

Bacterial diversity and metabolism in microbial consortium of non-axenic culture *Tychonema* sp. BBK16

Krasnopeev A.Yu.*, Tikhonova I.V., Podlesnaya G.V., Potapov S.A., Gladkikh A.S., Suslova M.Yu., Lipko I.A., Sorokovikova E.G., Belykh O.I.

Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. We performed high-throughput sequencing of microbial community with cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 and heterotrophic bacteria *in vitro*. Representatives of the phylum Pseudomonadota/Proteobacteria, the bacteria *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, and *Bosea* dominate and coexist with the cyanobacterium for a long period of cultivation. It was found that this cyanobacterium is an edicator of this community providing the microbiome with organic matter. Metabolic features of heterotrophic bacteria based on reconstructed genomes are presented. The main processes of carbon and nitrogen metabolism in the biofilm are carbohydrate and amino acid metabolism, as well as processes regulating the relationships between members of this consortium. *Hydrogenophaga* sp. and *Tychonema* sp. BBK16 show carbon autotrophy due to the Calvin–Benson–Bassham (CBB) cycle, while *Sphingomonas* sp. due to the glyoxylate pathway of metabolism. The biofilm also contains the anoxygenic photoheterotroph *Bosea* sp. using light energy to transform organic matter. *Aminobacter* sp. is an active degrader of complex organics, which possesses methylotrophy and supplies hydrogen for oxidation by *Hydrogenophaga* sp., *Paucibacter* sp., also supplies hydrogen for this community. *Sphingomonas*, *Tychonema* and *Paucibacter* release phosphate from organic compounds providing phosphorus to this consortium.

Keywords: cyanobacteria, heterotrophic bacteria, biofilm, functional genes, metabolism

1. Introduction

Interactions occurring between algae and bacteria represent a particular circulation of organic matter (Azam et al., 1983). Cyanobacteria, as primary producers, form a specific habitat environment by forming organic matter and synthesizing biologically active metabolites (Woodhouse et al., 2018). Heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria are more often species with flexible universal metabolism, most of the strains belong to Proteobacteria (Berg et al., 2009). High-throughput sequencing allows a detailed inventory of cyanobacteria-heterotrophic bacteria associations without cultivating (Shaw et al., 2020). For example, Nostoc macrocolony communities from lakes have been found to repeat partly a plankton-lake motif, but members of Shingomonadaceae, Rhodobacteriaceae, Comamonadaceae become distinctive (Aguilar et al., 2019). These bacteria are frequent companions of cyanobacteria in natural conditions (Chun et al., 2017; Park et al., 2021; Thorat et al., 2022). Metagenomic studies of the non-axenic cultures' microbiome of subpolar cyanobacteria showed the occurrence of

representatives of Proteobacteria and Bacteroidetes in the community and ruled out the possibility of external contamination confirming the co-evolution of cyanobacteria and their companions (Cornet et al., 2018). Non-axenic algal cultures are suitable model objects for studying interactions between algae and heterotrophic bacteria because they demonstrate *in situ* relationships. The presence of different bacteria in cyanobacterial cultures allows the study of their genomes using bioinformatics tools for nucleotide fragment separation (Tan et al., 2016).

The genome of the filamentous cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 isolated from benthic biofilms revealed its ecology and genomic characteristics (Tikhonova et al., 2022; Evseev et al., 2023). Analysis of DNA isolated from a non-axenic culture of cyanobacterium revealed heterotrophic bacteria inhabiting the mucous cover during autotrophic biofilm growth *in vitro*. The aim of this work is to study the bacteria-companions of *Tychonema* sp. BBK16 and the metabolic characterization of this microbial consortium based on DNA barcoding and metagenomics data.

*Corresponding author.

E-mail address: krasnopeev@lin.irk.ru (A.Yu. Krasnopeev)

Received: December 05, 2023; **Accepted:** December 17, 2023;

Available online: December 19, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2. Material and methods

Sample collection and DNA sequencing

Obtaining a non-axenic culture of cyanobacterium and isolation of DNA was previously described (Tikhonova et al., 2022). The strain was cultured in vitro for seven years on autotrophic Z-8 medium containing nitrate, sulfate, carbonate, and phosphate as nutrients. Illumina Miseq sequencing of the V3-V4 region of 16S rRNA gene was performed according to the manufacturer's instructions with primers 343F (CTCCTACGGRRSGCAG) and 806R (GGACTACNVVGGGTWTCTAAT) in Evrogen (Moscow). Shotgun sequencing was performed by different methods using the DNBSEQ-400 sequencer (MGI, China) by PCR-free protocol with enzymatic fragmentation (MGI, China) and using the Illumina MiSeq platform (Illumina, USA) by the paired-end reads in the case of MGI - 150 bp, in the case of Illumina - 300 bp. The quality of V3-V4 amplicon libraries and metagenomic sequencing results were assessed using the program MultiQC v. 1.12 (Ewels et al., 2016), and adapters were removed using the Trim Galore v. 0.6.5 program (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/, date last accessed: 12 December 2023). A phylogenetic tree was constructed using the BEAST v. 1.8.4 (Drummond and Rambaut, 2007). Raw data deposited PRJNA1042932 (two metagenomic sequencing pools), SRR11929492 (16S rRNA gene sequencing data).

DNA metabarcoding data processing

The DADA2 v. 1.16 package for the R programming language was used for further processing, which included filtering out non-target and chimeric sequences, and clustering into ASVs (Amplicon Sequence Variants) (Callahan et al., 2016; R Core Team, 2021). Nearest homologues were selected by BLASTn searches using the NCBI nr/nt reference sequence databases. ASVs and nearest homologues were aligned using the ClustalO algorithm (Sievers et al., 2011).

