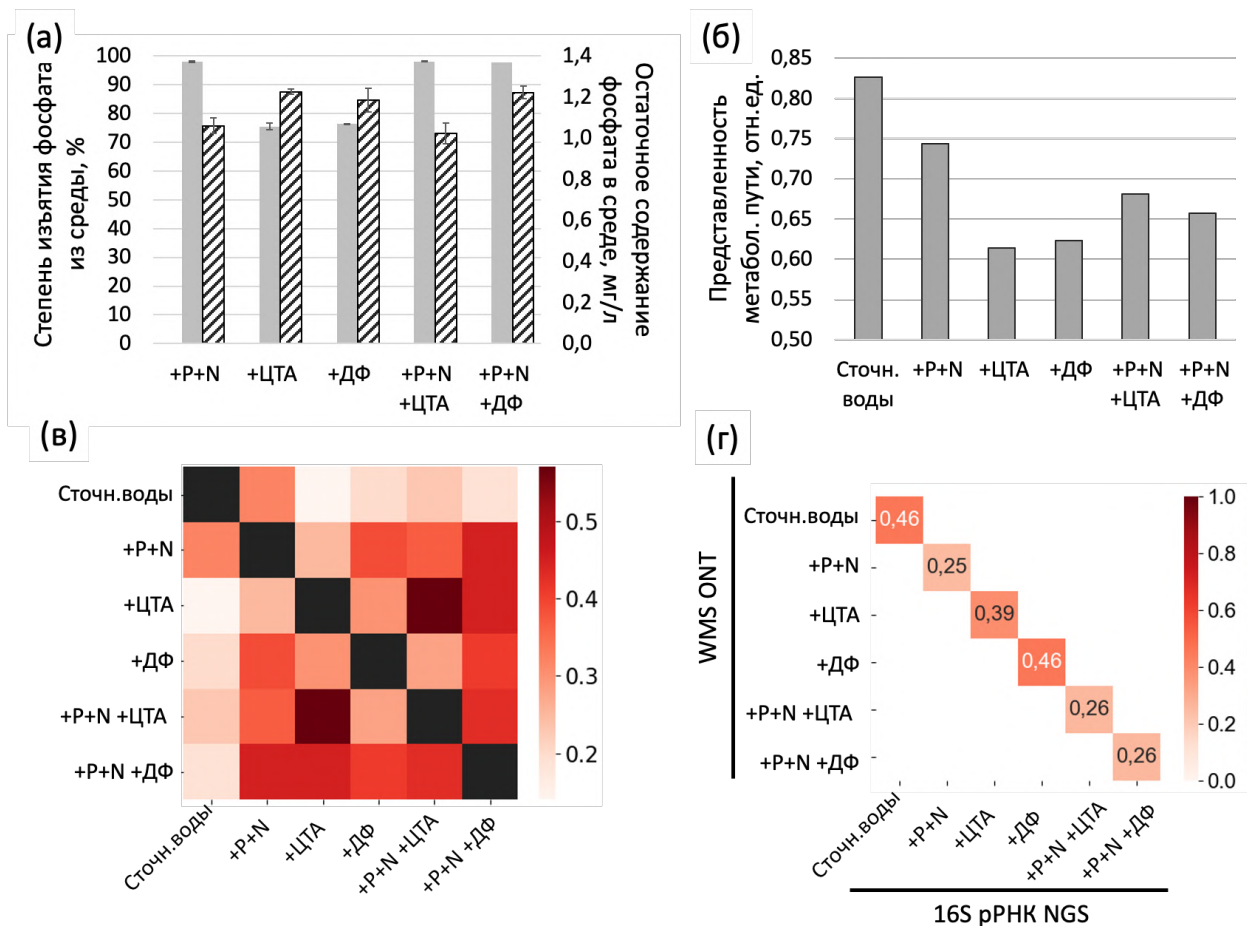


Рис. 16. Функциональная характеристика и таксономический состав АБС активного ила ВОС при инкубации в сточных водах с добавлением биогенных элементов и (или) ЛВ: серый — степень биоизъятия фосфата из сточных вод и остаточное штрих — содержание фосфата в сточных водах, средние арифметические величины ($n = 6$) с соответствующими значениями стандартного отклонения (а); рассчитанная представленность путей метаболизма элементов минерального питания по алгоритму PICRUSt2 (б); сравнение АБС на основе данных *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS — тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы (в); сравнение результатов таксономического анализа на основе данных *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS с результатами секвенирования полного метагенома (WMS) на платформе ONT (г).

Важным результатом является отсутствие значимых различий между способностью к биоизъятию P_i между образцами АБС, инкубированными с ЛВ и без них. По-видимому, использованные в нашей работе концентрации ЛВ не оказывали существенного влияния на метаболизм фосфора в клетках микроорганизмов, составляющих основу АБС. Не исключено также, что уязвимые для действия лекарств микроорганизмы быстро

замещались в составе сообщества более толерантными его компонентами, при этом интегральный показатель (поглощение P_i) оставался на уровне АБС, не инкубированных с ЛВ.

На основе полученных данных *16S rPHK* метабаркодинга с помощью алгоритма PICRUSt2 была проведена количественная оценка представленности генов, кодирующих метаболические пути (на уровне суперклассов по классификации базы данных MetaCyc [Caspri и др., 2020]). С помощью данного алгоритма удалось предсказать наличие в исследованных АБС 201 метаболического пути, объединенных в 32 суперкласса (рис. 16б). Данное множество было разделено на две части: пути деградации субстратов и пути биосинтеза различных соединений. Представленность суперклассов метаболических путей в образцах АБС, инкубированных с лекарственными веществами, анализировали относительно образцов, инкубированных без добавления лекарственных веществ, но с дополнительными макроэлементами.

Установлено, что инкубация с лекарственными веществами снижала представленность в метагеноме сообщества генов, кодирующих пути деградации ряда субстратов — альдегидов, октана, олигомеров нейлона-6 и циклолитов. Фактически, эти соединения, а также родственные им молекулы часто выявляются в муниципальных сточных водах как органические поллютанты, в основном из промышленных источников (см., например, [Ahmed и др., 2021]). Аналогично, инкубация с ЛВ снижала представленность генов, кодирующих пути метаболизма макроэлементов минерального питания, такие как микробное окисление серы, нитрификация, денитрификация и деградация метилфосфоната. Можно ожидать, что изменения, подобные вышеописанным, будут снижать потенциальную способность сообществ к биоизъятию макроэлемента из сточных вод (рис. 16б), но фенотипическое проявление этой тенденции может отставать во времени от изменения её генетических детерминантов.

Вместе с этим инкубация сообществ в присутствии ЛВ и высоких концентраций биодоступного азота и фосфора увеличивало представленность в их метагеноме путей как катаболизма, так и биосинтеза нуклеотидов и нуклеозидов. Таким образом, вероятно, что потенциал компонентов АБС к вовлечению в метаболизм неорганического азота и фосфора частично сохраняется. Для аминокислот, углеводов и биополимеров в большей степени увеличивали представленность генов катаболизма, чем биосинтеза.

Исследованные ЛВ оказывали различное влияние на представленность определенных метаболических путей в метагеноме сообществ. Так, наблюдали увеличение относительной представленности путей, связанных с устойчивостью к действию ЦТА (по механизму репарации компонентов клеточной стенки, так как ЦТА действует за счет подавления синтеза компонентов клеточной стенки) [Johnson, Fisher, Mobashery, 2013]. Кроме того, ЦТА, в отличие от ДФ, уменьшал представленность путей биосинтеза сидерофоров, что может быть косвенным индикатором пролиферации микроводорослей в образцах АБС, инкубированных с антибиотиком.

Попарная оценка сходства микробиомов образцов по индексу Мориситы выявила низкое сходство для всех образцов, кроме инкубированных с ЦТА (рис. 16в). Таким образом, несмотря на сходство микробиома исследованных образцов (некоторые рода были обнаружены в каждом образце), отдельные ЛВ в концентрациях, сопоставимых с рутинно выявляемыми в окружающей среде и сточных водах [Henderson и др., 2022; Shipingana, Shivaraju, Yashas, 2022], способны изменять представленность микробных таксонов в АБС. При этом добавление антибиотика (ЦТА) вызывает сходные изменения микробиома вне зависимости от доступности макронутриентов.

Результаты таксономического анализа на основе данных *16S rPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS сопоставлялись с результатами секвенирования полного метагенома на платформе ONT. Результаты выявления наиболее представленных в АБС родов микроорганизмов прямым анализом длинных чтений ONT и ДНК-метабаркодинга для некоторых образцов не совпадали (рис. 16г). Ввиду прямого подсчёта количества чтений и отсутствия этапа амплификации при подготовке библиотек количественное распределение микроорганизмов по данным нанопорового секвенирования может точнее отражать структуру АБС. Так, несмотря на существование корового микробиома общего для всех исследованных АБС, в образцах с добавкой ЦТА и макронутриентов происходило постепенное развитие гетеротрофных бактерий (из pp. *Brevundimonas*, *Sphingomonas* и *Tabrizicola*) и снижение представленности цианобактерий (из pp. *Pseudanabaena* и *Leptolyngbya*). Кроме того, секвенирование полного метагенома на платформе ONT позволяет выявлять и классифицировать эукариотические организмы, являющиеся определяющими компонентами в АБС.

К концу эксперимента внешний вид и морфология АБС, инкубированных с различными добавками, отличались в разных экспериментальных вариантах (рис. 17а). В образце с добавкой только азота и фосфора наблюдали умеренную флокуляцию биомассы с характерной сине-зелёной окраской, указывающей на присутствие во флоккулах цианобактерий. Во всех образцах, инкубированных с добавлением ДФ, флокуляция биомассы была более выраженной, а их окраска изменялась. В во всех образцах, инкубированных с добавлением ЦТА, наблюдали более гомогенную биомассу с характерной для микроводорослей зелёной окраской.

Судя по результатам оптической микроскопии, при инкубации с ЦТА микроводоросли развивались в АБС сильнее, чем в других образцах (рис. 17б). Это подтверждалось и снимками в режиме регистрации эмиссии флуоресценции хлорофилла *a* (рис. 17в). В пробах, инкубированных с добавлением ДФ, как и в контроле, биомасса включала преимущественно нитчатые цианобактерии и бактериальные агрегаты (рис. 17б).

Физиологическое состояние микроводорослей и цианобактерий в исследованных образцах АБС оценивали по функциональным параметрам их фотосинтетического аппарата (рис. 18а, см. также Материалы и Методы). Во всех образцах через сутки после начала инкубации наблюдался небольшой рост значения максимального квантового выход фотосистемы II, Q_y . Вероятно, это происходило вследствие акклимации к новым, более благоприятным условиям (с более высокой доступностью азота и фосфора). Далее значения Q_y снижались (также для всех образцов) вне зависимости от добавок. В случае образцов, инкубированных без добавления лекарств, а также образцов с добавлением ДФ, значение Q_y продолжало снижаться на протяжении всего эксперимента до 0,2–0,3. По всей видимости, это может быть связано с ростом присутствия в АБС цианобактериального компонента.

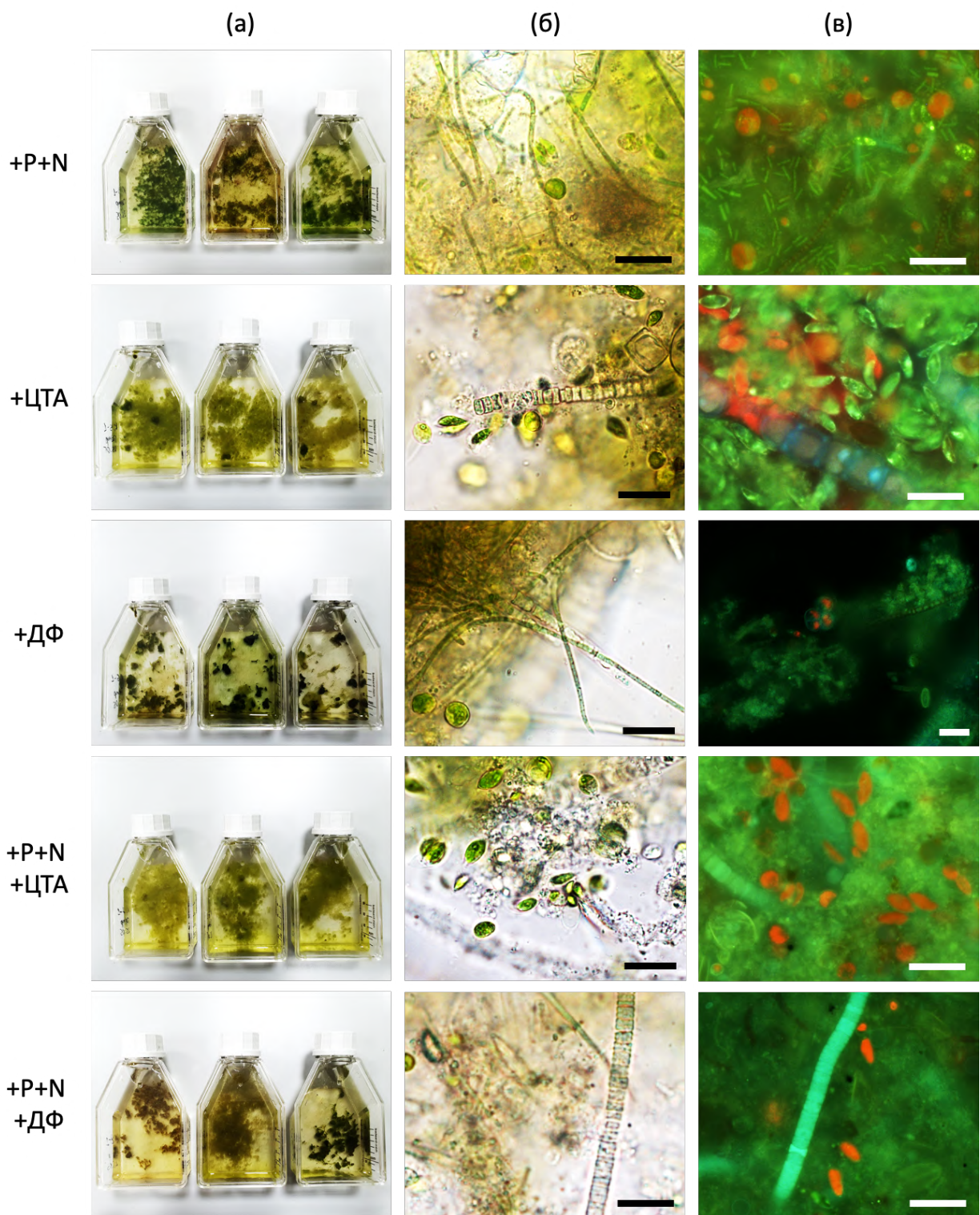


Рис. 17. Морфологические признаки образцов АБС активного ила ВОС к концу инкубации в сточных водах с добавками лекарств и (или) источников азота и фосфора: внешний вид суспензии АБС (а), микроскопия препаратов АБС в проходящем свете (б), микроскопия окрашенных ДАФИ препаратов АБС в флуоресцентном режиме в интервале 455–700 нм (в). Масштабный отрезок для б, в — 5 мкм.

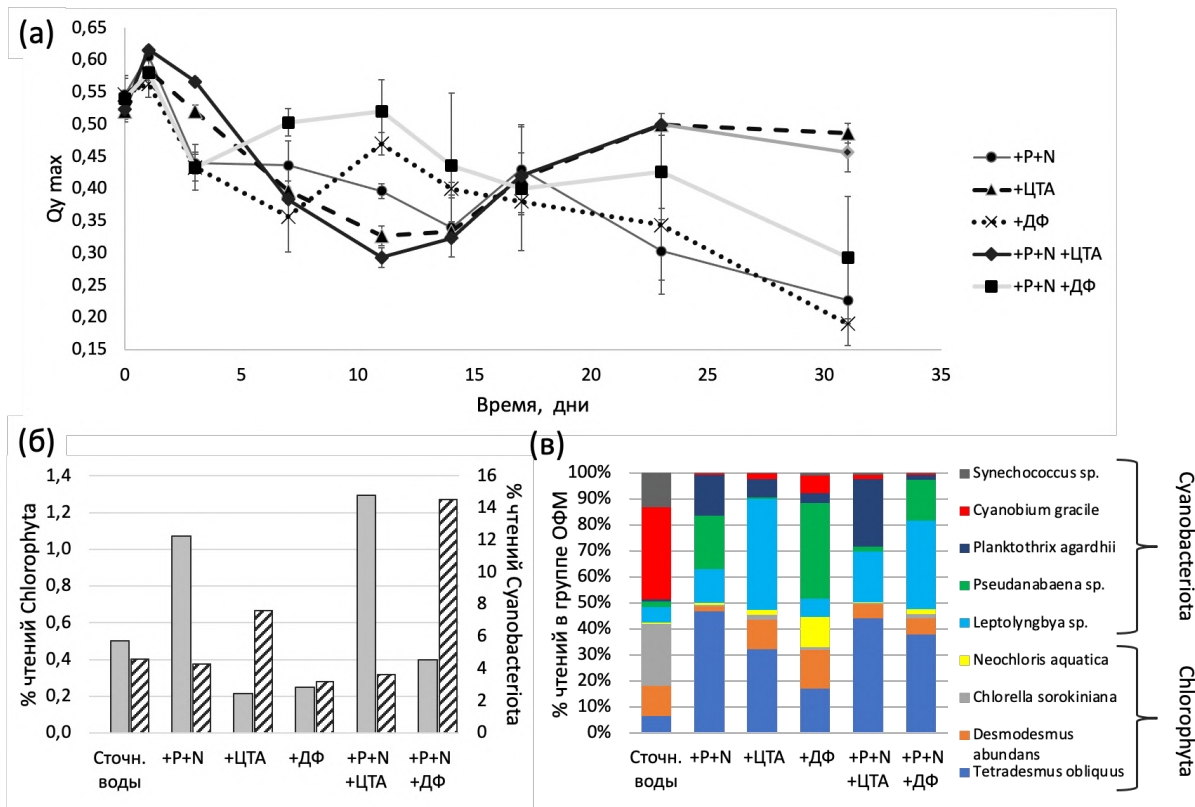


Рис. 18. Динамика и состав ОФМ в образцах АБС активного ила ВОС при инкубации в сточных водах с добавлением биогенных элементов и (или) лекарственных веществ: динамика максимального потенциального фотохимического квантового выхода (Q_y) фотосистемы II, средние арифметические величины ($n = 6$) с соответствующими значениями стандартного отклонения (а); содержание ОФМ в микробиоме, рассчитанное по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT: серый — на уровне филума Chlorophyta, штрих — на уровне филума Cyanobacteriota (б); таксономический состав ОФМ к концу инкубации, описанный по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT (в).

При инкубации образцов с добавлением ЦТА наблюдали снижение значений Q_y на протяжении первых десяти дней, после чего он снова повысился и вышел на стационарный уровень порядка 0,5. Таким образом, по крайней мере, отдельные фотоавтотрофные микроорганизмы в составе АБС смогли адаптироваться к действию антибиотика и заняли доминирующее положение в составе сообщества. Судя по значениям Q_y , а также по результатам морфологического анализа, в образцах, инкубированных с ЦТА, повышали представленность микроводорослей.

Ввиду отсутствия значимой разницы между динамикой значений Q_y для контрольной пробы (+P+N) и образцами с ДФ, можно предположить, что разница в эффектах на АБС между ЛВ является не столько следствием прямого действия на ФС II,

сколько самым фактом развития одной из групп ОФМ: микроводорослей — при добавлении ЦТА, цианобактерий — при добавлении ДФ. Как правило, квантовый выход ФСII у микроводорослей бывает выше, чем у цианобактерий [Schuurmans и др., 2015; Solovchenko и др., 2022]. Известно, что и цианобактерии, и микроводоросли относительно толерантны к ЦТА и ДФ в концентрациях, использованных в данном исследовании, а также способны к деградации данных соединений [Vingiani и др., 2019; Sánchez-Sandoval и др., 2022]. Однако при сравнительном анализе выявлено, что при добавлении ЦТА более высокие темпы роста имеют микроводоросли, а при ДФ — цианобактерии [Dias и др., 2015]. Паттерн кривой динамики Q_y при добавлении ЦТА также совпадал с ранее полученным, на примере микроводоросли *Lobosphaera* sp., в котором после 10 суток адаптации наблюдался рост значения [Vasilieva и др., 2023b].

Анализ чтений, полученных при секвенировании полного метагенома на платформе ONT, также позволил провести поиск в образцах АБС эукариотических микроводорослей, наличие которых сложно было подтвердить на основе данных метабаркодинга по гену *16S rРНК*. Было установлено, что количество чтений, соответствующих представителям отдела Chlorophyta (преимущественно роды *Tetradesmus*, *Desmodesmus* и *Chlorella*), было наибольшим в образцах биомассы, инкубируемой в условиях добавки макронутриентов, а также макронутриентов с ЦТА, тогда как цианобактерии преобладали в образце с макронутриентами и ДФ (рис. 18б,в). Наконец, анализ длинных чтений секвенирования на платформе ONT позволил с большей точностью классифицировать микроорганизмы в составе АБС, в ходе чего было показано наличие в АБС таких видов как *Staphylococcus epidermis*, *S. haemolyticus* и др., являющихся потенциальными носителями антибиотикоустойчивости и развившимися в образце с добавкой макронутриентов и ЦТА [Werth и др., 2013; Lee и др., 2018].

3.3. Анализ таксономического состава и биоразнообразия лабораторных АБС под действием модельных стрессоров

Практическая реализации 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 удастся преодолеть путем иммобилизации клеток на биосовместимых носителях, но при использовании данного

подхода необходимо учитывать возможное влияние иммобилизации на физиологическое состояние и структуру АБС [Garbowski и др., 2020; Vasilieva и др., 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 при инкубации в присутствии дополнительного стрессора — 20 мг/л антибиотика цефтриаксона (ЦТА). Несмотря на то, что такая концентрация в несколько раз превышает значения, которые фиксировали исследования присутствия антибиотиков в различных сточных водах [Henderson и др., 2022; Shipingana, Shivaraju, Yashas, 2022], ее использовали в данном исследовании для создания однозначных стрессовых условий для АБС культуры микроводоросли *Lobosphaera* sp., демонстрирующей высокие показатели толерантности к различным микрополлютантам при инкубации в иммобилизованном состоянии [Vasilieva и др., 2021; Vasilieva и др., 2023a; Vasilieva и др., 2024]. Помимо этого, более высокие концентрации антибиотика могут также служить моделью залповых сбросов стоков из медицинских учреждений или животноводческих хозяйств, где используются данные препараты [Yang и др., 2006].

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 (рис. 19а). После второй недели инкубации значения индекса сходства Мориситы увеличивались для всех АБС, вовлеченных в эксперимент, по сравнению с первой неделей (рис. 19б). При этом иммобилизованные монокультуры по таксономической структуре АБС сильнее всего отличались от остальных образцов, что демонстрирует значительный потенциал иммобилизации на биополимерных носителях в плане модуляции структуры микробиома альгологических монокультур.

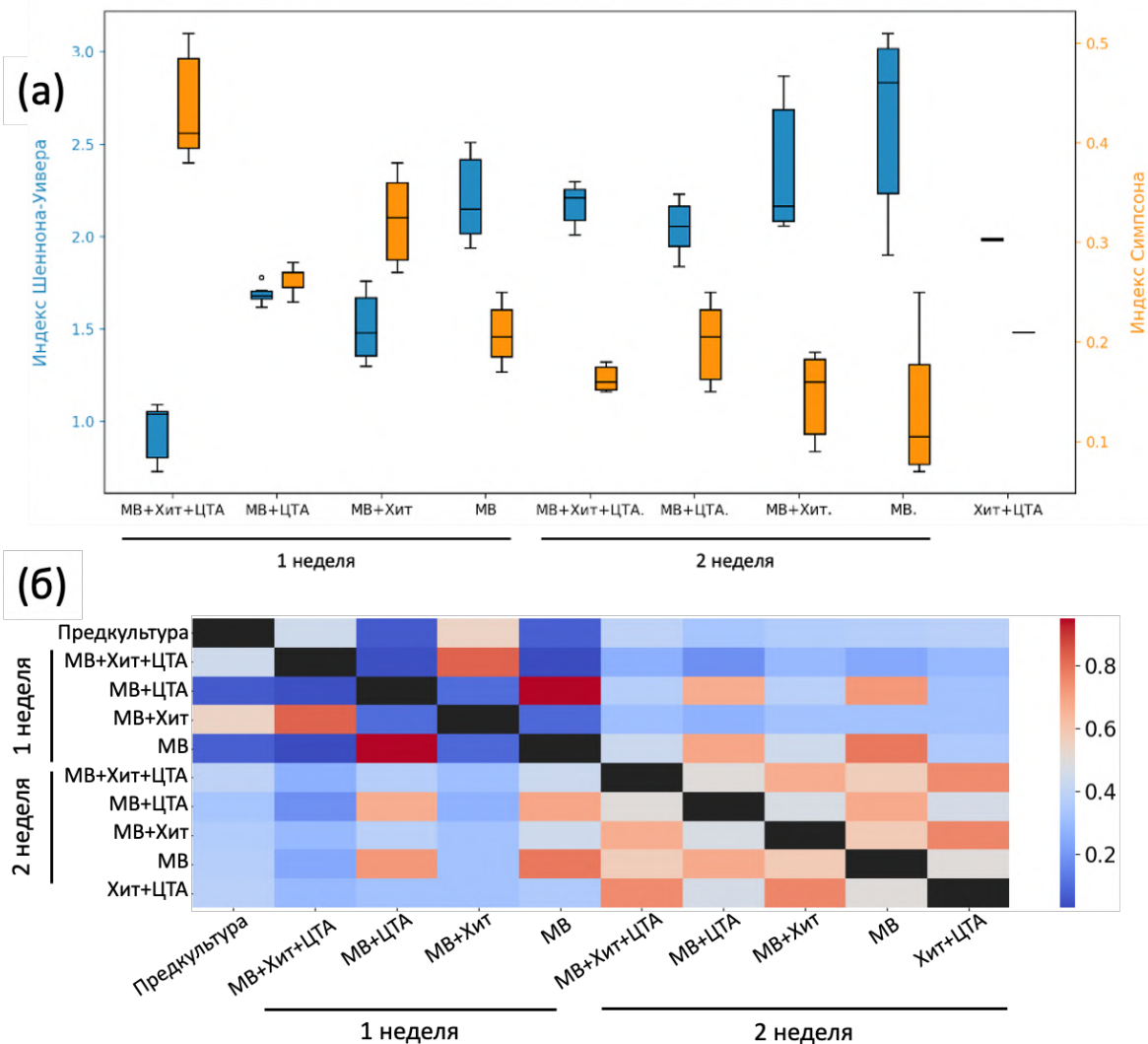


Рис. 19. Динамика таксономического состава микробиома АБС на базе штамма *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 (МВ) в иммобилизованном состоянии (Хит) и в суспензионной культуре, с добавлением антибиотика цефтриаксона (ЦТА) по данным *16S rPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS: индексы α -разнообразия Шеннона (синий) и Симпсона (оранжевый) средние арифметические величины ($n = 6$) с соответствующими значениями стандартного отклонения (а), тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы (б).

