

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВА ЦИАНОБАКТЕРИЙ УЧАСТКА РАВНИННОГО ВОДОХРАНИЛИЩА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО УЧЕТА И 16S-МЕТАБАРКОДИРОВАНИЯ

М.В. Уманская*, М.Ю. Горбунов, Е.С. Краснова, Н.Г. Тарасова

Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН,
Тольятти, Россия

* Эл. почта: mvumansk67@gmail.com

Статья поступила в редакцию 17.05.2023; принята к печати 04.07.2023

Проанализированы состав и структура сообщества цианобактерий, определенные с помощью световой микроскопии и 16S-метабаркодирования, в заливе крупного равнинного водохранилища и прилегающей к нему акватории. По данным обоих методов, «ядро» сообщества формируют представители семейств *Aphanizomenonaceae*, *Prochlorococcaceae* и *Microcystaceae*, с выраженным доминированием видов комплекса *Aphanizomenon-Dolichospermum*, характерных для начальной стадии цветения цианобактерий в каскаде водохранилищ Волги. Обнаружено достаточно хорошее совпадение структур доминантного комплекса, определенных морфологическими и молекулярно-генетическими методами, на уровне семейств и порядков, однако на родовом и видовом уровнях, а также в составе минорных видов наблюдаются заметные различия. Несмотря на то что идентификация оперативных таксономических единиц (ОТЕ) и валидно описанных видов цианобактерий оказалась возможной далеко не во всех случаях, значения индексов разнообразия, рассчитанных по микроскопическим данным и данным метабаркодирования, близки, и, таким образом, выделяемые ОТЕ в среднем соответствуют по объему морфологически выделяемым видам. Обсуждаются причины расхождения данных, полученных этими методами, связанные в том числе с особенностями алгоритмов выделения ОТЕ, а также с разными числами копий рибосомального оперона и разными числами хромосом в клетках разных типов цианобактерий. По всем этим причинам количество последовательностей при метабаркодировании не является прямым аналогом ни количества, ни биомассы клеток и должно рассматриваться как независимая характеристика сообщества.

Ключевые слова: планктон, цианобактерии, Куйбышевское водохранилище, р. Уса, микроскопический учет, метабаркодирование.

MICROSCOPIC EXAMINATION AND 16S METABARCODING FOR COMPARATIVE ANALYSIS OF CYANOBACTERIA COMMUNITY STRUCTURE IN A PLAINLAND

RESERVOIR. V. Umanskaya*, M. Yu. Gorbunov, Ye. S. Krasnova, N. G. Tarasova

Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of Volga River Basin RAS, Togliatti, Russia

* Email: mvumansk67@gmail.com

Light microscopy and 16S metabarcoding was used to determine the composition and structure of cyanobacteria community in a bay of a large plain reservoir and neighboring water area. Both methods suggest that the core of the community is formed by representatives of the families *Aphanizomenonaceae*, *Prochlorococcaceae* and *Microcystaceae*, the dominant species belonging to the *Aphanizomenon-Dolichospermum* complex, which are typical for the initial stages of cyanobacterial blooms in the cascade of Volga reservoirs. A satisfactory similarity between the dominant complex structures determined using the morphological and the molecular genetic approaches has been found at the family and order levels. There are however noticeable differences at the genus and species levels and among minor species. Despite that the identification of the operational taxonomic units (OTU) and validity of the described cyanobacteria species were achievable in far not every case, the values of diversity indexes calculated using microscopy and metabarcoding data were similar and, thus, OTUs generally correspond to morphologically distinguished species. The causes of the discrepancy between the results obtained using the two methods are discussed, including those related to peculiarities of OTU discrimination algorithms, different copy numbers of the ribosomal operon per chromosome, and chromosome numbers per cell in different cyanobacterial species. For all these reasons, the number of sequences defined by metabarcoding is not a direct analogue of cell number or biomass and thus should be regarded as an independent characteristic of a community.

Keywords: plankton, cyanobacteria, Kuibyshev Reservoir, the river Usa, microscopic assessment, metabarcoding.

Введение

Цианобактерии – единственная группа выделяющих кислород фотоавтотрофных бактерий, широко распространенная в различных водных и наземных экосистемах. Они развиваются как в пресных, так и в морских экосистемах в составе планктона, бентоса, перифитона и микробных (цианобактериальных) матов, и глобально создают значительную часть первичной продукции биосферы. Цианобактерии часто являются одной из доминирующих групп фитопланктона в пресных водах [32, 33]. Учет и видовую идентификацию цианобактерий традиционно проводят вместе с эукариотическими водорослями с помощью световой микроскопии. Этот метод требует высокой квалификации и опыта таксономиста, а морфологическая идентификация цианобактерий затрудняется относительно небольшим числом диагностических признаков, их слабой выраженностью, наличием филогенетически далеких видов с высоким морфологическим сходством, вплоть до криптических, а также фенотипическими вариациями на разных стадиях жизненного цикла или в зависимости от условий среды. Все эти факторы могут приводить к расхождениям в идентификации одних и тех же видов разными таксономистами [16, 17, 23, 28–31]. В случае одиночных пикоцианобактерий, имеющих клетки размерами 0,5–2,0–3,0 мкм, таксономическое определение в природном материале по морфологическим признакам практически невозможно, и их можно учитывать только с помощью флуоресцентной микроскопии.

В последнее время становятся все более доступны методы, основанные на принципах баркодинга природных сообществ, то есть секвенирования коротких участков целевых (маркерных) генов из суммарной ДНК всего сообщества и идентификации полученных последовательностей путем сравнения с имеющимися базами данных. Число таких исследований быстро растет по мере появления новых и увеличения доступности существующих методов секвенирования нового поколения. Наиболее универсальными маркерами для прокариот служат фрагменты вариабельных участков последовательностей гена РНК малой субъединицы рибосом (16S-rРНК); в качестве селективных маркеров для цианобактерий и эукариотических водорослей используются фрагменты гена большой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (rbcL) и генов фотосистемы II (например, psbA); маркерами токсичных видов могут быть гены синтаз микроцистина и других токсинов.

Метабаркодирование позволяет выявлять виды независимо от их жизненной стадии и размера, включая криптические [30, 44]. Однако его применение сильно зависит от выбранного маркерного гена и используемой базы данных, алгоритма биоинформатической обработки первичных данных, метода и уровня кластеризации выделенных последовательностей [42].

Одновременное применение морфологического и молекулярно-генетического методов может быть очень информативным для анализа состава природных сообществ цианобактерий, оценки их структуры и определения количественных характеристик. Однако сравнение результатов применения морфологического и молекулярно-генетического методов для анализа сообществ разных групп организмов из одних и тех же природных проб показывает заметные расхождения между составом, относительной численностью и встречаемостью таксонов разного ранга, определенными «классическими» и «молекулярными» методами, в составе как фитопланктона в целом [8, 42], так и цианобактерий [9, 32]. Однако число таких сравнительных работ в случае цианобактерий пока еще невелико, а с учетом их высокого экологического значения в пресных континентальных водоемах продолжение такого сравнительного анализа в различных водоемах крайне необходимо для лучшего понимания новых результатов, полученных методами метабаркодирования.

В настоящей работе представлены результаты сравнительного анализа состава и структуры сообщества цианобактерий, определенного с помощью световой микроскопии и 16S-метабаркодинга в зоне впадения притока в крупное равнинное водохранилище.

Материалы и методы

Отбор проб на станциях, расположенных в устьевой части Усинского залива и Приплотинном плесе Куйбышевского водохранилища, выше и ниже залива, проводили 30 июня, и на станциях, расположенных на р. Уса и в средней части Усинском заливе, – 5 июля 2021 года (рис. 1). В заливе и на акватории водохранилища станции отбора проб находились на расстоянии 50–200 м от берега, а их глубина составляла 4–17 м. Поскольку глубина речной станции – всего 1,5 м, проба на этой станции была отобрана интегрально из интервала 0–1 м с шагом 0,5 м в стерильную ПЭТ-бутыл. На всех остальных станциях пробы отбирали интегрально с шагом 1 м от поверхности до 10 м или до дна (если глубина станции была меньше 10 м) также в стерильные ПЭТ-бутылки. Из них в дальнейшем были отобраны аликвоты для определения цианобактерий морфологическими, эпифлуоресцентными и молекулярно-генетическими методами.

