

СРАВНИТЕЛЬНАЯ МЕТАГЕНОМИКА ДЛЯ МОНИТОРИНГА СКРЫТОЙ ДИНАМИКИ АЛЬГО-БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2024 г. П. А. Зайцев^{1,*}, Б. М. Шурыгин¹, В. А. Родин¹, Т. В. Панова¹,
М. Э. Зверева¹, Е. В. Скрипникова², А. Е. Соловченко¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

*E-mail: zaytseva@my.msu.ru

Поступила в редакцию 02.03.2024 г.

После доработки 19.04.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Современные методы метагеномики, в том числе на основе длинных чтений нанопорового секвенирования, особенно актуальны для задач экологического мониторинга, в частности для оценки антропогенного воздействия на природные сообщества микроорганизмов. К подобным относятся альго-бактериальные сообщества, обитающие в водоочистных сооружениях и участвующие в биологической доочистке сточных вод от избытка органических отходов и биогенных элементов (фосфора и азота). Метагеномный анализ показал изменение таксономического состава и функционального профиля альго-бактериального сообщества при моделировании попадания в стоки лекарств — антибиотиков широкого спектра действия (на примере цефтриаксона) и нестероидных противовоспалительных средств (на примере диклофенака). Сопоставлены результаты метагеномного анализа на основе длинных прочтений нанопорового секвенирования и классических методов экологического мониторинга, в том числе метабаркодинга на основе коротких чтений на платформе секвенирования второго поколения. Нанопоровое секвенирование полного метагенома показало большее биоразнообразие образцов по сравнению с ДНК-метабаркодингом коротких чтений, позволило точнее определить таксономическую принадлежность ряда организмов, определить группы эукариотических окислительных фототрофов, а также выявить наличие генов антибиотикоустойчивости в сообществе. Показано, что под действием лекарственных веществ происходит обогащение альго-бактериального сообщества антибиотикоустойчивыми бактериями. При этом, несмотря на сохранение темпов изъятия фосфора, потенциал сообщества для изъятия биогенных элементов снижается, что выражается в уменьшении на 2 порядка относительной представленности генов метаболизма неорганических нутриентов. Одновременное воздействие цефтриаксона и избытка биогенных элементов в сточных водах приводит к максимальному обогащению антибиотикоустойчивых организмов, а также замене исходно присутствующих в сообществе цианобактерий на эукариотические микроводоросли.

DOI: 10.56304/S1992722324601502

ВВЕДЕНИЕ

В промышленных и муниципальных сточных водах на водоочистных сооружениях (ВОС) даже после трехступенчатой системы очистки могут присутствовать превышающие предельно допустимые концентрации (ПДК) органические отходы и неорганические соединения с биогенными свойствами (имеющими биодоступный азот и фосфор в составе), которые способны вызывать эвтрофикацию водоемов при попадании в окружающую среду. Помимо этого, дополнительную антропогенную нагрузку могут нести более специфические классы микрополлютантов, такие как лекарственные соединения: антибиотики, ги-

полипидермические средства, противовоспалительные препараты, β -блокаторы, нормомитики [1, 2].

В условиях доступности источника естественного освещения и субстратов для роста в системах ВОС могут формироваться альго-бактериальные сообщества (АБС), в которых организмами-эпификаторами являются окислительные фототрофные микроорганизмы (ОФМ) — эукариотические зеленые микроводоросли и цианобактерии [3]. Известно, что ОФМ в АБС активного ила способны снижать в сточных водах концентрацию макро- и нутриентов за счет их биоизъятия [4–6], а также осуществлять биodeградацию опасных микро-

поллютантов [7–9]. Роль бактериального компонента в данном АБС может заключаться в стимулировании роста ОФМ группой MGP-бактерий (*microalgal growth promoting bacteria*) [10, 11] — путем снабжения их кофакторами и витаминами [12, 13] и повышения биодоступности макроэлементов (азота и фосфора) [14]. Помимо этого, бактериальные компоненты АБС могут сами поглощать макроэлементы из сточных вод, в том числе за счет механизмов усиленного биологического удаления фосфора (*enhanced biological phosphorus removal*, EBPR) или анаэробного окисления аммония (анаммокс) — процессов, возможность протекания которых в АБС была доказана в [15, 16]. Для повышения стабильности и эффективности работы АБС при очистке сточных вод важно развить инструментарий анализа и мониторинга данных систем, в том числе на основе мультиомиксного подхода, включающего в себя метагеномный анализ [17–20]. Метагеномика — изучение генетического разнообразия живых систем путем секвенирования ДНК всех имеющихся в них организмов — в настоящее время играет важную роль в изучении микробных сообществ. Метагеномный подход получил распространение в практике экологического мониторинга окружающей среды для оценки антропогенного воздействия, расследования причин экологических катастроф, а также поиска штаммов микроорганизмов для биоремедиации экосистем [21, 22].

Важным преимуществом метагеномики является ее способность выявлять скрытое микробное разнообразие, представленное некультивируемыми видами, что особенно актуально в системах альго-бактериальных взаимодействий, меняющихся при антропогенном воздействии. Поскольку метагеномика не дает исчерпывающей информации о физиологическом состоянии АБС и протекающих в нем процессах, для решения данной задачи требуется комбинировать ее с другими методами экологического мониторинга, такими как микроскопия, функциональный мониторинг фотосинтетического аппарата, анализ химического состава среды и т.д.

Классические методы метагеномики, такие как ДНК-метабаркодинг и секвенирование полного метагенома, реализуемые на платформах секвенирования второго поколения (NGS — *next generation sequencing*), имеют ограничение в длине читаемого фрагмента ДНК, что приводит к низкому таксономическому разрешению для метабаркодинга и неполноте при сборке метагеномов [23]. Кроме того, в отличие от анализа полного метагенома метабаркодинг не позволяет сделать предположений о физиологическом и метаболическом потенциале образца. Косвенные предсказания такого рода можно получить с помощью алгоритмов PICRUSt2 и Tax4Fun2 [24, 25], но их точность далека от идеальной.

В последние годы быстро растет популярность технологий секвенирования третьего поколения, к которым относится и технология нанопорового секвенирования [26], успешно реализованная в виде коммерчески доступной технологии компаний Oxford Nanopore Technologies (ONT). Ее преимущества включают в себя большую длину прочтения (до 100 тыс. пар оснований и более), возможность секвенирования одиночных молекул без необходимости усреднения сигналов от группы молекул, отсутствие необходимости предамплификации препарата ДНК, что снижает риск систематической ошибки из-за избирательного обогащения определенных частей генома и/или определенных микроорганизмов [21, 27]. Хотя данный метод исходно был менее точен, чем другие технологии секвенирования, современные протоколы пробоподготовки и алгоритмы анализа данных позволили снизить уровень ошибок до приемлемых 0–5% [28, 29]. Особое преимущество нанопорового секвенирования состоит в сравнительно скромных требованиях к материальному обеспечению для осуществления секвенирования, что делает данный метод применимым для экспресс-мониторинга даже в полевых условиях [27, 30].

Стратегия секвенирования полного метагенома является “золотым стандартом” для метагеномных исследований различных типов образцов сообществ из-за большого количества получаемых данных, позволяющих провести тщательный анализ сообществ. Этот подход включает в себя точную таксономическую идентификацию эукариотических и прокариотических видов, образующих сообщество, подтверждение наличия функционально-значимых генов, поиск новых эффективных и стабильных ферментов, а также реконструкцию моделей метаболизма в масштабе метагенома [31–33]. Альтернативным подходом является прямой анализ необработанных метагеномных чтений: филотипирование организмов на основе прямого подсчета их маркеров в необработанных чтениях с помощью алгоритмов без выравнивания [34, 35], более точной таксономической идентификации с помощью BLAST, MEGAN или TAXAssign [35–37] либо классификации на основе геномных бинов видов алгоритмами MetaPhlan [38]. Хотя указанные подходы к обработке метагеномных данных ориентированы на прокариот, разрабатываются новые алгоритмы для эукариотических микроорганизмов, включая микроводоросли из АБС [39, 40]. Анализ необработанных чтений может быть использован и для выявления функционально-значимых генов в контексте поиска определенных метаболических путей, таких как деградация опасных микроразрушителей: деградация пластика — гены полиэтилентерефталат гидролазы (ПЭТаза) и гидролазы моно-2-гидроксиэтилтерефталата (МГЭТаза)

Таблица 1. Состав сточных вод*

Показатель	Единицы измерения	Значение	ПДК
Водородный показатель	ед. pH	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 “Московский”».