Shotgun data processing

Assembly of reads into contigs was performed using the SPAdes v. 3.15.4 (Prjibelski et al., 2020). Mapping of reads to the produced contigs was performed with BWA v. 0.7.17 and the Samtools v. 1.18 package (Heng and Durbin, 2009; Danecek et al., 2021). Metagenomic binning and genome isolation was performed using MetaBAT2 v. 2.15 (Kang et al., 2019). Completeness and contamination of the final MAGs were evaluated using CheckM2 v. 1.0.2 based on a machine learning algorithm (Chklovski et al., 2022).

Open reading frames (ORFs) in contigs were detected using Prodigal v. 2.6.3 (Hyatt et al., 2010). KEGG annotation and assignment of KO numbers to proteins were performed using the BlastKOALA service (Kanehisa et al., 2016) and semi-automatically using DIAMOND v. 2.1.8 (Buchfink et al., 2021) against the NCBI nr protein sequence database. Ribosomal RNA genes were isolated using Barrnap v. 0.9 (Seemann, 2013). Taxonomic annotation of contigs and MAGs was performed using the Kaiju service (Menzel et al., 2016) and manually improved using author scripts based on

metabolic annotation obtained previously.

The functional characteristics of microorganisms were established based on the presence of marker genes for metabolic processes in the genome, similar to the methodology described by Garner et al. (2023). Carbon autotrophy was established by the presence of genes in the CBB cycle - *rbcL*, *prkB*; glyoxylate assimilation pathway - *mct*; ammonia transport into the cell - *amt*, and its assimilation - *glnA*; transport of nitrite/nitrate - *nrtABC*, assimilation of nitrates/nitrites - *narB*, *nirA*, *nasABED*; denitrification genes - *narGHI*, *nirK*, *norB*, *nosZ*; urea transport - *urtABCDE* and its decomposition to ammonia - *ureABC*; carboxylation of urea - E6.3.4.6 urea carboxylase; ammonium production from glutamate - *asnB*; phosphonate transport *phnCDE*; phosphonate decomposition - *phnAB*; decomposition and modification of phosphonates - *phnJKLMXPWXY*; assimilation of phosphate from organic compounds - *phoD*; transport of inorganic phosphate - *pstBS*; hydrolytic enzymes for polysaccharides - *argH*, *glgX*, *susACD*; sulfate and thiosulphate transport system - *cysAPUW*; oxidation of sulfates and thiosulphates in periplasm - *soxABCDXZ*; degradation of aromatic compounds - *vanA*, *dmpB*, *xylE*; assimilation of carbon monoxide with the release of hydrogen - *coxMLS*, *cutML*; permeases for facilitated transport of oligopeptides and oligosaccharides - *oppABCDF*, *mppA*; methylamine utilisation (methylotrophy)- *gmaS*, *mgsABC*, *mgdABCD*; use of carbon monoxide - *coxMLS*, *cutML*; synthesis of bacteriochlorophylls - *bchMO*; light-gathering polypeptides, photosystem II - *pufML*.

3. Results and discussion

Phylogenetic diversity and bacterial genomes in a non-axenic culture *Tychonema* sp. *BBK16*

Sequencing of the V3-V4 amplicon library of 16S rRNA gene resulted in 62,028 paired-end reads. From this set, 21 ASVs were isolated, the annotation of which revealed representatives of three phyla: Cyanobacteria (66.1%), Pseudomonadota/Proteobacteria (33.7%), and Actinobacteriota (0.2%). The most represented genera are *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Pseudomonas*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, *Bosea*, *Methylophilus*, *Rhodopseudomonas*, *Ensifer*, *Tabrizicola*, *Acidovorax*, *Caulobacter*; minor genera are *Rhodococcus* and *Iamia* (Table 1).

Shotgun sequencing generated 18,442,914 paired-end reads; taxonomic annotation of which revealed representatives of three phyla: Cyanobacteria (50.2%), Proteobacteria (49.6%), and Actinobacteriota (0.2%). Metagenomic binning of the contigs obtained after assembly identified 12 bacterial genomes of different quality (Table 2). The most complete genomes according to CheckM2 completeness and contamination statistics (given in parentheses, %), were the following: *Tychonema* sp. *BBK16* (bin.4 — 99.15 / 2.42), *Tahibacter* sp. (bin.3 — 99.3 / 0.09), *Aminobacter* sp. (bin.8 — 97.44 / 1.83), *Paucibacter* sp. (bin.9 — 100 / 0.26), *Sphingomonas* sp. (bin.11 — 99.76 / 8.07). Also noteworthy is the high percentage of assembly of the *Devosia*, *Bosea*, and *Hydrogenophaga* genomes.

Table 1. Abundance of ASVs in the biofilm of *Tychonema* sp. BBK16 sample

ID	Phylum	Class	Genus	Count	Value, %
ASV001	Cyanobacteriota	Cyanobacteria	<i>Tychonema</i> CCAP 1459-11B	41016	66.12
ASV003	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>	10959	17.66
ASV005	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	5116	8.24
ASV012	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Paucibacter</i>	1041	1.67
ASV009	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	840	1.35
ASV016	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Aminobacter</i>	789	1.27
ASV017	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	669	1.08
ASV004	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Tahibacter</i>	635	1.02
ASV020	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	433	0.7
ASV037	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	147	0.24
ASV041	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Bosea</i>	81	0.13
ASV047	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	71	0.11
ASV049	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Methylophilus</i>	60	0.01
ASV050	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodopseudomonas</i>	58	0.094
ASV051	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Ensifer</i>	52	0.084
ASV056	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Tabrizicola</i>	36	0.058
ASV027	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	14	0.023
ASV093	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	3	0.005
ASV092	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Caulobacter</i>	3	0.005
ASV091	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	<i>Iamia</i>	3	0.005
ASV095	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	2	0.003

Table 2. Metagenome-assembled genomes isolated from the *Tychonema* sp. BBK16 biofilm sample. Bins with >50% completeness and <5% contamination are in bold.