Для морфологической идентификации и количественного учета наноцианобактерий обрабатывали пробы воды фиксатором Кузьмина и далее в соответствии со стандартной методикой [4]. Видовую принадлежность устанавливали по определителям [1, 21, 24, 25]. Для учета пикоцианобактерий фиксировали пробы воды стерильным формалином до конечной концентрации 4%, фильтровали через мембранные фильтры (ФМНЦ-0,2; «Владисарт», Россия), на которых и определяли численность пикоцианобактерий с помощью

флуоресцентной микроскопии по автофлуоресценции хлорофилла. К пикоцианобактериям относили все одиночные клетки, линейные размеры которых не превышали 3 мкм.

Для метабаркодирования фильтровали пробы в стерильных условиях через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Фильтры с осадками переносили в стерильные пробирки, фиксировали в 3 мл 80% (об/об) этанола и хранили при -20°C . Выделение ДНК и высокопроизводительное секвенирование было выполнено в компании Синтол (Москва, Россия). Для амплификации варибельного участка V3–V4 гена 16S-rРНК прокариот использовали универсальные прокариотические праймеры 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') и 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') [19] со стандартными адаптерами Illumina. Парноконцевое секвенирование полученных библиотек ДНК было выполнено на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq® Reagent Kit v2, 2×250 нк, 500 циклов.

Обработку полученных сырых данных проводили с помощью программного пакета Usearch 11.0.67 [14]. Полученные уникальные последовательности были кластеризованы на уровне 97% с выделением операционных таксономических единиц (ОТЕ). Таксономическую принадлежность ОТЕ определяли с помощью

элайнера SINA v1.2.11 [34] с использованием базы данных SILVA SSU v. 138.1 [35].

Для уточнения классификации использовали алгоритм BLAST на платформе NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетические деревья были построены в программе MEGA v.11 [27] с использованием референтных последовательностей 16S-rРНК, полученных из базы данных NCBI. Матрицы расстояний рассчитывались в соответствии с двухпараметрической моделью Кимуры. Бутстрап-анализ полученных кладограмм был проведен на основе 1000 повторов.

Таксономическая структура сообщества цианобактерий приведена в соответствие с классификацией [40]. Структуру сообщества цианобактерий в отдельных пробах определяли по относительному вкладу вида в общую численность (микроскопический анализ) или ОТЕ в общее число последовательностей цианобактерий (метабаркодирование). Сравнение структур сообщества цианобактерий исследованного участка, полученных разными методами, проводили для всего района исследования в целом, без учета пространственно-временных изменений. Средний относительный вклад вида в общую численность или ОТЕ в общее число последовательностей цианобактерий для всего района был рассчитан как средний из относительных вкладов каждого вида или ОТЕ в отдельных пробах.



Рис. 1. Карта-схема расположения станций отбора проб на р. Уса, в Усинском заливе и в прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища

Результаты Структура цианобактерий по результатам микроскопического определения

Цианобактерии являлись основой фитопланктона Усинского залива и прилегающего участка Куйбышевского водохранилища в исследованный период [7]. По морфологическим признакам в их составе было выявлено 28 видов, а средняя численность составила $2,033 \times 10^5$ кл./мл. В составе сообщества в исследованный период доминировали цианобактерии пор. Nostocales, которым сопутствовали одиночные пикоцианобактерии и колониальные представители пор. Chroococcales. Основной вклад в общую численность цианобактерий вносили представители сем. Aphanizomenonaceae (65,4%) с выраженным доминированием *Aphanizomenon flos-aquae* (Ralfs ex Bornet et Flahault), *Dolichospermum flos-aquae* (Brébisson ex Bornet et Flahault) Wacklin et al. и *Trichormus variabilis* (Kützing ex Bornet et Flahault) Komárek et Anagnostidis, в порядке уменьшения вклада в общую численность (рис. 2). Прочие виды родов *Aphanizomenon* (*A. gracile* Lemmermann; *A. klebahnii* (Elenkin) Pechar et Kalina), *Dolichospermum* (*D. planctonicum* (Brunnthal) Wacklin et al.; *D. sigmoideum* (Nygaard) Wacklin et al., а также *Cuspidothrix elenkinii* (Kisselev) Rajaniemi et al.) были минорными и их суммарный вклад не превышал 1,1% численности.

Одиночные неидентифицированные пикоцианобактерии (ПЦБ) формировали 22,9% общей численности и составляли тем самым существенную часть сообщества (рис. 2). Мелкоклеточные колониальные цианобактерии формировали чуть более 2% численности и были представлены в основном р. *Aphano-*

capsa (рис. 2). Вклад р. *Microcystis* в общую численность составил 7,5%, в основном за счет *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (рис. 2). По сравнению с Nostocales, нитчатые безгетероцистные цианобактерии были немногочисленны (около 1,8%); среди них преобладали Pseudanabaenaceae, преимущественно за счет *Pseudanabaena mucicola* (Naumann et Huber-Pestalozzi) Schwabe (рис. 2), им сопутствовали виды *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Anagnostidinium amphibium* (Agardh ex Gomont) Strunecký et al., *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont и *Glaucospira laxissima* (G.S. West) Simic, Komárek & Dordevic, в порядке уменьшения вклада. Прочие виды были минорными и в сумме составляли не более 0,1% численности.

Метабаркодирование вариабельного участка V3–V4 гена 16S-рРНК: структура цианобактерий на уровне ОТЕ

В результате метабаркодирования было выделено 29 ОТЕ, принадлежащих к кл. Cyanobacteria=Оху-photobacteria, с суммарным числом последовательностей 92869. В составе сообщества по числу последовательностей доминировали ОТЕ, принадлежащие к сем. Aphanizomenonaceae; им сопутствовали представители сем. Prochlorococaceae. Меньший, но также существенный вклад в структуру сообщества вносили ОТЕ, входящие в сем. Microcystaceae и Pseudanabaenaceae (рис. 3). Прочие филогенетические группы и клады являлись минорными и составляли в сумме 2,9% последовательностей, но вносили заметный вклад в общее разнообразие сообщества (представляя собой чуть менее половины ОТЕ, 41,4%).

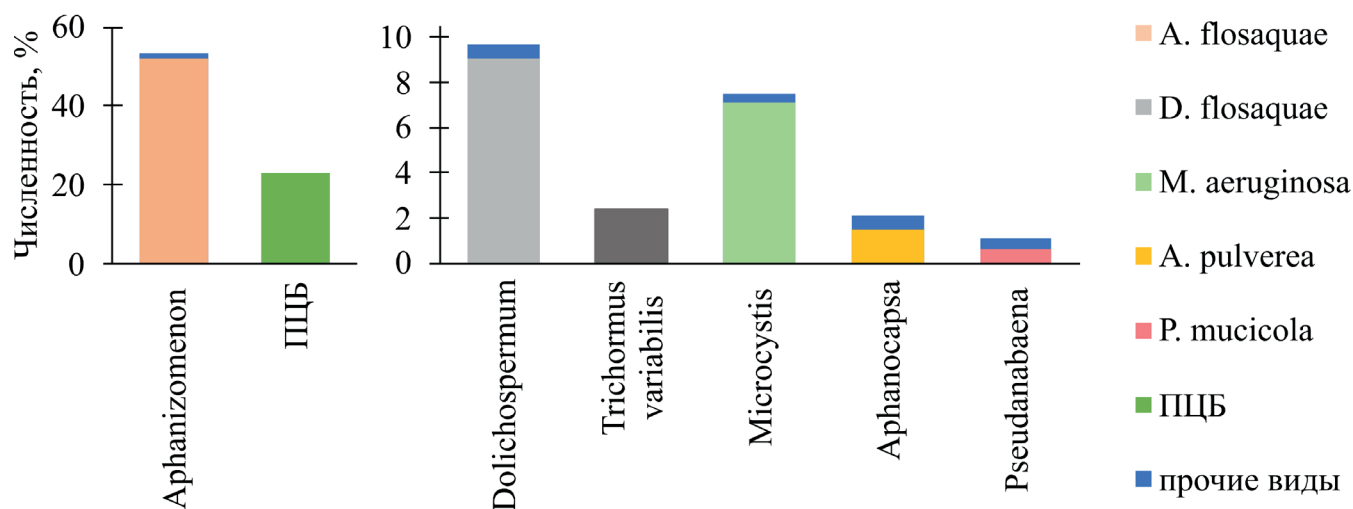


Рис. 2. Структура доминирующего комплекса сообщества цианобактерий по результатам микроскопического анализа: преобладающие роды и виды. ПЦБ – одиночные пикоцианобактерии