[40]; фикоремедиация тяжелых металлов – гены редуктазы хрома и гены, отвечающие за биоаккумуляцию железа и марганца [41, 42]; деградация ксенобиотиков – гены нитриказы и др. [43–47]. Для задач экспресс-анализа АБС в рамках экологического мониторинга значимыми факторами являются доступность и скорость анализа, обеспечиваемые постепенно возрастающим количеством онлайн-сервисов, таких как BugSeq и MGnify [47, 48]. Прямой анализ необработанных длинных чтений нанопорового секвенирования выполняется быстрее и точнее по сравнению с метагеномикой коротких чтений [47].

Цель настоящей работы – изучение очевидных и скрытых изменений структуры и свойств микробиома АБС при воздействии лекарственных веществ (ЛВ), в том числе антибиотиков (на примере цефтриаксона – распространенного антибиотика и группы цефалоспоринов) и нестероидных противовоспалительных средств (на примере диклофенака). Особое внимание уделялось сопоставлению наблюдаемых изменений морфобиологических свойств АБС и изменений их метагеномов, выявленных эталонным методом NGS-метабаркодирования и нанопоровым секвенированием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы сообществ и условия их культивирования. Сбор образцов АБС активного ила и сточных вод проводили на ВОС г. Звенигород ООО “Звенигородский городской водоканал” в июне 2021 г. Пробы отбирали из заполненных сточными водами вторичных отстойников в общую чистую нестерильную емкость. Сточные воды соби-

рали на ВОС после третичной очистки: после блока доочистки, но до блока обеззараживания. Эксперименты с активным илом и сточными водами (табл. 1) ставили в день сбора образцов.

Для моделирования стресса, связанного с воздействием лекарственных веществ на АБС активного ила в условиях стандартной и повышенной для сточных вод концентрации неорганического фосфата (P_i), проводили культивирование в стационарных условиях, аналогичных условиям во вторичных отстойниках. Культивирование проводили в 75-мл стерильных пластиковых культуральных флаконах (Eppendorf, Германия) с фильтром при освещении светодиодными лампами (белый свет, 5500 К) интенсивностью 50 мкмоль квантов ФАР/м²/с (измерения квантометром LI250, LiCOR, США), при комнатной температуре в течение 31 сут. В каждый флакон добавляли по 5 мл сырой биомассы АБС активного ила и доводили до 40 мл сточными водами. В матрасы добавляли растворы цефтриаксона (ЦТА, ООО “Биосинтез”, Россия) или диклофенака (ДФ, Chemopharm A.D., Сербия), а в отдельных вариантах – дополнительные источники фосфора и азота (K_2HPO_4 и KNO_3) (табл. 2). В качестве контроля эффекта ЛВ использовали биомассу АБС в сточных водах без добавки ЛВ, но содержащих дополнительные источники фосфора и азота. Для метагеномного анализа также использовали контроль в виде сточной воды без биомассы и добавок. Каждый экспериментальный вариант инкубировали в трех повторах.

В ходе эксперимента проводили мониторинг состояния фотосинтетического аппарата ОФМ из исследованных сообществ путем анализа ин-

Таблица 2. Дизайн эксперимента

Экспериментальный вариант	Добавки (конечная концентрация, мг/л)
Сточные воды	
+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)

дукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a*. В конце инкубации отбирали пробы биомассы для выделения метагеномной ДНК и морфологического анализа методом оптической микроскопии, а также проб культуральной жидкости для определения остаточного содержания Р_т спектрофотометрическим методом с молибденовым синим [49].

Выделение метагеномной ДНК. Для выделения тотальной ДНК для каждого экспериментального варианта были собраны образцы биомассы (0.3–0.5 мл). Перед началом выделения биомассы осадки клеток замораживали в жидком азоте и измельчали до состояния мелкодисперсного порошка с помощью пестиков для гомогенизации (SSIBio, США) в микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл. Процедура замораживания–гомогенизации проводили троекратно. Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу производителя.

Нанопоровое секвенирование образцов и биоинформатическая обработка его результатов. Нанопоровое секвенирование образцов проводили по технологии 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 включал 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 (New England Biolabs, США). Очистку ДНК проводили 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) и проводили реакцию лигирования с помощью лигазы Blunt/TA Ligase Master Mix (New England Biolabs). Использовали реагенты баркодов с номерами 3–8. Повторяли очистку

ДНК на магнитных частицах Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, США). После очистки полученные забаркодированные образцы объединяли в эквимоларных количествах. На третьем этапе с использованием лигазы Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs) проводили лигирование адаптеров из набора SQK-LSK 109 (ONT, Великобритания). По протоколу проводили очистку на магнитных частицах Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) с промывками буфером для удержания длинных фрагментов ДНК и этапами элюции с использованием буфера из набора SQK-LSK 109 (ONT, Великобритания), в итоге получили 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, переводили в формат FASTQ. Для преобразования первичных данных использовали программу Guppy basecaller (ONT). Дебаркодирование образцов проводили с помощью этой же программы в ходе первичной обработки данных. Данные с качеством $Q < 8$, полученные из оценки программой Guppy basecaller, не участвовали в дальнейшем анализе.

Для биоинформатической обработки данных для каждого образца проводили слияние всех выходных файлов формата FASTQ из директории fastq_pass в общий файл с таким же форматом. Анализ полученных чтений проводили в онлайн-сервисе BugSeq (<https://bugseq.com>), выбрав базу данных для анализа “NCBI nt” и указав тип образца как “environmental”.

Профилирование таксономического состава сообществ по локусу 16S рРНК. Для анализа состава микробиома применяли метод ДНК-метабаркодирования по гипервариабельному участку V4 гена 16S рРНК с применением праймеров F515 и R806 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и GGACTACVSGGGTATCTAAT) [50] на приборе Illumina MiSeq. Подготовка библиотек проводили согласно протоколу производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina, США). Для этого проводили ПЦР согласно следующему протоколу: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с, 25 циклов, первичная денатурация при 94°C в течение 60 с, заключительный этап элонгации проводили в течение 3 мин при температуре 72°C. ПЦР-продукты очищали по рекомендованной Illumina-методике с использованием AMPureXP (Beckman Coulter, США).

Секвенирование библиотек проводили путем двустороннего чтения (2×300 пар оснований). Первичную обработку проводили с помощью программного обеспечения Illumina. Дальнейшие шаги обработки, в частности объединение последовательностей в ASV (Amplicon sequence variant), осуществляли пакетными программами dada2 [51], phyloseq [52] и DECIPHER [53], работа с которыми проводилась в программной среде R. Для представления данных таксономического анализа использовали средства программного пакета QIIME [54]. В качестве базы референсных последовательностей была использована база данных SSU 16s rRNA SILVA, релиз 132 [55].

При анализе результатов ДНК-метабаркодинга из образцов удаляли неклассифицированные чтения, чтения плазмидной и митохондриальной ДНК, а также те таксономические группы, которым соответствовало одно непарное чтение. При анализе проводили объединение биологических повторов для каждого экспериментального варианта с суммированием количества чтений для всех ASV. Для полученных наборов данных, соответствующих биологическим повторам эксперимента, проводили расчет средних значений количества чтений для всех ASV. Расчет индексов α -разнообразия Шеннона–Уивера (1) и Симпсона (2), а также индекса β -разнообразия Мориситы (3) проводили по формулам [56]:

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

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

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.

Индекс β -разнообразия Мориситы также применяли для попарного сравнения результатов таксономического анализа на основе данных метабаркодинга и данных секвенирования полного метагенома на платформе Oxford Nanopore. Визуализацию значений индексов разнообразия проводили с помощью алгоритма на языке програм-

мирования Python (версия 3.7.1) с использованием библиотеки Matplotlib.

Функциональную аннотацию результатов метабаркодинга проводили с помощью алгоритма PICRUSt2 для таксономических профилей на уровне родов без дополнительных опций [24].