bin ID	Compl. *	Cont.*	Contig N50	Genome Size	GC Content	Total CDS	Genus
bin.1	20.8	0.35	3434	1190380	0.63	1405	<i>Rhodococcus</i>
bin.2	7.19	0.01	149685	412532	0.6	443	<i>Aminobacter</i>
bin.3	99.3	0.09	214065	6110546	0.66	4716	<i>Tahibacter</i>
bin.4	99.15	2.42	108947	5876576	0.44	5150	<i>Tychonema</i>
bin.5	65.82	0.01	39311	2077122	0.69	1999	<i>Hydrogenophaga</i>
bin.6	84.19	2.56	14881	4250091	0.64	4320	<i>Devosia</i>
bin.8	97.44	1.83	134644	5591995	0.63	5427	<i>Aminobacter</i>
bin.9	100	0.26	214794	4356207	0.67	3973	<i>Paucibacter</i>
bin.10	84.96	3.7	10883	5032618	0.66	5129	<i>Bosea</i>
bin.11	99.76	8.07	90952	3846091	0.69	3710	<i>Sphingomonas</i>
bin.12	15.11	0.04	3530	797961	0.67	888	<i>Stenotrophomonas</i>

Note: * Compl. – Completeness, Cont. - Contamination

To assess the convergence of the targeting and metagenomic sequencing results, a phylogenetic tree was constructed based on the DNA alignment of the fragment 16S rRNA gene (Fig. 1). According to the BLASTn search, the tree also contains the nearest homologues. As shown in the figure, in most cases, it is possible to find a pair of sequences from ASVs and metagenomes belonging to the same genus/species that indicate sufficient sequencing depth for both methods.

Even when no 16S rRNA marker gene was detected in the metagenome, other coding sequences and genome fragments were annotated as taxa represented in the tree.

Metabolic functions of bacteria in the *Tychonema* sp. BBK16 biofilm

According to the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, a total of 2387 different functional orthologs (KO) were identified in the

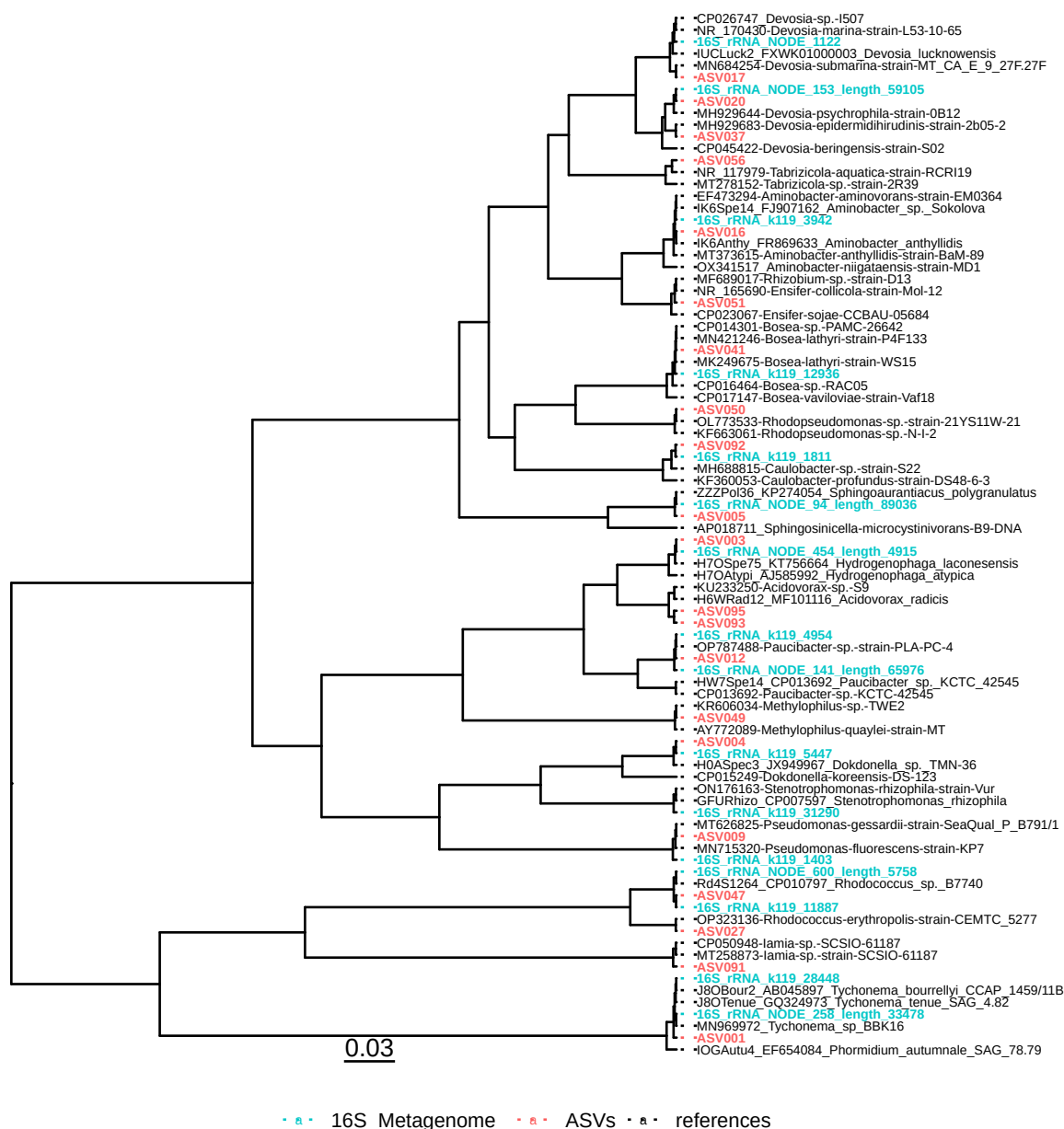


Fig.1. Phylogenetic tree based on DNA alignment of the fragment of the 16S rRNA gene. ASVs obtained from DNA-metabarcoding data are highlighted in red, fragments of 16S rRNA gene from the metagenome are in blue, and nearest neighbors by BLASTn-search are in black color

biofilm-consortium. We presented 8 bins to describe the bacterial functions (Fig.2). The analysis of the main pathways of carbon metabolism showed that the most significant participants in the biofilm community are the metabolism of carbohydrates and amino acids; a large part is represented by the categories of signaling and cellular processes, nucleotide and energy metabolism, membrane transport, and the metabolism of cofactors and vitamins. See Supplementary material (S1) for additional analysis - comparison of predicted functions of microorganisms and actual functional genes.