Сем. *Aphanizomenonaceae* было представлено семью ОТЕ, которые в сумме составляли 71,9% последовательностей (рис. 4). Доминировали ОТЕ-1, нуклеотидная последовательность которого идентична участку V3–V4 гена 16S-rРНК штамма *Aphanizomenon flos-aquae* CCAP 1401/7 (HE975013), и ОТЕ-9, относящийся к р. *Dolichospermum*. Более точно идентифицировать этот ОТЕ невозможно из-за высокого сходства его нуклеотидной последовательности с коллекционными штаммами нескольких разных видов (рис. 4, табл. 1). Ближайшим к ОТЕ-3190 оказался изолят KY091688 из оз. Изник (Турция), определенный как *Anabaenopsis elenkinii* TURKEYBLM9 (табл. 1). Однако нуклеотидная последовательность этого штамма очень далека от других штаммов этого вида и рода, вероятно поэтому его таксономическое определение ошибочно. В таком случае ОТЕ-3190 также принадлежит к роду *Dolichospermum* и, судя по результатам филогенетического анализа, близок к видам *D. flos-aquae* или *D. lemmermanii* (рис. 4). Два ОТЕ принадлежат к роду *Cuspidothrix*, причем их относительный вклад в общее число последовательностей довольно велик (рис. 3, 4), тогда как по микроскопическому определению этот род являлся минорным, и его доля в численности не превышала 0,1%. По данным метабаркодинга не были выявлены ОТЕ, относящиеся к роду *Trichormus* (рис. 4), который был обнаружен по морфологическим признакам.

В сем. *Prochlorococcaceae* входят пять ОТЕ, суммарно составляющие 18,73% всех последовательностей (рис. 3, 5). Среди них доминирует ОТЕ-42, который, как и ОТЕ-1916, близок к *Cyanobium gracile* PCC-6307 (рис. 5). Поиск соответствий в Genbank выявил для ОТЕ-42 большее сходство с *Cyanobium* sp. JJ2-3, а для ОТЕ-1916 – с *Synechococcus* sp. SR-R4S6 (табл. 1). Третий ОТЕ, ОТЕ-151, имеет последовательность, идентичную с *Synechococcus* cf. *nidulans* TAU-MAC 3010, и филогенетически близок к *Anathece clathrata* (рис. 5, табл. 1). Обнаруженные при микроскопическом анализе *Aphanocapsa pulvereae* и *A. incerta* не представлены в Genbank, однако другие мелкоклеточные виды *Aphanocapsa* (*A. holsatica*, *A. feldmanii* и *A. salina*) входят в кладу *Synechococcus-Prochlorococcus-Cyanobium*. Это позволяет считать, что некоторые из обнаруженных ОТЕ, относящихся к этой кладе, могут принадлежать к роду *Aphanocapsa*.

В составе сообщества обнаружен минорный ОТЕ-1479, последовательность которого идентична недавно описанному виду *Altericista lacusladogae* Averina, E. Polyakova, Senetskaya & Pinevich 2021 (рис. 5) и который по своим размерам может быть отнесен к пикоцианобактериям. Еще четыре ОТЕ с небольшим числом последовательностей принадлежат к р. *Chamaesiphon* (рис. 3, 5, табл. 1), представители которого не были зарегистрированы при микроскопическом определении.

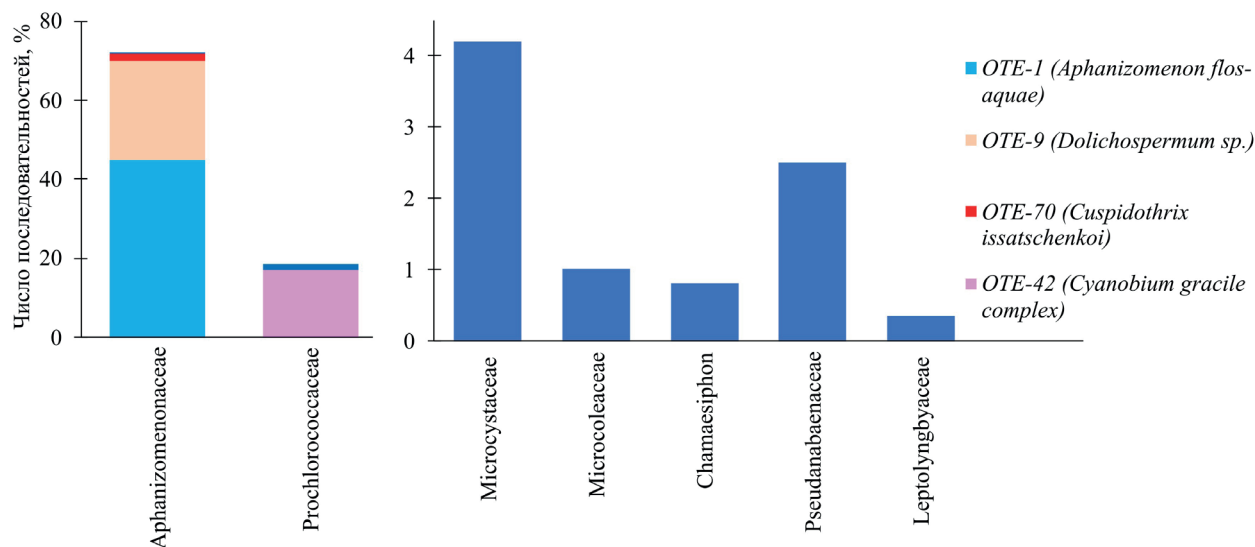


Рис. 3. Структура сообщества цианобактерий по данным метабаркодирования: преобладающие семейства и ОТЕ

К сем. *Microcystaceae* относится ОТЕ-20, идентичный штамму *Microcystis aeruginosa* (рис. 3, 5, табл. 1), вклад которого в общее количество последовательностей составляет 4,16%. Минорный ОТЕ-792 имеет нуклеотидную последовательность, идентичную со штаммами *Snowella litoralis* и *S. rosea* (табл. 1). В соответствии с таксономической схемой, принятой в рамках Международного кодекса номенклатуры водорослей, грибов и растений (Ботанический Кодекс), род *Snowella* относят к пор. *Synechococcales*, но, согласно филогенетическим

данным [40], он безусловно принадлежит к сем. *Microcystaceae* (пор. *Chroococcales*) (рис. 5).

Среди безгетероцистных нитчатых цианобактерий основной вклад вносили ОТЕ, входящие в сем. *Pseudanabaenaceae* (рис. 5), с выраженным доминированием ОТЕ-63, последовательность которого идентична с *Pseudanabaena mucicola* NRERC-307 (рис. 3, табл. 1). Два минорных ОТЕ (804 и 1865) принадлежат к сем. *Leptolyngbyaceae* и филогенетически близки к *Phormidesmis arctica* HOR 11-6 (рис. 5). Ранее в соста-