Определение концентрации неорганического фосфата. Для определения остаточной концентрации P_i в среде по методу [49] 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 (Eppendorf, 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 мин 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

$$C_{P_i} = \frac{3 D_{880}}{0.13}, \quad (4)$$

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

Состояние фотосинтетического аппарата оценивали путем анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла a с использованием импульсного флуориметра FluorCam FC 800-C (Photon Systems Instruments, Чешская Республика). Регистрацию параметров для ОФМ проводили непосредственно в культуральных матрасах после адаптирования образцов в темноте в течение 15 мин. 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 из окружающего фона. Для оценки состояния фотосинтетического аппарата ОФМ вычисляли параметры максимального потенциального квантового выхода фотосистемы II (ФСII), вычисляемые 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 ФСII, F_0 и F_m — минимальный и максимальный уровень флуоресценции хлорофилла a после насыщающей вспышки соответственно.

Оптическая микроскопия. 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 . Для визуализации остальных клеток в АБС использовали раствор флуоресцентного красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole, **DAPI**), растворенного в диметилсульфоксиде с концентрацией 1 мг/мл. 10 мкл исходного раствора DAPI добавляли к 90 мкл суспензии клеток и инкубировали 20 мин в темноте. 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. Регистрацию внешнего вида АБС в культуральных матрасах проводили с помощью цифровой фотокамеры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Внешний вид и морфология исследованных сообществ. В лабораторных условиях был смоделирован стресс для образцов АБС активного ила ВОС, связанный с попаданием в сточные воды лекарственных веществ (ЦТА или ДФ), в характерных для стоков концентрациях 5 мкг/л. При этом инкубацию с ЛВ в присутствии избыточной для данных сточных вод концентрации макронутриентов использовали, чтобы оценить влияние ЛВ на способность АБС к биоизъятию биогенных элементов. К концу эксперимента внешний вид и морфология АБС, инкубированных с различными добавками (табл. 1), различались в разных экспериментальных вариантах (рис. 1а). В образце с добавкой только азота и фосфора наблюдали умеренную флокуляцию биомассы с характерной синезеленой окраской, указывающей на присутствие во флоккулах цианобактерий. Во всех образцах, инкубированных с добавлением ДФ, флокуляция биомассы была более выраженной, а их окраска изменялась (рис. 1а). В во всех образцах, инкубированных с добавлением ЦТА, наблюдали более гомогенную биомассу с характерной для микроводорослей зеленой окраской.

Судя по результатам оптической микроскопии, при инкубации с ЦТА микроводоросли раз-

вивались в АБС сильнее, чем в других образцах (рис. 1б). Это подтвердилось и снимками в режиме регистрации эмиссии флуоресценции хлорофилла a (рис. 1в). В пробах, инкубированных с добавлением ДФ, как и в контроле, биомасса включала в себя преимущественно нитчатые цианобактерии и бактериальные агрегаты (рис. 1б).

Динамика состояния фотосинтетического аппарата в ходе инкубации. Физиологическое состояние микроводорослей и цианобактерий в исследованных образцах АБС оценивали по функциональным параметрам их фотосинтетического аппарата (рис. 2). Во всех образцах через сутки после начала инкубации наблюдался небольшой рост значения максимального квантового выхода ФСII, 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 ЛВ, а также образцов с добавлением ДФ значение Q_y продолжало снижаться на протяжении всего эксперимента до значений в диапазоне 0.2–0.3. По-видимому, это может быть связано с ростом присутствия в АБС цианобактериального компонента.

При инкубации образцов с добавлением ЦТА наблюдали снижение значений Q_y на протяжении первых 10 дней, после чего он снова повысился и вышел на стационарный уровень ~0.50. 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, повышалась представленность микроводорослей.

Ввиду отсутствия значимой разницы между динамиками значений Q_y для контрольной пробы (+P+N) и образцов с ДФ можно предположить, что разница в эффектах на АБС между ЛВ является не столько следствием прямого действия на ФСII, сколько самим 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 [57]. Согласно [45, 58], и цианобактерии, и микроводоросли имеют толерантность к ЦТА и ДФ в концентрациях, использованных в проведенном исследовании, и способны снижать активность данных соединений в растворах. Однако при сравнительном анализе выявлено, что при добавлении ЦТА более высокие темпы роста имеют микроводоросли, а при ДФ — цианобактерии [59, 60]. Паттерн кривой динамики Q_y при добавлении

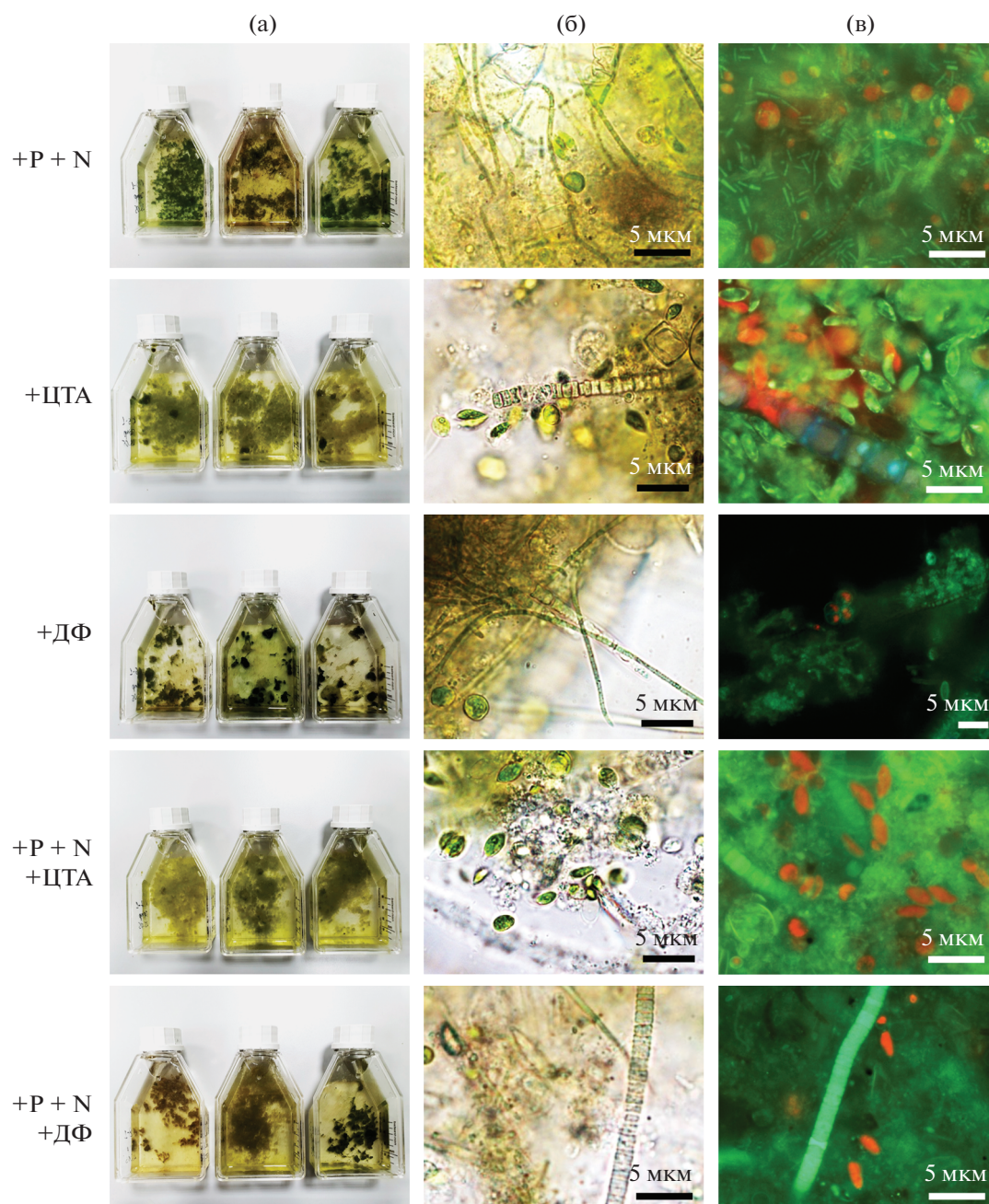


Рис. 1. Морфологические признаки образцов АБС Звенигородских ВОС после 31 суток инкубации в сточных водах с добавками лекарств и (или) источников азота и фосфора (табл. 1): а – внешний вид суспензии АБС, б – микроскопия препаратов АБС в проходящем свете, в – микроскопия препаратов АБС в флуоресцентном режиме в интервале 455–700 нм.