Functional annotation of the assembled genomes identified key metabolic markers of biofilm community members (Table 3). The ability to fix inorganic carbon was confirmed by the presence of the enzymes of the CBB cycle in the microorganisms *Tychonema* sp. BBK16 and *Hydrogenophaga* sp., although in the latter this process is facultative and occurs when there is a deficit of organic matter in the medium. The ability to use solar energy

is confirmed by the presence of bacteriochlorophyll, carotenoid synthesis genes, and photosystem II reaction center enzymes in the bacterium *Bosea* sp.

A complex cycle of biogenic elements – phosphorus, nitrogen, and sulfur – occurs in the biofilm. Thus, the source of phosphorus is phosphates, which in a closed ecosystem are produced by the activity of the enzyme alkaline phosphatase of the microorganisms *Tychonema*, *Paucibacter*, and *Sphingomonas*. Most bacteria have phosphonate transport systems. These organic phosphorus compounds are common in natural ecosystems and were once the first sources of phosphorus for ancient microorganisms (McGrath et al., 2013). Phosphonate transport systems can also serve as phosphate transporters (Stasi et al., 2019).

Traditionally, the relationship between autotroph and heterotrophic bacteria is considered as a metabolic symbiosis “carbon in exchange for nitrogen” implying that bacteria fix atmospheric nitrogen. Thus,

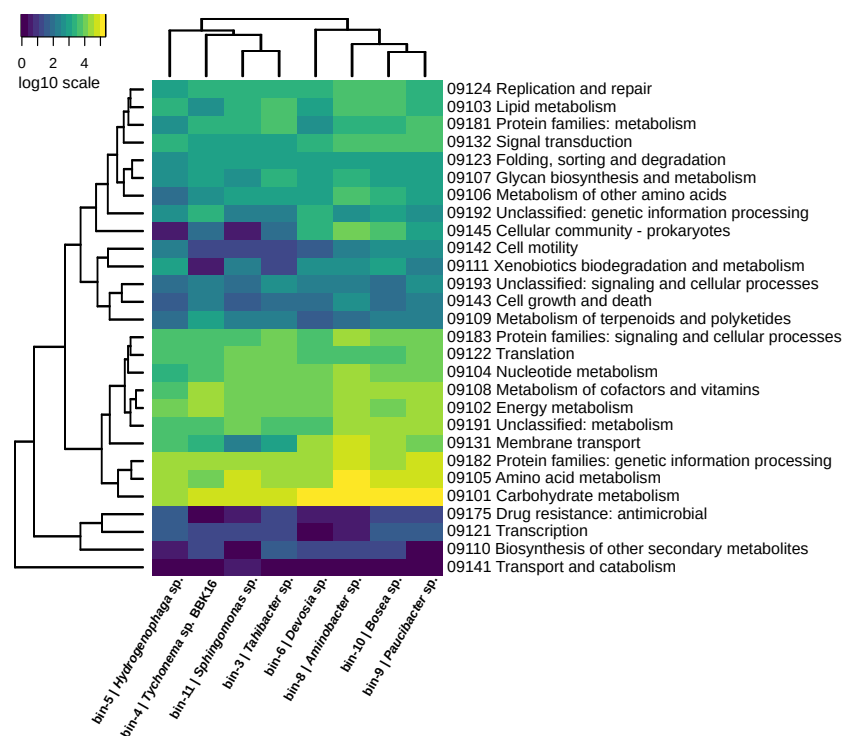


Fig.2. Abundance heatmap of different metabolic processes in the biofilm of *Tychonema* sp. BBK16

a microbial community represented by the filamentous cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* and strains of Actinobacteria and Proteobacteria, many of which were atmospheric nitrogen fixers, was isolated from arid soils (Nelson et al., 2021). In our case, nitrogen fixation was not detected, which was confirmed by the predictive method (PICRUSt2) and the absence of marker genes for the process in the genome (Supplementary materials, S2, S3). Genes responsible for denitrification (nitrogen removal) were identified in three members of a consortium related to Proteobacteria (*Aminobacter*, *Tahibacter*, and probably *Paucibacter*). According to genomic characteristics, the main sources of nitrogen for all members of the consortium may be ammonium, nitrate, nitrite, and urea (as a metabolite and as a decomposition product of dead biomass). Genes related to ammonium transport and ammonium assimilation enzymes were detected in all consortium members. Genes coding for urea transport and its degradation to ammonium were revealed in cyanobacteria and heterotrophic bacteria, except *Sphingomonas*, *Paucibacter*, and *Tahibacter*.

Thus, all metabolic processes are necessary to keep the whole community alive. The autotrophic cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16, as well as the facultative autotrophs *Hydrogenophaga* and *Sphingomonas*, forms organic matter for bacteria. However, it has genes for organic matter assimilation being a mixotroph (Evseev et al., 2023). Facultative autotrophy of hydrogen-oxidizing bacteria is an inducible process; they are successful organotrophs in the presence of simple organic matter (Zavarzin, 1972). Bacteria *Aminobacter*, *Tahibacter*, *Devosia*, and *Paucibacter* are able to consume polysaccharide substances, which are abundant in cyanobacterial biofilm. *Aminobacter*

has the most extensive metabolism being an active polysaccharide degrader, methylotroph, denitrifier, and, as well as *Paucibacter*, a supplier of hydrogen for the hydrogen-oxidizing bacteria. Hydrogen is also released during the anoxygenic photosynthesis of the bacterium *Bosea*. *Devosia* are able to inhabit places rich in organic compounds, such as wastewater and biofilms, due to transport proteins - permeases, which uptake short peptides of various amino acid compositions serving as a source of carbon and nitrogen (Talwar et al., 2020). During the phosphate depletion period, *Sphingomonas*, *Tychonema*, and *Paucibacter* additionally produce alkaline phosphatase to hydrolyze phosphate-containing organic matter. Cyanobacteria *Tychonema* sp. BBK16 is dependent on other bacteria because the system is closed and nitrate and nitrite cannot be provided from outside, while ammonium is released by the bacterial decomposition of nitrogen-containing polysaccharides and glycosides, proteins and amino acids.