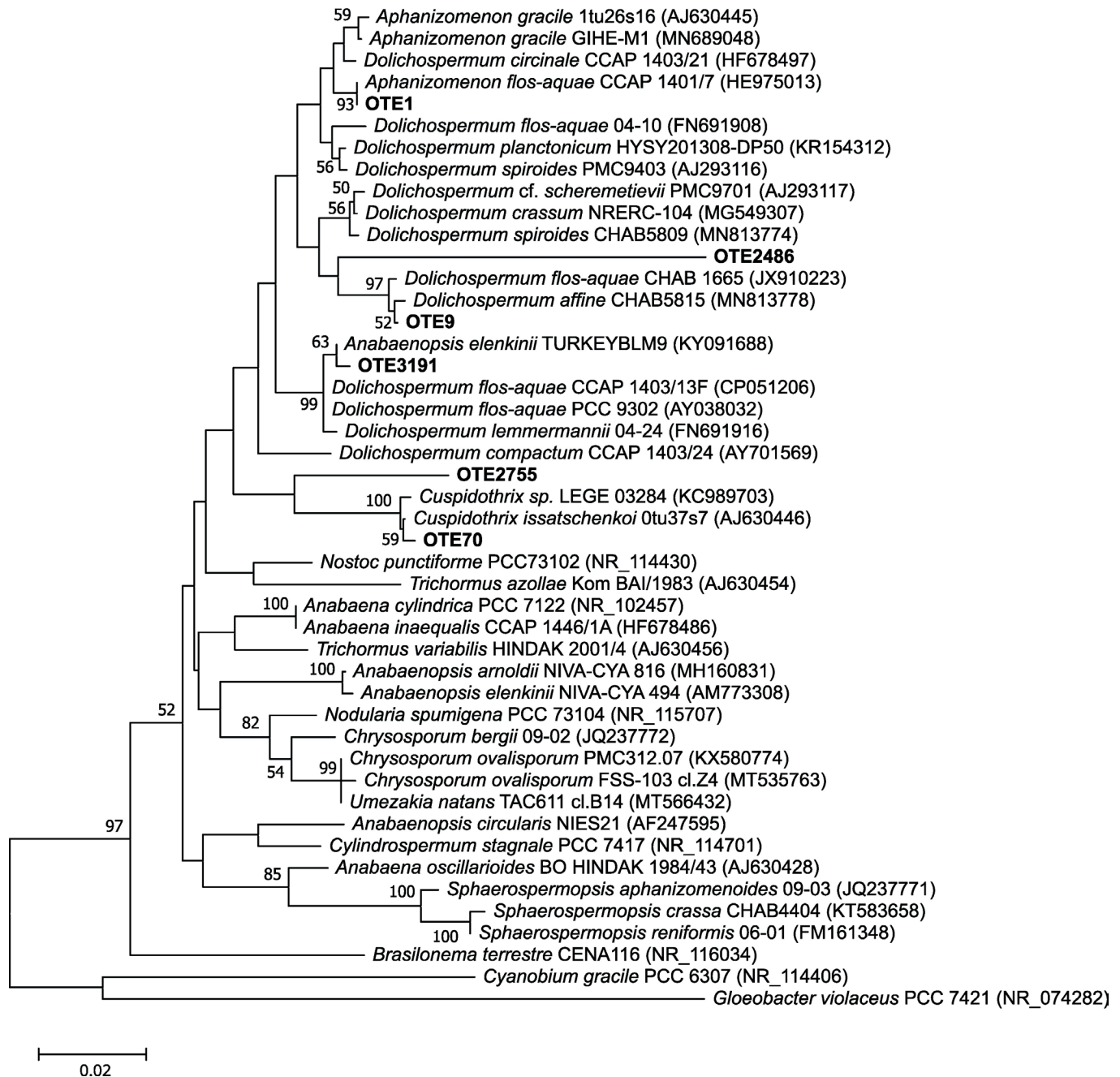


Рис. 4. Филогенетическое дерево обнаруженных ОТЕ цианобактерий, принадлежащих к порядку *Nostocales*

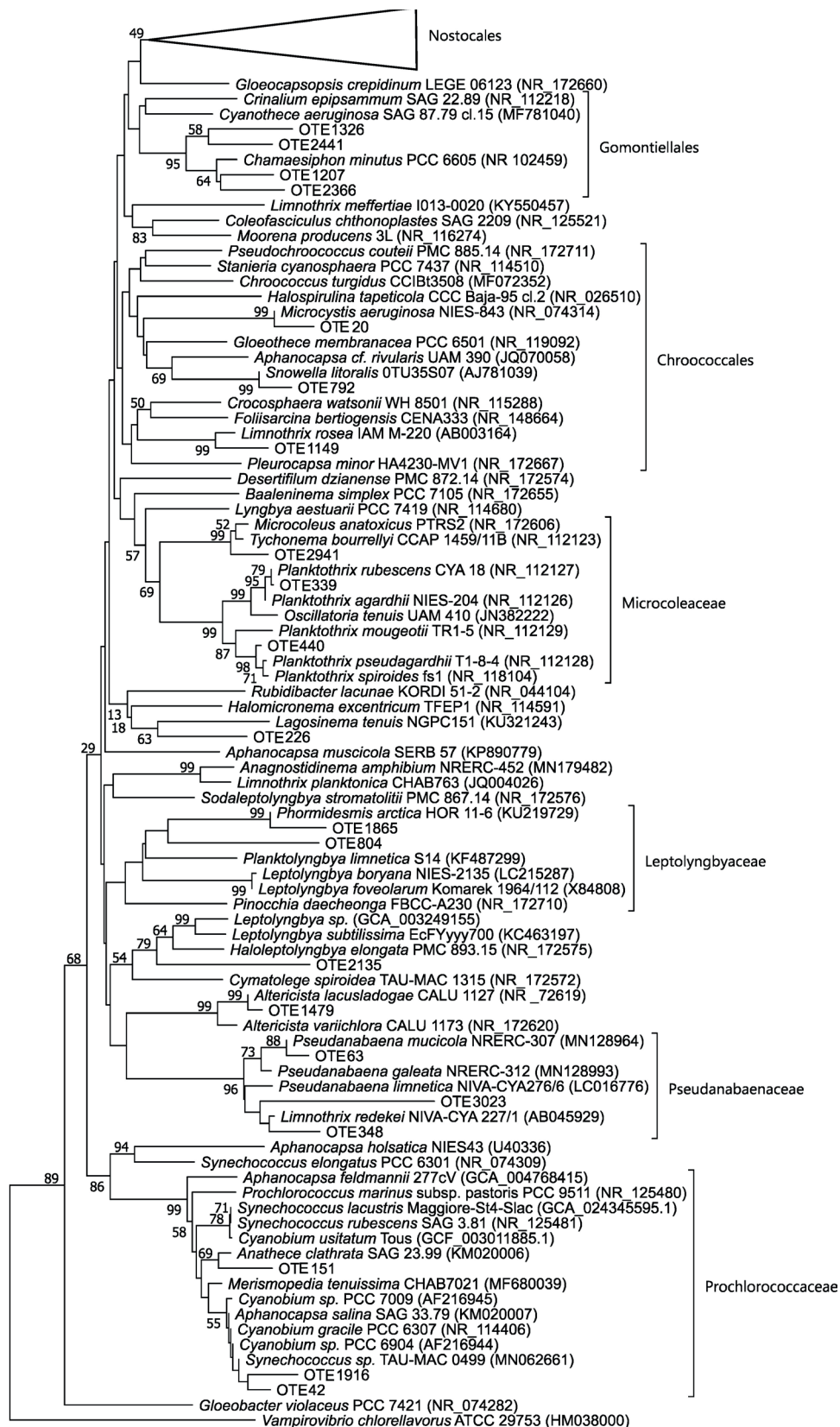


Рис. 5. Филогенетическое дерево обнаруженных ОТЕ, принадлежащих к кл. Cyanobacteriia

ве планктона района исследований отмечался другой вид этого рода – *Phormidesmis mollis* (Gomont) Turicchia, Ventura, Komárková & Komárek [3, 6], но в исследованный период по данным микроскопического определения он не был обнаружен.

ОТЕ-339 и ОТЕ-440, суммарный вклад которых в общее число последовательностей составлял 1% (рис. 3, 5, табл. 1), принадлежат к сем. Microcoleaceae, при-

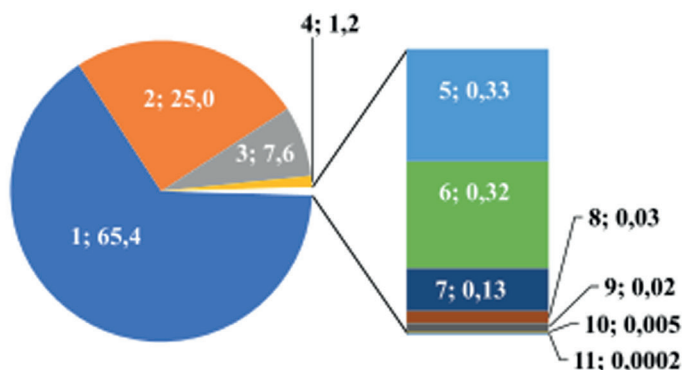
чем первый принадлежит к комплексу *Planktothrix agardhii/rubescens*, а второй близок к *P. spiroides* и *P. pseudagardhii*. Поскольку *P. pseudagardhii* морфологически неотличим от *P. agardhii* [41], а *P. spiroides* внешне сильно напоминает виды *Arthrospira*, которые, однако, отсутствовали по микроскопическим данным, вероятно, ОТЕ-440 при микроскопическом определении был учтен как *P. agardhii*.