ЦТА также совпадал с полученным ранее на примере микроводоросли *Lobosphaera* sp., в котором после 10 сут адаптации наблюдался рост значения [45].

Изъятие неорганического фосфата сообщества микроорганизмов. По завершении инкубации АБС в присутствии исследованных ЛВ оценивали способность сообществ к биоизъятию P_i из сточ-

ных вод. Измерение остаточного содержания P_i в образцах культуральной жидкости показало, что сообщества утилизировали большую часть исходно содержавшегося в сточных водах P_i . В образцах с низким исходным содержанием P_i (5 мг/л) степень изъятия составила 70%, а при повышении исходной концентрации P_i до уровня 50 мг/л она достигла 95% (рис. 3). В случае низкой исходной

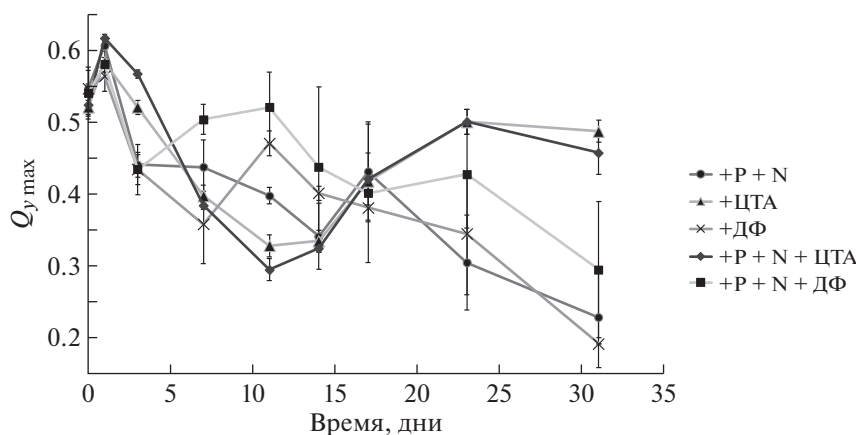


Рис. 2. Динамика максимального потенциального фотохимического квантового выхода ($Q_y \max$) фотосистемы II образцов АБС Звенигородских ВОС в ходе инкубации в сточных водах с добавлением биогенных элементов и (или) ЛВ (табл. 2). На графике представлены средние арифметические величины ($n = 6$) с соответствующими значениями стандартного отклонения.

концентрации P_i компоненты сообщества могли испытывать стресс из-за недостатка биодоступного азота, что могло снижать способность к поглощению P_i [61]. Отметим, что предел чувствительности использованного в настоящей работе метода определения P_i составляет 1 мг/л, поэтому точное определение остаточных концентраций $P_i \sim 1-2$ мг/л (следовательно, и процента биоизъятия) в случае культур с низким содержанием P_i затруднительно.

Важным результатом является отсутствие значимых различий между способностями к биоизъятию P_i образцами АБС, инкубированными с добавлени-

ем ЛВ и без него. По-видимому, использованные в работе концентрации ЛВ не оказывали существенного влияния на метаболизм фосфора в клетках микроорганизмов, составляющих основу АБС. Не исключено также, что уязвимые для действия ЛВ 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.

Влияние инкубации с ЛВ на структуру микробиома. Для всех исследованных образцов были получены данные ампликонного секвенирования гипервариабельного фрагмента V4 гена 16S рРНК на платформе секвенирования Illumina NGS, в среднем по 15000 прямых и обратных чтений для каждого образца. Для образцов “сточные воды”, “+P+N”, “+ЦТА”, “+ДФ”, “+P+N+ЦТА”, “+P+N+ДФ” данные в формате FASTQ для прямых и обратных чтений доступны в базе данных NCBI под номером биопроекта (BioProject) PRJNA1101684 под номерами биообразцов (Bio-Samples) SAMN40996167–SAMN40996172 соответственно. На основании полученных данных определены состав и условное количественное содержание микроорганизмов (рис. 4а). Таксономический состав образцов имел много общих родов не только между собой, но и с контрольным образцом сточных вод без добавки биомассы.

Для АБС характерны следующие особенности: в образцах, инкубированных с ЛВ (+ДФ, +ЦТА), наблюдали замещение цианобактерий рода *Limnothrix* на представителей рода *Leptolyngbya* и *Nodosilinea*; в образцах, инкубированных без добавки макронутриентов, развивались цианобактерии рода *Leptolyngbya*; в образце ДФ+N+P цианобактерии рода *Leptolyngbya* замещались представителями рода *Nodosilinea*; в образцах с

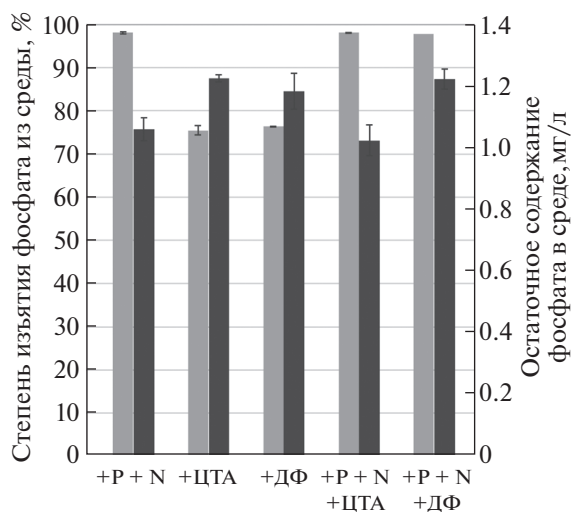


Рис. 3. Степень биоизъятия фосфата из сточных вод (светло-серый) и остаточное содержание фосфата в сточных водах (темно-серый) в образцах АБС Звенигородских ВОС к концу месяца инкубации в сточных водах с микрополлютантами.