It was previously suggested that the microbiome associated with cyanobacteria represents an “ecological footprint” of the habitat (Cornet et al., 2018). We assume that the microbial consortium studied with *Tychonema* is represented by typical inhabitants of substrates rich in organic and has all necessary for this purpose: enzymes of denitrification, methylotrophy, hydrolysis of aromatic compounds and complex polysaccharides, as well as organic compounds of nitrogen, phosphorus, and sulfur. Some of the genera have been described such as *Hydrogenophaga*, *Methylophilus* and *Pseudomonas* are found in the cultivated diatoms of Lake Baikal (Mikhailov et al., 2018). In the article also showed that the Nocardioideae are satellites of Baikal cultivated diatom algae.

Table 3. Microbial processes in the biofilm of *Tychonema* sp. BBK16

Bacterium	Metabolism	Confirmative genes
<i>Tychonema</i> sp. BBK16	Autotroph. Uses nitrate, nitrite, ammonia and urea. Assimilates phosphates of inorganic and organic compounds, synthesizes alkaline phosphatase. Utilizes sulfates and thiosulphates.	rbcL, prkB, amt, nrtA, narB, nirA, glnA, ureABC, urtABCE, pstB, pstS, phoD, cysU, cysW
<i>Tahibacter</i> sp.	Organotroph. Uses phosphates, phosphonates, and ammonia, hydrolyses glycans. Denitrification.	argH, amt, phnA, pstBS, nirK, norB
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	Chemoorganotroph/chemolithoautotroph. Oxidises hydrogen as a source of energy and CO ₂ or simple organic matter as a carbon source. Preferred nitrogen source is urea, glutamate. Able to degrade oligosaccharides. Transports nitrate and phosphate. Participates in thiosulfate oxidation by the periplasmic SOX enzyme complex.	rbcL, prkB, soxABCDXZ, urtABCE, ureABC, urea carboxylase, amt, asnB, cysU, cysW
<i>Devosia</i> sp.	Organotroph. Utilizes organic and inorganic sources of nitrogen and phosphorus, detoxifies urea by decomposition or incorporation into organic compounds. Contains a large number of transporters of oligopeptides and simple organic matter, modifies aromatic compounds. Possesses a powerful chemotaxis system.	glgX, nasC, nasABED, nrtABC, oppABCDF, mppA, phnCIJMP, pstBS, urtAE, ureaABC, urea carboxylase, vanA
<i>Aminobacter</i> sp.	Organotroph. Mobile due to pili, hydrolyses polysaccharides, catechols, glycogen, urea, assimilates nitrate, phosphate, sulfate, thiosulphate, denitrifier. Oxidizes carbon monoxide to carbon dioxide. Methylotroph involved in the degradation of methylamines (serine pathway).	amt, argH, glgX, dmpB, xylE, nasABED, nosZ, nrtABC, pstBS, phnACDIJKLMPWY; soxABG, cysU, cysW, urtABCE, ureABC, gmaS, mgsABC, mgdABCD, coxMLS, cutML
<i>Paucibacter</i> sp.	Aerobic heterotroph capable of hydrolysing complex polysaccharides, a companion bacterium to cyanobacteria in nature and cultures, utilizes nitrate, phosphate, sulfate, thiosulphate. Possible denitrification.	amt, argH, narGHI, nasABED, nrtABC, phoD, pstBS, phnDEX, soxBCDXZ, cysU, cysW, susA, coxMLS, cutML
<i>Bosea</i> sp.	Anoxygenic aerobic phototroph, contains bacteriochlorophyll a and photosystem II. Assimilates nitrate and phosphate.	amt, glgX, argH, bchM, chlM, bchO, bchX,Y,Z, pufM,L, nrtAC, nasDF, urtABC, pstBS, phnCIJKMPXY
<i>Sphingomonas</i> sp.	Universal organotroph capable of carbon autotrophy, fixes carbon dioxide using an alternative carbon pathway, the glyoxylate cycle. Hydrolyses polysaccharides. Assimilates phosphates and phosphonates, produces alkaline phosphatase for phosphorus production from organic compounds.	amt, argH, mct, phoD, pstBS

4. Conclusion

We have demonstrated that Proteobacteria are the main symbionts of the filamentous cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 *in vitro*. The dominant genera were *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, and *Tahibacter*. The studied biofilm community showed processes of oxygenic and anoxygenic photosynthesis (phototrophy and photoheterotrophy), facultative carbon dioxide fixation involving the glyoxylate pathway and SBB, methylotrophy, degradation of polysaccharides and aromatic compounds to oligosaccharides, organic acids, aldehydes, peptides, and monosaccharides, and organic polymers of nitrogen and phosphorus.

Acknowledgments

The authors are grateful to Y.S. Bukin, O.N. Pavlova, S.V. Bukin, I.S. Mikhailov, Y.R. Zakharova for their valuable discussions and help. Metagenomic sequencing using DNA nanoball sequencing (MGI)

technology was supported by Helicon Company (Moscow). The research is funded by State Project 0279-2021-0015, “Viral and bacterial communities as the basis for the stable functioning of freshwater ecosystems...”.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interests.