Табл. 1

Последовательности в базе данных Genbank, ближайшие к доминирующим OTU

ОТЕ	Название	% сходства	№ в Genbank
Nostocales: Aphanizomenonaceae			
ОТЕ-1	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NRERC-020	100	MN104685.1
ОТЕ-9	<i>Dolichospermum circinale</i> CHAB1304	100	GU197629.1
	<i>Dolichospermum affine</i> CHAB5815	99,75	MN813778.1
	<i>Dolichospermum affine</i> NIES-40	100	AF247591.1
ОТЕ-70	<i>Cuspidothrix issatschenkoii</i> GIHE-M3	100	MT135015.1
ОТЕ-3191	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> TURKEYBLM9	99,75	KY091688.1
	<i>Dolichospermum flos-aquae</i> CCAP 1403/13F	99,51	CP051206.1
Chroococcales: Microcystaceae			
ОТЕ-20	<i>Microcystis aeruginosa</i> PMC 1276.20	100	MW405033.1
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	99,75	NR_074314.1
ОТЕ-792	<i>Snowella litoralis</i> 1LT47S05	100	AJ781041.1
	<i>Snowella rosea</i> 1LM40S01	100	AJ781042.1
Gomontiellales: Chamaesiphonaceae			
ОТЕ-1326	<i>Chamaesiphon cf. incrustans</i> str. <i>Ch. fontanile</i>	95,01	KY704115.1
Oscillatoriales: Microcoleaceae			
ОТЕ-339	<i>Planktothrix agardhii</i> PCC 7811	100	LR882969.1
ОТЕ-440	<i>Planktothrix pseudagardhii</i> HAB639	100	GQ457311.1
	<i>Planktothrix spiroides</i> fs1	99,26	NR_118104.1
Nodosilineales: Persinematocaceae			
ОТЕ-226	Filamentous cyanobacterium odo3mo16	94,58	AB863129.1
	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 6Dec13_09, пруд Бугач	99,75	KM585774.1
Leptolyngbyales: Leptolyngbyaceae			
ОТЕ-804	<i>Leptolyngbya</i> sp. GSE-PSE30-01B	99,50	HM018675.1
Synechococcales: Prochlorococcaceae			
ОТЕ-42	<i>Cyanobium</i> sp. JJ2-3	99,75	AM710363.1
	<i>Cyanobium gracile</i> PCC 6307	99,5	NR_102447.1
ОТЕ-1916	<i>Synechococcus</i> sp. SR-R4S6	99,01	MT376740.1
	<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	97,28	NR_125481.1
ОТЕ-151	<i>Synechococcus cf. nidulans</i> TAU-MAC 3010	100	MN062662.1
Pseudanabaenales: Pseudanabaenaceae			
ОТЕ-63	<i>Pseudanabaena mucicola</i> NRERC-307	100	MN128964.1
	<i>Pseudanabaena yagii</i> NIVA-CYA 111	99,5	NR_177737.1
ОТЕ-348	<i>Cyanobium</i> sp. ULC068	100	MH118735.1
	<i>Pseudanabaena frigida</i> ULC067	99,75	MH118734.1

микроскопия



метабаркодинг

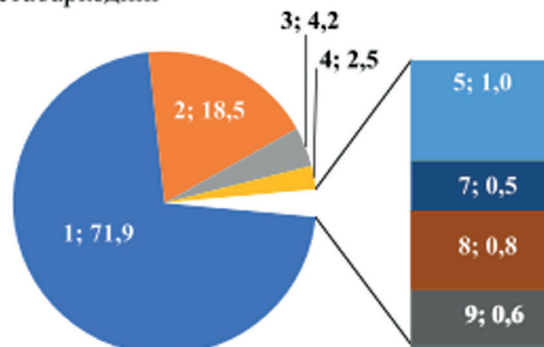
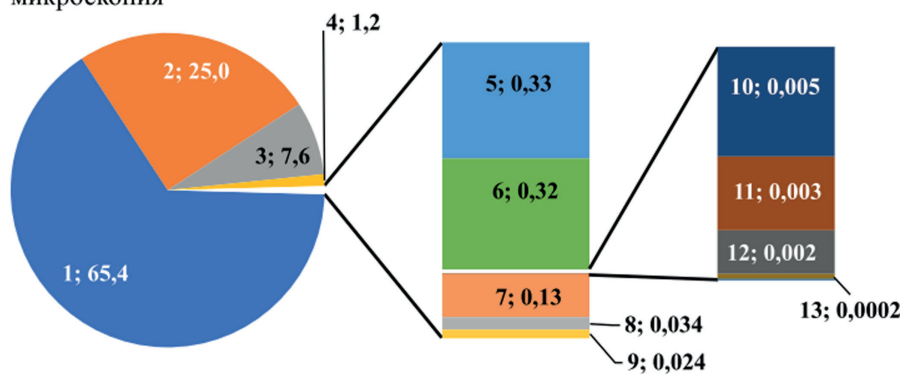


Рис. 6. Сравнительный анализ структуры сообщества цианобактерий на уровне порядков по результатам микроскопического и молекулярно-генетического анализа. Обозначения: номер порядка; вклад в общую численность или суммарное количество последовательностей (%). Порядок: 1 – Nostocales Borzi 1914; 2 – Synechococcales Hoffmann et al. 2005; 3 – Chroococcales Schaffner 1922; 4 – Pseudanabaenales Komárek and Anagnostidis 1988; 5 – Oscillatoriales Schaffner 1922; 6 – Coleofasciculales Strunecký and Mareš 2023; 7 – Nodosilineales Strunecký and Mareš 2023; 8 – Gomontiellales Strunecký and Mareš 2023; 9 – Leptolyngbyales Strunecký and Mareš, 2023; 10 – Chroococciopsidales Komárek et al. 2014; 11 – Spirulinales Komárek et al. 2014

микроскопия



метабаркодинг

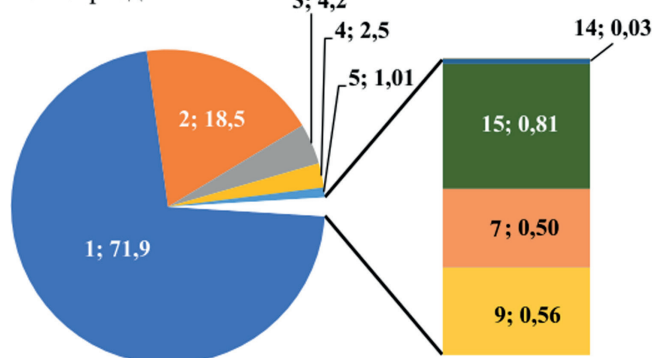


Рис. 7. Сравнительный анализ структуры сообщества цианобактерий на уровне семейств по результатам микроскопического и молекулярно-генетического анализа. Обозначения: номер семейства; вклад в общую численность или суммарное количество последовательностей (%). Семейство: 1 – Aphanizomenonaceae Elenkin 1938; 2 – Prochlorococcaceae Komárek and Strunecký 2020; 3 – Microcystaceae Elenkin 1933; 4 – Pseudanabaenaceae Anagnostidis and Komárek 1988; 5 – Microcoleaceae Komárek et al. 2014; 6 – Wilmottiaceae Strunecký and Mareš 2023; 7 – Persinematocaceae Strunecký and Mareš 2023; 8 – Cyanothecaceae Komárek et al. 2014; 9 – Leptolyngbyaceae Komárek et al. 2014; 10 – Chroococciopsidaceae Geitler ex Büdel et al. 2012; 11 – Cyatolegaceae Strunecký and Mareš, 2023; 12 – Chroococcaceae Nägeli 1849; 13 – Spirulinaceae (Gomont) Hoffmann et al. 2005; 14 – Geminocystaceae Tuji et al. 2021; 15 – Chamaesiphonaceae Borzi 1882

В целом, по данным микроскопического анализа в цианобактериальном сообществе исследованного района выявлено 28 видов, а также одиночные неидентифицированные пикоцианобактерии, которые входят в 11 порядков и 13 семейств; в результате метабаркодирования было выделено 29 ОТЕ цианобактерий, которые являются представителями 8 порядков и 9 семейств. При этом 5 доминирующих макротаксонов и их порядок, но не соотношение их вкладов, совпадают для обоих методов как на уровне порядков, так и на уровне семейств, тогда как структура (состав и соотношение вкладов) минорного комплекса порядков и семейств имеют заметные отличия (рис. 6, 7).