Показано, что иммобилизация приводила к росту представленности MGP-бактерий из pp. *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Shinella*, *Devosia*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas* и *Bosea* (табл. 9). 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, Swiontek Brzezinska, 2015]. Данные наблюдения подчеркивают ценность хитозана как материала для иммобилизации ОФМ в контексте решения биотехнологических задач.

Таблица 9. Таксономический состав микробиома АБС модельной лабораторной монокультуры *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 в конце 2 недель инкубации при иммобилизации на хитозане С600 и (или) в присутствии 20 мг/л антибиотика цефтриаксона, описанный по данным *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. Приводятся общие для всех экспериментальных вариантов таксоны.

Класс	Род
Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas</i>
Alphaproteobacteria	<i>Phreatobacter</i>
Alphaproteobacteria	<i>Aminobacter</i>
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>
Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>
Alphaproteobacteria	<i>Shinella</i>
Alphaproteobacteria	<i>Bosea</i>
Bacteroidia	<i>Nubsella</i>
Bacteroidia	<i>Sphingobacterium</i>
Bacteroidia	<i>Flavobacterium</i>
Gammaproteobacteria	<i>Variovorax</i>
Gammaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>
Gammaproteobacteria	<i>Pseudoxanthomonas</i>

3.4. Анализ таксономического состава и биоразнообразия природных АБС из эвтрофицированных экотопов

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 (рис. 7). 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. Для этого был проведен анализ сообществ из пяти водоемов в окрестностях апатитовых разработок предприятия АНОФ-2: четырех постоянных водоемов — «озеро», «залив», «пруд I» и «пруд II», и одного «временного водоема». Необходимо отметить, что из постоянных водоемов можно было выделить две группы, отличающиеся по природе происхождения, гидрологическому режиму и экологической нагрузке на водоемы. В частности, «пруд I» и «пруд II» являются рукотворными водоемами и находятся в непосредственной близости от хвостохранилища АНОФ-2.

Результаты метагеномного анализа методом *16S rRNA* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS показали преобладание в образцах АБС представителей классов Actinobacteria и Alphaproteobacteria (табл. 10). Среди Alphaproteobacteria в АБС из «озера», «залива» и «пруда II» преобладал схожий набор pp. *Rhizobium*, *Brevundimonas*, *Xanthobacter* и *Sphingomonas*. В образцах «прудов» и «временном водоеме» также присутствовали представители класса Gammaproteobacteria. В целом, количество классифицированных ASV в образце «временного водоема» значительно отличалось от остальных образцов. При расчете индексов α -разнообразия было показано, что все образцы, кроме «временного водоема», имеют схожие высокие значения индекса Шеннона (> 3) и низкие значения индекса Симпсона ($< 0,1$), что свидетельствует о высокой степени биоразнообразия и отсутствие явно выраженных доминантных групп в микробном сообществе, соответственно (табл. 11). При этом, для образцов постоянных водоемов не было выявлено статистически достоверных различий в значениях обоих индексов. Необходимо отметить, что данный метод анализа не позволил определить в АБС относительное содержание и таксономическую принадлежность эукариотических ОФМ.

Таблица 10. Таксономический состав микробиома АБС из эвтрофицированных экотопов в окрестности апатитовых разработок по данным *16S рРНК* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS.

Класс	Род	% чтений NGS
АБС — «Озеро»		
Actinobacteria	unclassified Micrococcaceae	8,3
	unclassified Propionibacteriaceae	6,0
	<i>Cellulomonas</i>	5,9
	unclassified Microbacteriaceae	3,2
	<i>Aestuariimicrobium</i>	2,9
	<i>Rarobacter</i>	2,5
	<i>Microbacterium</i>	1,5
	unclassified Micrococcales	2,3
Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium</i>	4,3
	<i>Brevundimonas</i>	2,8
	<i>Xanthobacter</i>	1,5
Bacteroidia	WCHB1-32	11,7
Clostridia	<i>Clostridium sensu stricto</i> 13	9,3
	<i>Romboutsia</i>	4,5
Negativicutes	<i>Pelosinus</i>	3,1
Saccharimonadia	unclassified Saccharimonadaceae	8,0
Verrucomicrobiae	<i>Luteolibacter</i>	0,9
АБС — «Залив»		
Actinobacteria	<i>Cellulomonas</i>	6,4
	unclassified Propionibacteriaceae	4,3
	<i>Rarobacter</i>	3,9
	unclassified Microbacteriaceae	3,7
	<i>Microbacterium</i>	3,1
	unclassified Micrococcales	2,4
Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium</i>	6,3
	<i>Brevundimonas</i>	4,1
	<i>Xanthobacter</i>	2,9
	<i>Sphingomonas</i>	2,9
Bacteroidia	WCHB1-32	16,3
Saccharimonadia	unclassified Saccharimonadaceae	4,0
Verrucomicrobiae	<i>Luteolibacter</i>	2,1
АБС — «Пруд I»		
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	1,6
Bacilli	<i>Exiguobacterium</i>	12,8
Clostridia	<i>Clostridium sensu stricto</i> 13	4,9

Класс	Род	% чтений NGS
	<i>Romboutsia</i>	3,7
Gammaproteobacteria	unclassified Chitinophagaceae	5,4
	<i>Pseudomonas</i>	3,0
Verrucomicrobiae	<i>Luteolibacter</i>	3,2
АБС — «Пруд II»		
Actinobacteria	<i>Paenarthrobacter</i>	9,9
	unclassified Micrococcaceae	9,7
	<i>Rhodococcus</i>	4,3
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	12,9
	<i>Brevundimonas</i>	2,1
	<i>Rhizobium</i>	1,4
Bacilli	<i>Exiguobacterium</i>	1,0
Bacteroidia	<i>Chryseobacterium</i>	3,8
Gammaproteobacteria	unclassified Chitinophagaceae	3,2
Saccharimonadia	unclassified Saccharimonadaceae	6,1
АБС — «Временный водоем»		
Actinobacteria	unclassified Microbacteriaceae	14,8
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	5,7
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	74,6

Таблица 11. Значения индексов α -разнообразия АБС из эвтрофицированных экотопов в окрестности апатитовых разработок по данным *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. Средние арифметические величины ($n = 3$) с соответствующими значениями стандартного отклонения.

Индексы α -разнообразия	«Озеро»	«Залив»	«Пруд I»	«Пруд II»	«Врем. водоем»
Шеннон	3,25±0,53	3,55±0,59	3,84±0,84	3,49±0,38	1,24±0,34
Симпсон	0,09±0,06	0,08±0,05	0,08±0,09	0,07±0,03	0,49±0,08

Оценка степени сходства сообществ по индексу Мориситы также показала существенную разницу между образцами (рис. 20а). Образцы «озера» и «залива» являются наиболее схожими между собой, в то время как «временный водоём» максимально отличается от всех остальных сообществ. Образцы сообществ «пруда I» и «пруда II» отличаются и между собой, и от остальных образцов, но при этом «пруд II» имеет большую степень сходства с «озером» и «заливом». Оценка потенциала исследуемых сообществ к метаболизму элементов минерального питания, в частности обуславливающих толерантность к высоким концентрациям неорганического фосфора в окрестностях

апатитовых разработок, проводили с использованием результатов *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга и алгоритма предсказания представленности метаболических путей PICRUSt2 (рис. 20б). Наиболее представленными искомыми метаболическими путями оказались во «временном водоеме», в то время как сообщество «озера» имело наименьший потенциал к биоизъятию фосфора, по нашим оценкам. Таким образом, при выборе аллохтонного АБС для поиска эффективных штаммов-биоаккумуляторов фосфора, данные два образца не рассматривали. Несмотря на высокий потенциал «временного водоема» к изъятию фосфора, 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. В оценке не учитывали вклад эукариотических ОФМ в толерантность АБС к высоким концентрациям неорганического фосфора, что указывает на необходимость использования дополнительных методов, в том числе для расширенного метагеномного анализа.

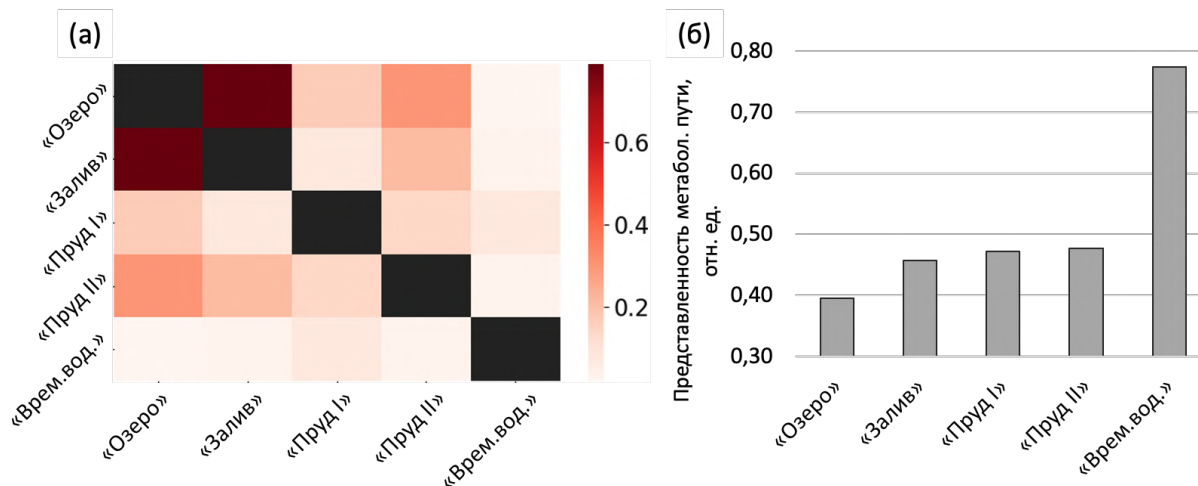


Рис. 20. Сравнение АБС апатитовых разработок на основе данных *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS: тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы (а), рассчитанная представленность путей метаболизма элементов минерального питания по алгоритму PICRUSt2 (б).

Для дальнейшей оценки стабильности и потенциала выбранных АБС к более эффективной очистке сточных вод было проведено сравнение их друг с другом и с АБС активного ила ВОС в исходном виде (содержание P_i в окружающей среде не превышает 10 мг/л) и при инкубации в присутствии стрессора в виде избытка неорганического фосфора (стандартная среда BG-11 содержит 40 мг P_i /л, в данном эксперименте в состав BG-11

содержание фосфата увеличивали до 200 мг P_i/л). Для анализа динамики таксономического состава АБС и их потенциала к фосфорной толерантности параллельно использовались три метагеномных метода: *16S pPHK* ДНК-метабаркодинг на платформе NGS с функциональным анализом с помощью алгоритма PICRUSt2 (табл. 12, 13; рис. 21), секвенирование полного метагенома на платформе NGS с таксономической классификацией с помощью алгоритма MetaPhlAn 4 и функциональным анализом с помощью алгоритма HUMAnN 3 (табл. 14, 15; рис. 22), и секвенирование полного метагенома на платформе ONT с таксономической классификацией с помощью алгоритма BugSeq и функциональным анализом с помощью выравнивания против эталонных профилей генов фосфорной толерантности из геномов прокариот и эукариот (табл. 16, 17; см. также Материалы и методы и рис. 23).

При анализе динамики АБС методом *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS отмечалось изменение таксономического состава всех сообществ под действием стрессора — избытка экзогенного P_i (табл. 12 и 13). В АБС из «залива» произошло снижение биоразнообразия и повышение степени доминирования отдельных таксонов микроорганизмов, в частности pp. *Blastomonas*, *Rhizobium* и *Roseococcus*, при этом pp. *Rhizobium* и *Brevundimonas* сохраняются в составе микробиома во всех случаях. В АБС из «пруда II» также происходит снижение биоразнообразия и доминирование ранее не выявляемой в природном сообществе цианобактерии из р. *Nodosilinea*, в то время как pp. *Rhizobium* и *Brevundimonas* также продолжают выявляться в сообществе, несмотря на действие стрессора. В АБС активного ила ВОС происходят наиболее видимые изменения с увеличением силы стрессора: происходит смена доминантных представителей цианобактерий с pp. *Planktothrix* и *Tychonema* на pp. *Geitlerinema* и *Limnothrix*, повышается биоразнообразие сообщества, а также исчезают такие характерные представители сообществ активного ила как р. *Candidatus Accumulibacter* и *Methanosaeta*. В то же время при повышении концентрации экзогенного P_i в микробиоме сообщества начинают выявляться pp. *Blastomonas*, *Rhizobium* и *Brevundimonas*, как и в образцах АБС из эвтрофицированных экотопов.

Таблица 12. Таксономический состав микробиома АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л) по данным *16S рРНК* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. Представители ОФМ: голубой — филум Cyanobacteriota.

Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS
АБС — «Залив»					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
WCHB1-32	16,3	<i>Blastomonas</i>	41,1	<i>Blastomonas</i>	27,2
<i>Cellulomonas</i>	6,4	<i>Rhizobium</i>	19,4	<i>Hydrogenophaga</i>	21,1
<i>Rhizobium</i>	6,3	<i>Roseococcus</i>	16,8	<i>Bosea</i>	18,7
unclassified	4,3	<i>Paludisphaera</i>	11,0	<i>Rhizobium</i>	12,1
Propionibacteriaceae	4,3	<i>Bosea</i>	5,2	<i>Paludisphaera</i>	10,0
<i>Brevundimonas</i>	4,1	<i>Brevundimonas</i>	2,9	<i>Roseococcus</i>	8,6
unclassified	4,0	<i>Rhizobacter</i>	1,7	<i>Brevundimonas</i>	1,6
Saccharimonadaceae	4,0	<i>Hydrogenophaga</i>	1,6	<i>Rhizobacter</i>	0,4
<i>Rarobacter</i>	3,9				
Microbacteriaceae	3,7				
<i>Microbacterium</i>	3,1				
<i>Sphingomonas</i>	2,9				
<i>Xanthobacter</i>	2,9				
unclassified	2,4				
Micrococcales	2,4				
<i>Luteolibacter</i>	2,1				
АБС — «Пруд II»					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Sphingomonas</i>	12,9	<i>Nodosilinea</i>	31,6	<i>Nodosilinea</i>	50,5
<i>Paenarthrobacter</i>	9,9	<i>Aquiflexum</i>	24,9	<i>Arenimonas</i>	15,4
Micrococaceae	9,7	<i>Arenimonas</i>	24,2	<i>Brevundimonas</i>	9,5
unclassified	6,1	<i>Microcella</i>	7,1	<i>Rhizobacter</i>	7,0
Saccharimonadaceae	6,1	<i>Blastomonas</i>	2,9	<i>Microcella</i>	6,0
<i>Rhodococcus</i>	4,3	<i>Rhizobacter</i>	2,5	<i>Sphingopyxis</i>	3,5
<i>Chryseobacterium</i>	3,8	<i>Sphingopyxis</i>	2,5	<i>Acidimicrobidae bacterium</i>	2,9
Chitinophagaceae	3,2	<i>Rhizobium</i>	2,0	<i>Bosea</i>	1,6
<i>Brevundimonas</i>	2,1	<i>Acidimicrobidae bacterium</i>	1,6	<i>Seohaecicola</i>	1,3
<i>Rhizobium</i>	1,4	<i>Bosea</i>	0,7	<i>Rhizobium</i>	1,1

Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS
АБС — ВОС					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Planktothrix</i>	35,1	<i>Geitlerinema</i>	39,4	<i>Geitlerinema</i>	19,7
<i>Rhodofera</i>	18,4	<i>Salinarimonas</i>	22,2	<i>Alishewanella</i>	18,3
<i>Tychonema</i>	12,1	<i>Limnothrix</i>	17,5	<i>Salinarimonas</i>	15,5
<i>Trichococcus</i>	4,8	<i>Seohaecicola</i>	10,0	<i>Parvibaculum</i>	13,1
<i>Terrimonas</i>	4,7	<i>Brevundimonas</i>	2,2	<i>Aquiflexum</i>	7,9
<i>Halomonas</i>	4,4	<i>Blastomonas</i>	1,5	<i>Microcella</i>	7,3
<i>Candidatus Accumulibacter</i>	4,3	<i>Microcella</i>	1,4	<i>Seohaecicola</i>	6,1
<i>Methylothera</i>	3,7	<i>Alishewanella</i>	1,3	<i>Roseococcus</i>	4,8
<i>Halomonas</i>	2,6	<i>Rhizobacter</i>	1,0	<i>Blastomonas</i>	4,6
<i>Bacteroidetes bacterium</i>	2,6	<i>Rhizobium</i>	0,9	<i>Brevundimonas</i>	1,7
<i>Rhodocyclaceae bacterium</i>	2,5				
<i>Janibacter</i>	1,9				
<i>Leptolinea</i>	1,4				
<i>Methanosaeta</i>	1,1				

Сравнение АБС, инкубированных при действии «фосфорного» стрессора разной интенсивности, по индексу Мориситы подтвердило, что воздействие стрессора неизменно приводит к значительным отличиям от интактных АБС (рис. 21а). При этом разница эффектов двух уровней интенсивности стрессора (40 и 200 мг P_i/л) была минимальной для АБС из «залива» и «пруда II», но для АБС активного ила ВОС она была более значительной. По-видимому, при действии столь интенсивного стрессора исследованные АБС не достигали стационарного состояния в течение периода наших наблюдений. Можно также отметить, что более интенсивной стрессовой воздействию на АБС приводило к повышению сходства их микробиомов за счет наличия общих таксонов (pp. *Blastomonas*, *Rhizobium* и *Brevundimonas*).

Таблица 13. Значения индексов α -разнообразия АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л), рассчитанные по данным *16S рРНК* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. Средние арифметические величины ($n = 3$) с соответствующими значениями стандартного отклонения.

Индексы α -разнообразия	Природное АБС	АБС в среде BG-11	АБС в среде BG-11+P
АБС — «Залив»			
Шеннон	3,55±0,59	2,30±0,16	2,15±0,16
Симпсон	0,08±0,05	0,14±0,03	0,15±0,02
АБС — «Пруд II»			
Шеннон	3,49±0,38	1,54±0,51	1,62±0,29
Симпсон	0,07±0,03	0,38±0,19	0,31±0,05
АБС — ВОС			
Шеннон	2,10±0,05	3,37±0,45	3,00±0,27
Симпсон	0,19±0,02	0,06±0,03	0,12±0,06

Функциональный анализ результатов *16S рРНК* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS исследуемых АБС под действием разного уровня стрессора выявил рост представленности в метагеноме метаболических путей, утилизирующих неорганические нутриенты, с повышением концентрации экзогенного P_i в среде для сообществ из «залива» и «пруда II» (рис. 21б). Потенциал к биоизъятию фосфора у обоих АБС при максимальной исследованной интенсивности стрессора превышает таковой у интактных АБС активного ила ВОС. При этом потенциал данного сообщества также растет с ростом интенсивности стрессового воздействия, но затем снижается, что может свидетельствовать о нестабильности структуры сообщества. Необходимо отметить, что эти оценки также не учитывали эукариотических представителей ОФМ, способных вносить существенный вклад в потенциальную толерантность АБС к высоким концентрациям фосфата в среде.

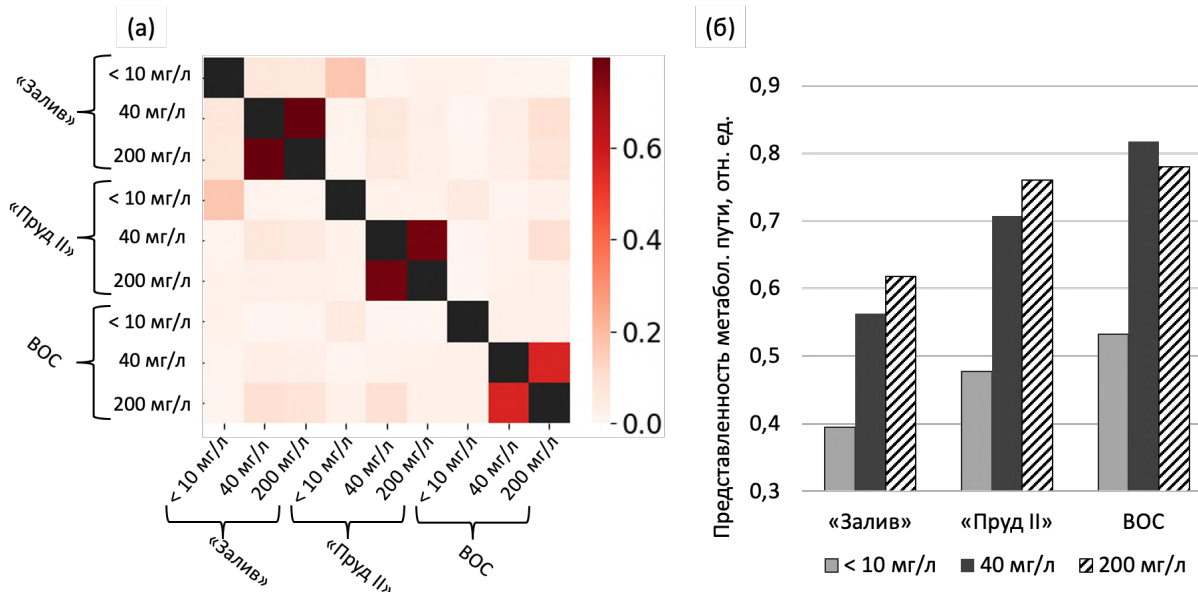


Рис. 21. Сравнение АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л) на основе данных *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS: тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы (а), рассчитанная представленность путей метаболизма элементов минерального питания по алгоритму PICRUSt2 (б).

При анализе динамики АБС под действием стрессора — избытка P_i — методом секвенирования полного метагенома на платформе NGS удалось провести таксономическую классификацию большинства компонентов микробиома до уровня вида (табл. 14). Стоит отметить, что для АБС из образцов «залива» и «пруда II» наблюдали схожая картина с результатами, полученными с помощью *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. В частности, в микробиоме присутствовали те же представители рр. *Blastomonas*, *Rhizobium* и *Brevundimonas*, классифицированные как *Blastomonas fulva*, *Rhizobium rhizophilum* и *Brevundimonas bullata*, тогда как другие таксоны отличаются на уровне рода. Помимо этого, при росте интенсивности стрессора у АБС из образцов «залива» и «пруда II» наблюдали такую же тенденцию к снижению биоразнообразия и увеличению выраженности доминант (табл. 15). Однако анализ данным методом не показал развития в АБС «пруда II» цианобактерий при повышении уровня стрессора.

Секвенирование метагенома АБС активного ила ВОС на платформе ONT дало иные результаты по сравнению с *16S pPHK* ДНК-метабаркодингом на платформе NGS: биоразнообразие микробиома снижалось при повышении концентрации экзогенного P_i в

среде (табл. 14 и 15). При этом использованием полных чтений позволило классифицировать ранее наблюдаемых в данном АБС микроорганизмов из рр. *Planktothrix*, *Methanothrix* и *Trichococcus* — *Planktothrix sertae*, *Methanothrix soehngenii* и *Trichococcus flocculiformis*, а также обнаружить типичный для активного ила организм *Candidatus Competibacter denitrificans*. Результаты сравнения образцов АБС по таксономической классификации с помощью индекса Мориситы были сходными с результатами *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS: АБС, инкубированные с избытком экзогенного P_i , значительно отличались от интактного сообщества, но становились больше схожими между собой (рис. 22а). Исключение составило АБС активного ила, оказавшееся не похожим ни на свое исходное состояние, ни на другие АБС.

Таблица 14. Значения индексов α -разнообразия АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л), рассчитанные по данным секвенирования полного метагенома на платформе NGS.

Индексы α -разнообразия	Природное АБС	АБС в среде BG-11	АБС в среде BG-11+P
АБС — «Залив»			
Шеннон	2,44	0,62	0,73
Симпсон	0,13	0,72	0,66
АБС — «Пруд II»			
Шеннон	2,54	1,39	1,14
Симпсон	0,13	0,33	0,37
АБС — ВОС			
Шеннон	3,63	1,74	1,48
Симпсон	0,05	0,25	0,27

Таблица 15. Таксономический состав микробиома АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л) по данным секвенирования полного метагенома на платформе NGS. Представители ОФМ (филум Cyanobacteriota) выделены цветом.

Вид	% чтений NGS	Вид	% чтений NGS	Вид	% чтений NGS
АБС — «Залив»					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Pseudomonas zeae</i>	19,3	<i>Blastomonas fulva</i>	84,5	<i>Blastomonas fulva</i>	80,3
<i>Lacipirellula limnantheis</i>	17,3	<i>Chryseobacterium aquaticum</i>	6,6	<i>Rhizobium rhizophilum</i>	10,0
<i>Mesorhizobium qingshengii</i>	15,2	<i>Rhizobium rhizophilum</i>	6,1	<i>Paludisphaera soli</i>	4,3
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	9,4	<i>Mycolicibacterium</i> sp. CR10	1,9	<i>Chryseobacterium aquaticum</i>	4,1
<i>Hyphomicrobium facile</i>	4,3	<i>Paludisphaera soli</i>	0,8	<i>Mycolicibacterium</i> sp. CR10	1,3
<i>Gemmatimonas groenlandica</i>	3,3	<i>Bosea</i> sp. RAC05	0,1	<i>Aquibium microcysteis</i>	0,01
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	3,1	<i>Aquincola tertiaricarbonis</i>	0,1		
<i>Sphingopyxis solisilvae</i>	2,7	<i>Brevundimonas bullata</i>	0,02		
<i>Chryseobacterium</i> sp.	2,4	<i>Aquibium microcysteis</i>	0,02		
<i>Hyphomicrobiales bacterium</i>	2,4				
<i>Microvirga antarctica</i>	2,0				
<i>Kineosporia</i> sp. A 224	1,7				
<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i> VA2	1,7				
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	1,5				
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1,4				
<i>Pseudomonas mohnii</i>	1,2				
<i>Brevundimonas bullata</i>	1,1				

Вид	% чтений NGS	Вид	% чтений NGS	Вид	% чтений NGS
АБС — «Пруд II»					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Escherichia coli</i>	18,4	<i>Rhizobium rhizophilum</i>	51,3	<i>Rhizobium rhizophilum</i>	45,0
<i>Brevundimonas bullata</i>	15,9	<i>Pseudonocardia alni</i>	21,2	<i>Sphingopyxis solisilvae</i>	39,0
<i>Tepidiforma bonchosmolovskayae</i>	13,8	<i>Sphingopyxis solisilvae</i>	12,2	<i>Pseudonocardia alni</i>	12,4
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	9,2	<i>Paludisphaera soli</i>	8,4	<i>Bosea sp. RAC05</i>	1,8
<i>Cutibacterium acnes</i>	7,0	<i>Blastomonas fulva</i>	4,0	<i>Devosia limi</i>	1,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,9	<i>Bosea sp. RAC05</i>	2,0	<i>Blastomonas fulva</i>	0,6
<i>Pontibacter amylolyticus</i>	4,2	<i>Roseomonas oleicola</i>	0,5		
<i>Arthrobacter sp. TB 26</i>	3,3	<i>Devosia limi</i>	0,4		
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	3,0				
<i>Pseudomonas mandelii</i>	1,8				
<i>Afipia sp. OHSU II C1</i>	1,8				
<i>Hydrothalea flava</i>	1,3				
<i>Priestia megaterium</i>	1,0				
АБС — ВОС					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Candidatus Competibacter denitrificans</i>	5,4	<i>Thauera sp. 27</i>	40,1	<i>Leptolyngbya boryana</i>	37,2
<i>Rhodobacter sp. HX 7 19</i>	2,7	<i>Hyphomonas polymorpha</i>	20,2	<i>Nitrospira sp. ND1</i>	25,5
<i>Thermomonas SGB62036</i>	2,2	<i>Alishewanella aestuarii</i>	18,8	<i>Eliaoraea tepidiphila</i>	25,2
<i>Phycoccus elongatus</i>	1,7	<i>Taishania pollutisoli</i>	5,4	<i>Roseomonas alkaliterrae</i>	6,5
<i>Candidatus Microthrix SGB36776</i>	1,7	<i>Kamptonema sp. PCC 6506</i>	5,0	<i>Alishewanella aestuarii</i>	2,7
<i>Methanothrix soehngeni</i>	1,5	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	2,6	<i>Gemmataceae bacterium</i>	0,9

Вид	% чтений NGS	Вид	% чтений NGS	Вид	% чтений NGS
<i>Trichococcus flocculiformis</i>	1,4	<i>Armatimonadetes bacterium</i> Uphv1 Ar2	0,9	<i>Pseudanabaena</i> sp. SR411	0,4
<i>Candidatus Microthrix parvicella</i>	1,2	<i>Sphingopyxis solisilvae</i>	0,9		
<i>Planktothrix sarta</i>	0,7				
<i>Ornithinibacter</i> SGB87564	0,5				
Burkholderiales unclassified SGB103074	0,5				
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	0,4				

Также проводили функциональный анализ отсквенированного на платформе NGS метагенома АБС, инкубированных с разной концентрацией P_i (т.е. при действии стрессора разной интенсивности). Результаты показали снижение представленности метаболических путей утилизации элементов минерального питания при повышении концентрации экзогенного P_i в среде для сообществ из «залива» и «пруда II» (рис. 22б). Для АБС активного ила ВОС потенциальная толерантность к P_i (по результатам анализа метагенома) выросла при концентрации экзогенного P_i в среде 40 мг /л и вернулась к исходным значениям при концентрации 200 мг/л.