References

- Aguilar P., Dorador C., Vila I. et al. 2019. Bacterial Communities associated With Spherical Nostoc Macrocolonies. *Frontiers in Microbiology* 10: 483. DOI:[10.3389/fmicb.2019.00483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00483)
- Azam F., Fenchel T., Field J. et al. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology – Progress Series* 10: 257-263. DOI:[10.3354/meps010257](https://doi.org/10.3354/meps010257)
- Berg K., Lyra C., Sivonen K. et al. 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME Journal* 3:314–325. DOI:[10.1038/ismej.2008.110](https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110)

- Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods* 18: 366–368. DOI:[10.1038/s41592-021-01101-x](https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x)
- Callahan B., McMurdie P., Rosen M. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583. DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)
- Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2022. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20:1203–1212. DOI: [10.1101/2022.07.11.499243](https://doi.org/10.1101/2022.07.11.499243)
- Chun S.J., Cui Y., Ko S.R. et al. 2017. *Acidovorax lacteus* sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* sp. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1199–1205. DOI: [10.1007/s10482-017-0892-9](https://doi.org/10.1007/s10482-017-0892-9)
- Cornet L., Bertrand A., Hanikenne M. et al. 2018. Metagenomic assembly of new subpolar Cyanobacteria and their associated microbiome from non-axenic cultures. *Microbial Genomics* 4:e000212. 1. DOI: [10.1099/mgen.0.000212](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000212)
- Danecek P., Bonfield J., Liddle J. et al. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 10:1-4. DOI:[10.1093/gigascience/giab008](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008)
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214. DOI: [10.1186/1471-2148-7-214](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214)
- Evseev P., Tikhonova I., Krasnopeev A. et al. 2023. *Tychonema* sp. BBK16 characterisation: lifestyle, phylogeny and related phages. *Viruses* 15: 442. DOI:[10.3390/v15020442](https://doi.org/10.3390/v15020442)
- Ewels Ph., Magnusson M., Lundin S. et al. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32:3047–3048. DOI:[10.1093/bioinformatics/btw354](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354)
- Garner R.E., Kraemer S.A., Onana V.E. et al. 2023. A genome catalogue of lake bacterial diversity and its drivers at continental scale. *Nature Microbiology* 8:1920–1934. DOI:[10.1038/s41564-023-01435-6](https://doi.org/10.1038/s41564-023-01435-6)
- Heng L., Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)
- Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F. et al. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Molecular Biology* 428(4): 726-731. DOI:[10.1016/j.jmb.2015.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006)
- Kang D.D., Li F., Kirton E. et al. 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 26:7:e7359. DOI:[10.7717/peerj.7359](https://doi.org/10.7717/peerj.7359)
- McGrath J., Chin J., Quinn J. 2013. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Microbiology* 11:412–419. DOI:[10.1038/nrmicro3011](https://doi.org/10.1038/nrmicro3011)
- Menzel P., Ng K., Krogh A. 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications* 7:11257. DOI:[10.1038/ncomms11257](https://doi.org/10.1038/ncomms11257)
- Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Volokitina N.A. et al. 2018. Bacteria associated with planktonic diatoms from Lake Baikal. *Acta Biologica Sibirica*, 4(4):89-94. DOI: [10.14258/abs.v4.i4.4880](https://doi.org/10.14258/abs.v4.i4.4880)
- Nelson C., Giraldo-Silva A., Garcia-Pichel F. 2021. A symbiotic nutrient exchange within the cyanosphere microbiome of the biocrust cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *ISME Journal* 15: 282–292. DOI:[10.1038/s41396-020-00781-1](https://doi.org/10.1038/s41396-020-00781-1)
- Park M., Kim M., Park T. 2021. Effect of cryopreservation on the bacterial community structure of filamentous cyanobacteria *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Cryobiology* 98:87–95. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.003)
- Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current protocols in bioinformatics* 70(1): 102. DOI:[10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Seemann T. 2013. Barrnap 0.9: rapid ribosomal RNA prediction.
- Shaw C., Brooke C., Hawley E. et al. 2020. Phototrophic co-cultures from extreme environments: community structure and potential value for fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology* 11: 572131. DOI:[10.3389/fmicb.2020.572131](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572131)
- Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539. DOI: [10.1038/msb.2011.75](https://doi.org/10.1038/msb.2011.75)
- Stasi R., Neves H.I., Spira B. 2019. Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology* 19:79. DOI:[10.1186/s12866-019-1445-3](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1445-3)
- Talwar C., Nagar S., Kumar R. et al. 2020. Defining the environmental adaptations of genus *Devosia*: insights into its expansive short peptide transport system and positively selected genes. *Scientific Reports* 10: 1151. DOI:[10.1038/s41598-020-58163-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58163-8)
- Tan B.F., Te S.H., Boo C.Y. et al. 2016. Insights from the draft genome of the subsection V (Stigonematales) cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. Strain MRB220 associated with 2-MIB production. *Stand in Genomic Science* 11: 58. DOI:[10.1186/s40793-016-0175-5](https://doi.org/10.1186/s40793-016-0175-5)
- Thorat V., Tiwarekar B., Kirdat K. et al. 2022. *Hydrogenophaga crocea* sp. nov. associated with cyanobacterial mat isolated from farmland mud. *Archives of Microbiology* 204: 265. DOI:[10.1007/s00203-022-02865-2](https://doi.org/10.1007/s00203-022-02865-2)
- Tikhonova I.V., Kuzmin A.V., Sorokovikova E.G. et al. 2022. Microcystin-producing cyanobacteria *Tychonema* sp. from Biofilms of Lake Baikal. *Chemistry for Sustainable Development*. 30: 415-423. DOI: [10.15372/CSD2022399](https://doi.org/10.15372/CSD2022399)
- Woodhouse J.N., Ziegler J., Grossart H.-P. et al. 2018. Cyanobacterial community composition and bacteria–bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 9:777. DOI:[10.3389/fmicb.2018.00777](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777)
- Zavarzin G.A. 1972. Hydrogen bacteria. In: *Lithotrophic microorganisms*. Moscow. pp. 54-99. (in Russian)