Принимая, что большую часть микроскопически учтенных пикоцианобактерий можно отнести к р. *Cyanobium*, состав доминирующего комплекса на уровне родов практически совпадает, но среди субдоминантов и, особенно, минорных родов различия довольно значительны. Не совпадают и вклады отдельных родов, определенные разными методами (табл. 2, рис. 2, 3). При переходе к видовому уровню различия в структуре сообщества становятся еще более выраженными, причем и по составу, и по относительному вкладу в структуру. Однако величины индексов разнообразия, рассчитанные как по микроскопическим данным (количество видов), так и по данным метабаркодирования (ко-

Табл. 2

Состав родов доминирующего комплекса цианобактериального сообщества исследованного района

Род	Микроскопия		Метабаркодирование	
	Вклад в общую численность		Вклад в общее число последовательностей	
	род, %	вид, %	род, %	ОТЕ; %
Nostocales: Aphanizomenonaceae				
<i>Aphanizomenon</i>	53,3	<i>A. flos-aquae</i> , 52,8	44,8	ОТЕ-1; 44,8
<i>Dolichospermum</i>	9,7	<i>D. flos-aquae</i> , 9,1	25,3	ОТЕ-9; 25,0
<i>Cuspidothrix</i>	0,02	<i>C. elenkinii</i> , 0,02	1,8	ОТЕ-70; 1,8
<i>Trichormus</i>	2,4	<i>T. variabilis</i> , 2,4		
Synechococcales: Prochlorococcaceae				
ПЦБ ¹	22,9			
<i>Cyanobium</i>			18,5	ОТЕ-42; 17,1
<i>Aphanocapsa</i>	2,1	<i>A. pulverea</i> , 1,5		
Chroococcales: Microcystaceae				
<i>Microcystis</i>	7,5	<i>M. aeruginosa</i> , 7,1	4,2	ОТЕ-20; 4,2
Pseudanabaenales; Pseudanabaenaceae				
<i>Pseudanabaena</i>	1,1	<i>P. mucicola</i> , 0,7	2,3	ОТЕ-63; 2,3
Oscillatoriales: Microcoleaceae				
<i>Planktothrix</i>	0,3	<i>P. agardii</i> , 0,3	1,0	ОТЕ-339; 0,9

¹ – одиночные неидентифицированные пикоцианобактерии.

Табл. 3

Общая характеристика сообщества цианобактерий исследованного района по данным разных методов

Метод исследования	Число видов (ОТЕ)	Доминирующий комплекс ²	Индексы разнообразия		
			Шеннона	Пиелу	Симпсона
Микроскопия	28 ¹	<i>Aphanizomenon</i> ПЦБ ³ <i>Dolichospermum</i> <i>Microcystis</i>	2,12	0,44	0,65
Метабаркодирование	29	<i>Aphanizomenon</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Cyanobium</i> <i>Microcystis</i>	2,25	0,32	0,7

¹ Без учета пикоцианобактерий.

² В порядке уменьшения вклада в общую численность или количество последовательностей.

³ Пикоцианобактерии.

личество ОТЕ), оказались довольно близкими (табл. 3), что свидетельствует о том, что в целом по своему объему выделенные ОТЕ практически соответствуют видовому уровню, хотя их точная идентификация и оказалась возможной далеко не во всех случаях. Надо отметить, что только для четырех видов цианобактерий (*A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *P. mucicola*, *P. agardii*) были обнаружены соответствующие им ОТЕ; еще 11 ОТЕ либо принадлежат к другому виду рода, определенного по морфологическим признакам, либо могут быть идентифицированы только до рода.

Обсуждение

Морфологическое разнообразие цианобактерий значительно превышает разнообразие любой другой группы прокариот, но, тем не менее, спектр морфологических признаков одноклеточных, особенно мелкоклеточных, форм цианобактерий очень ограничен, а более крупных и колониальных форм – весьма вариативен. Известно, что колониальные формы часто утрачивают слизистые оболочки и теряют колониальную организацию, по крайней мере при длительном культивировании, а иногда и при первичном выделении в культуры. Из-за этого многие штаммы в коллекциях цианобактериальных культур, исходно выделенные как представители колониальных *Aphanothece* (PCC 7424), *Aphanocapsa* (PCC 6803) или *Merismopedia* (= *Agmenellum*, PCC 7002), сейчас относят к рр. *Synechococcus*, *Synechocystis* и *Cyanobium* соответственно. Даже типовой штамм *Cyanobium gracile* PCC 6307, ранее *Synechococcus* PCC 6307, был исходно выделен как *Gloeocapsa* (*Coccochloris*) *peniocyctis* 1020 [36]. Генетический анализ показывает, что некоторые морфологически определенные виды одноклеточных пикоцианобактерий представляют собой комплексы криптических линий, эволюционно весьма далеких друг от друга [26, 37].

Спектр морфологических признаков безгетероцистных нитчатых цианобактерий с узкими трихомами лишь немногим шире, чем у пикопланктонных одноклеточных цианобактерий, они также принадлежат к нескольким морфологически трудно различимым, но филогенетически изолированным группам: *Pseudanabaenales*, *Leptolyngbyales*, *Nodosilineales*, *Coleofasciculales*, что иллюстрирует высокую частоту морфологической конвергенции среди филогенетически отдаленных таксонов цианобактерий [40]. При этом морфология нитчатых форм может изменяться в зависимости от условий среды, при выделении в культуры и при длительном культивировании. У представителей *Nostocales* гетероцисты и акинеты, форма и положение которых являются важными таксономическими маркерами, на отдельных стадиях развития и в природном материале могут быть редкими или вообще отсутствовать. Поэтому многие описанные до настоящего времени в рамках Ботанического кодек-

са традиционные таксоны, а также некоторые роды и виды цианобактерий оказываются при филогенетическом анализе полифилетическими [13, 22, 43].

Необходимо учитывать, что по ряду причин ОТЕ невозможно отождествлять с видами. В использованном нами [14], как и в большинстве других алгоритмов выделения операционных таксономических единиц, порог кластеризации равен 97%, тогда как видовой порог сходства полных последовательностей 16S-rРНК, принятый в настоящее время, – 98,7–99% [39], причем сходство отдельных вариативных участков генов 16S-rРНК может быть как больше, так и меньше этого порога. Кроме того, во многих родах цианобактерий (например, р. *Microcystis*) сходство генов 16S-rРНК разных морфологически описанных видов может быть существенно выше 99%, вплоть до полной идентичности. Виды, описанные с помощью геномной таксономии, также могут иметь полностью идентичные последовательности rРНК, поскольку последние не используются в ходе анализа. Поэтому в состав одного ОТЕ вполне могут войти последовательности, принадлежащие к нескольким близким видам.

Экологически состав и структура сообщества цианобактерий исследованного участка является вполне типичной для пресных континентальных водоемов [20, 32, 45 и др.]. «Ядро» исследованного цианобактериального сообщества составляют представители трех семейств, *Aphanizomenonaceae*, *Prochlorococcaceae* и *Microcystaceae*, которые в сумме образуют около 95% общей численности и общего количества последовательностей, а им сопутствуют представители сем. *Pseudanabaenaceae* и *Microcoleaceae* (рис. 2, 3, 7, табл. 3). Как правило, в летний период на этом участке обычно доминируют виды р. *Microcystis* (*Microcystaceae*) [2, 5], но во время наших исследований они еще не достигли своего максимального развития и составляли относительно небольшую часть цианобактерий, а в целом в сообществе преобладали виды раннелетнего Н1-комплекса *Aphanizomenon-Dolichospermum* (табл. 2, 3).

Aphanizomenon flos-aquae доминировал в сообществе по данным как микроскопии, так и метабаркодинга, причем ОТЕ, соответствующие другим видам этого рода, определенным микроскопически, не были обнаружены. Ему сопутствовали представители р. *Dolichospermum*. ОТЕ, относящиеся к р. *Dolichospermum*, не удалось идентифицировать до вида, причем в некоторых случаях их нуклеотидные последовательности были идентичны (или почти идентичны) нуклеотидным последовательностям разных видов (табл. 1). Вероятно, сильные расхождения между микроскопической и молекулярно-генетической идентификацией в пределах р. *Dolichospermum* (рис. 2, 4) связаны с вариативностью морфологии, из-за которой экологические модификации одного вида определяются как

разные виды. Однако, возможно, что это как раз тот случай, когда стандартный [14] порог кластеризации для выделения операционных таксономических единиц недостаточен для разделения видов.