Разница в результатах разными методами биоинформатического анализа может быть связана с особенностями алгоритмов таксономической классификации и функционального анализа, использующих k-мерный подход для анализа необработанных прочтений метагенома без сборки метагеномно-собранных геномов (MAG). Хотя прочтения, полученные на платформах технологии NGS методом синтеза точнее и, казалось бы, позволяют осуществлять таксономическую классификацию до уровня вида, малая длина NGS-прочтений всё же ограничивает точность классификации и количественного анализа микробиомов. Причина заключается в том, что необходимые для классификации локусы ДНК-баркодов или наборов других генов-маркеров, как правило, значительно превышают по длине возможности NGS. И несмотря на использование k-мерного подхода для соотнесения полученных прочтений с базами данных, короткая длина последовательностей в значительном количестве случаев может приводить либо к неправильному результату,

либо к отсутствию совпадений. Следует особо отметить, что данный метод не выявил ни одного представителя эукариотических ОФМ в исследуемых образцах (несмотря на их явное присутствие, см. рис. 24 и параграф 3.5), что может быть указывать на несовершенство пайплайнов MetaPhlan 4 и HUMAnN 3, в частности на неполноту использованных в них эталонных баз данных, в частности базы алгоритма Kraken2 и базы MetaCyc [Alneberg и др., 2014; Blanco-Míguez и др., 2023]. Для повышения точности подхода классификации прочтений, полученных на платформах NGS, требуется проводить сборку до уровня контигов [Marcelino и др., 2020; Krinos и др., 2024].

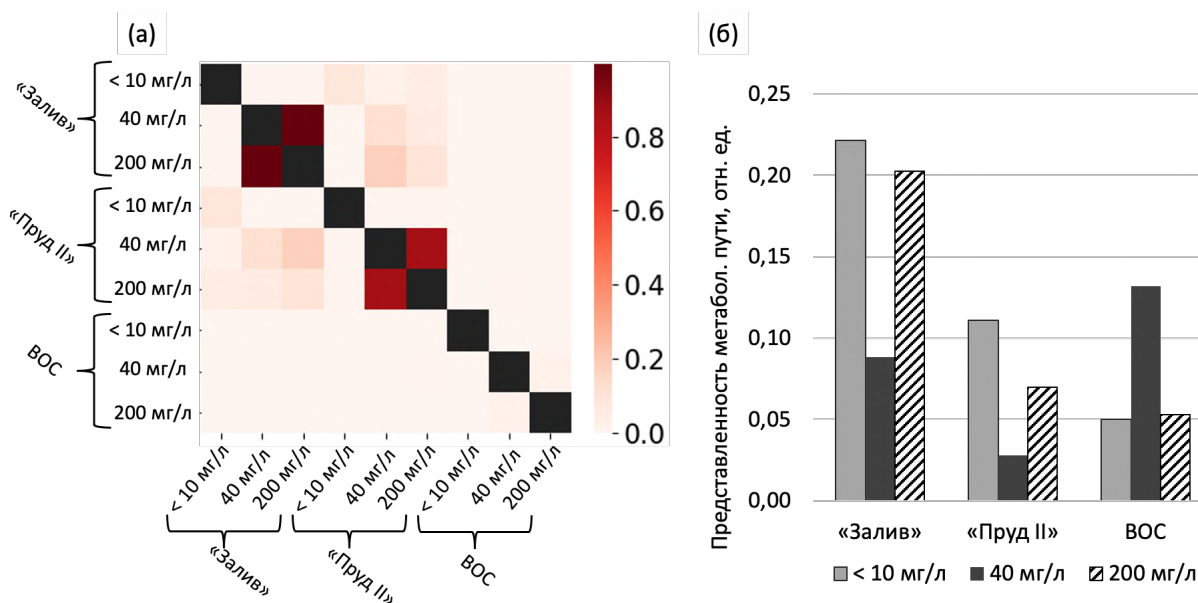


Рис. 22. Сравнение АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л) на основе данных секвенирования полного метагенома на платформе NGS: тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы (а), рассчитанная представленность путей метаболизма элементов минерального питания по алгоритму HUMAnN 3 (б).

При анализе динамики тех же АБС в описанных выше условиях (избыток P_i) методом секвенирования полного метагенома на платформе ONT также удалось провести таксономическую классификацию большинства компонентов микробиома до уровня вида (табл. 16). Стоит отметить, что для АБС из образцов «залива» и «пруда II» получены результаты, сходные с анализом результатов NGS-секвенирования обоими вышеупомянутыми методами. А именно, выявили снижение биоразнообразия АБС при повышении интенсивности стрессора (табл. 17) и обнаружили представителей пр.

Blastomonas, *Rhizobium* и *Brevundimonas* — *Blastomonas fulva*, *Rhizobium* sp. WL3 и *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas naejangsanensis*. Алгоритмы, реализованные на платформе BugSeq, также выявили большее разнообразие ОФМ в исследуемых АБС, обнаружив и эукариотические микроводоросли. В образцах АБС из «залива» при повышении интенсивности стрессора (концентрации экзогенного P_i) исчезают представители цианобактерий из pp. *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Calothrix*, *Nodularia* и *Leptolyngbya*, а среди микроводорослей начинает доминировать *Chlamydomonas applanata*. В образцах АБС «пруда II» с ростом концентрации P_i цианобактерий из pp. *Nodosilinea* и *Leptolyngbya* переходят из категории мало представленных в доминирующие (в среде с 40 мг P_i /л), но при 200 мг P_i /л их представленность снижается. В образцах АБС активного ила ВОС происходит повышение биоразнообразия при максимальной концентрации P_i , что сопровождается развитием ОФМ: цианобактерий *Microcoleus vaginatus*, *Oscillatoria nigroviridis* и *Pseudanabaena galeata*, а также микроводорослями *Tetradismus obliquus*, *Edaphochlamys debaryana*, *Uronema* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Desmodesmus abundans*.

При сравнении АБС по таксономической классификации между с помощью индекса Мориситы отмечено сходство образцов АБС «залива» и активного ила ВОС независимо от интенсивности стрессора (возможно, благодаря учету вклада эукариотических ОФМ при сравнении; рис. 23а). В то же время, нативное АБС «пруда II» сходно с нативным АБС «залива», но это сходство слабело с повышением концентрации экзогенного P_i и развитием цианобактерий.

Таблица 16. Таксономический состав микробиома АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л) по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT. Представители ОФМ помечены цветом: голубой — филум Cyanobacteriota, зеленый — филум Chlorophyta.

Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений
АБС — «Залив»					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Lacipirellula limnantheis</i>	17,1	<i>Chlamydomonas applanata</i>	60,2	<i>Chlamydomonas applanata</i>	24,9
<i>Nostoc</i> sp.	14,6	<i>Rhizobium</i> sp. WL3	8,4	<i>Bosea</i> sp. RAC05	14,2
<i>Bracteacoccus minor</i>	6,7	<i>Blastomonas</i> sp. RAC04	8,0	<i>Blastomonas</i> sp. RAC04	10,8
<i>Chlorella</i> sp.	6,5	<i>Blastomonas fulva</i>	6,7	<i>Hydrogenophaga</i> sp. RAC07	9,9
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	5,7	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	2,7	<i>Blastomonas fulva</i>	8,6
<i>Hyphomicrobium</i> sp. ghe19	4,4	<i>Sediminicoccus rosea</i>	2,6	<i>Rhizobium</i> sp. WL3	7,7
<i>Corallocooccus coralloides</i>	3,3	<i>Planctomyces</i> sp. SH-PL62	1,2	<i>Sediminicoccus rosea</i>	1,7
<i>Gemmatimonas groenlandica</i>	2,9	<i>Bosea</i> sp. RAC05	1,1	<i>Planctomyces</i> sp. SH-PL62	1,5
<i>Cylindrospermum</i> sp.	1,9	<i>Brevundimonas bullata</i>	0,6	<i>Roseococcus microcysteis</i>	0,4
<i>Chlorococcum tatrense</i>	1,8	<i>Tetrademus obliquus</i>	0,5	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	0,4
<i>Calothrix</i> sp.	1,5			<i>Brevundimonas bullata</i>	0,3
<i>Chlamydomonas</i> sp.	1,4				
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	1,3				
<i>Corallocooccus</i> sp. NCRR	1,2				
<i>Desulfosporosinus meridiei</i>	1,0				
<i>Nodularia</i> sp.	0,8				
<i>Cutibacterium acnes</i>	0,8				
<i>Monoraphidium</i> sp.	0,8				
<i>Escherichia coli</i>	0,8				
<i>Corallocooccus</i> sp. EGB	0,8				
<i>Mesorhizobium terrae</i>	0,6				

Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений
<i>Mesorhizobium loti</i>	0,6				
<i>Phycoccus</i> sp. HDW14	0,5				
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0,5				
<i>Tepidiforma bonchosmolovskayae</i>	0,5				
<i>Leptolyngbya</i> sp.	0,4				
<i>Rhizobium</i> sp. TH2	0,4				
<i>Bradyrhizobium sediminis</i>	0,4				
<i>Microbacterium aurugineum</i>	0,3				
АБС — «Пруд II»					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Tumebacillus avium</i>	9,7	<i>Nodosilinea</i> sp. E11	37,3	<i>Microcella humidisoli</i>	19,7
<i>Microbacterium oxydans</i>	8,1	<i>Sphingopyxis</i> sp. EG6	9,3	<i>Arenimonas daejeonensis</i>	12,4
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	6,8	<i>Elioraea tepida</i>	8,6	<i>Pseudonocardia alni</i>	7,5
<i>Pseudonocardia</i> sp. AL041005-10	6,0	<i>Rhizobium</i> sp. WL3	8,1	<i>Brevundimonas</i> sp.	6,6
<i>Escherichia coli</i>	5,4	<i>Blastomonas</i> sp. RAC04	4,5	<i>Brevundimonas pondensis</i>	5,9
<i>Hyphomicrobium</i> sp. ghe19	3,6	<i>Microcella humidisoli</i>	4,1	<i>Pseudonocardia</i> sp. AL041005-10	5,7
<i>Microbacterium</i> sp. PAMC22086	2,9	<i>Blastomonas fulva</i>	3,7	<i>Brevundimonas bullata</i>	3,9
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	2,8	<i>Leptolyngbya</i> sp. BL0902	3,7	<i>Sphingopyxis</i> sp. EG6	3,8
<i>Cutibacterium acnes</i>	2,8	<i>Lacipirellula parvula</i>	2,1	<i>Bosea</i> sp. RAC05	3,4
<i>Arthrobacter</i> sp.	2,8	<i>Roseomonas fluvialis</i>	2,0	<i>Elioraea tepida</i>	2,9
<i>Pseudomonas</i> sp. MPC6	2,5	<i>Lacipirellula limnantheis</i>	1,7	<i>Rhizobium</i> sp. WL3	2,5
<i>Bradyrhizobium symbiodeficiens</i>	1,8	<i>Sphingopyxis</i> sp. FD7	1,2	<i>Nodosilinea</i> sp. E11	2,5
<i>Oerskovia</i> sp. KBS0722	1,5	<i>Bosea</i> sp. RAC05	1,1	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	1,7
<i>Mycolicibacterium frederiksbergense</i>	1,5				
<i>Priestia megaterium</i>	1,4				

Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений
<i>Pseudomonas mandelii</i>	1,3				
<i>Tepidiforma bonchosmolovskayae</i>	1,3				
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	1,2				
<i>Brevundimonas pondensis</i>	1,2				
<i>Methylomonas rapida</i>	1,2				
<i>Rhodococcus jostii</i>	0,9				
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	0,9				
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	0,9				
<i>Devosia beringensis</i>	0,9				
<i>Leptolyngbya sp.</i>	0,5				
АБС — БОС					
Природное АБС		АБС в среде BG-11		АБС в среде BG-11+P	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,2	<i>Leptolyngbya boryana</i>	10,6	<i>Tetrademus obliquus</i>	12,0
<i>Candidatus Promineifilum breve</i>	2,9	<i>Planktothrix agardhii</i>	4,4	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	4,5
<i>Ottowia testudinis</i>	2,6	<i>Pseudanabaena galeata</i>	4,2	<i>Microcella humidisoli</i>	3,8
<i>Microcoleus vaginatus</i>	2,2	<i>Agrobacterium sp. MA01</i>	3,7	<i>Roseococcus microcystis</i>	3,5
<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	1,7	<i>Tetrademus obliquus</i>	3,0	<i>Roseomonas fluviialis</i>	2,6
<i>Chitinophagaceae bacterium</i>	1,4	<i>Aquidulcibacter paucihalophilus</i>	2,4	<i>Pseudanabaena galeata</i>	1,9
<i>Thermomonas carbonis</i>	1,3	<i>Characium saccatum</i>	2,2	<i>Sediminicoccus rosea</i>	1,7
<i>Trichococcus flocculiformis</i>	1,0	<i>Edaphochlamys debaryana</i>	2,1	<i>Aquihabitans sp. G128</i>	1,5
<i>Methanothrix soehngeni</i>	1,0	<i>Blastomonas sp. RAC04</i>	1,9	<i>Microcoleus vaginatus</i>	1,2
<i>Fuscovulum blasticum</i>	0,8	<i>Aquiflexum balticum</i>	1,9	<i>Blastomonas sp. SL216</i>	1,0
<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	0,6	<i>Microcella humidisoli</i>	1,8	<i>Tautonia plasticadhaerens</i>	0,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,6	<i>Blastomonas fulva</i>	1,6	<i>Blastomonas sp. RAC04</i>	0,9

Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений
<i>Mycolicibacterium fallax</i>	0,5	<i>Microcoleus vaginatus</i>	1,6	<i>Edaphochlamys debaryana</i>	0,9
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	0,4	uncultured	1,5	<i>Uronema</i> sp. FACHB-2429	0,9
<i>Variovorax paradoxus</i>	0,4	<i>Erythrobacter</i> sp.	1,5	<i>Amoebophilidium protococcarum</i>	0,8
<i>Caldilinea aerophila</i>	0,3	<i>Roseococcus microcystis</i>	1,5	<i>Pirellula</i> sp. SH-Sr6A	0,8
<i>Bradyrhizobium sediminis</i>	0,3	<i>Porphyrobacter</i> sp. ULC335	1,2	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	0,7
		<i>Sandaracinobacteroides saxicola</i>	1,0	<i>Aquidulcibacter paucihalophilus</i>	0,7
		<i>Brevundimonas</i> sp. M20	0,9	<i>Blastomonas fulva</i>	0,7
		<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	0,8	<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,6
				<i>Desmodesmus abundans</i>	0,6

Таблица 17. Значения индексов α -разнообразия АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л), рассчитанные по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT.

Индексы α -разнообразия	Природное АБС	АБС в среде BG-11	АБС в среде BG-11+P
АБС — «Залив»			
Шеннон	3,53	2,01	2,60
Симпсон	0,11	0,31	0,15
АБС — «Пруд II»			
Шеннон	3,99	1,96	1,17
Симпсон	0,06	0,26	0,60
АБС — ВОС			
Шеннон	4,58	3,51	5,19
Симпсон	0,04	0,09	0,01

Секвенированные на платформе ONT полные метагеномы исследуемых АБС, инкубируемых с разной концентрации P_i , также подвергали функциональному анализу. Выявлен рост представленности генов, связанных с толерантностью к избытку экзогенного P_i , у АБС из образцов «залива» и ВОС (рис. 236). У АБС из «пруда II» происходит рост этого показателя при концентрации экзогенного P_i в среде 40 мг/л и снижение — при

концентрации 200 мг/л, что отражает динамику представленности ОФМ в исследованных АБС. У АБС из образца «залив» отмечали максимальный рост представленности вышеупомянутой категории генов в метагеномных чтениях эукариотических ОФМ, что также подчеркивает значение данной функциональной группы микроорганизмов для формирования толерантности АБС к высокой концентрации фосфата.

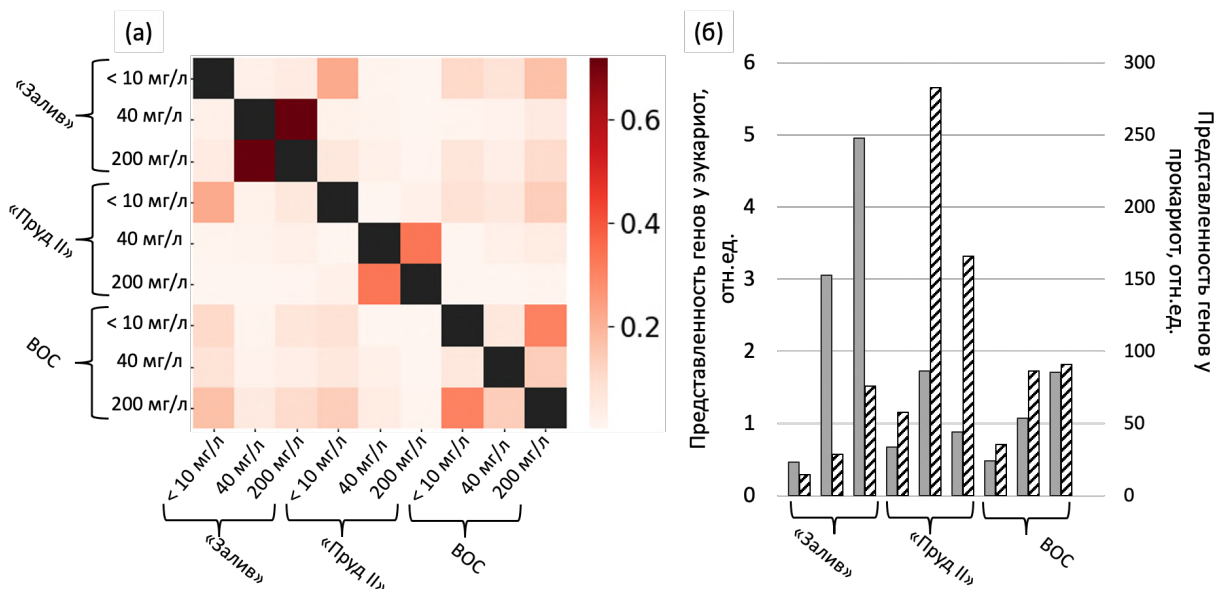


Рис. 23. Сравнение АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями экзогенного P_i в среде (BG-11 — 40 мг/л, BG-11+P — 200 мг/л) на основе данных секвенирования полного метагенома на платформе ONT: тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы (а), обилие генов, связанных с биоаккумуляцией фосфора: серый — гены из геномов эукариот, штрих — гены из геномов прокариот (б).

При сравнении результатов метагеномного анализа, полученных методами *16S pRNAK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS, а также секвенирования полного метагенома на платформах NGS и ONT, необходимо отметить явное преимущество последней технологии для анализа АБС. Несмотря на широкое распространение метода *16S pRNAK* ДНК-метабаркодинга, в том числе в исследованиях сообществ ОФМ, его явным недостатком остается отсутствие возможности классифицировать эукариотических ОФМ в сообществе, которые при этом вносят определяющий вклад в функционирование всей системы. Помимо этого, *16S pRNAK* ДНК-метабаркодинг не позволяет делать прямой анализ содержания генов искомого метаболического пути, а вместо этого такие алгоритмы как PICRUST2 могут лишь косвенно предсказать состав метаболических путей в сообществе,

опираясь на априорные знания о наличии этих путей в соответствующих таксонах. При этом, необходимо учитывать тот факт, что проводимая при пробоподготовке библиотек для секвенирования ПЦР может приводить к изменению отношения количества ДНК разных таксонов из-за неравномерного прохождения реакции. Вследствие этого, количественные оценки представленности метаболических путей также могут нести в себе данную ошибку. Само же таксономическое разрешение *16S rPHK* ДНК-метабаркодинга также ограничено длиной чтений, получаемых на платформах NGS, и позволяет прочитать лишь последовательности ДНК-баркода, в данном случае V3-V4 гена *16S rPHK*, что ограничивает таксономическое разрешение метода, в лучшем случае, уровнем родов. Несмотря на эти недостатки, метод *16S rPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS является ценным шагом в исследовании АБС, позволяя делать первичные оценки разнообразия сообществ перед применением более трудных и ресурсозатратных методов. Секвенирование полного метагенома АБС принципиально преодолевает недостатки *16S rPHK* ДНК-метабаркодинга, однако имеет свои особенности, связанные с биоинформатической обработкой данных. Так, секвенирование метагенома на платформах NGS не позволяет проводить ни надежную классификацию, ни функциональную аннотацию необработанных прочтений ввиду их короткой длины, оставаясь при этом эталонным методом для получения метагеномно-собранных геномов из сложных биологических сообществ. Наилучшие результаты при данном подходе продемонстрированы платформами 3-го поколения секвенирования, в частности ONT. Данная технология производит прочтения в теории неограниченной длины, для таксономической классификации которых можно использовать более точные алгоритмы выравнивания против эталонных баз данных или самостоятельно собранных наборов искомым последовательностей — профилей [Kerkhof и др., 2017; Portik, Brown, Pierce-Ward, 2022]. Хотя первые продукты данной технологии были известны высокими показателями ошибок при секвенировании (до 10%), в настоящее время данные технологии существенно продвинулись в сторону повышения точности. Таким образом, метод секвенирования полного метагенома на платформе ONT становится перспективным инструментом для решения задач экологического мониторинга и функциональной характеристики АБС в биотехнологических системах, сохраняя баланс между широкой доступностью метода,

точностью количественного и качественного анализа, а также ресурсозатратами на биоинформатическую обработку данных [Hatfield и др., 2020; Loos van der и др., 2021].

При инкубации АБС активного ила и апатитовых разработок в условиях фосфорной эвтрофикации было обнаружено, что в первом происходит развитие микроводорослей, в том числе нитчатых, способных к внутриклеточному накоплению полифосфатов (рис. 24); в АБС из апатитовых разработок наблюдали активный рост зелёных микроводорослей и нитчатых цианобактерий, также обладающих выраженной способностью к аккумуляции полифосфатов. Данные результаты дополнительно подтверждают возможность использования АБС из экотопов апатитовых разработок как источника штаммов ОФМ и ассоциированных с ними бактерий для создания искусственных сообществ с целью очистки сточных вод от избытков фосфора [Gonçalves, Pires, Simões, 2017; Toyama и др., 2018; Toyama и др., 2019; Aditya и др., 2022].

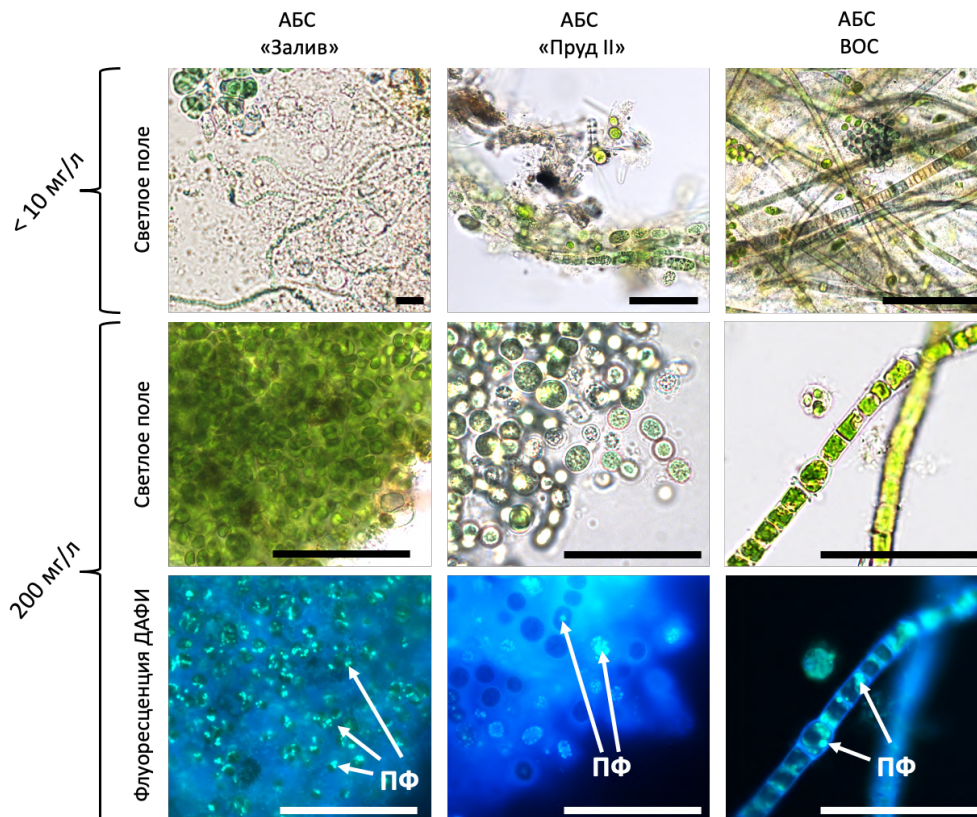


Рис. 24. Микроскопические изображения АБС эвтрофицированных экотопов («Залив» и «Пруд II») и активного ила ВОС в природных сообществах и при инкубации с повышенными концентрациями P_i в среде (BG-11+P — 200 мг/л), а также визуализация полифосфатов в клетках, инкубированных в тех же условиях. Обозначения: ПФ — полифосфаты. Масштабный отрезок — 10 мкм.