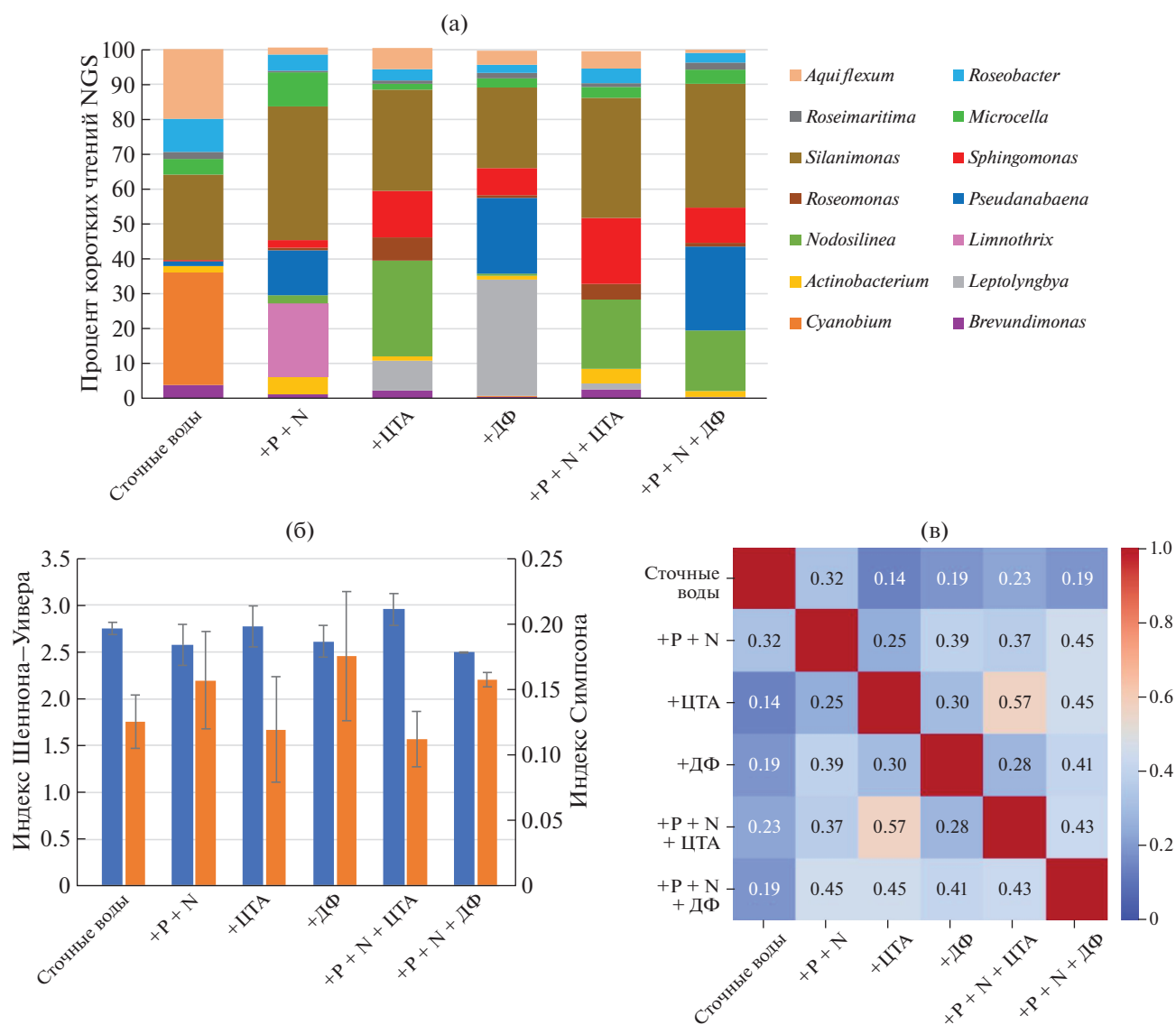


Рис. 4. Структура микробиома образцов АБС Звенигородских ВОС к концу месяца инкубации в сточных водах с микрополлютантами, описанная методом 16S рРНК-метабаркодинга по технологии NGS: а – содержание коротких чтений доминантных микроорганизмов (>1%) в микробиоме на уровне родов, б – рассчитанные индексы α -разнообразия Шеннона–Уивера (синий) и Симпсона (оранжевый), в – тепловая карта значений индекса β -разнообразия Мориситы.

ЦТА были шире представлены бактерии из класса *Alphaproteobacteria* (роды *Shingomonas*, *Brevundimonas* и *Roseomonas*), а разнообразие цианобактерий было, наоборот, сужено (до рода *Pseudanabaena*). В целом класс *Cyanobacteria* был шире представлен в образцах с ДФ, но при инкубации сообщества с ЦТА их содержание снижалась, что подтверждает наблюдения морфофизиологических особенностей образцов. 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 антианти-

коустойчивым фенотипом [1, 2, 62]. 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 [63]. Возможно, добавление в сточные воды ЛВ создает отбор среди микроорганизмов не только по признаку антибиотикоустойчивости, но и общей токсикологической устойчивости к разным микрополлютантам.

Оценка влияния инкубации с ЛВ на биоразнообразие микробных компонентов АБС показала,

что они не влияли на индекс Шеннона–Уивера, значение которого колебалось возле отметки 2.5 (рис. 4б). В то же время в образцах с ЦТА отмечалось незначительное уменьшение прямого индекса Симпсона с 2.0 к 1.5, что может свидетельствовать о сдвиге в структуре сообщества на фоне селективного давления со стороны ЦТА. Попарная оценка сходства микробиомов образцов по индексу Мориситы выявила низкое сходство для всех образцов, кроме инкубированных с ЦТА, индекс которых составил 0.57 (рис. 4в). 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 [5, 64], способны изменять представленность таксонов. При этом добавление ЦТА вызывает сходные изменения микробиома вне зависимости от доступности макронутриентов.

Анализ структуры микробиома сообществ с помощью нанопорового секвенирования. В результате запуска для каждого образца получены следующие объемы данных: “сточные воды” — 0.22 Гб, “+P+N” — 0.53 Гб, “+ЦТА” — 0.39 Гб, “+ДФ” — 0.24 Гб, “+P+N+ЦТА” — 0.50 Гб, “+P+N+ДФ” — 0.43 Гб. Для перечисленных образцов данные в формате FASTQ доступны в базе данных NCBI под номером биопроекта (BioProject) PRJNA1101684 под номерами биообразцов (BioSamples) SAMN40996167–SAMN40996172 соответственно.

Результаты метабаркодинга по гену 16S сопоставляли с экспресс-секвенированием полного метагенома по тем же образцам ДНК с помощью нанопоровой технологии. Результаты выявления наиболее представленных в АБС родов микроорганизмов прямым анализом необработанных нанопоровых чтений и NGS-метабаркодинга во многом совпадали (рис. 5а). Однако ввиду прямого подсчета количества чтений и отсутствия этапа амплификации при подготовке библиотек количественное распределение микроорганизмов по данным нанопорового секвенирования может точнее отражать структуру АБС. Так, несмотря на общий набор микроорганизмов во всех АБС, в образцах с ЦТА и добавкой макронутриентов происходят постепенное развитие гетеротрофных бактерий (из родов *Shingomonas*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas* и *Tabrizicola*) и снижение представленности цианобактерий (из родов *Pseudanabaena* и *Leptolyngbya*).

Анализ чтений, полученных при секвенировании полного метагенома, также позволил провести поиск в образцах АБС эукариотических микроводорослей, наличие которых сложно было подтвердить на основе данных метабаркодинга по гену 16S. Установили, что количество чтений, соответствующих представителям отдела *Chloro-*

phyta (преимущественно роды *Tetradesmus*, *Desmodesmus* и *Chlorella*), было наибольшим в образцах биомассы, инкубируемой в условиях добавки макронутриентов, а также макронутриентов с ЦТА, и составляло от 2 до 3% от общего числа чтений. Тогда как цианобактерии сильнее всего развивались в образце с макронутриентами и ДФ, достигая 30% от общего количества чтений (рис. 5б). Хотя эти результаты не полностью совпадают с данными традиционных методов, они заслуживают большего доверия, поскольку подсчеты необработанных чтений напрямую связаны со структурой АБС в отличие от косвенных оценок, основанных на обзорной микроскопии сложно структурированных образцов (рис. 1). Наконец, анализ длинных чтений нанопорового секвенирования позволил с большей точностью классифицировать микроорганизмы в составе АБС, в ходе чего выявлено наличие в АБС таких видов, как *Staphylococcus epidermis*, *S. haemolyticus* и др., являющихся потенциальными носителями антибиотикоустойчивости [65] и получившими развитие в образце с добавкой макронутриентов и ЦТА.

Для количественного сравнения результатов, полученных с помощью двух разных платформ и поколений секвенирования, применяли метрики оценки разнообразия образцов (рис. 5в). Хотя данные расчеты не корректно применять при анализе необработанных чтений при секвенировании полного метагенома ввиду отсутствия нормировки на длину геномов содержащихся в образцах организмов, они способны дать представление о тенденциях в различии сообществ. Так, значения индекса Шеннона–Уивера всех образцов для результатов нанопорового секвенирования превышали значения при метабаркодинге и находились в диапазоне от 3.0 до 4.2, что может свидетельствовать о преимуществе первого в изучении скрытого микробного разнообразия даже малопредставленных компонентов сообщества. Это может быть связано с тем, что в подходе прямого классифицирования необработанных чтений по их таксономической принадлежности отсутствует этап формирования ASV или OTU (operational taxonomic unit), при котором может происходить объединение последовательностей близкородственных организмов. Среди образцов выделялись значения данного индекса для АБС с добавлением ЦТА и ДФ+N+P, которые были ниже всех остальных и составляли 3.2 и 3.0 соответственно. При этом значения прямого индекса Симпсона для тех же образцов выше остальных, что совпадает с результатами на основе метабаркодинга и указывает на активные процессы селекции микроорганизмов в данных наборах условий. Оценку попарного сходства образцов между двумя технологиями секвенирования проводили по индексу Мориситы, рассчитанному для доминантных родов (представленных >1%) (рис. 5г).