Отсутствие в ампликонной библиотеке ОТЕ, относящихся к р. *Trichormus*, вероятно, связано с тем, что морфологически *Trichormus variabilis* был определен по форме вегетативных клеток, поскольку находился в фазе активного роста, когда в его нитях практически полностью отсутствовали акинеты, а ведь именно форма и расположение акинет является основным диагностическим признаком этого вида [23].

В составе одноклеточного пикопланктона исследованного района, как и в большинстве пресных водоемов [11, 12], преобладали представители семейства *Prochlorococcaceae* Komárek and Strunecký 2020. ОТЕ, доминировавшие в исследованной выборке, входили в кладу *Cyanobium gracile* (рис. 3, 5, табл. 3). Однако кроме одноклеточных форм, традиционно относимых к ботаническим родам *Synechococcus* и *Cyanobium*, это семейство включает ряд мелкоклеточных колониальных видов pp. *Aphanothece*, *Aphanocapsa*, *Cyanodiction* и *Merismopedia*, которые не образуют какой-то отдельной клады, а спорадически распределены в пределах *Cyanobium*-кластера. Вероятно, некоторые обнаруженные минорные ОТЕ в составе *Prochlorococcaceae* могут соответствовать не одиночным пикопланктонным, а мелкоклеточным колониальным формам представителей вышеперечисленных родов.

Наряду с ними в состав пикопланктона, видимо, могут входить расселительные стадии (экзоспоры) рода *Chamaesiphon* (порядок Gomontiellales Strunecký and Mareš 2023), которые после отделения от материнской колонии могут некоторое время свободно плавать в толще воды. Возможно, однако, что обнаружение ОТЕ рода *Chamaesiphon* в нашем исследовании связано с присутствием сидячих эпифитных стадий, например, на ракообразных, которые не учитывались при микроскопическом определении. В состав одноклеточного пикопланктона, учтенного микроскопически, может быть также включен и недавно открытый вид *Altericista lacusladogae* [10], клетки которого имеют пикопланктонные размеры.

Безгетероцистные нитчатые цианобактерии в период исследования являлись субдоминантами, однако их суммарный вклад и состав, определенные разными методами, оказались различными (рис. 2, 3, табл. 3). Это, впрочем, было вполне ожидаемо, так как многие виды этой группы, входящие в разные филогенетические клады, морфологически очень сходны и могут легко быть определены неправильно. Преобладающий среди них ОТЕ-63 соответствует обнаруженному микроскопически виду *Pseudanabaena mucicola*, который обычно тесно ассоциирован с *Microcystis aeruginosa* и обитает в его колониальной слизи. Остальные,

свободноживущие, представители этой экологической группы были намного менее многочисленны по данным как микроскопии, так и метабаркодинга, хотя в разгар цветения на некоторых станциях Усинского залива иногда регистрировались в составе доминирующего комплекса [2].

Макротаксономическая структура цианобактериального сообщества, полученная по результатам микроскопического и молекулярно-генетического анализа, оказалась весьма близкой на уровне доминирующих порядков (первые 5 порядков) и семейств (также первые 5 семейств), но для минорных таксонов были обнаружены существенные различия (рис. 6, 7). В целом, большее разнообразие макротаксонов было выявлено микроскопическими методами.

Возможными причинами этого могут быть следующие: а) некоторые виды, определенные микроскопически, были встречены единично, и их генетического материала могло оказаться недостаточно для обнаружения методом баркодирования; б) обсужденное выше несоответствие между морфологической и генетической идентификациями видов, так как морфологически разные виды не всегда отличаются генетически при использованном пороге кластеризации и маркерном гене; в) неточности в таксономическом определении морфологически сходных видов; г) невозможность правильной идентификации OTU из-за отсутствия в Genbank последовательностей, соответствующих некоторым определенным микроскопически видам. В целом, различия в структуре, полученной морфологическим и молекулярно-генетическим методами, вполне ожидаемы, они отмечались и в других подобных исследованиях планктонного сообщества [8, 28]. Тем не менее в нашем исследовании показано вполне удовлетворительное совпадение структур в пределах доминирующего комплекса на макротаксономическом уровне (табл. 3, рис. 6, 7) и, хотя и в меньшей степени, на родовом уровне (табл. 2).

Несмотря на сходный состав доминирующих родов по микроскопическим и молекулярно-генетическим данным, вклад отдельных таксонов в структуру сообщества и их соотношение между собой довольно заметно различаются (рис. 6, 7, табл. 2). Хотя возможно, что отчасти это связано с особенностями разных методов идентификации и присущими им ограничениями; известно также, что и число рибосомных оперонов в хромосоме [16, 38], и среднее число хромосом в клетке (плоидность) [18] варьирует у цианобактерий в заметных пределах. При этом плоидность изменяется в пределах одного таксона в зависимости от его физиологического состояния. Поэтому мы полагаем, что данные метабаркодинга следует считать не дубликатом, а еще одним полноценным параметром биоразнообразия, относительно независимым от соотношения численностей и биомасс морфологически

определенных организмов. В гидробиологических исследованиях желательнее определять все эти параметры, используя их как отдельные, взаимодополняющие показатели для наиболее полной характеристики сообщества микроорганизмов.

Заключение

Состав и структура сообщества цианобактерий исследованного участка акватории крупного водохранилища являются типичными для пресных континентальных водоемов. «Ядро» сообщества образуют представители сем. *Aphanizomenonaceae*, *Prochlorococcaceae* и *Microcystaceae* с выраженным преобладанием видов комплекса *Aphanizomenon-Dolichospermum*, что связано с начальной стадией цианобактериального цветения в период отбора. Метабаркодирование показало, что среди пикопланктона преобладали представители клады *Cyanobium gracile*. Сравнительный анализ структуры цианобактериального сообщества Усинского залива и прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища и р. Уса, определенной морфологическим и молекулярно-генетическим методом, показал вполне удовлетворительное совпадение структур в пределах доминирующего комплекса на макротаксономическом уровне (семейства и порядки). Показано, что стандартный

уровень сходства при выделении ОТЕ не всегда достаточен для надежного определения и разделения видов цианобактерий, а высокий уровень сходства последовательностей некоторых ОТЕ с более чем одним видом или клоном в Genbank свидетельствует о недостаточном разрешении анализа только по генам 16s-RNA. Для некоторых видов, определенных микроскопически, в Genbank не были обнаружены соответствующие последовательности, поэтому ряд неидентифицированных ОТЕ может принадлежать именно к этим видам. Выявлено присутствие в сообществе недавно открытого вида *Altericista*. Несмотря на сходный состав комплекса преобладающих родов, вклады отдельных родов и тем более видов, определенных разными методами, совпадают плохо, что может быть связано с тем, что в клетках разных организмов находится различное число копий маркерных генов. Поэтому количество последовательностей при метабаркодировании не является прямым аналогом ни численности, ни биомассы клеток, и его можно рассматривать как отдельную дополнительную характеристику сообщества.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-20005, <https://rscf.ru/project/23-14-20005/>

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Голлербах ММ, Косинская ЕК, Полянский ВИ. Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР. Т. 2. М.: Советская наука; 1953.
2. Горохова ОГ. Состав и структура сообществ фитопланктона Усинского залива Куйбышевского водохранилища в период «цветения» воды. Известия СНЦ РАН. 2016;18(5):122-30.
3. Горохова ОГ. Состав и структура альгофлоры реки Уса и ее притоков (бассейн Куйбышевского водохранилища). Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2019;28(1):27-39.
4. Мордухай-Болтовской ФД, ред. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М.: Наука; 1975.
5. Тарасова НГ. Состав, сезонная динамика и инвазийные виды фитопланктона Куйбышевского водохранилища (диссертация). Тольятти: ИЭВБ РАН; 2005.
6. Тарасова НГ, Уманская МВ. Видовой состав и эколого-географическая характеристика аль-

гофлоры планктона реки Уса (Самарская область). Фиторазнообразии Восточной Европы. 2021;15(4):115-35.