Сравнительную оценку потенциальной способности к биоизъятию P_i из сточных вод аллохтонными и автохтонными АБС, 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, чем на микробиом АБС апатитовых разработок. Несмотря на рост биоразнообразия АБС в условиях фосфорной эвтрофикации, из АБС активного ила исчезали исходно присутствовавшие в нем цианобактерии и полифосфат-аккумулирующие бактерии, наиболее характерные для данного типа сообществ [Eikelboom, 1975; Qiu и др., 2019; Izadi, Izadi, Eldyasti, 2020; Romanis, Pearson, Neilan, 2021]. В то же время структура АБС апатитовых разработок не претерпела значительных изменений, в них сохранялись исходно обитавшие там представители MGP-бактерий (бактерий, стимулирующих рост микроводорослей) из pp. *Brevundimonas*, *Bosea* и *Rhizobium*, характерные для микробиома фикософеры и цианософеры [Kim и др., 2014; Krohn-Molt и др., 2013; Toyama и др., 2018; Vale и др., 2023; Zheng и др., 2023].

Тенденция динамики микробиома во всех рассмотренных АБС, в первую очередь, указывает на конкурентное преимущество ОФМ в условиях фосфорной эвтрофикации при наличии источника света, за счет механизмов избыточного поглощения фосфора, одновременно решающих задачу и запасаения данного элемента, и снижения токсического эффекта от его избытка в среде [Solovchenko и др., 2019; Lobakova и др., 2022]. Характерно, что развитие ОФМ во всех рассмотренных АБС сопровождалось развитием и MGP-бактерий, что подчеркивает важность альго-бактериальных взаимодействий и их возможный мутуалистический характер. Снижение разнообразия MGPВ во всех АБС при повышении интенсивности стрессора, вероятно, указывает на эволюционные процессы, описываемые гипотезой Красной королевы — происходит отбор наиболее значимых для данных ОФМ компонентов фикософеры и ризософеры, которые могут вносить вклад в толерантность к избыточным концентрациям фосфата [Yuan, Meng, 2020; Vale и др., 2023]. Устойчивость АБС апатитовых разработок к резким увеличениям концентрации экзогенного фосфата указывает на возможное действие «эффекта памяти», как эволюционного механизма адаптации к стрессору, постоянно действующему на сообщества в окрестностях добычи фосфорных руд [Вандыш, Кашулин, Черепанов, 2014; Vahø и др., 2021; Khalighi и др., 2022].

3.5. Выделение ОФМ в альгологические монокультуры и анализ их потенциальной толерантности к избытку неорганического фосфора

Из образцов АБС, собранных в эвтрофицированных экотопах «залив» и «пруд II», методом накопительной культуры на среде BG-11 с повышенным содержанием P_i (200 мг/л) были выделены альгологические монокультуры микроводорослей *Micractinium simplicissimum*, *Micractinium inermum* (рис. 25), *Desmodesmus armatus* (рис. 26), *Chlamydomonas applanata* (рис. 27), а также цианобактерий *Cylindrospermum* sp. и *Nodosilinea* sp. (рис. 28).

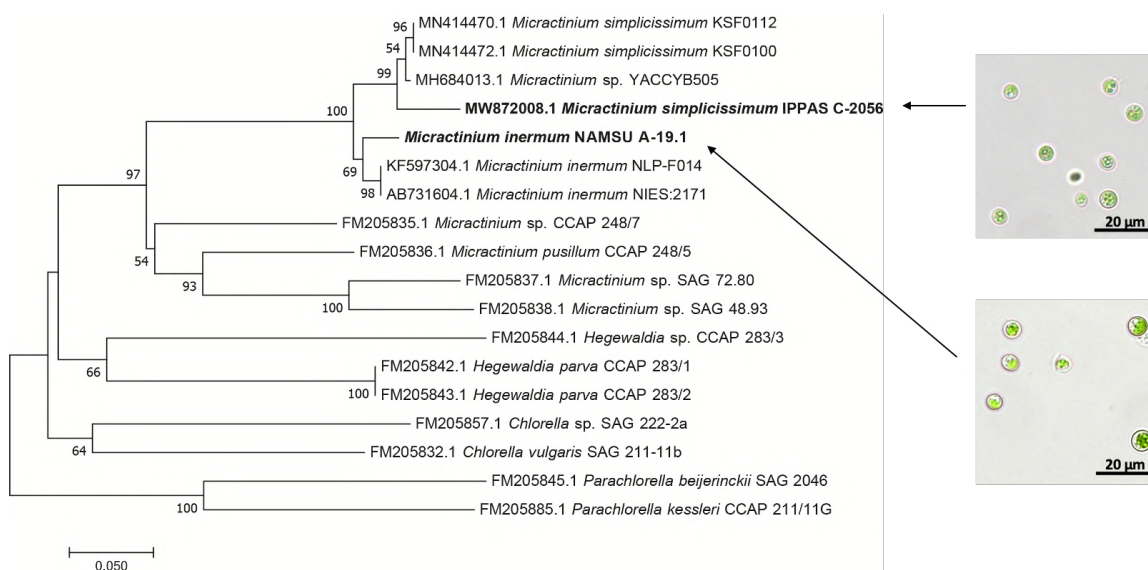


Рис. 25. Филогенетическое дерево рода *Micractinium* (сем. Chlorellaceae), отражающее таксономическую принадлежность штаммов NAMSU A-19.1 и IPPAS C-2056, построенное с использованием локуса ITS1-5,8S *pPHK*-ITS2 по методу NJ. Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

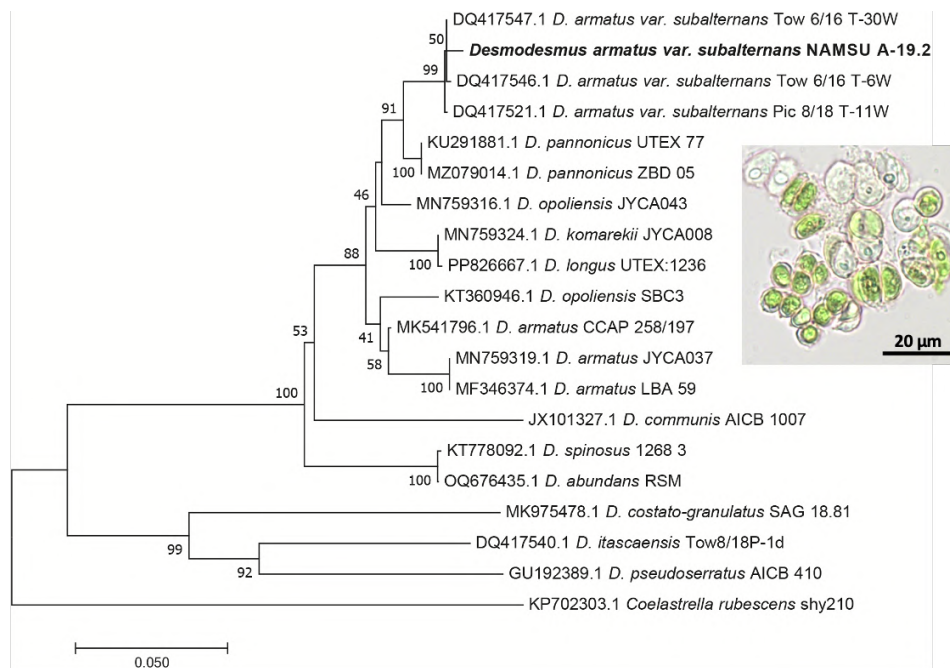


Рис. 26. Филогенетическое дерево рода *Desmodesmus* (сем. Scenedesmaceae), отражающее таксономическую принадлежность штамма NAMSU A-19.2, построенное с использованием локуса ITS1-5,8S *pPHK*-ITS2 по методу NJ. Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

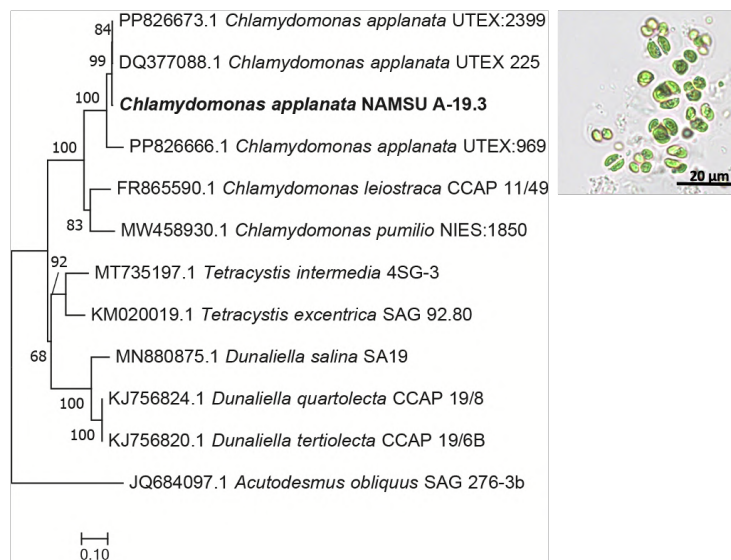


Рис. 27. Филогенетическое дерево рода *Chlamydomonas* (сем. Chlamydomonadaceae), отражающее таксономическую принадлежность штамма NAMSU A-19.3, построенное с использованием локуса ITS1-5,8S *pPHK*-ITS2 по методу NJ. Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

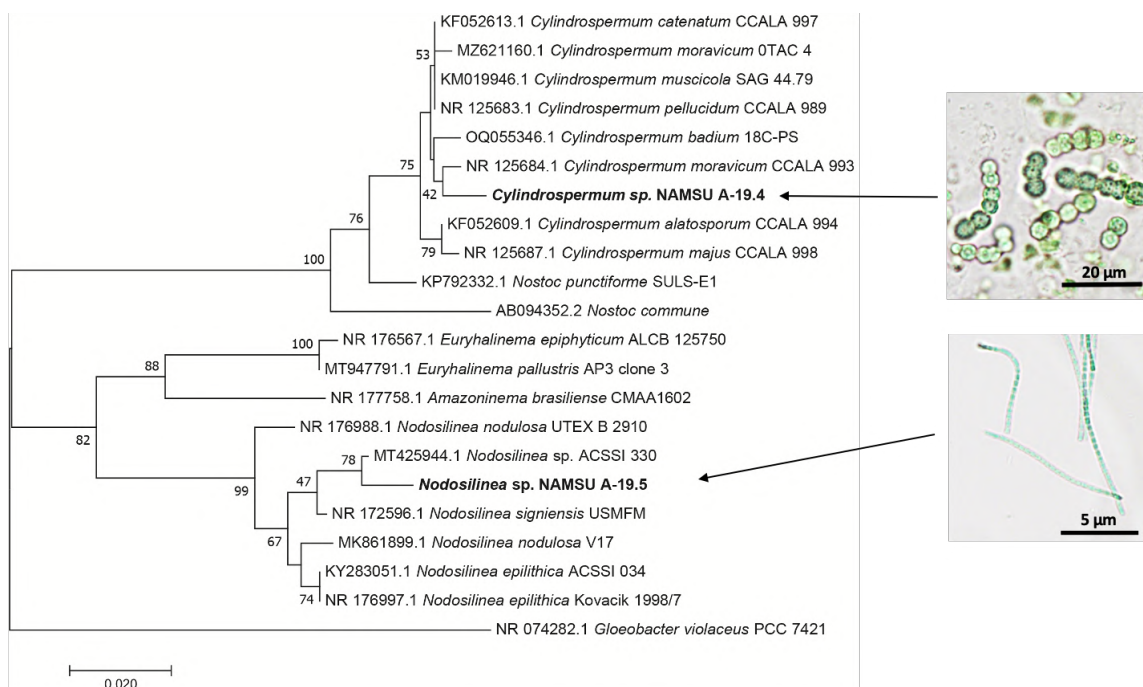


Рис. 28. Филогенетическое дерево рода *Cylandrospermum* и *Nodosilinea* (класс Суанорфусеае), отражающее таксономическую принадлежность штаммов NAMSU A-19.4 и A-19.5, построенное с использованием фрагмента гена *16S pPHK* по методу NJ. Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

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 визуальной оценкой накопления биомассы и аккумуляции полифосфатов методами оптической микроскопии (рис. 29). Результаты выявили, что штаммы микроводоросли *M. inertum* NAMSU A-19.1 и цианобактерии *Nodosilinea* sp. NAMSU A-19.5 не содержали полифосфатов на момент окончания инкубации с обоими вариантами концентраций экзогенного P_i . Штамм микроводоросли *D. armatus* NAMSU A-19.2 незначительно накапливал полифосфаты при инкубации в среде с концентрацией P_i 40 мг/л, но при 200 мг/л увеличивал биомассу без запасания фосфора в резерве. Вероятно, это указывает на повышенные потребности в фосфоре для данного организма, необходимые для его развития. Штаммы микроводорослей *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 и *C. applanata* NAMSU A-19.3, а также цианобактерии *Cylandrospermum* sp. NAMSU A-19.4 обильно

накапливали полифосфаты при обоих вариантах концентраций экзогенного P_i . Однако в культуре штамма *Cylindrospermum* sp. NAMSU A-19.4 накопление шло только в вегетативных клетках, но не в обильно представленных гетероцистах. Это может быть связано с необходимостью активно обеспечивать энергетическими эквивалентами из фотосинтеза комплексы ферментов и транспортеров, участвующих в энергозатратных процессах синтеза полифосфатов [Solovchenko и др., 2019].

Для всех шести культур ОФМ был проведен метагеномный анализ по методу *16S rRNA* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS с целью таксономического профилирования компонентов АБС (табл. 18). Результаты показали наличие бактериальных спутников флуксифере у каждого штамма микроводорослей и цианосфере у каждого штамма цианобактерий, среди которых можно отметить ряд общих представителей — рр. *Sphingopyxis*, *Rhizobium*, *Brevundimonas*, *Microbacterium*, *Devosia*. Стоит отметить, что некоторые из них также присутствовали в микробиоме АБС из окрестностей апатитовых разработок (см. п. 3.4.), что подтверждает их связь с ОФМ в природных сообществах. Наибольшим биоразнообразием обладал микробиом штамма микроводоросли *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, для которого было выполнено таксономическое профилирование по результатам секвенирования полного метагенома на платформе ONT (табл. 19). Результаты показали обилие видов бактерий, относимых к группе МГРВ, и для которых описано участие в реминерализации неорганического фосфора в среде и способность к его биоаккумуляции [Burkhardt и др., 2014; Qin и др., 2016; Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018].

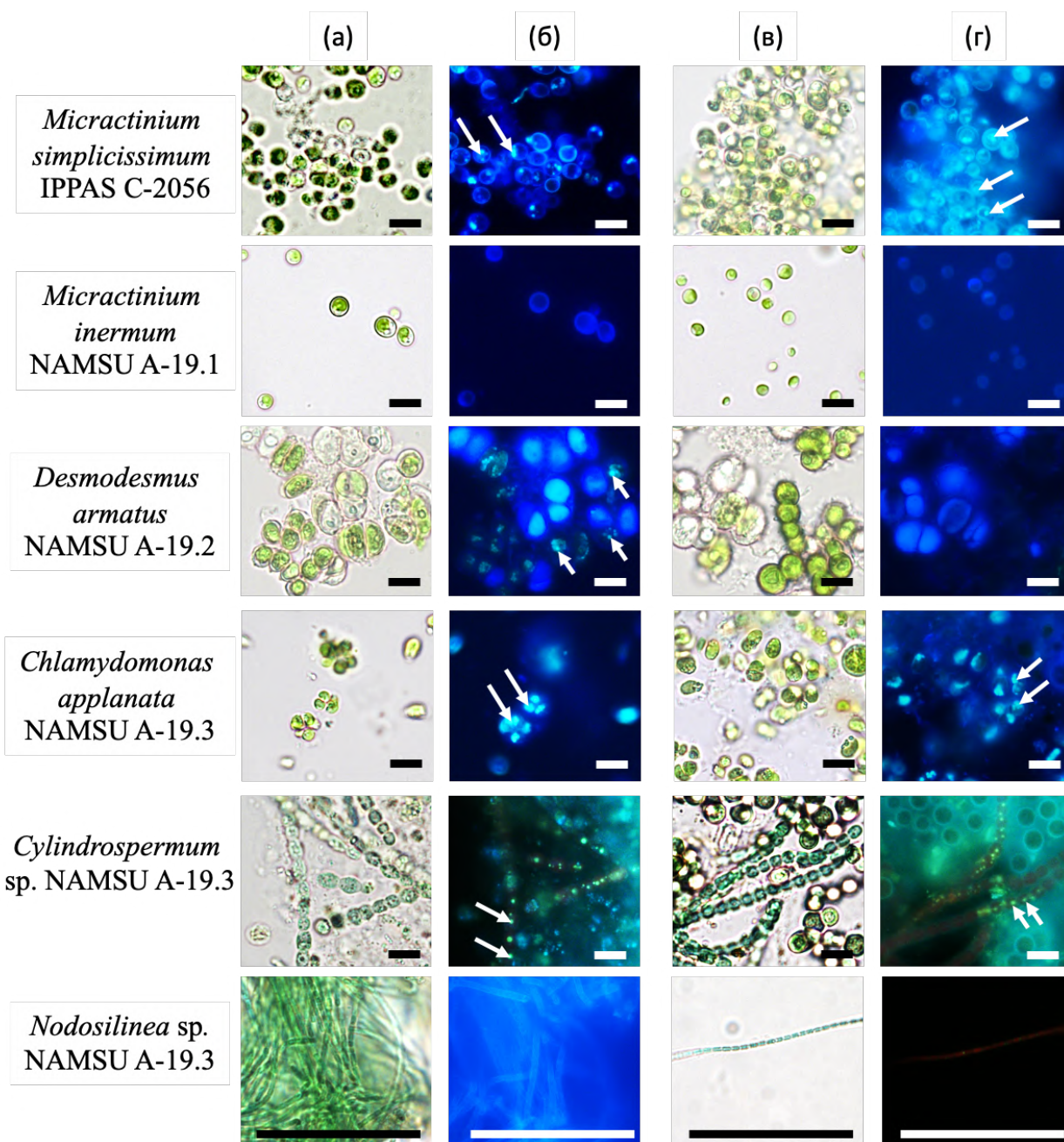


Рис. 29. Микроскопические изображения альгологических монокультур микроводорослей *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, *M. inermum* NAMSU A-19.1, *D. armatus* NAMSU A-19.2, *C. applanata* NAMSU A-19.3, а также цианобактерий *Cylindrospermum* sp. NAMSU A-19.4 и *Nodosilinea* sp. NAMSU A-19.5 при инкубации на среде BG-11 с концентрацией P_i 40 мг/л (а,б) и с повышенной концентрацией P_i до 200 мг/л (в,г). Изображения представлены в проходящем свете (а,в), а также во флуоресцентном режиме для визуализация полифосфатов (белая стрелка) при окрашивании ДАФИ (б,г). Масштабный отрезок — 10 мкм.

Таблица 18. Таксономический состав микробиома АБС альгологических монокультур микроводорослей *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, *M. inermum* NAMSU A-19.1, *D. armatus* NAMSU A-19.2, *C. applanata* NAMSU A-19.3, а также цианобактерий *Cylindrospermum* sp. NAMSU A-19.4 и *Nodosilinea* sp. NAMSU A-19.5, описанный по данным 16S pPHK ДНК-метабаркодинга на платформе NGS.

<i>M. simplicissimum</i> IPPAS C-2056		<i>M. inermum</i> NAMSU A-19.1		<i>D. armatus</i> NAMSU A-19.2	
Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS
<i>Microcella</i>	23,0	<i>Sphingopyxis</i>	14,9	unclassified Sphingomonadaceae	56,6
<i>Rhizobium</i>	22,0	<i>Bosea</i>	14,3	unclassified Rhizobiaceae	22,0
<i>Brevundimonas</i>	19,8	<i>Chryseobacterium</i>	14,1	<i>Microbacterium</i>	17,9
<i>Mesorhizobium</i>	6,9	<i>Devosia</i>	13,8	unclassified Rhizobiales	3,6
<i>Paracoccus</i>	4,1	<i>Roseomonas</i>	12,0		
<i>Porphyrobacter</i>	3,7	<i>Rhizobium</i>	11,9		
<i>Aliihoeflea</i>	3,7	<i>Pir4 lineage</i>	10,8		
<i>Larkinella</i>	2,8	<i>Dietzia</i>	3,9		
<i>Sphingomonas</i>	2,7	<i>Rhodococcus</i>	2,3		
<i>Pedobacter</i>	2,3	<i>Microbacterium</i>	1,9		
<i>Rhodococcus</i>	2,2				
<i>Pseudoxanthobacter</i>	1,6				
<i>Aquihabitans</i>	1,2				
<i>Devosia</i>	1,1				
<i>C. applanata</i> NAMSU A-19.3		<i>Cylindrospermum</i> sp. NAMSU A-19.4		<i>Nodosilinea</i> sp. NAMSU A-19.5	
Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS	Род	% чтений NGS
<i>Stenotrophomonas</i>	71,8	<i>Devosia</i>	31,2	<i>Sphingopyxis</i>	59,0
<i>Rhizobium</i>	13,9	<i>Bosea</i>	30,9	unclassified Xanthobacteraceae	34,0
<i>Procabacter</i>	5,2	<i>Rhodococcus</i>	12,2	<i>Microbacterium</i>	6,3
<i>Phreatobacter</i>	4,3	unclassified Xanthobacteraceae	9,0		
<i>Aeromicrobium</i>	1,8	<i>Rhizobium</i>	8,2		
<i>Devosia</i>	1,7	<i>Sphingopyxis</i>	7,1		
<i>Microbacterium</i>	1,0				

Таблица 19. Таксономический состав микробиома АБС альгологической монокультуры микроводоросли *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, описанный по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT.

Класс	Вид	% чтений ONT
Actinobacteria	<i>Microbacterium</i> sp. J1-1	1,1
	<i>Microcella humidisoli</i>	1,1
Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	19,8
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	19,1
	<i>Brevundimonas vancouverii</i>	12,2
	<i>Mesorhizobium</i> sp.	8,1
	<i>Paracoccus</i> sp. Arc7-R13	5,3
	<i>Paracoccus marcusii</i>	2,7
	<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06	1,5
	<i>Bosea</i> sp.	1,0
	<i>Sphingomonas</i> sp.	0,8
	<i>Sphingopyxis</i> sp.	0,6
	<i>Devosia</i> sp.	0,2
Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.	0,4
	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	0,4
Chitinophagia	<i>Sediminibacterium</i> sp.	0,2
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	3,1
	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	1,9
	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	1,5
	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	0,4

Для подтверждения результатов таксономического профилирования микробиома АБС альгологической монокультуры микроводоросли *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, выполненного на основе секвенирования полного метагенома на платформе ONT, были выделены 12 чистых культур бактерий на твердой среде Эванса. Для шести культур таксономическая принадлежность была определена с помощью филогенетического анализа фрагмента гена *16S rDNA*.

На основании проведенного филогенетического анализа штамм AN-1 был идентифицирован до вида *Brevundimonas diminuta* (Leifson and Hugh 1954) (рис. 30) [Segers и др., 1994]. Результаты секвенирования лабораторной культуры штамма *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 с помощью длинных чтений на платформе ONT выявили присутствие в пробе бактерии вида *B. diminuta*, что показывает высокий уровень корреляции двух массивов

данных: данных секвенирования метагенома микроводоросли и генотипирования чистых культур бактерий из фикосферы изучаемой микроводоросли.

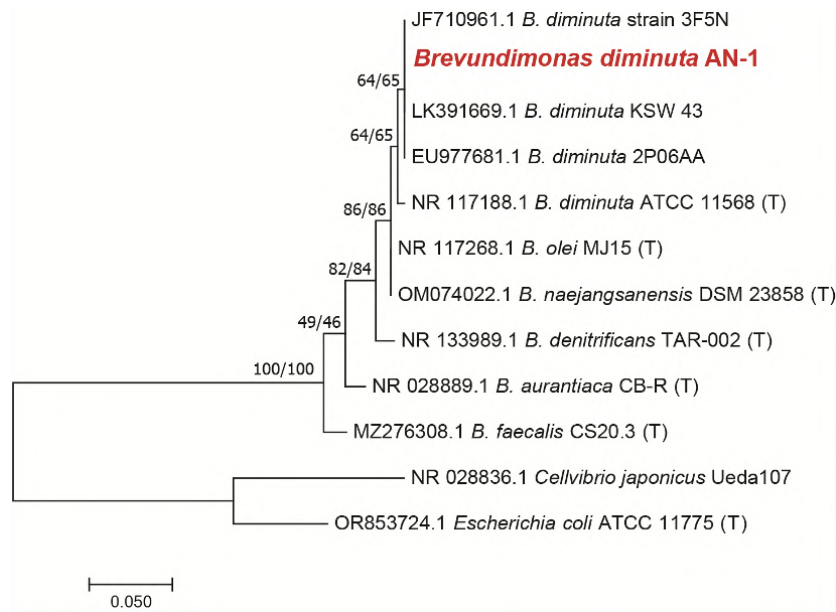


Рис. 30. Филогенетическое дерево рода *Brevundimonas* (сем. Caulobacteraceae), отражающее таксономическую принадлежность штамма AN-1, построенное с использованием фрагмента гена *16S pPHK* по методу ML. Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию в деревьях, построенных методами максимального правдоподобия и ближайших соседей (ML/NJ). Буквой «Т» помечены последовательности типовых штаммов. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

Описан штамм *B. diminuta*, выделенный из ризосферы травянистых растений, произрастающих в загрязненном промышленном районе Индии. Для данного штамма показаны свойства PGPB (plant growth promoting bacteria), такие как синтез сидерофоров, растворение фосфата и активность 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы [Rathi, Yogalakshmi, 2021]. Показано увеличение скорости роста и накопления биомассы *Helianthus annuus* L. (Подсолнечника масличного) в 1,5-2 раза [Rathi, Yogalakshmi, 2021]. Данный штамм является устойчивым к тяжелым металлам, в частности к меди [Rathi, Nandabalan, 2017] и способен к практически полному биоизъятию данного элемента из среды, содержащей 250 мг/л меди [Rathi, Yogalakshmi, 2021].