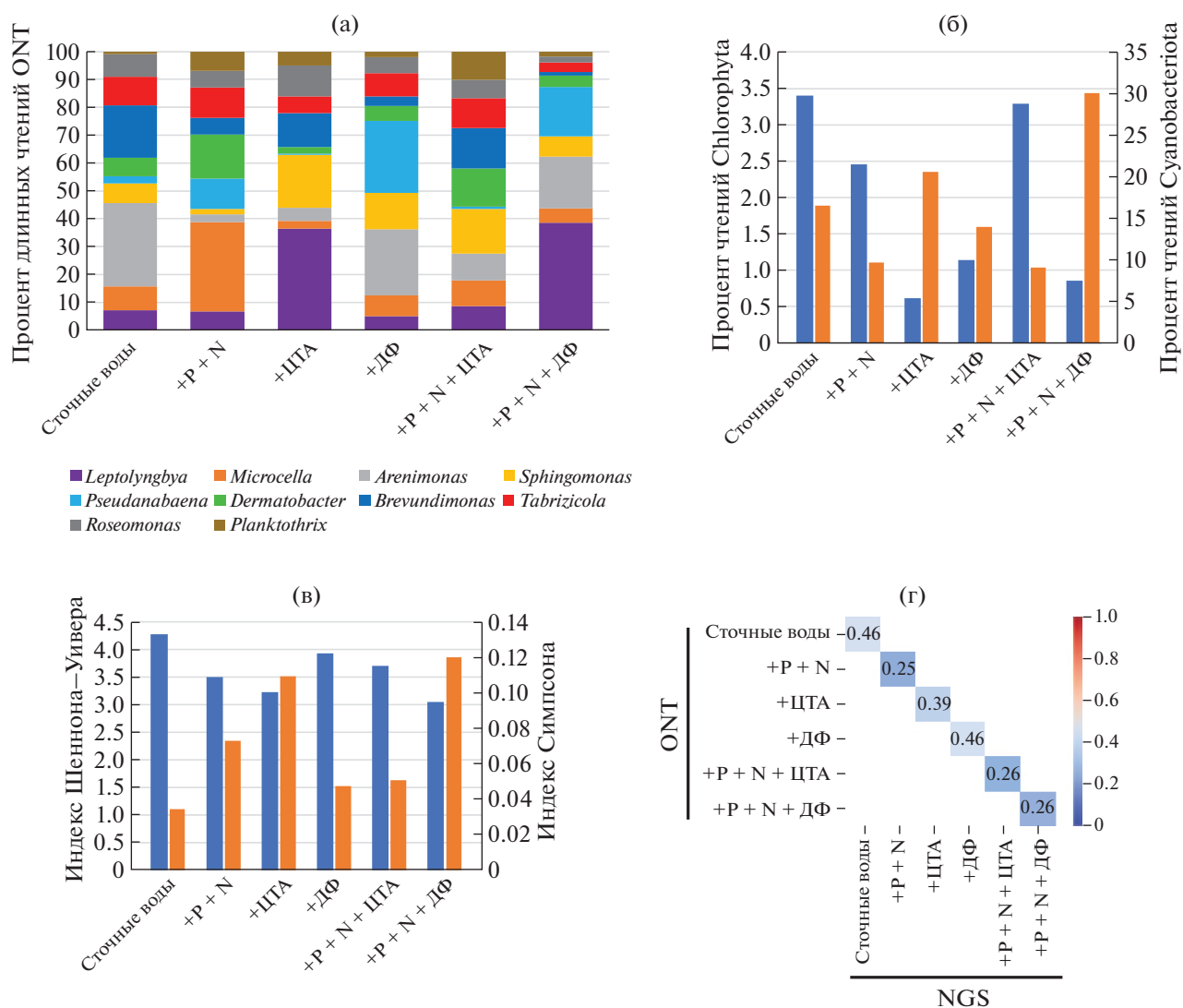


Рис. 5. Структура микробиома образцов АБС Звенигородских ВОС через месяц после инкубации в сточных водах с ЛВ (табл. 1), полученная с помощью метода нанопорового секвенирования по технологии ONT: а – содержание длинных чтений 10 наиболее представленных микроорганизмов в микробиоме на уровне родов, б – содержание ОФМ в микробиоме на уровне отделов *Chlorophyta* (синий) и *Cyanobacteriota* (оранжевый), в – рассчитанные индексы α-разнообразия Шеннона–Уивера (синий) и Симпсона (оранжевый), г – тепловая карта значений индекса β-разнообразия Мориситы, рассчитанного для результатов нанопорового секвенирования (ONT) и 16S рРНК-метабаркодирования (NGS) для каждого образца.

Результат показал отсутствие выраженного сходства между методами секвенирования для всех образцов, причем для образцов +N+P, ДФ+N+P, ЦТА+N+P сходство между результатами метабаркодирования и нанопорового секвенирования наблюдалось меньше всего и находилось в диапазоне 0.25–0.26. Несмотря на разную возможную природу подобных различий, они лишь подчеркивают зависимость получаемых при метагеномном анализе результатов от выбора метода секвенирования биологического образца.

Влияние ЛВ на потенциальный функциональный профиль сообщества. На основе полученных дан-

ных 16S рРНК метабаркодирования провели количественную оценку потенциальной представленности генов, кодирующих метаболические пути, на уровне суперклассов с помощью алгоритма PICRUSt2 по классификации базы данных MetaCyc [66]. Благодаря чему удалось предсказать возможное наличие в исследованных АБС 201 метаболических путей, объединенных в 32 суперкласса (рис. 6). Данное множество было разделено на две части: пути деградации субстратов (рис. 6а) и пути биосинтеза различных соединений (рис. 6б). Представленность суперклассов метаболических путей в образцах АБС, инкуби-

рованных с ЛВ, анализировали относительно образцов, инкубированных без добавления ЛВ, но с дополнительными макронутриентами.

Установлено, что инкубация с ЛВ снижала представленность в метагеноме сообщества генов, кодирующих пути деградации ряда субстратов — альдегидов, октана, олигомеров нейлона-6 и циклолитов. Эти соединения, а также родственные им молекулы часто выявляются в муниципальных сточных водах как органические поллютанты, в основном в промышленных стоках [67]. Аналогично инкубация с ЛВ на 2 порядка снижала представленность генов, кодирующих пути метаболизма макроэлементов минерального питания, такие как микробное окисление серы, нитрификация, денитрификация и деградация метилфосфоната. Можно ожидать, что подобные изменения будут снижать потенциал сообщества относительно способности к биоизъятию макронутриентов из сточных вод.

Вместе с этим инкубация сообществ в присутствии ЛВ и высоких концентраций биодоступного азота и фосфора увеличивала представленность в их метагеноме путей как катаболизма, так и биосинтеза нуклеотидов и нуклеозидов на 2 порядка. По-видимому, потенциал компонентов АБС к вовлечению в метаболизм неорганического азота и фосфора частично сохраняется. Для аминокислот, углеводов и биополимеров в большей степени увеличивалась представленность генов катаболизма, чем биосинтеза.

Исследованные лекарства оказывали различное влияние на определенные метаболические пути в метагеноме сообществ. Так, наблюдали увеличение на 4 порядка относительной представленности путей, связанных с устойчивостью к действию ЦТА (по механизму репарации компонентов клеточной стенки, так как ЦТА действует за счет подавления синтеза данных компонентов) [68]. Кроме того, ЦТА в отличие от ДФ уменьшал представленность путей биосинтеза сидерофоров на порядок, что может быть косвенным индикатором пролиферации микроводорослей в образцах АБС, инкубированных с антибиотиком.

В целях уточнения потенциального функционального профиля образцов АБС Звенигородских ВОС проводили поиск маркеров определенных метаболических путей в необработанных длинных чтениях, полученных методом нанопорового секвенирования. С этой целью использовали алгоритмы сервиса BugSeq, исходно разработанного для поиска маркеров антибиотикоустойчивости в микробных сообществах, позволившие обнаружить релевантные гены в исследованных образцах АБС. В АБС, инкубируемых с добавкой только макронутриентов, присутствовал ген устойчивости к рифамицину — ген *arr*, участвующий

в процессе АДФ-рибозилирования [69]. В образцах, инкубированных с ЦТА, обнаружены гены семейства *bla*, кодирующие ферменты из семейства β -лактамаз, способные к инактивации β -лактамных антибиотиков, неспецифичные в отношении ЦТА [70]. Представители родов *Brevundimonas* и *Sphingopyxis* являются носителями генов и семейства *bla*. Примечательно, что в образце, инкубированном с ДФ и макронутриентами, были найдены отдельные копии генов семейства *bla*, а также гена *mph(F)*, участвующего в формировании устойчивости к антибиотикам группы макролидов, в частности к азитромицину, эритромицину и кларитромицину [69]. Таким образом, под действием ЛВ, попадающих в сточные воды, у микроорганизмов из сообществ очистных сооружений может формироваться неспецифичная и перекрестная (множественная) лекарственная устойчивость, в том числе к антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние лекарственных веществ на морфофизиологические свойства и метагеномы АБС водоочистных сооружений, формирующихся на основе микроводорослей и (или) цианобактерий. Были сопоставлены результаты метагеномных исследований, выполненные методами метагеномики коротких чтений ампликонов 16S рРНК и метагеномики длинных чтений полного метагенома сообщества, в дополнение к традиционным методам морфофизиологического мониторинга АБС.