Разнообразие бактерий и путей их метаболизма в неаксеничной культуре *Tychonema* sp. BVK16

Краснопеев А.Ю., Тихонова И.В., Подлесная Г.В., Потапов С.А., Гладких А.С., Сулова М.Ю., Липко И.А., Сороковикова Е.Г., Белых О.И.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Проведено высокопроизводительное секвенирование микробного консорциума, образованного культивируемой цианобактерией *Tychonema* sp. BVK16 и гетеротрофными бактериями. Представители филы Pseudomonadota/Proteobacteria – бактерии родов *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, *Bosea* – доминируют и сосуществуют с цианобактерией на протяжении длительного периода культивирования. Цианобактерия является эдификатором этого сообщества, обеспечивая весь микробиом органическим веществом. Приведены метаболические особенности бактерий, исходя из восстановленных геномов. Главными процессами метаболизма углерода и азота в биопленке являются метаболизм углеводов и аминокислот, а также процессы регуляции взаимоотношений между участниками консорциума. Углеродной автотрофией обладают *Tychonema* sp. BVK16 и *Hydrogenophaga* sp. за счет цикла Кальвина – Бенсона – Бассама (КББ) и *Sphingomonas* sp. за счет глиоксилатного пути метаболизма. Также в биопленке присутствует аноксигенный фотогетеротроф *Bosea* sp., который использует энергию света для преобразования органических веществ. Метилотрофией обладает активный деструктор сложной органики *Aminobacter* sp., который поставляет водород для окисления бактериями *Hydrogenophaga* sp. Также водород выделяется бактерией *Paucibacter* sp. Микроорганизмы *Tychonema*, *Sphingomonas*, *Paucibacter* осуществляют высвобождение фосфатов из органических соединений, обеспечивая фосфором весь консорциум.

Ключевые слова: цианобактерия, бактерии, биопленки, функциональные гены, метаболизм

1. Введение

Взаимодействия, происходящие между водорослями и бактериями представляют собой особый круговорот органического вещества (Azam et al., 1983). Цианобактерии, как первичные продуценты, создают специфическую среду местообитания, образуя органические вещества и синтезируя биологически активные метаболиты (Woodhouse et al., 2018). Ассоциированные с цианобактериями гетеротрофные бактерии чаще являются культивируемыми видами с пластичным универсальным метаболизмом, большая часть штаммов принадлежит Proteobacteria (Berg et al., 2009). Высокопроизводительное секвенирование дает возможность провести детальную инвентаризацию ассоциаций цианобактерий с гетеротрофами без получения штаммов бактерий (Shaw et al., 2020). Например, выявлено, что сообщества макроколоний цианобактерии *Nostoc* из озерной прибрежной зоны в целом похожи на планктонные, но в них выше представ-

ленность бактерий семейств Shingomonadaceae, Rhodobacteriaceae, Comamonadaceae (Aguilar et al., 2019). Эти бактерии частые спутники цветений цианобактерий в естественных условиях, а также в неаксеничных культурах (Chun et al., 2017; Park et al., 2021; Thorat et al., 2022). Метагеномные исследования состава микробиома неаксеничных культур полярных цианобактерий показали преобладание Proteobacteria и Bacteroidetes в составе сообщества, предполагая совместную эволюцию цианобактерий и их спутников (Cornet et al., 2018). Неаксеничные культуры водорослей являются модельными объектами для изучения взаимодействий водоросли и гетеротрофных бактерий, поскольку демонстрируют взаимоотношения *in situ*. Присутствие различных бактерий в культурах цианобактерий позволяет исследовать их геномы благодаря биоинформатическим инструментам разделения фрагментов нуклеотидных последовательностей и генов (Tan et al., 2016).

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: krasnopeev@lin.irk.ru (А.Ю. Краснопеев)

Поступила: 05 декабря 2023; **Принята:** 17 декабря 2023;
Опубликована online: 19 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Ранее при анализе генома нитчатой цианобактерии *Tychoneta* sp. BVK16, выделенной из бентосных биопленок оз. Байкал, показаны ее экологические и геномные особенности (Tikhonova et al., 2022; Evseev et al., 2023). При анализе ДНК неаксеничной культуры *Tychoneta* sp. выявлены многочисленные последовательности гетеротрофных бактерий. Целью работы является изучение бактерий-спутников *Tychoneta* sp. BVK16 и метаболическая характеристика этого микробного консорциума на основе данных ДНК-штрихкодирования и метагеномики.

2. Материалы и методы

Секвенирование ДНК культуры

Получение неаксеничной культуры цианобактерии и выделение ДНК описано ранее (Tikhonova et al., 2022). Штамм *Tychoneta* sp. BVK16 культивируется на автотрофной среде Z-8, содержащей нитраты, сульфаты, карбонаты и фосфаты в качестве биогенов, в течение семи лет. Секвенирование участка V3-V4 16S рРНК гена проведено по инструкции производителя с праймерами 343F (CTCCTACGGRRSGCAG) и 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) в компании Евроген (Москва) на платформе Illumina Miseq. Шотган секвенирование проведено разными методами – с использованием секвенатора DNBSEQ-400 (MGI, Китай) по протоколу без ПЦР с ферментативной фрагментацией (MGI, Китай) и с использованием платформы Illumina MiSeq (Illumina, USA) методом парно-концевых прочтений (paired-end reads). Длина полученных фрагментов в случае MGI составила 150 п.н., в случае Illumina – 300 п.н. Оценку качества библиотек V3-V4 ампликонов и результатов метагеномного секвенирования проводили с помощью программы MultiQC v. 1.12 (Ewels et al., 2016), адаптеры удалены с помощью программы Trim Galore v. 0.6.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/, дата последнего доступа: 12 декабря 2023 г.). Филогенетическое дерево реконструировано с использованием BEAST v. 1.8.4 (Drummond and Rambaut, 2007). Сырые данные депонированы в Genbank под номерами доступа PRJNA1042932 (два пула метагеномного секвенирования) и SRR11929492 (данные секвенирования ампликонов участка V3-V4 16S rRNA гена).