Филогенетический анализ, выполненный для штаммов AN-2 и А-5 выявил высокий уровень гомологии их последовательностей с последовательностями видов рода

Microbacterium (рис. 31). При этом штамм AN-2 филогенетически близок к таким представителям данного рода, как *M. paraoxydans*, *M. helvum*, *M. aurugineum* и *M. azadiractae*, а штамм А-7 — как видам *M. esteraromaticum* и *M. arabinogalactanolyticum*. До вида указанные штаммы на основе исключительно филогенетического анализа идентифицировать не удалось, что требует, по-видимому, полифазного подхода, широко применяемого в таксономии прокариот [Prakash и др., 2007]. Стоит отметить, что, согласно результатам секвенирования лабораторной культуры штамма *M. simplicissimum* IPPAS С-2056 с помощью длинных чтений (технология Oxford Nanopore), в образце был выявлен вид *M. aurugineum*, что указывает на сходство данных секвенирования метагенома микроводоросли и ПЦР-фрагментов, полученных из чистых культур бактерий, выделенных из того же фототрофа.

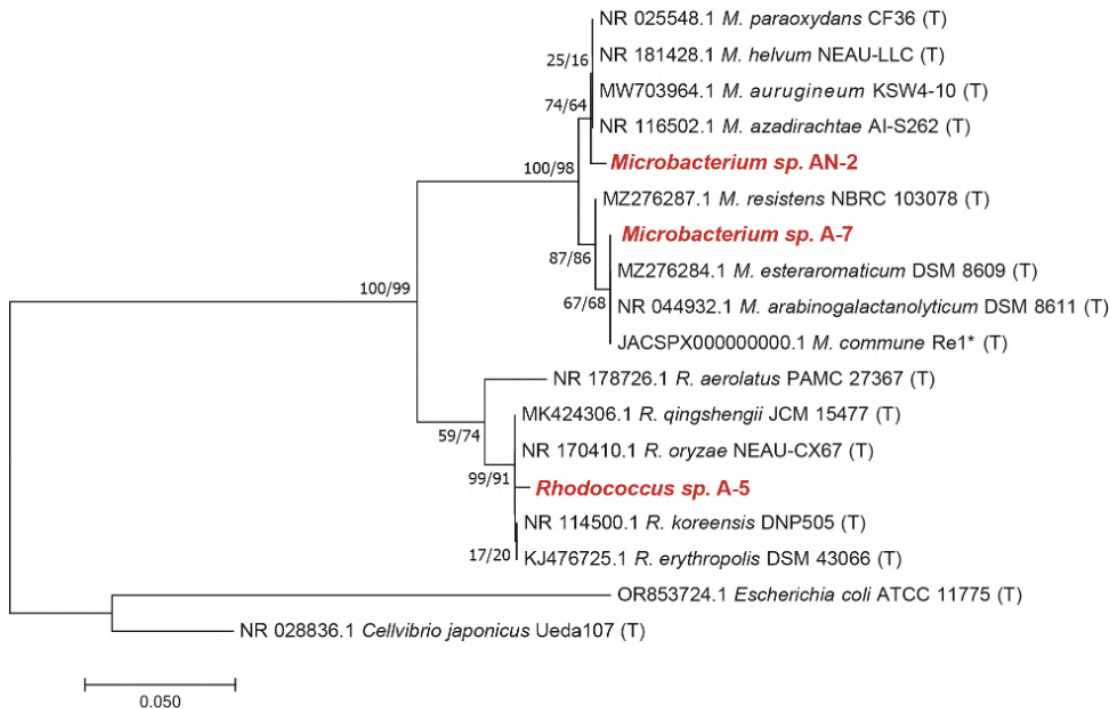


Рис. 31. Филогенетическое дерево родов *Microbacterium* (сем. Microbacteriaceae) и *Rhodococcus* (сем. Nocardiaceae), отражающее таксономическую принадлежность штаммов AN-2, А-5 и А-7, построенное с использованием фрагмента гена *16S pPHK* по методу ML с использованием модели K2G (двухпараметрическая модель Кимура с гамма-распределением). Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию в деревьях, построенных методами максимального правдоподобия и ближайших соседей (ML/NJ). Звездочкой помечен штамм, для которого использовался *16S pPHK* фрагмент, полученный из полногеномных прочтений. Буквой «Т» помечены последовательности типовых штаммов. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

Для штаммов рода *Microbacterium* известна способность вступать во взаимовыгодные отношения с растительными организмами. В частности, из ризосферы *Arabidopsis thaliana* были выделены штаммы данного рода, вызывающие значительное увеличение биомассы побегов и корней *Arabidopsis*, томатов и побегов салата [Cordovez и др., 2018]. Типовой штамм вида *M. azadirachtae*, одного из филогенетически наиболее близких к исследуемому штамму *Microbacterium* sp. AN-2, был выделен из ризопланы проростков нима (*Azadirachta indica*) [Madhaiyan и др., 2010]. Известны эндофитные штаммы рода *Microbacterium*, устойчивые к действию тяжелых металлов, таких как Ni и Pb, и способствующие их транспорту и биоаккумуляции в сообществах с высшими растениями, оказывая, при этом, положительное влияние на скорость роста самого растения [Sun и др., 2019]. Отмечена устойчивость к антибиотикам [Sheng и др., 2008]. Механизмы положительного влияния данной бактерии схожи с таковыми для *B. diminuta* — синтез сидерофоров, индолилуксусной кислоты и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы, растворение фосфатов [Sheng и др., 2008]. Для ризосферного штамма рода *Rhodococcus* показано положительное влияние на рост *A. thaliana* совместно с эффективным разложением полихлорированных бифенилов — органических загрязнителей окружающей среды [Vergani и др., 2019].

Анализ таксономической принадлежности штаммов А-1 и А-3 с помощью филогенетического анализа фрагмента гена *16S rDNA*, выявил их принадлежность к роду *Pseudomonas* (рис. 32). Для штамма А-3 удалось провести идентификацию до уровня вида, а именно *Pseudomonas yamanorum* [Arnau, Sanchez, Delgado, 2015], а для штамма А-1 показана принадлежность к кластеризации со штаммами видов *P. fluorescens*, *P. antarctica* и *P. extremaustralis*, типовые штаммы двух последних из которых были выделены из местообитаний Антарктики [Reddy и др., 2004; López и др., 2009]. При этом типовой штамм *P. yamanorum* также является психротолерантной бактерией [Arnau, Sanchez, Delgado, 2015]. Для эндофитного штамма *P. fluorescens* известна устойчивость к тяжелым металлам и антибиотикам, а также наличие стимулирующего рост эффекта на растения за счет синтеза сидерофоров и индолилуксусной кислоты [Sheng и др., 2008].

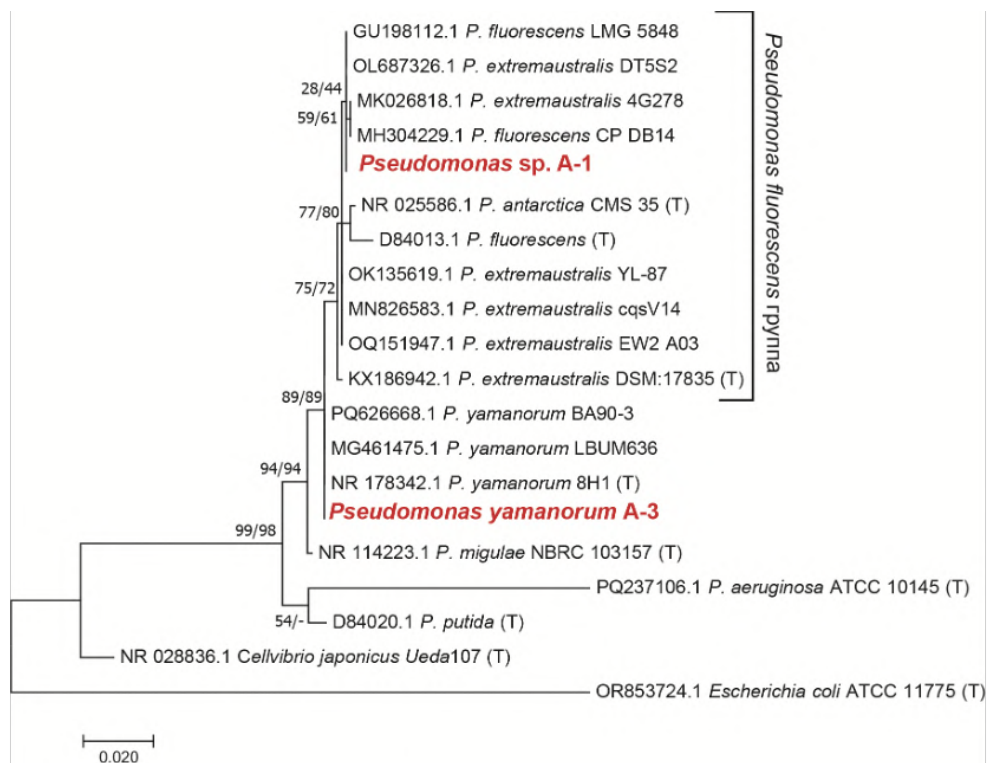


Рис. 32. Филогенетическое дерево рода *Pseudomonas* (сем. Pseudomonadaceae), отражающее таксономическую принадлежность штаммов А-1 и А-3, построенное с использованием фрагмента гена *16S рPHK* по методу ML с использованием модели K2G (двухпараметрическая модель Кимура с гамма-распределением). Достоверность топологии определяли при помощи bootstrap-анализа (1000 итераций). Значения в узлах отражают процент деревьев, имеющих данную топологию в деревьях, построенных методами максимального правдоподобия и ближайших соседей (ML/NJ). Буквой «Т» помечены последовательности типовых штаммов. Масштабный отрезок: количество замен на позицию во множественном выравнивании.

Таким образом, из фикосферы *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 было выделено 6 штаммов бактерий, идентифицированных следующим образом: *B. diminuta* AN-1, *Microbacterium* sp. AN-2, *Microbacterium* sp. A-7, *Rhodococcus* sp. A-5, *Pseudomonas* sp. A-1, *P. yamanorum* A-7. Для всех родов и видов, филогенетически близких к выделенным бактериальным штаммам, описана способность оказывать рост-стимулирующее действие на растительные организмы, а также к биоремедиации: устойчивость к тяжелым металлам и их биоаккумуляции, разложение соединений хлора. Подобные свойства указывают на перспективность использования данных штаммов для улучшения ростовых свойств культуры микроводоросли, участия в метаболизме фосфора и биоизъятия тяжелых металлов, присутствующих в сточных водах в значительных количествах — как самих по себе, так и в составе АБС.

3.6. Роль микробиома фикосферы лабораторного АБС в ответе на изменения режима фосфорного питания

Для оценки биотехнологического потенциала штамма *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 для задач биоизъятия избытков экзогенного P_i был проанализирован ответ культуры на смену стрессоров — резкое повышение концентрации P_i в среде после длительного фосфорного голодания. Установлено, что, несмотря на ранее демонстрируемую высокую толерантность к экзогенному P_i [Lobakova и др., 2022], клетки *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 повреждаются и гибнут в результате резкого повышения концентрации P_i в среде после периода голодания (рис. 33а,б). 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 (рис. 33а,в), предположительно нарушающих фолдинг белков и смещающих равновесие реакций фосфорилирования-дефосфорилирования в центральном метаболизме [Achbergerová, Nahálka, 2011].

Спустя неделю после начала восстановления фосфорного питания в культуре визуально увеличивается количество бактерий, которые также имеют включения, имеющие характерный для полифосфатов элементный состав (рис. 33б). В частности, это Mg, чьи ионы участвуют в стабилизации полифосфатов (рис. 33г) [Schönborn, Bauer, Röske, 2001; Shebanova и др., 2017]. Эти события сопровождались характерными изменениями микробиома фикосферы *M. simplicissimum*, где MGP-бактерии из pp. *Rhizobium*, *Brevundimonas*, *Chrysobacterium* и замещались другими MGPB из pp. *Variovorax* и *Bosea*, бактериями из pp. *Sediminibacterium* и *Caulobacter* (рис. 33д), для которых в литературе также описано участие в круговороте фосфора в природных водоемах и ВОС [Burkhardt и др., 2014; Qin и др., 2016; Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018]. Подобная смена одних симбиотических компонентов на другие отражает действие концепции непрерывности в микробиоме фикосферы [Ewald, 1987; Kublanovskaya и др., 2020; Chekanov и др., 2021]. В данном исследовании процесс адаптации к стрессору — резкой смене фосфорного питания — также может быть соотнесен с гипотезой Красной королевы: в сообществе происходит смена таксонов и частичная гибель клеток эдификатора — *M. simplicissimum*, но, по сути, не меняются функциональные группы, обеспечивающие фосфат-толерантный фенотип всего сообщества.

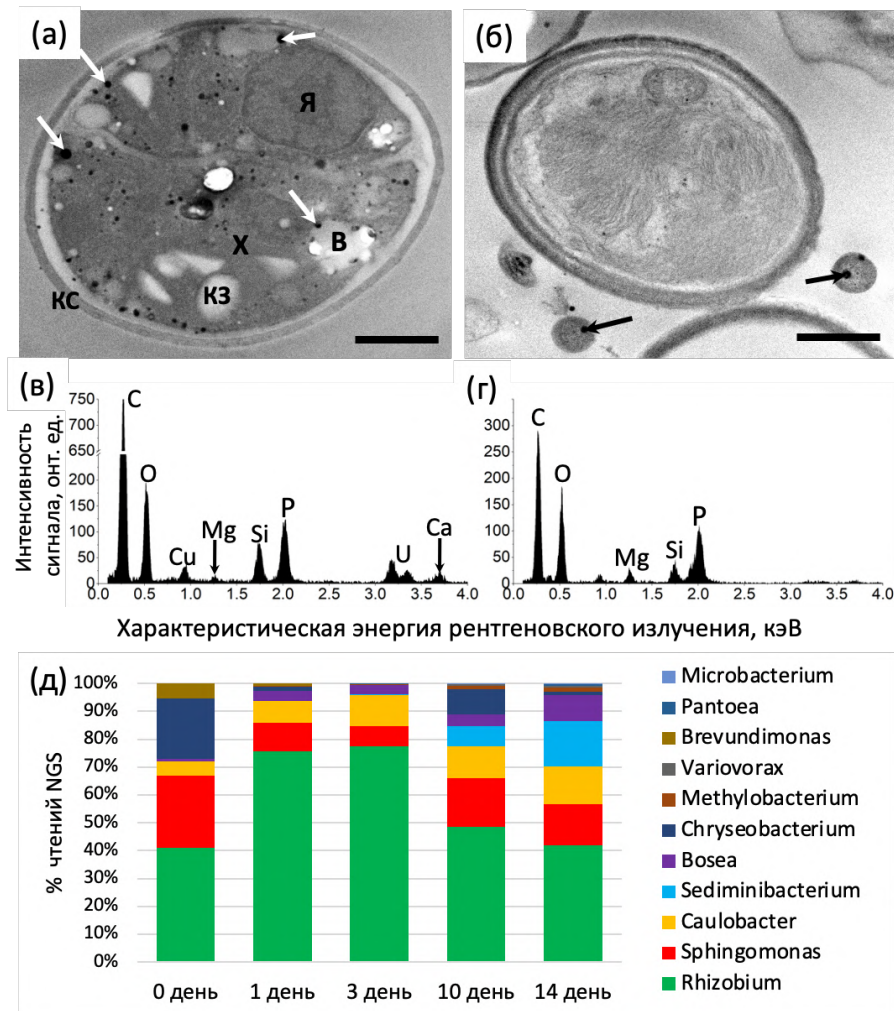


Рис. 33. Характеристика АБС культуры *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 при восстановлении фосфорного питания после длительного фосфорного голодания: общий вид клеток на 1 сутки (а) и на 10 суток (б) после восстановления питания; репрезентативные спектры ЭДРС включений полифосфатов на 1 сутки (в) и на 10 суток (г) после восстановления питания; динамика таксономического состава микробиома АБС при восстановлении питания, описанная на уровне родов по данным *16S pPHK* ДНК-метабаркодинга на платформе NGS. Обозначения для а,б: Я — ядро, Х — хлоропласт, В — вакуоль, КЗ — крахмальное зерно, КС — клеточная стенка, стрелками обозначены включения полифосфатов. Масштабный отрезок для а,б — 1 мкм.

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 [Burkhardt и др., 2014; Qin и др., 2016; Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018].

3.7. Конструирование искусственного АБС для биоизъятия избытков фосфатов из сточных вод

Объективную оценку способности АБС, формирующегося на базе *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 и иммобилизованного на хитозане С600, к биоизъятию P_i из сточных вод водоочистных сооружений проводили в ходе культивационных экспериментов в тонкослойном каскаде. Показано, что данное АБС способно к снижению P_i до уровня ниже ПДК и предела количественной оценки P_i за неделю, причем данная способность сохраняли в ходе как минимум четырех циклов культивирования (рис. 34а). При этом не выявлено значительного увеличения биомассы клеток ОФМ в АБС, что контролировали по содержанию суммарного хлорофилла (рис. 34б). Хотя в данном исследовании не проводилось измерение общей динамики веса альго-бактериальной биомассы, визуально клетки ОФМ преобладали в АБС. Это позволяет предположить, что поглощенный из среды P_i не используется для роста, а накапливается внутри клеток сообщества, очевидно, в форме полифосфатов. Анализ состояния фотосистемы II (ФС II) также не показал снижения уровня квантового выхода, что свидетельствует о стабильности протекания в клетках ОФМ процессов фотосинтеза — источника энергии, критически необходимого для молекулярных реакций в процессе биоизъятия P_i и синтеза полифосфатов (рис. 34б). Функциональный анализ результатов секвенирования полного метагенома на платформе ONT выявил тенденцию к росту представленности в микробиоме данной культуры прокариотических носителей генов эффективного фосфорного метаболизма (рис. 34в). К ним относятся обитатели фикосферы *M. simplicissimum* из функциональной группы MGPB, в частности pp. *Microbacterium*, *Brevundimonas*, *Devosia* [Krohn-Molt и др., 2017; Toyama и др., 2018; Toyama и др., 2019; Vale и др., 2023], а также участвующие в реминерализации фосфора в культуре pp. *Acinetobacter*, *Sediminibacterium*, *Pseudomonas* и *Sphingomonas* (табл. 20) [Burkhardt и др., 2014; Qin и др., 2016; Lahiri, Ghosh, Sarkar, 2018].

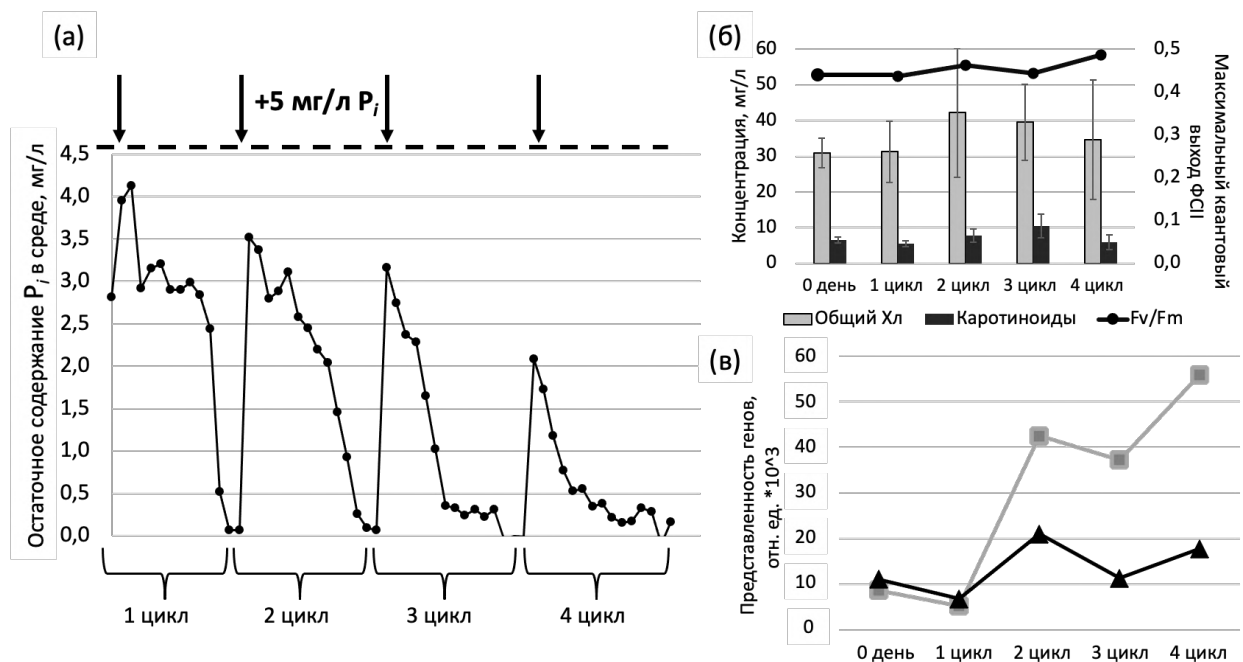


Рис. 34. Динамика биоизъятия P_i из третичных стоков ВОС иммобилизованным АБС на базе *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 в тонкослойном каскаде в течение 4 недельных циклов: остаточное содержание P_i в среде (а), динамика содержания пигментов и активности фотосистемы II (б), обилие генов, связанных с биоаккумуляцией фосфора, рассчитанное по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT: черный — гены в эукариотах, серый — гены в прокариотах (в).

Рост представленности в метагеноме данной культуры эукариотических носителей генов эффективного фосфорного метаболизма был незначительным и непостоянным (рис. 34в). Метагеномный анализ выявил динамику эукариотических ОФМ в ходе инкубации АБС в каскаде, при которой параллельно с *M. simplicissimum* из исходной монокультуры в сообществе развиваются микроводоросли из нестерильного образца сточных вод, а именно — *Chlamydomonas reinhardtii* развивается до конца третьей недели, после чего замещается на *Tetradesmus obliquus* (табл. 20). Необходимо заметить, что микроводоросль *Tetradesmus obliquus* развивался во всех образцах АБС активного ила (см. табл. 16 в п. 3.4) и третичных стоков ВОС (см. рис. 18 в п. 3.2) при повышении концентрации P_i в среде. Несмотря на подобную динамику ОФМ-компонента и полное замещение *M. simplicissimum* к концу 4 недели инкубации, это не повлияло на снижение потенциала эукариотической составляющей АБС к биоизъятию P_i , что с практической точки зрения по-прежнему удовлетворяет задаче биологической очистки сточных вод.

Таблица 20. Таксономический состав микробиома иммобилизованного АБС на базе *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 при инкубации с третичными стоками ВОС в тонкослойном каскаде в течение четырех циклов по 7 сут. (по данным секвенирования полного метагенома на платформе ONT). Представители ОФМ выделены цветом: зеленый — филум Chlorophyta.

<i>M. simplicissimum</i> IPPAS C-2056		0 день		1 цикл	
Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений
<i>Micractinium singularis</i>	50,7	<i>Micractinium singularis</i>	54,5	<i>Micractinium singularis</i>	41,7
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	12,0	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	12,0	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	10,0
<i>Brevundimonas diminuta</i>	11,5	<i>Blastomonas</i> sp. RAC04	4,7	<i>Limnobacter</i> sp. SAORIC-580	8,5
<i>Brevundimonas vancouverensis</i>	7,4	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	4,4	<i>Acidovorax</i> sp. JMULE5	7,0
<i>Mesorhizobium</i> sp.	4,9	<i>Blastomonas fulva</i>	3,8	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	3,9
<i>Paracoccus</i> sp. Arc7-R13	3,2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2,7	<i>Hyphomonadaceae bacterium</i> JAD_PAG50586_4	3,9
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1,8	<i>Acinetobacter</i> sp. NEB 394	2,7	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,3
<i>Paracoccus marcusii</i>	1,6	<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06	2,5	<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06	2,3
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	1,2	<i>Rheinheimera</i> sp. F8	2,4	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	2,3
<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06	0,9	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01	2,4	<i>Sphingomonas koreensis</i>	2,3
<i>Pseudomonas chengduensis</i>	0,9	<i>Acidovorax</i> sp. JMULE5	2,2	<i>Ferrovibrio terrae</i>	2,3
<i>Microbacterium</i> sp. J1-1	0,7	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	2,0	<i>Sediminibacterium</i> sp. TEGAF015	2,3
<i>Microcella humidisoli</i>	0,7	<i>Delftia lacustris</i>	1,4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,8
<i>Bosea</i> sp.	0,6	<i>Pseudomonas putida</i>	1,2	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	1,5
<i>Sphingomonas</i> sp.	0,5	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	1,0	<i>Delftia lacustris</i>	1,5
<i>Sphingopyxis</i> sp.	0,4			<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	1,5
<i>Variovorax</i> sp.	0,2			<i>Myxococcus</i> sp. MH1	1,5
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	0,2				
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	0,2				
<i>Devosia</i> sp.	0,1				
<i>Sediminibacterium</i> sp.	0,1				

2 цикл		3 цикл		4 цикл	
Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений	Вид	% ONT чтений
<i>Micractinium singularis</i>	53,3	<i>Micractinium singularis</i>	32,2	<i>Tetrademus obliquus</i>	29,5
<i>Myxococcus</i> sp. MH1	13,5	<i>Tetrademus obliquus</i>	26,3	<i>Micractinium singularis</i>	25,8
<i>Tetrademus obliquus</i>	6,7	<i>Limnobacter</i> sp. SAORIC-580	7,6	<i>Limnobacter</i> sp. SAORIC-580	4,8
<i>Limnobacter</i> sp. SAORIC-580	4,3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2,9	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	4,8
<i>Pseudomonas chengduensis</i>	3,6	<i>Hyphomonadaceae bacterium</i> JAD_PAG50586_4	2,6	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	3,9
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	3,5	<i>Ferrovibrio terrae</i>	2,4	<i>Myxococcus</i> sp. MH1	3,0
<i>Ferrovibrio terrae</i>	2,1	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	2,1	<i>Hyphomonadaceae bacterium</i> JAD_PAG50586_4	2,7
<i>Acidovorax</i> sp. JMULE5	1,8	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	2,1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,7
<i>Hyphomonadaceae bacterium</i> JAD_PAG50586_4	1,5	<i>Acidovorax</i> sp. JMULE5	2,1	<i>Sphingopyxis</i> sp. EG6	2,7
<i>Devosia</i> sp. A16	1,5	<i>Sphingomonas koreensis</i>	2,1	<i>Acidovorax</i> sp. JMULE5	2,1
<i>Hydrogenophaga</i> sp. YM1	1,5	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,1	<i>Devosia</i> sp. A16	2,1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,1	<i>Hydrogenophaga</i> sp. YM1	1,6	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	2,1
<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06	0,9	<i>Sediminibacterium</i> sp. TEGAF015	1,6	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	1,8
<i>Aquincola tertiaricarbonis</i>	0,9	<i>Microcella humidisoli</i>	1,6	<i>Microcella humidisoli</i>	1,5
<i>Rhizobacter</i> sp. AJA081-3	0,9	<i>Devosia</i> sp. A16	1,3	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	1,2
<i>Sphingopyxis</i> sp. EG6	0,9	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01	1,3	<i>Rhizobacter</i> sp. AJA081-3	1,2
<i>Sphingomonas koreensis</i>	0,8	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	1,3	<i>Blastomonas fulva</i>	1,2
<i>Agrobacterium</i> sp. MA01	0,8	<i>Rhizobacter</i> sp. AJA081-3	1,1	<i>Aquibium microcysteis</i>	1,2
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	0,7	<i>Sphingopyxis</i> sp. EG6	1,1	<i>Aquincola tertiaricarbonis</i>	1,2
		<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	1,1	<i>Sphingomonas koreensis</i>	0,9
		<i>Blastomonas fulva</i>	1,1	<i>Hydrogenophaga</i> sp. YM1	0,9
		<i>Aquibium microcysteis</i>	1,1	<i>Brevundimonas diminuta</i>	0,9
		<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06	0,8	<i>Humisphaera borealis</i>	0,9
		<i>Delftia lacustris</i>	0,8		

Морфоструктурный анализ культуры иммобилизованного АБС на базе *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 методами ПЭМ и ЭДРС подтвердил накопление включений с характерным для полифосфатов набором элементов в клетках микроводорослей (рис. 35а,е) и клетках бактерий (рис. 35б,д) [Shebanova и др., 2017]. В культуре наблюдались множественные контакты клеток микроводорослей и бактерий друг с другом, а также с материалом носителя хитозана С600 (рис. 34а,в). В ряде случаев были отмечены структуры похожие на ВПМ, вероятно способствующие закреплению клеток на поверхности носителя (рис. 35в). Среди бактерий, развивающихся в микробиоме АБС присутствуют представители таксонов (представители pp. *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Sphingomonas*), для которых в литературе отмечена способность к формированию структур ВПМ и участие в образовании альго-бактериальных биопленок, в том числе в системах очистки сточных вод [Nuramkhaan и др., 2019; Kublanovskaya и др., 2020; Celis de и др., 2024]. Данный факт имеет большое практическое значение в контексте использования АБС, иммобилизованных в тонкослойных каскадах на синтетических биodeградируемых носителях, поскольку процесс формирования биопленки стабилизирует сообщество в закрепленном виде. Необходимость в этом возникает в иммобилизованных культурах из-за начинающейся через определенное время деградации хитозана под действием литических ферментов бактерий из pp. *Variovorax* и *Stenotrophomonas*, которые также присутствовали в АБС культуры *M. simplicissimum* IPPAS C-2056 перед иммобилизацией [Jankiewicz, Swiontek Brzezinska, 2015].