Показано, что инкубация АБС в течение 31 сут в присутствии ЛВ вызывает обогащение АБС антибиотикоустойчивыми бактериями. Несмотря на сохранение темпов изъятия фосфора, генетически детерминированный потенциал сообщества в плане его способности к изъятию биогенных элементов проявлял тенденцию к снижению. Параллельно наблюдали замену исходно присутствовавших в сообществе цианобактерий на эукариотические микроводоросли.

Несмотря на значительный объем данных об изменении метаболизма исследованных АБС, полученный с помощью алгоритма PICRUSt2, они не позволяют однозначно судить о направленности изменения метаболического потенциала сообщества. Причиной является ограничение по точности идентификации микроорганизмов, накладываемое методом ДНК-метабаркодирования на платформах NGS, результаты которого использует алгоритм PICRUSt2.

Напротив, анализ необработанных длинных чтений (с применением алгоритмов сервиса BugSeq) обнаружил присутствие в метагеномах АБС, инкубированных в присутствии антибиотика, рост представленности маркеров устойчиво-

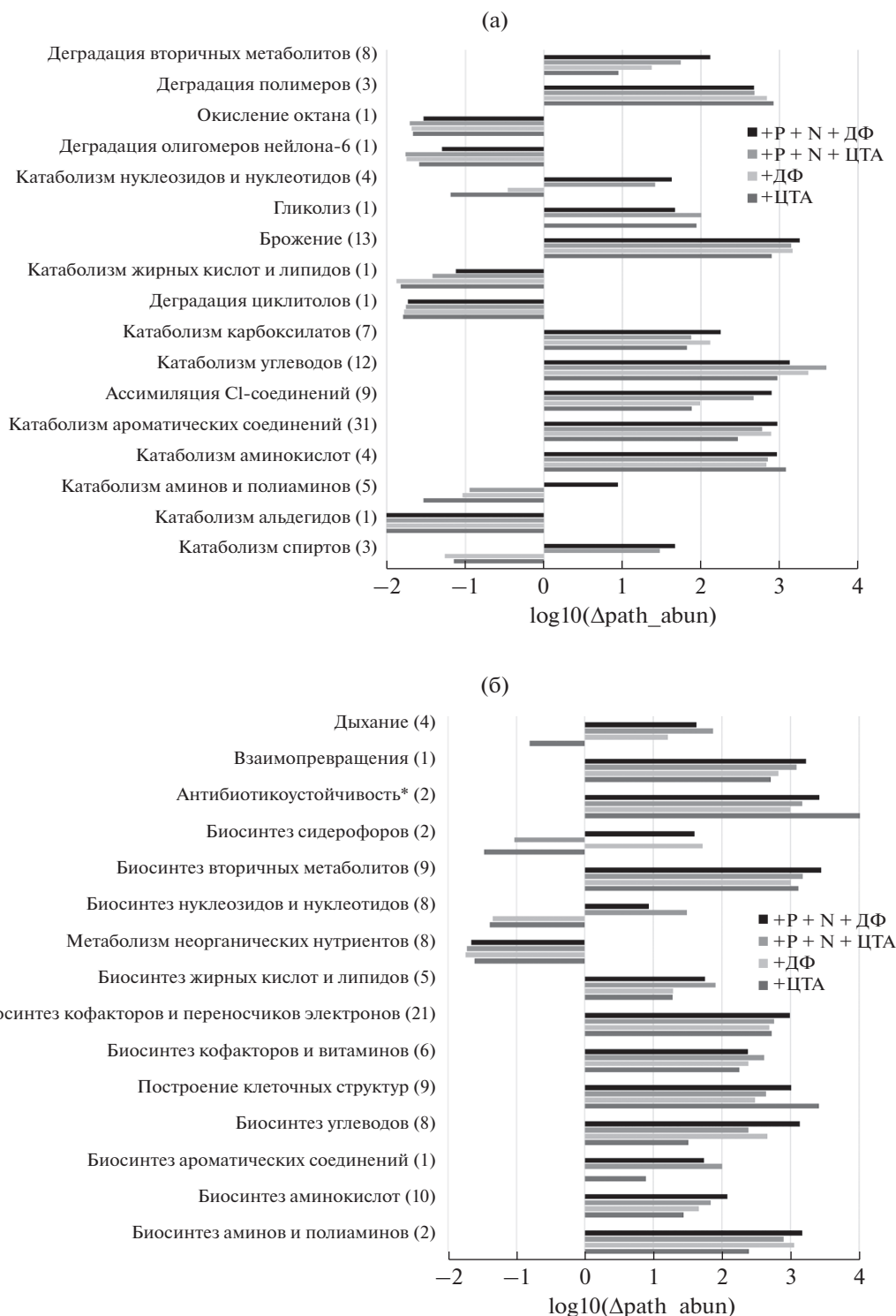


Рис. 6. Функциональная аннотация представленности метаболических путей в АБС Звенигородских ВОС после 31 суток инкубации в сточных водах с ЛВ: а – пути деградации субстратов, б – пути биосинтеза. В скобках указано число путей, найденных для данного суперкласса. (*подразумевается, что устойчивость к действию антибиотика обеспечивается индукцией пути биосинтеза компонентов клеточной стенки бактерий).

сти к антибиотикам. Отметим, что наблюдали рост представленности генов устойчивости к иным видам антибиотиков, не использовавших-

ся в данной работе. Таким образом, исследование подтверждает принципиальную возможность постепенного формирования неспецифичной и

(или) перекрестной (множественной) лекарственной устойчивости, в том числе к антибиотикам, у микроорганизмов из сообществ очистных сооружений под действием ЛВ, попадающих в муниципальные сточные воды. Также результаты указывают на большое значение технологий метагеномного секвенирования для более удобного, точного и информативного мониторинга микробных сообществ.