7. Уманская МВ, Быкова СВ, Горбунов МЮ, Краснова ЕС, Тарасова НГ. Трансформация одноклеточного планктона в системе река–залив–равнинное водохранилище в начальной фазе цианобактериального цветения. Известия СНЦ РАН. 2021;23(5):144-51.

Общий список литературы/References

1. Gollerbakh MM, Kosinskaya EK, Polyansky VI. Sinezelenye Vodorosli. Opredelitel Presnovodnykh Vodorosley SSSR T. 2 [Blue-Green Algae]. Key to Freshwater Algae of the USSR. Vol. 2. Mjscow.: Sovetskaya Nauka; 1953. (In Russ.)
2. Gorokhova OG. [Composition and structure of algoflora Usa river and its tributaries (Basin of the Kuibyshev reservoir)]. Izvestiya SNT RAN. 2016;18(5):122-30. (In Russ.)
3. Gorokhova OG. [Composition and structure of algoflora Usa river and its tributaries (Basin of the Kuibyshev reservoir)]. Samarskaya Luka:

- Problems of Regional and Global Ecology. 2019;28(1):27-39. (In Russ.)
4. Mordukhai-Boltovskoy FD, ed. Metodika Izucheniya Biogeotsenozov Vnutrennikh Vodoyomov. [Methodology for Studying the Biogeocenoses of Inland Water Bodies]. Moscow: Nauka; 1975. (In Russ.)
 5. Tarasova NG. [Composition, Seasonal Dynamics and Invasive Species of Phytoplankton of the Kuibyshev Reservoir]. PhD Theses. Togliatti: IEVB RAN; 2005. (In Russ.)
 6. Tarasova NG, Umanskaya MV. [Species composition and ecological and geographical characteristics of algoflora of plankton of the Usa river (Samara region)]. Fitoraznoobraziye Vostochnoy Yevropy. 2021;15(4):115-35. (In Russ.)
 7. Umanskaya MV, Bykova SV, Gorbunov MYu, Krasnova ES, Tarasova NG. [Unicellular plankton transformation in the river-bay-reservoir system in the initial phase of cyanobacterial bloom]. Izvestiya SNT RAN. 2021;23(5):144-51. (In Russ.)
 8. Abad D, Albaina A, Aguirre M, Laza-Martínez A, Uriarte I, Iriarte A, Vilatte F, Estonba A. Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? A comparative study with microscopy. Marine Biol. 2016;163:1-13.
 9. Albrecht M, Pröschold T, Schumann R. Identification of cyanobacteria in a Eetrophic coastal lagoon on the Southern Baltic Coast. Front Microbiol. 2017;8:923.
 10. Averina S, Polyakova E, Senatskaya E, Pinevich A. A new cyanobacterial genus *Altericista* and three species, *A. lacusladogae* sp. nov., *A. violacea* sp. nov., and *A. variichlora* sp. nov., described using a polyphasic approach. J Phycol. 2021;57(5):1517-29.
 11. Callieri C. Single cells and microcolonies of freshwater picocyanobacteria: a common ecology. J Limnol. 2010;69(2):257-77.
 12. Callieri C, Cronberg G, Stockner JG. Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. In: Whitton B. (eds). Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Dordrecht; 2012. P. 229-69.
 13. Dreher TW, Davis II EW, Mueller RS. Complete genomes derived by directly sequencing freshwater bloom populations emphasize the significance of the genus level ADA clade within the Nostocales. Harmful Algae. 2021;103:102005.
 14. Edgar R. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nat Methods. 2013;10(10):996-8.
 15. Engene N, Gerwick WH. Intra-genomic 16S rRNA gene heterogeneity in cyanobacterial genomes. Fottea. 2011;11(1):17-24.
 16. Engene N, Tronholm A, Paul VJ. Uncovering cryptic diversity of Lyngbya: the new tropical marine cyanobacterial genus *Dapis* (Oscillatoriales). J Phycol. 2018;54(4):435-46.
 17. Esenkulova S, Sutherland BJ, Tabata A, Haigh N, Pearce CM, Miller KM. Comparing metabarcoding and morphological approaches to identify phytoplankton taxa associated with harmful algal blooms. Facets. 2020; 5(1):784-811.
 18. Griese M, Lange C, Soppa J. Ploidy in cyanobacteria. FEMS Microbiol Lett. 2011;323:124-31.
 19. Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. ISME J. 2011;5(10):1571-79.
 20. Kolmonen E, Sivonen K, Rapala J, Haukka K. Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. Aquat Microbial Ecol. 2004;36(3):201-11.
 21. Komárek J. Cyanoprocaryota 3. Teil: Heterocytous genera. Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2013;Bd.19/3.
 22. Komárek J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. Eur J Phycol. 2016;51(3):346-53.
 23. Komárek J, Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. Algol Stud Arch Hydrobiologie. 1989;56(Suppl):247-345.
 24. Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprocaryota 1. Teil: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. 1999; Bd.19/1.
 25. Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprocaryota 2. Teil: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2005; Bd.19/2.
 26. Komárek J, Johansen JR, Šmarda J, Strunecký O. Phylogeny and taxonomy of Synechococcus-like cyanobacteria. Fottea. 2020;20(2):171-91.
 27. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol. 2018;35:1547-9.
 28. Lee E, Ryan UM, Monis P, McGregor GB, Bath A, Gordon C, Paparini A. Polyphasic identification of cyanobacterial isolates from Australia. Water Res. 2014;59:248-261.
 29. Li H, Alsanea A, Barber M, Goel R. High-throughput DNA sequencing reveals the dominance of pico- and other filamentous cyanobacteria in an urban freshwater Lake Sci Total Environ. 2019;661:465-480.
 30. Li X, Huo S, Xi B. Updating the resolution for 16S rRNA OTUs clustering reveals the cryptic cyanobacterial genus and species. Ecol Indic. 2020;117:106695.
 31. Li XC, Huo S, Zhang J, Ma C, Xiao Z, Zhang H, Xi B, Xia X. Metabarcoding reveals a more complex

- cyanobacterial community than morphological identification. *Ecol Indic.* 2019;107:105653.
32. MacKeigan PW, Garner RE, Monchamp MÈ, Walsh DA, Onana VE, Kraemer SA, Pick FR, Beisner BE, Agbeti MD, da Costa NB, Shapiro BJ, Gregory-Eaves I. Comparing microscopy and DNA metabarcoding techniques for identifying cyanobacteria assemblages across hundreds of lakes. *Harmful Algae.* 2022;113:102187.
 33. Paerl HW, Paul VJ. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 2012;46:1349-63.
 34. Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics.* 2012;28:1823-9.
 35. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl Acids Res.* 2013;41(D1):D590-6.
 36. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol.* 1979;111:1-61.
 37. Salazar VW, Tschoeke DA, Swings J, Cosenza CA, Mattoso M, Thompson CC, Thompson FL. A new genomic taxonomy system for the *Synechococcus* collective. *Environ Microbiol.* 2020;22(11):4557-70.
 38. Schirrmeyer BE, Dalquen DA, Anisimova M, Bagheri HC. Gene copy number variation and its significance in cyanobacterial phylogeny. *BMC Microbiol.* 2012;12:177.
 39. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today.* 2006;33:152-5.
 40. Strunecký O, Ivanova AP, Mareš J. An updated classification of cyano-bacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *J Phycol.* 2023;59:12-51.
 41. Suda S, Watanabe MM, Otsuka S, Mahakahant A, Yongmanitchai W, Nopartnaraporn N, Liu Y, Day JG. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1577-95.
 42. Tapolczai K, Keck F, Bouchez A, Rimet F, Kahlert M, Vasselon V. Diatom DNA metabarcoding for biomonitoring: strategies to avoid major taxonomical and bioinformatical biases limiting molecular indices capacities. *Front Ecol Evol.* 2019;7:409. 10.3389/fevo.2019.00409.
 43. Wilmotte A, Herdman M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Hoboken, NJ: Wiley, 2015. p. 1-9.
 44. Woodhouse JN, Kinsela AS, Collins RN, Bowling LC, Honeyman GL, Holliday JK, Neilan BA. Microbial communities reflect temporal changes in cyanobacterial composition in a shallow ephemeral freshwater lake. *ISME J.* 2016;10:1337-51.
 45. Zwart G., Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F, Han SK. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microbial Ecol.* 2002;28(2):141-55ных водорослей СССР. Т. 2. М.: Советская наука; 1953.