Анализ ультраструктуры клеток микроводорослей *M. simplicissimum* в культуре к концу инкубации указывает на сильный стресс у фототрофных клеток, что выражается в разрыве тилакоидов в хлоропласте и нарушении целостности клеточной стенки (рис. 35г). Хотя ранее отмечалось, что квантовый выход ФС II был стабильным на протяжении всей инкубации, очевидно, что к концу 4-ой недели вклад в его значение начинал обеспечиваться другими микроводорослями, развивавшимися в АБС. Гибель самого *M. simplicissimum* при восстановлении фосфорного питания также соотносится с результатами исследования, описанного в п. 3.6. Таким образом, увеличение представленности в микробиоме АБС прокариотических носителей генов эффективного фосфорного метаболизма может быть связано с гибелью фототрофных клеток *M. simplicissimum* при восстановлении фосфорного питания на каждом цикле культивирования, и дальнейшей реминерализацией

освободившихся элементов бактериями из микробиома данного АБС. Но несмотря на гибель части клеток ОФМ, уровень биомассы остается стабильным в ходе всего периода инкубации, тогда как бактерии вносят свой вклад в стабилизацию культуры (за счет альго-бактериальных взаимодействий) и эффективное биоизъятия P_i из третичных стоков ВОС.

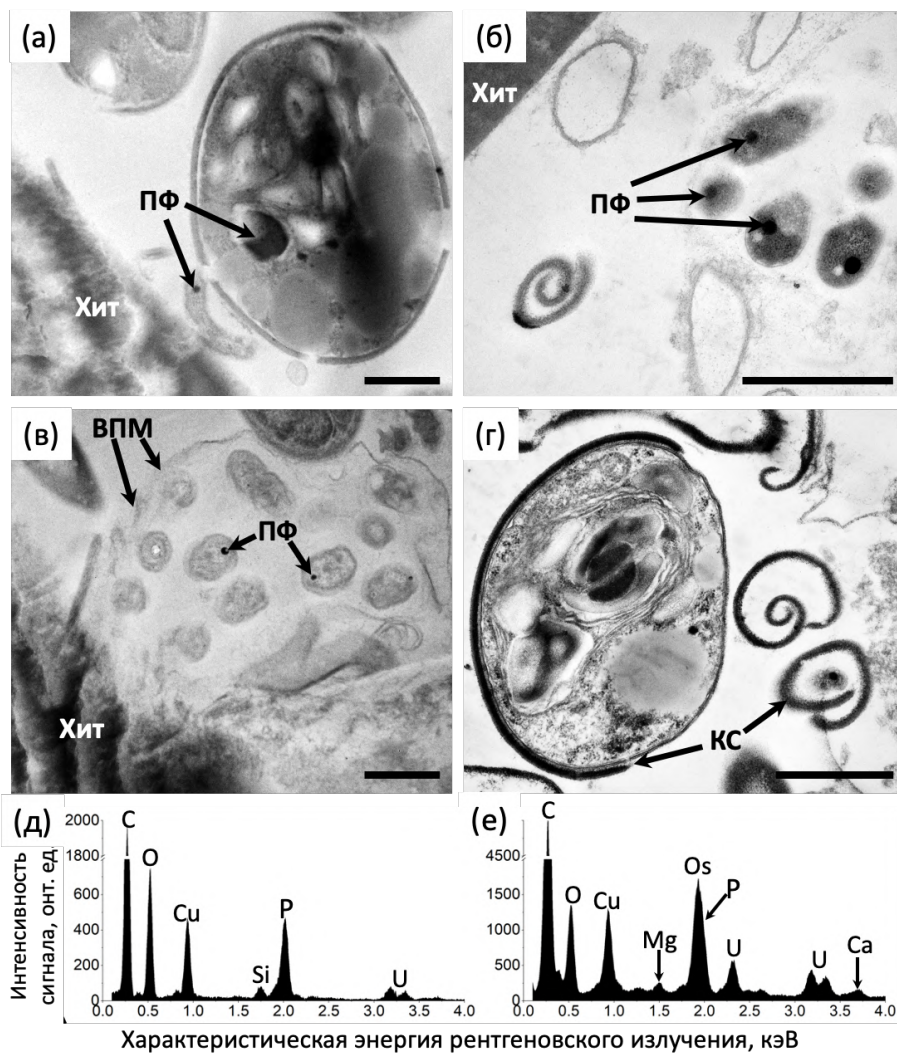


Рис. 35. Морфологическая характеристика иммобилизованного АБС на базе *M. simplicissimum* IPRAS С-2056 после 4 недель инкубации с третичными стоками ВОС в тонкослойном каскаде: изображения ПЭМ клеток АБС (а-г), репрезентативные спектры ЭДРС включений полифосфатов в клетках бактерий (д) и в клетках микроводоросли (е). Обозначения для а-г: Хит — хитозан С600, ПФ — полифосфаты, КС — клеточная стенка, ВПМ — внеклеточный полимерный матрикс. Масштабный отрезок для а-г — 1 мкм.

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 полного метагенома сообществ 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 бесконтрольного распространения антибиотикорезистентных «суперпатогенов».

Напротив, АБС из водоемов, соседствующих с апатитовыми разработками, продемонстрировали стабильность своего микробиома под действием повышенных концентраций P_i в среде, с выраженной представленностью бактерий, стимулирующих рост ОФМ. Также секвенирование полного метагенома с помощью длинных чтений 3-го поколения позволили выявить значительное разнообразие и богатство эукариотических

ОФМ 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 тонкослойном каскаде 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. *Sphingopyxis* 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 СОКРАЩЕНИЙ

<i>16S pPHK</i> — ген, кодирующий <i>16S pPHK</i>	ASV — amplicon sequence variant
АБС — альго-бактериальные сообщества	CFB — <i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>
АНОФ-2 — апатито-нефелиновая обогатительная фабрика 2	EBPR — enhanced biological phosphorus removal
БАВ — биологические активные вещества	ITS1-5,8S <i>pPHK</i> -ITS2 — фрагмент, содержащий внутренние транскрибируемые участки 1 и 2 (internal transcribed spacers — ITS) и ген <i>5,8S pPHK</i> ядерного рибосомального кластера
ВОС — водоочистные сооружения	MAG — metagenome-assembled genome
ВПМ — внеклеточный полимерный матрикс	MBGS — microalgal-bacterial granular sludge
ДМСО — диметилсульфоксид	NGS — next generation sequencing
ДАФИ — 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л	ONT — Oxford Nanopore Technologies
ДФ — диклофенак	P _i — inorganic phosphorus
ЛВ — лекарственные вещества	TGS — third generation sequencing
ОФМ — кислородные фототрофные микроорганизмы	TLC — thin-layer cascades
ПАО — полифосфат-аккумулирующие организмы	WMS — whole metagenome sequencing
ПДК — предельно допустимая концентрация	
ПФ — полифосфаты	
ПЦР — полимеразная цепная реакция	
ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия	
РОВ — растворенное органическое вещество	
СЭМ — сканирующая электронная микроскопия	
ФАР — фотосинтетически активная радиация	
ФБР — фотобиореактор	
ФС II — фотосистема II	
ЦТА — цефтриаксон	
ЧОВ — частицы органического вещества	
ЭДРС — энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батаков, А. Д., Кирюшина, А. П., Маторин, Д.Н., Терехова, В.А. Антибиотик ципрофлоксацин в водных и почвенных средах: реакция микроводорослей // Теоретическая И Прикладная Экология. – 2024. – Т. 2. – С. 143–150.
2. Бугранова, О. С., Цупикова, Н. А. Динамика сезонного развития фитопланктона пруда Нижнего (г. Калининград) в 2015 году и факторы, ее определяющие // Известия КГТУ. – 2016, № 43. – С. 11–21.
3. Вандыш, О. И., Кашулин, Н. А., Черепанов, А. А. Долговременные изменения зоопланктонных сообществ озера Имандра в условиях разноуровневого загрязнения стоками горнорудного производства // Вестник Кольского Научного Центра РАН. – 2014, № 2. – С. 118–125
4. Камило, С. Г. С., Сергеева, Ю. Д., Терехова, В. А., Киричук, А. А. Biosafety evaluation for some remediants and their effectiveness in detoxication peaty soils with heavy metals // Вестник Российского Университета Дружбы Народов Серия Экология И Безопасность Жизнедеятельности. – 2023. – Т. 31, № 4. – С. 572–582.
5. Плотников, А. О., Селиванова, Е. А., Хлопко, Ю. А., Воронов, Д. А., Маторин, Д. Н., Тодоренко, Д. А., Краснова, Е. Д. Структура и функционирование планктонных сообществ фототрофных и миксотрофных протистов в прибрежной лагуне “озеро Кисло-Сладкое” (Белое море, Карельский берег) // Известия Российской Академии Наук Серия Географическая. – 2023. – Т. 86, № 6. – С. 985–1001.
6. Abreu, C. I., Mathur, S., Petrov, D. A. Environmental memory alters the fitness effects of adaptive mutations in fluctuating environments // Nat. Ecol. Evol. – 2024. – V. 8, № 9. – P. 1760–1775.
7. Acevedo, B., Borrás, L., Oehmen, A., Barat, R. Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms // Water Res. – 2014. – V. 65. – P. 235–244.
8. Achbergerová L., Nahálka J. Polyphosphate-an ancient energy source and active metabolic regulator // Microb. Cell Factories. – 2011. – V. 10. – P. 1–14.
9. Aditya, L., Mahlia, T. I., Nguyen, L. N., Vu, H. P., Nghiem, L. D. Microalgae-bacteria consortium for wastewater treatment and biomass production // Sci. Total Environ. – 2022. – V. 838. – P. 155871.
10. Ahmed, H. B., Helal, M. H., Abdo, M. H., Fekry, M. M., Abdelhamid, A. E. Disarmament of micropollutants from wastewater using nylon waste/chitosan blended with algal biomass as recoverable membrane // Polym. Test. – 2021. – V. 104. – P. 107381.
11. Ajala, O. J., Tijani, J. O., Salau, R. B., Abdulkareem, A. S., Aremu, O. S. A review of emerging micro-pollutants in hospital wastewater: environmental fate and remediation options // Results Eng. – 2022. – V. 16. – P. 100671.
12. Akinawo S. O. Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies // Environ. Chall. – 2023. – V. 12. – P. 100733.
13. Albertsen, M., Hansen, L. B. S., Saunders, A. M., Nielsen, P. H., Nielsen, K. L. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal // ISME J. – 2012. – V. 6, № 6. – P. 1094–1106.

14. Aldrich J. RA Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922 // Stat. Sci. – 1997. – V. 12, № 3. – P. 162–176.
15. Allen J. L., Ten-Hage L., Leflaive J. Allelopathic interactions involving benthic phototrophic microorganisms // Environ. Microbiol. Rep. – 2016. – V. 8, № 5. – P. 752–762.
16. Alneberg, J., Bjarnason, B. S., De Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., Lahti, L., Loman, N.J., Andersson, A.F., Quince, C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // Nat. Methods. – 2014. – V. 11, № 11. – P. 1144–1146.
17. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25, № 17. – P. 3389–3402.
18. Arnau V. G., Sanchez L. A., Delgado O. D. *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – V. 65, № Pt_2. – P. 424–431.
19. Arutselvan, C., Narchonai, G., Pugazhendhi, A., LewisOscar, F., Thajuddin, N. Evaluation of microalgal strains and microalgal consortium for higher lipid productivity and rich fatty acid profile towards sustainable biodiesel production // Bioresour. Technol. – 2021. – V. 339. – P. 125524.
20. Asaad A. A., Amer A. S. Evaluation of *Chlorella vulgaris* biosorption capacity for phosphate and nitrate removal from wastewater // Sci. Rep. – 2024. – V. 14, № 1. – P. 884.
21. Ashraf N., Ahmad F., Lu Y. Synergy between microalgae and microbiome in polluted waters // Trends Microbiol. – 2023. – V. 31, № 1. – P. 9–21.
22. Astafyeva, Y., Gurschke, M., Qi, M., Bergmann, L., Indenbirken, D., de Grahl, I., Katzowitsch, E., Reumann, S., Hanelt, D., Alawi, M., Streit, W.R. Krohn, I. Microalgae and bacteria interaction—evidence for division of diligence in the alga microbiota // Microbiol. Spectr. – 2022. – V. 10, № 4. – P. e00633-22.
23. Ayre, J. M., Mickan, B. S., Jenkins, S. N., Moheimani, N. R. Batch cultivation of microalgae in anaerobic digestate exhibits functional changes in bacterial communities impacting nitrogen removal and wastewater treatment // Algal Res. – 2021. – V. 57. – P. 102338.
24. Azam F., Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – V. 5, № 10. – P. 782–791.
25. Baho, D. L., Rizzuto, S., Nizzetto, L., Hessen, D. O., Norberg, J., Skjelbred, B., Jones, K.C., Zhang, H., Leu, E. Ecological memory of historical contamination influences the response of phytoplankton communities // Ecosystems. – 2021. – P. 1–17.
26. Ballesteros, I., Terán, P., Guamán-Burneo, C., González, N., Cruz, A., Castillejo, P. DNA barcoding approach to characterize microalgae isolated from freshwater systems in Ecuador // Neotropical Biodivers. – 2021. – V. 7, № 1. – P. 170–183.
27. Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., Díaz-Alejo, H. M., Costas, E., López-Rodas, V. Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles // Microb. Ecol. – 2020. – V. 79, № 3. – P. 576–587.
28. De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Morey, T., Bashan, Y. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater // Water Res. – 2004. – V. 38, № 2. – P. 466–474.

29. Bates, S. T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight, R., Fierer, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *ISME J.* – 2011. – V. 5, № 5. – P. 908–917.
30. Beghini, F., McIver, L. J., Blanco-Míguez, A., Dubois, L., Asnicar, F., Maharjan, S., Mailyan, A., Manghi, P., Scholz, M., Thomas, A.M., Valles-Colomer, M., Weingart, G., Zhang, Y., Zolfo, M., Huttenhower, C., Franzosa, E.A., Segata, N. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3 // *elife.* – 2021. – V. 10. – P. e65088.
31. Belcour, A., Frioux, C., Aite, M., Bretaudeau, A., Hildebrand, F., Siegel, A. Metage2Metabo, microbiota-scale metabolic complementarity for the identification of key species // *Elife.* – 2020. – V. 9. – P. e61968.
32. Belevich, T. A., Ilyash, L. V., Milyutina, I. A., Logacheva, M. D., Troitsky, A. V. Photosynthetic Picoeukaryotes Diversity in the Underlying Ice Waters of the White Sea, Russia // *Diversity.* – 2020. – V. 12, № 3. – P. 93.
33. Bell W., Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products // *Biol. Bull.* – 1972. – V. 143, № 2. – P. 265–277.
34. Bergmaier D., Champagne C., Lacroix C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – V. 98, № 2. – P. 272–284.
35. Berkovich, A. K., Pyshkina, O. A., Zorina, A. A., Rodin, V. A., Panova, T. V., Sergeev, V. G., Zvereva, M. E. Direct Determination of the Structure of Single Biopolymer Molecules Using Nanopore Sequencing // *Biochem. Mosc.* – 2024. – V. 89, № Suppl 1. – P. S234–S248.
36. Berthold, D. E., Shetty, K. G., Jayachandran, K., Laughinghouse IV, H. D., Gantar, M. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture // *Biomass Bioenergy.* – 2019. – V. 122. – P. 280–289.
37. Blanco-Míguez, A., Beghini, F., Cumbo, F., McIver, L. J., Thompson, K. N., Zolfo, M., Manghi, P., Dubois, L., Huang, K.D., Thomas, A.M., Nickols, W.A., Piccinno, G., Piperni, E., Punčochář, M., Valles-Colomer, M., Tett, A., Giordano, F., Davies, R., Wolf, J., Berry, S.E., Spector, T.D., Franzosa, E.A., Pasolli, E., Asnicar, F., Huttenhower, C., Segata, N. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4 // *Nat. Biotechnol.* – 2023. – V. 41, № 11. – P. 1633–1644.
38. Borics G., Várbiro G., Padisák J. Disturbance and stress: different meanings in ecological dynamics? // *Hydrobiologia.* – 2013. – V. 711. – P. 1–7.
39. Briddon, C. L., Szekeres, E., Hegedüs, A., Nicoară, M., Chiriac, C., Stockenreiter, M., Drugă, B. The combined impact of low temperatures and shifting phosphorus availability on the competitive ability of cyanobacteria // *Sci. Rep.* – 2022. – V. 12, № 1. – P. 16409.
40. Buchholz, P. C., Feuerriegel, G., Zhang, H., Perez-Garcia, P., Nover, L. L., Chow, J., Streit, W.R., Pleiss, J. Plastics degradation by hydrolytic enzymes: The plastics-active enzymes database—PAZy // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* – 2022. – V. 90, № 7. – P. 1443–1456.
41. Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., Zemskaya, T. I. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results // *Scientific data.* – 2019. – V. 6, № 1. – P. 1–14.

42. Burkhardt, B. G., Watkins-Brandt, K. S., Defforey, D., Paytan, A., & White, A. E. Remineralization of phytoplankton-derived organic matter by natural populations of heterotrophic bacteria // *Marine Chemistry*. – 2014. – V. 163. – P. 1–9.
43. Cai T., Park S. Y., Li Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2013. – V. 19. – P. 360–369.
44. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nature methods*. – 2016. – V. 13, № 7. – P. 581–583.
45. Cao, Y., Wang, Y., Zheng, X., Li, F., Bo, X. RevEcoR: an R package for the reverse ecology analysis of microbiomes // *BMC Bioinformatics*. – 2016. – V. 17. – P. 1–6.
46. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D. Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature methods*. – 2010. – V. 7, № 5. – P. 335–336.
47. Carrillo-Reyes J., Barragán-Trinidad M., Buitrón G. Biological pretreatments of microalgal biomass for gaseous biofuel production and the potential use of rumen microorganisms: A review // *Algal Research*. – 2016. – V. 18. – P. 341–351.
48. Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P., Karp, P. D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes-a 2019 update // *Nucleic Acids Research*. – 2020. – V. 48, № D1. – P. D445–D453.
49. Cattaneo, A., Hudon, C., Vis, C., Gagnon, P. Hydrological control of filamentous green algae in a large fluvial lake (Lake Saint-Pierre, St. Lawrence River, Canada) // *Journal of Great Lakes Research*. – 2013. – V. 39, № 3. – P. 409–419.
50. de Celis, M., Modin, O., Arregui, L., Persson, F., Santos, A., Belda, I., Wilén, B.-M., Liébana, R. Community successional patterns and inter-kingdom interactions during granular biofilm development // *Npj Biofilms Microbiomes*. – 2024. – V. 10, № 1. – P. 109.
51. Cerruti, M., Stevens, B., Ebrahimi, S., Alloul, A., Vlaeminck, S. E., Weissbrodt, D. G. Enrichment and aggregation of purple non-sulfur bacteria in a mixed-culture sequencing-batch photobioreactor for biological nutrient removal from wastewater // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2020. – V. 8. – P. 557234.
52. Chakravorty, M., Nanda, M., Bisht, B., Sharma, R., Kumar, S., Mishra, A., Vlaskin, M.S., Chauhan, P.K. Kumar, V. Heavy metal tolerance in microalgae: detoxification mechanisms and applications // *Aquatic Toxicology*. – 2023. – V. 260. – P. 106555.
53. Charlesworth J., Burns B. P. Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments // *Aims Microbiol.* – 2016. – V. 2, № 3. – P. 251–261.
54. Chebotaryova, S. P., Zakharova, O. V., Gusev, A. A., Baranchikov, P. A., Kolesnikov, E. A., Yakusheva, A. S., Skripnikova, E.V., Lobakova, E.S., Xu, J., Alam, M.A., Solovchenko, A. E. Assessment of the Tolerance of a Chlorophyte *Desmodesmus* to CuO-NP for Evaluation of the Nanopollution Bioremediation Potential of This Microalga // *Nanomaterials*. – 2023. – V. 13, № 4. – P. 737.

55. Chekanov, K., Zaytseva, A., Mamedov, I., Solovchenko, A., Lobakova, E. The dynamics of the bacterial community of the photobioreactor-cultivated green microalga *Haematococcus lacustris* during stress-induced astaxanthin accumulation // *Biology*. – 2021. – V. 10, № 2. – P. 115.
56. Chekanov K., Kublanovskaya A., Lobakova E. Eukaryotic sequences in the 16Sr RNA metagenomic dataset of algal–bacterial consortia of the White Sea coastal zone // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2019. – V. 66, № 5. – P. 853–856.
57. Chia, M. A., Lorenzi, A. S., Ameh, I., Dauda, S., Cordeiro-Araújo, M. K., Agee, J. T., Okpanachi, I.Y., Adesalu, A. T. Susceptibility of phytoplankton to the increasing presence of active pharmaceutical ingredients (APIs) in the aquatic environment: A review // *Aquatic Toxicology*. – 2021. – V. 234. – P. 105809.
58. Chia, W. Y., Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Lup, A. N. K., Chew, K. W. Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production // *Environmental Science and Ecotechnology*. – 2020. – V. 4. – P. 100065.
59. Choi, S. S., Seo, Y. B., Nam, S. W., Kim, G. D. Enhanced production of astaxanthin by co-culture of *Paracoccus haeundaensis* and lactic acid bacteria // *Frontiers in Marine Science*. – 2021. – V. 7. – P. 597553.
60. Cooke, I., Mead, O., Whalen, C., Boote, C., Moya, A., Ying, H., Robbins, S., Strugnell, J.M., Darling, A., Miller, D., Voolstra, C.R., Adamska, M. Molecular techniques and their limitations shape our view of the holobiont // *Zoology*. – 2019. – V. 137. – P. 125695.
61. Cordovez, V., Schop, S., Hordijk, K., Dupré de Boulois, H., Coppens, F., Hanssen, I., Raaijmakers, J.M., Carrión, V. J. Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated *Microbacterium* spp // *Applied and environmental microbiology*. – 2018. – V. 84, № 22. – P. e01865–18.
62. Cui, H., Zhu, X., Zhu, Y., Huang, Y., Chen, B. Ecotoxicological effects of DBPs on freshwater phytoplankton communities in co-culture systems // *Journal of Hazardous Materials*. – 2022. – V. 421. – P. 126679.
63. Delmont, T. O., Gaia, M., Hinsinger, D. D., Fremont, P., Vanni, C., Fernandez-Guerra, A., Eren, A.M., Kourlaiev, A., d'Agata, L., Clayssen, Q., Villar, E., Labadie, K., Cruaud, C., Poulain, J., Da Silva, C., Wessner, M., Noel, B., Aury, J.-M., Tara Oceans Coordinators, de Vargas, C., Bowler, C., Karsenti, E., Pelletier, E., Wincker, P., Pelletier, E. Functional repertoire convergence of distantly related eukaryotic plankton lineages abundant in the sunlit ocean // *Cell Genomics*. – 2022. – V. 2, № 5.
64. Dias, E., Oliveira, M., Jones-Dias, D., Vasconcelos, V., Ferreira, E., Manageiro, V., Caniça, M. Assessing the antibiotic susceptibility of freshwater *Cyanobacteria* spp. // *Frontiers in microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 799.
65. Dong, H., Liu, W., Zhang, H., Zheng, X., Duan, H., Zhou, L., Xu, T., Ruan, R. Improvement of phosphate solubilizing bacteria *Paenibacillus xylanexedens* on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* and wastewater treatment in attached cultivation // *Chemosphere*. – 2022. – V. 306. – P. 135604.
66. Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., Langille, M. G. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions // *Nature Biotechnology*. – 2020. – V. 38, № 6. – P. 685–688.