Работа выполнена при поддержке Научно-образовательной школы МГУ “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология” (проект № 004053, нанопоровое секвенирование) и Российского научного фонда (грант № 21-74-20004, остальные исследования). Авторы признательны ООО “Звенигородский водоканал” за возможность отбора образцов. Измерения фотосинтетической активности выполнены с применением оборудования ЦКП “Фенотипирование фототрофных микроорганизмов” МГУ им. М.В. Ломоносова. Исследования методом NGS-метабаркодирования проведены с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gallardo-Altamirano M.J., Maza-Márquez P., Montemurro N. et al. // *Chemosphere*. 2019. V. 233. P. 828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.017>
2. Gao Y.X., Li X., Fan X.Y. et al. // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 351. P. 127016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127016>
3. Ji B., Liu Y. // *ACS ES&T Water*. 2021. V. 1. № 12. P. 2459. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.1c00303>
4. Sepúlveda-Muñoz C.A., de Godos I., Muñoz R. // *Symmetry*. 2023. V. 15. № 2. P. 525. <https://doi.org/10.3390/sym15020525>
5. Kathi S., Singh S., Yadav R. et al. // *Front. Chem. Eng.* 2023. V. 5. P. 1129783. <https://doi.org/10.3389/fceng.2023.1129783>
6. Magro F.G., Freitag J.F., Bergoli A. et al. // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2021. V. 20. № 3. P. 865. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09587-9>
7. Wang C., Jiang L., Zhang Y. et al. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2023. V. 30. № 43. P. 95975. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29147-8>
8. Eheneden I., Wang R., Zhao J. // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 891. P. 164489. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164489>
9. Marchetto F., Roverso M., Righetti D. et al. // *Life*. 2021. V. 11. № 12. P. 1300. <https://doi.org/10.3390/life11121300>
10. Clagnan E., Dell’Orto M., Štěrbová K. et al. // *Bioresour. Technol.* 2023. V. 374. P. 128781. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128781>
11. Qixin L., Xuan F., Zhiya S. et al. // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 354. P. 127161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127161>
12. Iqbal K., Saxena A., Pande P. et al. // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 354. P. 127203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127203>
13. Shetty P., Boboescu I.Z., Pap B. et al. // *Front. Energy Res.* 2019. V. 7. P. 52. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00052>
14. Leong W.H., Kiatkittipong K., Kiatkittipong W. et al. // *Processes*. 2020. V. 8. № 11. P. 1427. <https://doi.org/10.3390/pr8111427>
15. Chen J., Liu X., Lu T. et al. // *Water Res.* 2024. P. 121214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121214>
16. Tang L., Gao M., Liang S. et al. // *Water Res.* 2024. P. 121315. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121315>
17. Saravanan A., Kumar P.S., Varjani S. et al. // *Chemosphere*. 2021. V. 271. P. 129540. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129540>
18. Patel V.K., Sahoo N.K., Patel A.K. et al. // *Algal Biofuels: Recent Advances and Future Prospects* / Eds. Gupta S. et al. Cham: Springer International Publishing, 2017. P. 109. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51010-1_6
19. Padmaperuma G., Kapoore R.V., Gilmour D.J. et al. // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018. V. 38. № 5. P. 690. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1390728>
20. Nagarajan D., Lee D.-J., Varjani S. et al. // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 845. P. 157110. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157110>
21. Zhang L., Chen F., Zeng Z. et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 766364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>
22. Lane T.W., Lane P.D., Koh C.Y. et al. // *Pond Crash Forensics: Microbiome Analysis and Field Diagnostics* (№ SAND2013-6673C). 2013.
23. Thomma B.P., Seidl M.F., Shi-Kunne X. et al. // *Fungal Genet. Biol.* 2016. V. 90. P. 24. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.08.010>
24. Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R. et al. // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. № 6. P. 685. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
25. Wemheuer F., Taylor J.A., Daniel R. et al. // *Environ. Microbiol.* 2020. V. 15. № 1. P. 11. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00358-7>
26. Беркович А.К., Пышкина О.А., Зорина А.А. и др. // *Успехи биологической химии*. 2024. Т. 64. С. 449.
27. Edwards A., Debbonaire A., Nicholls S. et al. // *BioRxiv*. 2016. P. 073965. <https://doi.org/10.1101/073965>
28. Jain M., Koren S., Miga K.H. et al. // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. № 4. P. 338. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
29. Rang F.J., Kloosterman W.P., de Ridder J. // *Genome Biol.* 2018. V. 19. № 1. P. 90. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1462-9>
30. Parker J., Helmstetter A.J., Devey D. et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 8345. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08461-5>
31. Belcour A., Frioux C., Aite M. et al. // *eLife*. 2020. V. 9. P. e61968. <https://doi.org/10.7554/eLife.61968>

32. Zorrilla F., Buric F., Patil K.R. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. № 21. P. e126.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab815>
33. Kuppa Baskaran D.K., Umale S., Zhou Z. et al. // *ISME Commun.* 2023. V. 3. № 1. P. 42.
<https://doi.org/10.1038/s43705-023-00242-8>
34. Inskeep W., Jay Z., Herrgard M. et al. // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 95.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00095>
35. Patil K.R., McHardy A.C. // *Genome Biol. Evol.* 2013. V. 5. № 8. P. 1470.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evt105>
36. Huson D.H., Auch A.F., Qi J. et al. // *Genome Res.* 2007. V. 17. № 3. P. 377.
<https://doi.org/10.1101/gr.5969107>
37. Mallawaarachchi V., Wickramarachchi A., Lin Y. // *Bioinformatics.* 2020. V. 36. № 11. P. 3307.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa180>
38. Blanco-Míguez A., Beghini F., Cumbo F. et al. // *Nat. Biotechnol.* 2023. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41587-023-01688-w>
39. Karlicki M., Antonowicz S., Karnkowska A. // *Bioinformatics.* 2021. V. 38. № 2. P. 344.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab672>
40. Chia W.Y., Ying Tang D.Y., Khoo K.S. et al. // *Environ. Sci. Ecotechnol.* 2020. V. 4. P. 100065.
<https://doi.org/10.1016/j.esec.2020.100065>
41. Priya A.K., Jalil A.A., Vadivel S. et al. // *Chemosphere.* 2022. V. 305. P. 135375.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135375>
42. Васильева С.Г., Зайцев П.А., Баулина О.И. и др. // *Российские нанотехнологии.* 2023. Т. 18. № 1. С. 53.
<https://doi.org/10.56304/S1992722323010168>
43. Cheng X., Xu J., Smith G. et al. // *Environ. Manag.* 2021. V. 295. P. 113129.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113129>
44. Ovis-Sánchez J.O., Perera-Pérez V.D., Buitrón G. et al. // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 882. P. 163545.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163545>
45. Vasilieva S., Lukyanov A., Antipova C. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 13.
<https://doi.org/10.3390/ijms241310988>
46. Vingiani G.M., De Luca P., Ianora A. et al. // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. № 8. P. 459.
<https://doi.org/10.3390/md17080459>
47. Portik D.M., Brown C.T., Pierce-Ward N.T. // *BMC Bioinformatics.* 2022. V. 23. № 1. P. 541.
<https://doi.org/10.1186/s12859-022-05103-0>
48. Richardson L., Allen B., Baldi G. et al. // *Nucl. Acids Res.* 2022. V. 51. № D1. P. D753.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac1080>
49. Ota S., Kawano S. // *Bio-protoc.* 2017. V. 7. № 17. P. e2539.
<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2539>
50. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G. et al. // *ISME J.* 2010. V. 5. № 5. P. 908.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.171>
51. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 15. P. 2114.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
52. McMurdie P.J., Holmes S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 4. P. e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
53. Wright E.S. // *R J.* 2016. V. 8. № 1. P. 352.
54. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 5. P. 335.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
55. Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P. et al. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № D1. P. D643.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
56. Horn H.S. // *Am. Nat.* 1966. V. 100. № 914. P. 419.
57. Schuurmans R.M., van Alphen P., Schuurmans J.M. et al. // *PloS One.* 2015. V. 10. № 9. P. e0139061.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139061>
58. Solovchenko A.E., Vasilieva S.G., Zaitsev P.A. et al. // *J. Appl. Phycol.* 2022. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02660-4>
59. Sánchez-Sandoval D.S., González-Ortega O., Vázquez-Martínez J. et al. // *3 Biotech.* 2022. V. 12. № 9. P. 210.
<https://doi.org/10.1007/s13205-022-03268-2>
60. Dias E., Oliveira M., Jones-Dias D. et al. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 799.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00799>
61. Solovchenko A.E., Ismagulova T.T., Lukyanov A.A. et al. // *J. Appl. Phycol.* 2019. V. 31. № 5. P. 2755.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>
62. Henderson M., Ergas S.J., Ghebremichael K. et al. // *Water.* 2022. V. 14. № 5. P. 758.
<https://doi.org/10.3390/w14050758>
63. Singh J., Thakur I.S. // *Algal Res.* 2015. V. 11. P. 294.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.010>
64. Shipingana L.N.N., Shivaraju H.P., Yashas S.R. // *Appl. Water Sci.* 2022. V. 12. № 2. P. 16.
<https://doi.org/10.1007/s13201-022-01570-1>
65. Lee J.Y., Monk I.R., Gonçalves da Silva A. et al. // *Nat. Microbiol.* 2018. V. 3. № 10. P. 1175.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0230-7>
66. Caspi R., Billington R., Keseler I.M. et al. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № D1. P. D445.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz862>
67. Ahmed H.B., Helal M.H., Abdo M.H. et al. // *Polym. Test.* 2021. V. 104. P. 107381.
<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107381>
68. Johnson J.W., Fisher J.F., Mobashery S. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013. V. 1277. № 1. P. 54.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06813.x>
69. Rowe-Magnus D.A., Mazel D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 1999. V. 2. № 5. P. 483.
[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)00004-1)
70. Pournaras S., Tsakris A., Maniati M. et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. V. 46. № 12. P. 4026.
<https://doi.org/10.1128/2FAAC.46.12.4026-4028.2002>