67. Dow L. How do quorum-sensing signals mediate algae–bacteria interactions? // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9, № 7. – P. 1391.
68. Duhamel S. The microbial phosphorus cycle in aquatic ecosystems // *Nature Reviews Microbiology*. – 2024. – P. 1-17.
69. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – V. 32, № 5. – P. 1792–1797.
70. Edwards, A., Debonnaire, A. R., Nicholls, S. M., Rassner, S. M., Sattler, B., Cook, J. M., Davy, T., Soares, A., Mur, L.A.J., Hodson, A. J. In-field metagenome and 16S rRNA gene amplicon nanopore sequencing robustly characterize glacier microbiota // *BioRxiv*. – 2016. – P. 073965.
71. Efremenko, E., Senko, O., Maslova, O., Stepanov, N., Aslanli, A., Lyagin, I. Biocatalysts in synthesis of microbial polysaccharides: Properties and development trends // *Catalysts*. – 2022. – V. 12, № 11. – P. 1377.
72. Eikelboom D. Filamentous organisms observed in activated sludge // *Water Research*. – 1975. – V. 9, № 4. – P. 365–388.
73. Ennaceri, H., Ishika, T., Mkpuma, V. O., Moheimani, N. R. Microalgal biofilms: Towards a sustainable biomass production // *Algal Research*. – 2023. – V. 72. – P. 103124.
74. Ewald P. W. Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1987. – V. 503. – P. 295–306.
75. Fan J., Huang S., Chorlton S. D. BugSeq: a highly accurate cloud platform for long-read metagenomic analyses // *BMC Bioinformatics*. – 2021. – V. 22. – P. 1–12.
76. Fedoseeva, E. V., Sergeeva, Y. D., Volkova, V. D., Stom, D. I., Terekhova, V. A. Resistance and Activity of Phytopathogenic and Potential Antagonistic Soil Filamentous Fungi under the Action of Heavy Metals // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2023. – V. 16, № 6. – P. 831–842.
77. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. – 1985. – V. 39, № 4. – P. 783–791.
78. Franzosa, E. A., McIver, L. J., Rahnavard, G., Thompson, L. R., Schirmer, M., Weingart, G., Lipson, K.S., Knight, R., Caporaso, J.G., Segata, N., Huttenhower, C. Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes // *Nature Methods*. – 2018. – V. 15, № 11. – P. 962–968.
79. Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. D. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuário, D. B., Fiore, M. F. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production // *Hydrobiologia*. – 2009. – V. 627. – P. 195–209.
80. Fuster, M., Ruiz, T., Lamarque, A., Coulon, M., Legrand, B., Sabart, M., Latour, D., Mallet, C. Cyanosphere Dynamic During *Dolichospermum* Bloom: Potential Roles in Cyanobacterial Proliferation // *Microbial Ecology*. – 2024. – V. 87, № 1. – P. 3.
81. Gallardo-Altamirano, M. J., Maza-Márquez, P., Montemurro, N., Pérez, S., Rodelas, B., Osorio, F., Pozo, C. Insights into the removal of pharmaceutically active compounds from sewage sludge by two-stage mesophilic anaerobic digestion // *Science of The Total Environment*. – 2021. – V. 789. – P. 147869.

82. Gao, Y. X., Li, X., Fan, X. Y., Zhao, J. R., Zhang, Z. X. Wastewater treatment plants as reservoirs and sources for antibiotic resistance genes: a review on occurrence, transmission and removal // *Journal of water process engineering*. – 2022. – V. 46. – P. 102539.
83. Garbowski, T., Pietryka, M., Pulikowski, K., Richter, D. The use of a natural substrate for immobilization of microalgae cultivated in wastewater // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10, № 1. – P. 7915.
84. Glöckner F. O., Fuchs B. M., Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization // *Applied and environmental microbiology*. – 1999. – V. 65, № 8. – P. 3721–3726.
85. Golovchenko, A. V., Dobrovolskaya, T. G., Sokolova, D. S., Gracheva, T. A., Dorchenkova, Y. A., Glukhova, T. V., Manucharova, N. A. Diversity and Functional Potential of Prokaryotic Communities in Depth Profile of Boreo-Nemoral Minerotrophic Pine Swamp (European Russia) // *Forests*. – 2023. – V. 14, № 12. – P. 2313.
86. Gonçalves A. L., Pires J. C., Simões M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment // *Algal Research*. – 2017. – V. 24. – P. 403–415.
87. González-González L. M., De-Bashan L. E. Toward the enhancement of microalgal metabolite production through microalgae–bacteria consortia // *Biology*. – 2021. – V. 10, № 4. – P. 282.
88. Gorelova, O., Baulina, O., Solovchenko, A., Selyakh, I., Chivkunova, O., Semenova, L., Scherbakov, P., Burakova O., Lobakova, E. Coordinated rearrangements of assimilatory and storage cell compartments in a nitrogen-starving symbiotic chlorophyte cultivated under high light // *Archives of microbiology*. – 2015. – V. 197. – P. 181–195.
89. Grivalský, T., Ranglová, K., da Câmara Manoel, J. A., Lakatos, G. E., Lhotský, R., Masojídek, J. Development of thin-layer cascades for microalgae cultivation: milestones // *Folia microbiologica*. – 2019. – V. 64. – P. 603–614.
90. Grzegorzec M., Wartalska K., Kowalik R. Occurrence and sources of hormones in water resources—environmental and health impact // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2024. – P. 1–16.
91. Gubelit Y. I., Grossart H.-P. New Methods, New Concepts: What Can Be Applied to Freshwater Periphyton? // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 1275.
92. Hadi, S. I., Santana, H., Brunale, P. P., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., Oliveira, M.E.C., Silva, F.C.P., Brasil, B. S. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters // *PloS One*. – 2016. – V. 11, № 2. – P. e0149284.
93. Han M., Zhang C., Ho S.-H. Immobilized microalgal system: An achievable idea for upgrading current microalgal wastewater treatment // *Environmental Science and Ecotechnology*. – 2023. – V. 14. – P. 100227.
94. Hanashiro, F. T. T., Mukherjee, S., Souffreau, C., Engelen, J., Brans, K. I., Busschaert, P., De Meester, L. Freshwater bacterioplankton metacommunity structure along urbanization gradients in Belgium // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 743.
95. Hatfield, R. G., Batista, F. M., Bean, T. P., Fonseca, V. G., Santos, A., Turner, A. D., Lewis, A., Dean, K.J., Martinez-Urtaza, J. The application of nanopore sequencing technology to the study of dinoflagellates: a proof of concept study for rapid sequence-based discrimination of potentially harmful algae // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 844.

96. Heimann, K., Huerlimann, R. Microalgal Classification. In: Kim, S.-K. (ed.). Handbook of Marine Microalgae. – USA: Elsevier. – 2015. – P. 25–41.
97. Henderson, M., Ergas, S. J., Ghebremichael, K., Gross, A., Ronen, Z. Occurrence of antibiotic-resistant genes and bacteria in household greywater treated in constructed wetlands // *Water*. – 2022. – V. 14, № 5. – P. 758.
98. Herbes S. E., Allen H. E., Mancy K. H. Enzymatic characterization of soluble organic phosphorus in lake water // *Science*. – 1975. – V. 187, № 4175. – P. 432–434.
99. Hitchcock J. N. Microplastics can alter phytoplankton community composition // *Science of the Total Environment*. – 2022. – V. 819. – P. 153074.
100. Holtzman J., Lehman J. T. Role of apatite weathering in the eutrophication of Lake Victoria. In: Lehman J. T. (ed.). Environmental Change and Response in East African Lakes. – Netherlands: Springer Science & Business Media. – 1998. – P. 89–98.
101. Horn H. S. Measurement of "overlap" in comparative ecological studies // *The American Naturalist*. – 1966. – V. 100, № 914. – P. 419–424.
102. Hou, S. J., Cheng, K. C., Lin, S. H., Hsiao, I. L., Santoso, S. P., Singajaya, S., Chou, Y.-C., Lin, S. P. Improvement of extracellular polysaccharides production from *Cordyceps militaris* immobilized alginate beads in repeated-batch fermentation // *LWT*. – 2024. – V. 193. – P. 115752.
103. Hu, X., Meneses, Y. E., Hassan, A. A., Stratton, J., Huo, S. Application of alginate immobilized microalgae in treating real food industrial wastewater and design of annular photobioreactor: A proof-of-concept study // *Algal Research*. – 2021. – V. 60. – P. 102524.
104. Huggins, L. G., Colella, V., Atapattu, U., Koehler, A. V., Traub, R. J. Nanopore sequencing using the full-length 16S rRNA gene for detection of blood-borne bacteria in dogs reveals a novel species of hemotropic mycoplasma // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – V. 10, № 6. – P. e03088–22.
105. Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., Schuster, S. C. MEGAN analysis of metagenomic data // *Genome Research*. – 2007. – V. 17, № 3. – P. 377–386.
106. Inskeep, W. P., Jay, Z. J., Herrgard, M. J., Kozubal, M. A., Rusch, D. B., Tringe, S. G., Macur, R.E., Jennings, R. deM., Boyd, E.S., Spear, J.R., Roberto, F. F. Phylogenetic and functional analysis of metagenome sequence from high-temperature archaeal habitats demonstrate linkages between metabolic potential and geochemistry // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – V. 4. – P. 95.
107. Iqbal, K., Saxena, A., Pande, P., Tiwari, A., Joshi, N. C., Varma, A., Mishra, A. Microalgae-bacterial granular consortium: Striding towards sustainable production of biohydrogen coupled with wastewater treatment // *Bioresource Technology*. – 2022. – V. 354. – P. 127203.
108. Ismagulova, T., Chekanov, K., Gorelova, O., Baulina, O., Semenova, L., Selyakh, I., Chivkunova, O., Lobakova, E., Karpova, O., Solovchenko, A. A new subarctic strain of *Tetrademus obliquus*—part I: identification and fatty acid profiling // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – V. 30. – P. 2737–2750.
109. Izadi P., Izadi P., Eldyasti A. Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: a review // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2020. – V. 19. – P. 561–593.

110. Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J.R., Beggs, A.D., Dilthey, A.T., Fiddes, I.T., Malla, S., Marriott, H., Nieto, T., O'Grady, J., Olsen, H.E., Pedersen, B.S., Rhie, A., Richardson, H., Quinlan, A.R., Snutch, T.P., Tee, L., Paten, B., Phillippy, A.M., Simpson, J.T., Loman, N.J., Loose, M. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads // *Nature biotechnology*. – 2018. – V. 36, № 4. – P. 338–345.
111. Jamy, M., Foster, R., Barbera, P., Czech, L., Kozlov, A., Stamatakis, A., Bending, G., Hilton, S., Bass, D., Burki, F. Long-read metabarcoding of the eukaryotic rDNA operon to phylogenetically and taxonomically resolve environmental diversity // *Molecular Ecology Resources*. – 2020. – V. 20, № 2. – P. 429–443.
112. Jankiewicz U., Swiontek Brzezinska M. Purification, characteristics and identification of chitinases synthesized by the bacterium *Serratia plymuthica* MP44 antagonistic against phytopathogenic fungi // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2015. – V. 51. – P. 560–565.
113. Ji B., Liu Y. Assessment of microalgal-bacterial granular sludge process for environmentally sustainable municipal wastewater treatment // *Acs Es&T Water*. – 2021. – V. 1, № 12. – P. 2459–2469.
114. Ji B., Shi Y., Yilmaz M. Microalgal-bacterial granular sludge process for sustainable municipal wastewater treatment: Simple organics versus complex organics // *Journal of Water Process Engineering*. – 2022. – V. 46. – P. 102613.
115. Johnson J. W., Fisher J. F., Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2013. – V. 1277, № 1. – P. 54–75.
116. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Matsuura, Y., Ishiguro-Watanabe, M. KEGG: biological systems database as a model of the real world // *Nucleic Acids Research*. – 2025. – V. 53, № D1. – P. D672–D677.
117. Karlicki M., Antonowicz S., Karnkowska A. Tiara: deep learning-based classification system for eukaryotic sequences // *Bioinformatics*. – 2022. – V. 38, № 2. – P. 344–350.
118. Kashulin, N. A., Bekkelund A, D. V., Petrova, O. V. Apatite mining and processing production and eutrophication of the Arctic Lake Imandra // *Arktika: Ekologiya i Ekonomika*. – 2019. – V. 3, № 35. – P. 16–34.
119. Kashulin N., Kashulina T., Bekkelund A. Long-term eutrophication and dynamics of bloom-forming microbial communities during summer HAB in large Arctic lake // *Environments*. – 2021. – V. 8, № 8. – P. 82.
120. Kathi, S., Singh, S., Yadav, R., Singh, A. N., Mahmoud, A. E. D. Wastewater and sludge valorisation: a novel approach for treatment and resource recovery to achieve circular economy concept // *Frontiers in Chemical Engineering*. – 2023. – V. 5. – P. 1129783.
121. Kerkhof, L. J., Dillon, K. P., Häggblom, M. M., McGuinness, L. R. Profiling bacterial communities by MinION sequencing of ribosomal operons // *Microbiome*. – 2017. – V. 5. – P. 1–11.
122. Kesari, K. K., Soni, R., Jamal, Q. M. S., Tripathi, P., Lal, J. A., Jha, N. K., Siddiqui, M.H., Kumar, P., Tripathi, V., Ruokolainen, J. Wastewater treatment and reuse: a review of its applications and health implications // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2021. – V. 232. – P. 1–28.
123. Kezlya E., Tseplik N., Kulikovskiy M. Genetic Markers for Metabarcoding of Freshwater Microalgae: Review // *Biology*. – 2023. – V. 12, № 7. – P. 1038.

124. Khalighi, M., Sommeria-Klein, G., Gonze, D., Faust, K., Lahti, L. Quantifying the impact of ecological memory on the dynamics of interacting communities // PLoS computational biology. – 2022. – V. 18, № 6. – P. e1009396.
125. Kim, B. H., Ramanan, R., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction // Biomass Bioenergy. – 2014. – V. 69. – P. 95–105.
126. Koreivienė, J., Valčiukas, R., Karosienė, J., & Baltrėnas, P. Testing of *Chlorella/Scenedesmus* microalgae consortia for remediation of wastewater, CO₂ mitigation and algae biomass feasibility for lipid production // Journal of Environmental Engineering and Landscape Management. – 2014. – V. 22, № 2. – P. 105–114.
127. Krinos, A. I., Mars Brisbin, M., Hu, S. K., Cohen, N. R., Rynearson, T. A., Follows, M. J., Schulz, F., Alexander, H. Missing microbial eukaryotes and misleading meta-omic conclusions // Nature Communications. – 2024. – V. 15, № 1. – P. 9873.
128. Krohn-Molt, I., Wemheuer, B., Alawi, M., Poehlein, A., Güllert, S., Schmeisser, C., Pommerening-Röser, A., Grundhoff, A., Daniel, R., Hanelt D., Streit, W. R. Metagenome Survey of a Multispecies and Alga-Associated Biofilm Revealed Key Elements of Bacterial-Algal Interactions in Photobioreactors // Applied and environmental microbiology. – 2013. – V. 79, № 20. – P. 6196–6206.
129. Krohn-Molt, I., Alawi, M., Förstner, K. U., Wiegandt, A., Burkhardt, L., Indenbirken, D., Thieß, M., Grundhoff, A., Kehr, J., Tholey, A., Streit, W. R. Insights into Microalga and Bacteria Interactions of Selected Phycosphere Biofilms Using Metagenomic, Transcriptomic, and Proteomic Approaches // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 1941.
130. Kublanovskaya, A., Chekanov, K., Solovchenko, A., Lobakova, E. Cyanobacterial diversity in the algal–bacterial consortia from Subarctic regions: new insights from the rock baths at White Sea Coast // Hydrobiologia. – 2019. – V. 830, № 1. – P. 17–31.
131. Kublanovskaya, A., Solovchenko, A., Fedorenko, T., Chekanov, K., Lobakova, E. Natural Communities of Carotenogenic Chlorophyte *Haematococcus lacustris* and Bacteria from the White Sea Coastal Rock Ponds // Microbial ecology. – 2020a. – V. 79. – P. 785–800.
132. Kublanovskaya, A., Baulina, O., Chekanov, K., Lobakova, E. The microalga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) forms natural biofilms in supralittoral White Sea coastal rock ponds // Planta. – 2020b. – V. 252, № 3. – P. 37.
133. Kuppaa Baskaran, D. K., Umale, S., Zhou, Z., Raman, K., Anantharaman, K. Metagenome-based metabolic modelling predicts unique microbial interactions in deep-sea hydrothermal plume microbiomes // ISME communications. – 2023. – V. 3, № 1. – P. 42.
134. Lahiri S., Ghosh D., Sarkar D. Biogeochemical cycling bacteria and nutrient dynamics in waste stabilization pond system // Wastewater management through aquaculture. – 2018. – P. 29–52.
135. Lavrentyeva, E., Banzaraktsaeva, T., Dambaev, V., Buyantueva, L., Valova, E., Ivanov, V., Plotnikov, A. Taxonomic diversity and functional potential of microbial communities in salt lakes Gudzhirganskoe and Nukhe-Nur (Barguzin depression, Baikal Rift Zone) // Biological Communications. – 2023. – V. 68, № 2. – P. 86–96.
136. Law, Y., Kirkegaard, R. H., Cokro, A. A., Liu, X., Arumugam, K., Xie, C., Stockholm-Bjerregaard, M., Drautz-Moses, D.I., Nielsen, P.H., Wuertz, S., Williams, R. B. Integrative

- microbial community analysis reveals full-scale enhanced biological phosphorus removal under tropical conditions // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6, № 1. – P. 25719.
137. Lebonah, D. E., Dileep, A., Chandrasekhar, K., Sreevani, S., Sreedevi, B., Pramoda Kumari, J. DNA barcoding on bacteria: A review // *Advances in Biology*. – 2014. – V. 2014, № 1. – P. 541787.
138. Lee, J. Y., Monk, I. R., Gonçalves da Silva, A., Seemann, T., Chua, K. Y., Kearns, A., Hill, R., Woodford, N., Bartels, M.D., Strommenger, B., Laurent, F., Dodémont, M., Deplano, A., Patel, R., Larsen, A.R., Korman, T.M., Stinear, T.P., Howden, B. P. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis* // *Nature microbiology*. – 2018. – V. 3, № 10. – P. 1175–1185.
139. Lemoine, A., Dirberg, G., Georges, M., Robinet, T. Fine-scale congruence in bacterial community structure from marine sediments sequenced by short-reads on Illumina and long-reads on Nanopore // 2023.
140. Leong, W. H., Kiatkittipong, K., Kiatkittipong, W., Cheng, Y. W., Lam, M. K., Shamsuddin, R., Mohamad, M., Lim, J. W. Comparative performances of microalgal-bacterial co-cultivation to bioremediate synthetic and municipal wastewaters whilst producing biodiesel sustainably // *Processes*. – 2020. – V. 8, № 11. – P. 1427.
141. Li, S., Li, X., Chang, H., Zhong, N., Ren, N., Ho, S. H. Comprehensive insights into antibiotic resistance gene migration in microalgal-bacterial consortia: Mechanisms, factors, and perspectives // *Science of the Total Environment*. – 2023. – P. 166029.
142. Lian, J., Zou, D., Trebuch, L. M., Duan, C., Li, M. Exploring the interactions between algae and archaea // *Marine Life Science & Technology*. – 2024. – P. 1-16.
143. Liepina-Leimane, I., Barda, I., Jurgensone, I., Labucis, A., Baraskova, L., Aigars, J. Nitrogen fixation rate and phosphorus enrichment effects on diazotrophic cyanobacteria in the Gulf of Riga // *Marine Biology*. – 2024. – V. 171, № 9. – P. 169.
144. Lima, S., Brucato, A., Caputo, G., Grisafi, F., Scargiali, F. Inoculum of indigenous microalgae/activated sludge for optimal treatment of municipal wastewaters and biochemical composition of residual biomass for potential applications // *Journal of Water Process Engineering*. – 2022. – V. 49. – P. 103142.
145. Liu, Y. R., Delgado-Baquerizo, M., Yang, Z., Feng, J., Zhu, J., Huang, Q. Microbial taxonomic and functional attributes consistently predict soil CO₂ emissions across contrasting croplands // *Science of The Total Environment*. – 2020. – V. 702. – P. 134885.
146. Lobakova, E. S., Selyakh, I. O., Semenova, L. R., Scherbakov, P. N., Fedorenko, T. A., Chekanov, K. A., Chivkunova, O.B., Baulina, O.I., Vasilieva, S.G., Solovchenko, A.E., Gorelova, O. A. Hints for understanding microalgal phosphate-resilience from *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056 (Trebouxiophyceae) isolated from a phosphorus-polluted site // *Journal of Applied Phycology*. – 2022. – V. 34, № 5. – P. 2409–2422.
147. Lobus N. V., Kulikovskiy M. S. The Co-Evolution Aspects of the Biogeochemical Role of Phytoplankton in Aquatic Ecosystems: A Review // *Biology*. – 2023. – V. 12, № 1. – P. 92.
148. van der Loos, L. M., D'hondt, S., Willems, A., & De Clerck, O. Characterizing algal microbiomes using long-read nanopore sequencing // *Algal Research*. – 2021. – V. 59. – P. 102456.

149. López, N. I., Pettinari, M. J., Stackebrandt, E., Tribelli, P. M., Pötter, M., Steinbüchel, A., Méndez, B. S. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate) producer isolated from an Antarctic environment // *Current microbiology*. – 2009. – V. 59. – P. 514-519.
150. Louati, I., Nunan, N., Tambosco, K., Bernard, C., Humbert, J. F., Leloup, J. The phyto-bacterioplankton couple in a shallow freshwater ecosystem: Who leads the dance? // *Harmful Algae*. – 2023. – V. 126. – P. 102436.
151. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J. S., Lee, K. C., Saravanan, V. S., Santhanakrishnan, P. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of neem seedlings // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2010. – V. 60, № 7. – P. 1687-1692.
152. Marcelino, V. R., Clausen, P. T., Buchmann, J. P., Wille, M., Iredell, J. R., Meyer, W., Lund, O., Sorrell, T.C., Holmes, E. C. CCMetagen: comprehensive and accurate identification of eukaryotes and prokaryotes in metagenomic data // *Genome biology*. – 2020. – V. 21. – P. 1–15.
153. Martin, N., Bernat, T., Dinasquet, J., Stofko, A., Damon, A., Deheyn, D. D., Azam, F., Smith, J.E., Davey, M.P., Smith, A.G., Vignolini, S., Wangpraseurt, D. Synthetic algal-bacteria consortia for space-efficient microalgal growth in a simple hydrogel system // *Journal of Applied Phycology*. – 2021. – V. 33. – P. 2805–2815.
154. Mawadah I., Prabaningtyas S. The effect of adding bacteria (nitrogen-fixing bacteria, amyolytic, and phosphate solubilizing bacteria) and different culture media on the growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* // *BIO Web of Conferences*. – EDP Sciences, 2024. – V. 117. – P. 01045.
155. McMurdie P. J., Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data // *PloS One*. – 2013. – V. 8, № 4. – P. e61217.
156. Mishra A., Mandoli A., Jha B. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan // *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. – 2008. – V. 35, № 10. – P. 1093.
157. Mishra S. Cyanobacterial imprints in diversity and phylogeny. In: Singh, P.K., Singh, V.K., Kumar, A., Shrivastava, A.K. *Advances in Cyanobacterial Biology*. – USA: Elsevier. – 2020. –C. 1–15.
158. Moiseenko, T. I., Sharov, A. N., Vandish, O. I., Kudryavtseva, L. P., Gashkina, N. A., Rose, C. Long-term modification of Arctic lake ecosystems: Reference condition, degradation under toxic impacts and recovery (case study Imandra Lakes, Russia) // *Limnologica*. – 2009. – V. 39, № 1. – P. 1–13.
159. Morillas-España, A., Lafarga, T., Ación-Fernández, F. G., Gómez-Serrano, C., González-López, C. V. Annual production of microalgae in wastewater using pilot-scale thin-layer cascade photobioreactors // *Journal of Applied Phycology*. – 2021. – V. 33. – P. 3861–3871.
160. Mthethwa-Hlongwa, N. P., Amoah, I. D., Gomez, A., Davison, S., Reddy, P., Bux, F., Kumari, S. Profiling pathogenic protozoan and their functional pathways in wastewater using 18S rRNA and shotgun metagenomics // *Science of The Total Environment*. – 2024. – V. 912. – P. 169602.
161. Nagarajan, D., Lee, D. J., Varjani, S., Lam, S. S., Allakhverdiev, S. I., & Chang, J. S. Microalgae-based wastewater treatment–microalgae-bacteria consortia, multi-omics approaches and algal stress response // *Science of the Total Environment*. – 2022. – V. 845. – P. 157110.

162. Nelson C., Garcia-Pichel F. Beneficial cyanosphere heterotrophs accelerate establishment of cyanobacterial biocrust // *Applied and environmental microbiology*. – 2021. – V. 87, № 20. – P. e01236–21.
163. Nozhevnikova A. N., Botchkova E. A., Plakunov V. K. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology // *Microbiology*. – 2015. – V. 84, № 6. – P. 731–750.
164. Nuramkhaan, M., Zhang, Y., Dong, X., Huang, W., Lei, Z., Shimizu, K., Zhang, Z., Utsumi, M., Lee, D. J. Isolation of microalgal strain from algal-bacterial aerobic granular sludge and examination on its contribution to granulation process during wastewater treatment in respect of nutrients removal, auto-aggregation capability and EPS excretion // *Bioresource Technology Reports*. – 2019. – V. 8. – P. 100330.
165. Ota S., Kawano S. Extraction and molybdenum blue-based quantification of total phosphate and polyphosphate in *Parachlorella* // *Bio-Protocol*. – 2017. – V. 7, № 17. – P. e2539–e2539.
166. Oyserman, B. O., Moya, F., Lawson, C. E., Garcia, A. L., Vogt, M., Heffernan, M., Noguera, D.R., McMahon, K. D. Ancestral genome reconstruction identifies the evolutionary basis for trait acquisition in polyphosphate accumulating bacteria // *The ISME journal*. – 2016. – V. 10, № 12. – P. 2931–2945.
167. Padmaperuma, G., Kapoore, R. V., Gilmour, D. J., Vaidyanathan, S. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing // *Critical reviews in biotechnology*. – 2018. – V. 38, № 5. – P. 690–703.
168. Palacios O. A., López B. R., Bashan L. E. de-. Microalga Growth-Promoting Bacteria (MGPB): A formal term proposed for beneficial bacteria involved in microalgal–bacterial interactions // *Algal Research*. – 2022. – V. 61. – P. 102585.
169. Park, J., Park, B. S., Wang, P., Patidar, S. K., Kim, J. H., Kim, S. H., Han, M. S. Phycospheric native bacteria *Pelagibaca bermudensis* and *Stappia* sp. ameliorate biomass productivity of *Tetraselmis striata* (KCTC1432BP) in co-cultivation system through mutualistic interaction // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – P. 289.
170. Parker, J., Helmstetter, A. J., Devey, D., Wilkinson, T., Papadopulos, A. S. Field-based species identification of closely-related plants using real-time nanopore sequencing // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7, № 1. – P. 8345.
171. Pascault, N., Rué, O., Loux, V., Pédrón, J., Martin, V., Tambosco, J., Bernard, C., Humbert, J.-F., Leloup, J. Insights into the cyanosphere: capturing the respective metabolisms of cyanobacteria and chemotrophic bacteria in natural conditions? // *Environmental Microbiology Reports*. – 2021. – V. 13, № 3. – P. 364–374.
172. Pastori G. M., Foyer C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls // *Plant Physiology*. – 2002. – V. 129, № 2. – P. 460–468.
173. Patel, V. K., Sahoo, N. K., Patel, A. K., Rout, P. K., Naik, S. N., Kalra, A. Exploring microalgae consortia for biomass production: a synthetic ecological engineering approach towards sustainable production of biofuel feedstock // *Algal Biofuels: Recent Advances and Future Prospects*. – 2017. – P. 109–126.
174. Patil K. R., McHardy A. C. Alignment-free genome tree inference by learning group-specific distance metrics // *Genome biology and evolution*. – 2013. – V. 5, № 8. – P. 1470–1484.

175. Patil, S. M., Rane, N. R., Bankole, P. O., Krishnaiah, P., Ahn, Y., Park, Y. K., Yadav, K.K., Amin, M.A., Jeon, B. H. An assessment of micro-and nanoplastics in the biosphere: A review of detection, monitoring, and remediation technology // *Chemical Engineering Journal*. – 2022. – V. 430. – P. 132913.
176. Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S.S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A.M., Gile, G.H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P.J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Lukeš, J., Mann, D.J., Mitchell, E.A.D., Nitsche, F., Romeralo, M., Saunders, G.W., Simpson, A.G.B., Smirnov, A.V., Spouge, J.L., Stern, R.F., Stoeck, T., Zimmermann, J., Schindel, D., de Vargas, C. CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms // *PLoS biology*. – 2012. – V. 10, № 11. – P. e1001419.
177. Perera, I. A., Abinandan, S., R. Subashchandrabose, S., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M. Microalgal–bacterial consortia unveil distinct physiological changes to facilitate growth of microalgae // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2021. – V. 97, № 3. – P. fiab012.
178. Pinto, J., Lami, R., Krasovec, M., Grimaud, R., Urios, L., Lupette, J., Escande, M.-L., Sanchez, F., Intertaglia, L., Grimsley, N., Piganeau, G., Sanchez-Brosseau, S. Features of the Opportunistic Behaviour of the Marine Bacterium *Marinobacter algicola* in the Microalga *Ostreococcus tauri* Phycosphere // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9, № 8. – P. 1777.
179. Pinto Y., Bhatt A. S. Sequencing-based analysis of microbiomes // *Nature Reviews Genetics*. – 2024. – V. 25, № 12. – P. 829–845.
180. Płaza, G., Jałowicki, Ł., Głowacka, D., Hubeny, J., Harnisz, M., Korzeniewska, E. Insights into the microbial diversity and structure in a full-scale municipal wastewater treatment plant with particular regard to Archaea // *PLoS One*. – 2021. – V. 16, № 4. – P. e0250514.
181. Plouviez, M., Fernández, E., Grossman, A. R., Sanz-Luque, E., Sells, M., Wheeler, D., Guieysse, B. Responses of *Chlamydomonas reinhardtii* during the transition from P-deficient to P-sufficient growth (the P-overplus response): the roles of the vacuolar transport chaperones and polyphosphate synthesis // *Journal of Phycology*. – 2021. – V. 57, № 3. – P. 988–1003.
182. Portik D. M., Brown C. T., Pierce-Ward N. T. Evaluation of taxonomic classification and profiling methods for long-read shotgun metagenomic sequencing datasets // *BMC Bioinformatics*. – 2022. – V. 23, № 1. – P. 541.
183. Power R. A., Parkhill J., De Oliveira T. Microbial genome-wide association studies: lessons from human GWAS // *Nature Review Genetics*. – 2017. – V. 18, № 1. – P. 41–50.
184. Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S. K., Khanna, M., Lal, R. Polyphasic approach of bacterial classification—an overview of recent advances // *Indian Journal of Microbiology*. – 2007. – V. 47. – P. 98–108.
185. Pushpakumara, B. U., Tandon, K., Willis, A., Verbruggen, H. Unravelling microalgal-bacterial interactions in aquatic ecosystems through 16S rRNA gene-based co-occurrence networks // *Scientific Reports*. – 2023. – V. 13, № 1. – P. 2743.
186. Qin, Y., Hou, J., Deng, M., Liu, Q., Wu, C., Ji, Y., & He, X. Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6, № 1. – P. 35232.
187. Qiu, G., Zuniga-Montanez, R., Law, Y., Thi, S. S., Nguyen, T. Q. N., Eganathan, K., Liu, X., Nielsen, P.H., Williams, R.B.H., Wuertz, S. Polyphosphate-accumulating organisms in full-scale

- tropical wastewater treatment plants use diverse carbon sources // *Water research*. – 2019. – V. 149. – P. 496–510.
188. Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications // *Biotechnology advances*. – 2016. – V. 34, № 1. – P. 14–29.
189. Rambo, I. M., Dombrowski, N., Constant, L., Erdner, D., Baker, B. J. Metabolic relationships of uncultured bacteria associated with the microalgae *Gambierdiscus* // *Environmental Microbiology*. – 2020. – V. 22, № 5. – P. 1764–1783.
190. Ramegowda, V., Da Costa, M. V. J., Harihar, S., Karaba, N. N., Sreeman, S. M. Abiotic and biotic stress interactions in plants: a cross-tolerance perspective/ In: Hossain, M.A., Liu, F., Burritt, D.J., Fujita, M., Huang, B. (eds). *Priming-mediated stress and cross-stress tolerance in crop plants*. – USA:Elsevier. – 2020. – P. 267–302.
191. Rang, F. J., Kloosterman, W. P., Ridder, J. de. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy // *Genome biology*. – 2018. – V. 19, № 1. – P. 90.
192. Ranglová, K., Lakatos, G. E., Manoel, J. A. C., Grivalský, T., Estrella, F. S., Fernández, F. G. A., Molnár, Z., Ördög, V., Masojídek, J. Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 *Chlorella* strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater // *Algal Research*. – 2021. – V. 53. – P. 102136.
193. Rathi, M., Nandabalan, Y. K. Copper-tolerant rhizosphere bacteria—characterization and assessment of plant growth promoting factors // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2017. – V. 24. – P. 9723-9733.
194. Rathi, M., Yogalakshmi, K. *Brevundimonas diminuta* MYS6 associated *Helianthus annuus* L. for enhanced copper phytoremediation // *Chemosphere*. – 2021. – V. 263. – P. 128195.
195. Reddy, G. S., Matsumoto, G. I., Schumann, P., Stackebrandt, E., & Shivaji, S. Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2004. – V. 54, № 3. – P. 713-719.
196. Redfield, A. C. The biological control of chemical factors in the environment // *American scientist*. – 1958. – V. 46, № 3. – P. 230A-221.
197. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *The Journal of cell biology*. – 1963. – V. 17, № 1. – P. 208.
198. Rodgers, E. M., Gomez Isaza, D. F. The mechanistic basis and adaptive significance of cross-tolerance: a ‘pre-adaptation’ to a changing world? // *Journal of Experimental Biology*. – 2023. – V. 226, № 11. – P. jeb245644.
199. Romanis, C. S., Pearson, L. A., Neilan, B. A. Cyanobacterial blooms in wastewater treatment facilities: Significance and emerging monitoring strategies // *Journal of Microbiological Methods*. – 2021. – V. 180. – P. 106123.
200. Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I. The hologenome concept of evolution after 10 years // *Microbiome*. – 2018. – V. 6. – P. 1-14.
201. Saary, P., Mitchell, A. L., Finn, R. D. Estimating the quality of eukaryotic genomes recovered from metagenomic analysis with EukCC // *Genome biology*. – 2020. – V. 21. – P. 1-21.

202. Sadiq, F. A., Hansen, M. F., Burmølle, M., Heyndrickx, M., Flint, S., Lu, W., Chen, W., Zhang, H. Trans-kingdom interactions in mixed biofilm communities // *FEMS microbiology reviews*. – 2022. – V. 46, № 5. – P. fuac024.
203. Saini, J. S., Manni, M., Hassler, C., Cable, R. N., Duhaime, M. B., Zdobnov, E. M. Genomic insights into the coupling of a *Chlorella*-like microeukaryote and sulfur bacteria in the chemocline of permanently stratified Lake Cadagno // *The ISME Journal*. – 2023. – V. 17, № 6. – P. 903-915.
204. Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. // *Molecular biology and evolution*. – 1987. – V. 4, № 4. – P. 406-425.
205. Salcher, M. M., Posch, T., Pernthaler, J. In situ substrate preferences of abundant bacterioplankton populations in a prealpine freshwater lake // *The ISME journal*. – 2013. – V. 7, № 5. – P. 896-907.
206. Sánchez-Sandoval, D. S., González-Ortega, O., Vazquez-Martínez, J., García de la Cruz, R. F., & Soria-Guerra, R. E. Diclofenac removal by the microalgae species *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, and *Scenedesmus obliquus* // *3 Biotech*. – 2022. – V. 12, № 9. – P. 210.
207. Santo, É. D. E., Ishii, M., Pinto, U. M., Matsudo, M. C., Carvalho, J. C. M. D. Obtaining bioproducts from the studies of signals and interactions between microalgae and bacteria // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10, № 10. – P. 2029.
208. Sauvage, T., Schmidt, W. E., Suda, S., Fredericq, S. A metabarcoding framework for facilitated survey of endolithic phototrophs with *tuf A* // *BMC ecology*. – 2016. – V. 16. – P. 1-21.
209. Schädler, T., Neumann-Cip, A. C., Wieland, K., Glöckler, D., Haisch, C., Brück, T., Weuster-Botz, D. High-density microalgae cultivation in open thin-layer cascade photobioreactors with water recycling // *Applied Sciences*. – 2020. – V. 10, № 11. – P. 3883.
210. Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H., & Muyzer, G. Genetic diversity of ‘satellite’ bacteria present in cultures of marine diatoms // *FEMS microbiology ecology*. – 2002. – V. 42, № 1. – P. 25-35.
211. Schönborn, C., Bauer, H.-D., Röske, I. Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules // *Water Research*. – 2001. – V. 35, № 13. – P. 3190-3196.
212. Schuurmans, R. M., van Alphen, P., Schuurmans, J. M., Matthijs, H. C., Hellingwerf, K. J. Comparison of the photosynthetic yield of cyanobacteria and green algae: different methods give different answers // *PloS one*. – 2015. – V. 10, № 9. – P. e0139061.
213. Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K., De Vos, P. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1994. – V. 44, № 3. – P. 499-510.
214. Selivanova, E. A., Yakimov, M. M., Kataev, V. Y., Khlopko, Y. A., Balkin, A. S., Plotnikov, A. O. The Cultivation of Halophilic Microalgae Shapes the Structure of Their Prokaryotic Assemblages // *Microorganisms*. – 2024. – V. 12, № 10. – P. 1947.

215. Seyedsayamdost, M. R., Carr, G., Kolter, R., Clardy, J. Roseobactioids: Small Molecule Modulators of an Algal-Bacterial Symbiosis // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – V. 133, № 45. – P. 18343-18349.
216. Seymour, J. R., Amin, S. A., Raina, J. B., Stocker, R. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships // *Nature microbiology*. – 2017. – V. 2, № 7. – P. 1-12
217. Shebanova, A., Ismagulova, T., Solovchenko, A., Baulina, O., Lobakova, E., Ivanova, A., Moiseenko, A., Shaitan, K., Polshakov, V., Nedbal, L. Gorelova, O. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy // *Protoplasma*. – 2017. – V. 254. – P. 1323-1340.
218. Shen, Y., Gao, J., Li, L. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal // *Bioresource Technology*. – 2017. – V. 243. – P. 905-913.
219. Sheng, X. F., Xia, J. J., Jiang, C. Y., He, L. Y., Qian, M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape // *Environmental pollution*. – 2008. – V. 156, № 3. – P. 1164-1170.
220. Shetty, P., Boboescu, I. Z., Pap, B., Wirth, R., Kovács, K. L., Bíró, T., Futó Z., White III, R. A. Maróti, G. Exploitation of algal-bacterial consortia in combined biohydrogen generation and wastewater treatment // *Frontiers in Energy Research*. – 2019. – V. 7. – P. 52.
221. HyeonSeok, S., EunJu, L., JongOh, S., SoRa, K., HyungSeok, O., ChiYong, A., HeeMock, O., ByungKwan, C., SuhYung, C., SuhYung, C. Elucidation of the bacterial communities associated with the harmful microalgae *Alexandrium tamarense* and *Cochlodinium polykrikoides* using nanopore sequencing // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8, № 1. – P. 5323.
222. Shipingana, L. N. N., Shivaraju, H. P., & Yashas, S. R. Quantitative assessment of pharmaceutical drugs in a municipal wastewater and overview of associated risks // *Applied Water Science*. – 2022. – V. 12, № 2. – P. 16.
223. Sierra, M. A., Ryon, K. A., Tierney, B. T., Foux, J., Bhattacharya, C., Afshin, E., Butler, D., Green, S. J., Thomas, W. K., Ramsdell, J., Bivens, N. J., McGrath, K., Mason, K. E. Tighe, S. W. Microbiome and metagenomic analysis of Lake Hillier Australia reveals pigment-rich polyextremophiles and wide-ranging metabolic adaptations // *Environmental Microbiome*. – 2022. – V. 17, № 1. – P. 60.
224. Slocombe, S. P., Zúñiga-Burgos, T., Chu, L., Mehrshahi, P., Davey, M. P., Smith, A. G., Camargo-Valero, M. A., Baker, A. Overexpression of PSR1 in *Chlamydomonas reinhardtii* induces luxury phosphorus uptake // *Frontiers in Plant Science*. – 2023. – V. 14. – P. 1208168.
225. Solovchenko, A., Merzlyak, M. N., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, trebouxiophyceae) mutant deficient in $\delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light 1 // *Journal of phycology*. – 2010. – V. 46, № 4. – P. 763-772.
226. Solovchenko, A., Gorelova, O., Selyakh, I., Pogosyan, S., Baulina, O., Semenova, L., Chivkunova, O., Voronova, E., Konyukhov, I., Scherbakov, P., Lobakova, E. A novel CO₂-tolerant symbiotic *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Desmodesmaceae): Acclimation to and performance at a high carbon dioxide level // *Algal Research*. – 2015. – V. 11. – P. 399-410.

227. Solovchenko, A., Verschoor, A. M., Jablonowski, N. D., Nedbal, L. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae // *Biotechnology advances*. – 2016. – V. 34, № 5. – P. 550-564.
228. Solovchenko, A., Lukyanov, A., Vasilieva, S., & Lobakova, E. Chlorophyll fluorescence as a valuable multitool for microalgal biotechnology // *Biophysical Reviews*. – 2022. – V. 14, № 4. – P. 973-983.
229. Solovchenko, A. E., Ismagulova, T. T., Lukyanov, A. A., Vasilieva, S. G., Konyukhov, I. V., Pogosyan, S. I., Lobakova, E., Gorelova, O. A. Luxury phosphorus uptake in microalgae // *Journal of Applied Phycology*. – 2019. – V. 31. – P. 2755-2770
230. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. C. B. G., Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // *Bacteriological reviews*. – 1971. – V. 35, № 2. – P. 171-205.
231. Stocker T. F. The seesaw effect // *Science*. – 1998. – V. 282, № 5386. – P. 61-62.
232. Sun, W., Xiong, Z., Chu, L., Li, W., Soares, M. A., White Jr, J. F., Li, H. Bacterial communities of three plant species from Pb-Zn contaminated sites and plant-growth promotional benefits of endophytic *Microbacterium* sp.(strain BXGe71) // *Journal of hazardous materials*. – 2019. – V. 370. – P. 225-231.
233. Sutherland, D. L., Turnbull, M. H., Craggs, R. J. Environmental drivers that influence microalgal species in fullscale wastewater treatment high rate algal ponds // *Water Research*. – 2017. – V. 124. – P. 504-512.
234. Szoboszlay, M., Schramm, L., Pinzauti, D., Scerri, J., Sandionigi, A., Biazzo, M. Nanopore is preferable over Illumina for 16S amplicon sequencing of the gut microbiota when species-level taxonomic classification, accurate estimation of richness, or focus on rare taxa is required // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11, № 3. – P. 804.
235. Tarayre, C., Nguyen, H. T., Brognaux, A., Delepierre, A., De Clercq, L., Charlier, R., Michels, E., Meers, E., Delvigne, F. Characterisation of Phosphate Accumulating Organisms and Techniques for Polyphosphate Detection: A Review // *Sensors*. – 2016. – V. 16, № 6. – P. 797.
236. Terekhova, V. A., Prudnikova, E. V., Kiryushina, A. P., Karpukhin, M. M., Plekhanova, I. O., Yakimenko, O. S. Phytotoxicity of heavy metals in contaminated podzolic soils of different fertility levels // *Eurasian Soil Science*. – 2021. – V. 54, № 6. – P. 964-974.
237. Toyama, T., Kasuya, M., Hanaoka, T., Kobayashi, N., Tanaka, Y., Inoue, D., Sei, K., Morikawa, M., Mori, K. Growth promotion of three microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent // *Biotechnology for biofuels*. – 2018. – V. 11. – P. 1-12.
238. Toyama, T., Hanaoka, T., Yamada, K., Suzuki, K., Tanaka, Y., Morikawa, M., Mori, K. Enhanced production of biomass and lipids by *Euglena gracilis* via co-culturing with a microalga growth-promoting bacterium, *Emticicia* sp. EG3 // *Biotechnology for biofuels*. – 2019. – V. 12. – P. 1-12.
239. Turk Dermastia, T., Vascotto, I., Francé, J., Stanković, D., Mozetič, P. Evaluation of the *rbcL* marker for metabarcoding of marine diatoms and inference of population structure of selected genera // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – V. 14. – P. 1071379.

240. Upadhyay, A. K., Singh, R., Singh, D. V., Singh, L., Singh, D. P. Microalgal consortia technology: A novel and sustainable approach of resource reutilization, waste management and lipid production // *Environmental Technology & Innovation*. – 2021. – V. 23. – P. 101600.
241. Vale, F., Sousa, C. A., Sousa, H., Simões, L. C., McBain, A. J., Simões, M. Bacteria and microalgae associations in periphyton—mechanisms and biotechnological opportunities // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2023. – V. 47, № 4. – P. fuad047.
242. Van Le, V., Ko, S. R., Kang, M., Park, C. Y., Lee, S. A., Oh, H. M., Ahn, C. Y. The cyanobactericidal bacterium *Paucibacter aquatile* DH15 caused the decline of *Microcystis* and aquatic microbial community succession: a mesocosm study // *Environmental Pollution*. – 2022. – V. 311. – P. 119849.
243. Vasilieva, S., Lobakova, E., Grigoriev, T., Selyakh, I., Semenova, L., Chivkunova, O., Gotovtsev, P., Antipova, C., Zagoskin, Y., Scherbakov, P., Lukyanov, A., Lukanina, K., Solovchenko, A. Bio-inspired materials for nutrient biocapture from wastewater: Microalgal cells immobilized on chitosan-based carriers // *Journal of Water Process Engineering*. – 2021. – V. 40. – P. 101774.
244. Vasilieva, S. G., Semenova, L. R., Selyakh, I. O., Chivkunova, O. B., Shcherbakov, P. N., Baulina, O. I., Gorelova, O., Lobakova, E. S. Immobilization of a Mixed Culture of Oxygenic Phototrophic Microorganisms on a Chitosan-Based Sorbent for Nutrient Bioremoval // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2022. – V. 58, № 1. – P. 62-68.
245. Vasilieva, S., Shibzukhova, K., Solovchenko, A., Chivkunova, O., Antipova, C., Morozov, A., Lobakova, E. Immobilization on polyethylenimine and chitosan sorbents modulates the production of valuable fatty acids by the chlorophyte *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 // *Journal of Marine Science and Engineering*. – 2023. – V. 11, № 4. – P. 865.
246. Vasilieva, S., Lukyanov, A., Antipova, C., Grigoriev, T., Lobakova, E., Chivkunova, O., Scherbakov, P., Zaytsev, 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. – V. 24, № 13. – P. 10988.
247. Vasilieva, S., Solovchenko, A., Lobakova, E., Zaytsev, P., & Gorelova, O. Immobilization on chitosan triggers structural rearrangements and boosts phosphorus accumulation by the cells of the chlorophyte *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047 // *Journal of Applied Phycology*. – 2024. – P. 1-11.
248. Vergani, L., Mapelli, F., Suman, J., Cajthaml, T., Uhlik, O., Borin, S. Novel PCB-degrading *Rhodococcus* strains able to promote plant growth for assisted rhizoremediation of historically polluted soils // *PLoS One*. – 2019. – V. 14, № 8. – P. e0221253.
249. Vieira, H. H., Bagatini, I. L., Guinart, C. M., Vieira, A. A. H. *tufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae // *Algae*. – 2016. – V. 31, № 2. – P. 155-165.
250. Vingiani, G. M., De Luca, P., Ianora, A., Dobson, A. D., Lauritano, C. Microalgal enzymes with biotechnological applications // *Marine drugs*. – 2019. – V. 17, № 8. – P. 459.
251. Wang, J., Zhang, N., Xu, S., Shao, Z., Jiang, C., Yuan, H., Wang, C., Zheng, X., Chi, Y., Zhang, W., Wang, D., Zhuang, X. Carbon footprint analysis and comprehensive evaluation of municipal wastewater treatment plants under different typical upgrading and reconstruction modes // *Science of The Total Environment*. – 2023. – V. 880. – P. 163335.

252. Wang, L., Jia, X., Xu, L., Yu, J., Ren, S., Yang, Y., ang, K., López-Arredondo, D., Herrera-Estrella, L., Lambers, H., Yi, K. Engineering microalgae for water phosphorus recovery to close the phosphorus cycle // *Plant Biotechnology Journal*. – 2023. – V. 21, № 7. – P. 1373-1382.
253. Wang, S., Su, X., Cui, H., Wang, M., Hu, X., Ding, W., Zhang, W. Microbial richness of marine biofilms revealed by sequencing full-length 16S rRNA genes // *Genes*. – 2022. – V. 13, № 6. – P. 1050.
254. Wang, Y., Sun, P., Lin, M., He, Q., Ji, B. Using Natural and Artificial Microalgal-Bacterial Granular Sludge for Wastewater Effluent Polishing // *Water*. – 2023. – V. 15, № 14. – P. 2605.
255. Werth, B. J., Steed, M. E., Kaatz, G. W., Rybak, M. J. Evaluation of ceftaroline activity against heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-intermediate methicillin-resistant *S. aureus* strains in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model: exploring the “seesaw effect” // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – V. 57, № 6. – P. 2664-2668.
256. West, P. T., Probst, A. J., Grigoriev, I. V., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. Genome-reconstruction for eukaryotes from complex natural microbial communities // *Genome research*. – 2018. – V. 28, № 4. – P. 569-580.
257. Widiastuti, E. L., Afifa, A. D., Tugiyono, T., Umar, S., Mumtazah, D. F., Hadi, S. Plankton diversity and its heavy metal content in Ratai Bay of Pesawaran district, Lampung, Indonesia // *Journal of Water and Health*. – 2023. – V. 21, № 6. – P. 663-675.
258. Wilk-Woźniak, E., Pocięcha, A., Ciszewski, D., Aleksander-Kwaterczak, U., Walusiak, E. Phyto- and zooplankton in fishponds contaminated with heavy metal runoff from a lead-zinc mine // *Oceanological and Hydrobiological Studies*. – 2011. – V. 40. – P. 77-85.
259. Wilson, K. H., Blichington, R. B., Greene, R. C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – V. 28, № 9. – P. 1942-1946.
260. Wirth, R., Böjti, T., Lakatos, G., Maróti, G., Bagi, Z., Rakhely, G., Kovacs, K. L. Characterization of core microbiomes and functional profiles of mesophilic anaerobic digesters fed with *Chlorella vulgaris* green microalgae and maize silage // *Frontiers in Energy Research*. – 2019. – V. 7. – P. 111.
261. Wirth, R., Pap, B., Böjti, T., Shetty, P., Lakatos, G., Bagi, Z., Kovács, K. L., Maróti, G. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: microalgae-bacteria interactions during nutrient removal // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – V. 8. – P. 557572.
262. Wright, E. S. Using DECIPHER v2. 0 to analyze big biological sequence data in R. // *R Journal*. – 2016. – V. 8, № 1.
263. Xiong, W., Wang, S., Jin, Y., Wu, Z., Liu, D., Su, H. Insights into nitrogen and phosphorus metabolic mechanisms of algal-bacterial aerobic granular sludge via metagenomics: Performance, microbial community and functional genes // *Bioresource Technology*. – 2023. – V. 369. – P. 128442.
264. Yang, H., Dettman, B., Beam, J., Mix, C., Jiang, X. Occurrence of ceftriaxone-resistant commensal bacteria on a dairy farm and a poultry farm // *Canadian journal of microbiology*. – 2006. – V. 52, № 10. – P. 942-950.
265. Yang, Q., Ge, Y. M., Iqbal, N. M., Yang, X., Zhang, X. L. *Sulfitobacter alexandrii* sp. nov., a new microalgae growth-promoting bacterium with exopolysaccharides bioflocculating

- potential isolated from marine phycosphere // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2021. – V. 114, № 7. – P. 1091-1106.
266. Yuan, S., Meng, F. Ecological insights into the underlying evolutionary patterns of biofilm formation from biological wastewater treatment systems: Red or Black Queen Hypothesis? // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2020. – V. 117, № 5. – P. 1270-1280.
267. Zarezadeh, S., Moheimani, N. R., Jenkins, S. N., Hülsen, T., Riahi, H., Mickan, B. Microalgae and phototrophic purple bacteria for nutrient recovery from agri-industrial effluents: influences on plant growth, rhizosphere bacteria, and putative carbon-and nitrogen-cycling genes // *Frontiers in plant science*. – 2019. – V. 10. – P. 1193.
268. Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., Xie, Y. Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – V. 12. – P. 766364.
269. Zhang, L., Zhang, X., Gao, Q., Yan, L. Nitrogen application effect on maize yield, NH₃, and N₂O emissions in Northeast China by meta-analysis // *Agronomy*. – 2023. – V. 13, № 6. – P. 1479.
270. Zhang, Q., Zhang, Z., Lu, T., Peijnenburg, W. J. G. M., Gillings, M., Yang, X., Chen, J., Penuelas, J., Zhu, Y.-G., Zhou, N.-Y., Su, J., Qian, H. Cyanobacterial blooms contribute to the diversity of antibiotic-resistance genes in aquatic ecosystems // *Communications Biology*. – 2020. – V. 3, № 1. – P. 737.
271. Zhang, Y., Zheng, L., Wang, S., Zhao, Y., Xu, X., Han, B., Hu, T. Quorum Sensing Bacteria in the Phycosphere of HAB Microalgae and Their Ecological Functions Related to Cross-Kingdom Interactions // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – V. 19, № 1. – P. 163.
272. Zheng, Q. Hu, Y., Kosina, S. M., Van Goethem, M. W., Tringe, S. G., Bowen, B. P., Northen, T. R. Conservation of beneficial microbes between the rhizosphere and the cyanosphere // *New Phytologist*. – 2023. – V. 240, № 3. – P. 1246-1258.
273. Zhou, L., Wang, S. The bright side of ecological stressors // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2023. – V. 38, № 6. – P. 568-578.
274. Zorrilla, F., Buric, F., Patil, K. R., Zelezniak, A. metaGEM: reconstruction of genome scale metabolic models directly from metagenomes // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – V. 49, № 21. – P. e126.
275. Zou, S., Fei, C., Wang, C., Gao, Z., Bao, Y., He, M., Wang, C. How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae) // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6, № 1. – P. 36822.