Анализ фрагментов 16S рРНК гена

Пакет DADA2 v. 1.16 для языка программирования R использован для дальнейшей обработки, включающей в себя фильтрацию нецелевых и химерных последовательностей, а также кластеризацию последовательностей в ASVs (Exact Sequence Variants) (Callahan et al., 2016; R Core Team, 2021). Ближайшие гомологи выбраны путем BLASTn-поиска по базам референсных последовательностей NCBI nr/nt. ASVs и ближайшие гомологи выровнены с помощью алгоритма ClustalO (Sievers et al., 2011).

Обработка результатов шотган секвенирования

Сборку ридов в контиги проводили с использованием SPAdes v. 3.15.4 (Prjibelski et al., 2020).

Картирование ридов на полученные контиги выполнено в BWA v. 0.7.17 и пакетом Samtools v. 1.18 (Heng and Durbin, 2009; Danecsek et al., 2021). Метагеномный биннинг и выделение геномов проведены с помощью MetaBAT2 v. 2.15 (Kang et al., 2019). Вычитанность и контаминация полученных геномов оценены с использованием CheckM2 v. 1.0.2 на основе алгоритма машинного обучения (Chklovski et al., 2022).

Открытые рамки считывания (ORFs) в контигах обнаружены с помощью Prodigal v. 2.6.3 (Hyatt et al., 2010). Аннотация по KEGG и присвоение КО номеров белкам выполнены с помощью сервиса BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016) и в полуавтоматическом режиме с помощью DIAMOND 2.1.8 (Buchfink et al., 2021) против базы белковых последовательностей NCBI nr. Гены рибосомных РНК выделены с использованием Barrnap 0.9 (Seemann, 2013). Таксономическая аннотация контигов и геномов выполнена с помощью сервиса Kaiju (Menzel et al., 2016) и уточнена вручную с помощью авторских скриптов на основе метаболической аннотации.

Функциональные особенности микроорганизмов установлены на основании присутствия в геноме маркерных генов метаболических процессов в соответствии с методикой, описанной Гарнером и др. (2023). Углеродная автотрофия устанавливалась по присутствию генов цикла КББ – *rbcL*, *prkB*; путь ассимиляции глиоксилата – *mct*; транспорт аммония в клетку – *amt*, и его ассимиляция – *glnA*; транспорт нитритов/нитратов – *nr1ABC*, ассимиляция нитратов/нитритов – *narB*, *nirA*, *nasABED*; денитрификация – *narGHI*, *nirK*, *norB*, *nosZ*; транспорт мочевины – *urtABCDEF* и её разложение до аммония – *ureABC*; карбоксилирование мочевины – карбоксилаза мочевины *E6.3.4.6*; получение аммония из глутамата – *aspB*; транспорт фосфонатов – *phnCDE*; разложение фосфонатов – *phnAB*; разложение и модификация фосфонатов – *phnIJKLMNOPWXY*; усвоение фосфата из органических соединений – *phoD*; транспорт неорганического фосфата – *pstBS*; гидролитические ферменты для полисахаридов – *argH*, *glgX*, *susACD*; транспортная система сульфатов и тиосульфатов – *cysAPUW*; окисление сульфатов и тиосульфатов в периплазме – *soxABCDXZ*; деградация ароматических соединений – *vanA*, *dmpB*, *xyIE*; усвоение монооксида углерода с выделением водорода – *soxMLS*, *cutML*; пермеазы для облегченного транспорта олигопептидов и олигосахаров – *oppABCDF*, *mppA*; утилизация метиламинов (метилотрофия) – *gmaS*, *mgsABC*, *mgdABCD*; использование монооксида углерода – *soxMLS*, *cutML*; синтез бактериохлорофиллов – *bchMO*; светособирающие полипептиды фотосистемы II – *pufML*.

3. Результаты и обсуждение

Филогенетическое разнообразие бактерий и их геномов в неаксеничной культуре *Tychoneta* sp. BVK16

В результате секвенирования библиотеки ампликонов V3-V4 16S рРНК гена было получено

62 028 парно-концевых ридов. Из этого набора выделено 21 ASV, при аннотации которых обнаружены представители трех филумов: Cyanobacteria (66,1%), Pseudomonadota/Proteobacteria (33,7%) и Actinobacteriota (0,2%). Наиболее представленные рода – *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Pseudomonas*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, *Bosea*, *Methylophilus*, *Rhodopseudomonas*, *Ensifer*, *Tabrizicola*, *Acidovorax*, *Caulobacter*, минорные – *Rhodococcus* и *Iamia* (Таблица 1).

В результате секвенирования тотальной ДНК методом дробовика было получено 18 4421 914 парно-концевых ридов, при таксономической аннотации которых обнаружены представители трех филумов: Cyanobacteria (50,2%), Proteobacteria (49,6%) и Actinobacteriota (0,2%). В ходе метагеномного биннинга полученных после сборки контигов было выделено 12 бактериальных геномов разного качества (Таблица 2). Наиболее полными по показателям вычитанности и контаминации, согласно

Таблица 1. Представленность последовательностей (ASVs) фрагментов 16S рРНК гена бактерий в биопленке *Tychonema* sp. ВВК16

Номер	Филум	Класс	Род	Количество ридов	Доля, %
ASV001	Cyanobacteriota	Cyanobacteria	<i>Tychonema</i>	41016	66,125
ASV003	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>	10959	17,668
ASV005	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	5116	8,248
ASV012	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Paucibacter</i>	1041	1,678
ASV009	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	840	1,354
ASV016	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Aminobacter</i>	789	1,272
ASV017	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	669	1,079
ASV004	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Tahibacter</i>	635	1,024
ASV020	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	433	0,698
ASV037	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	147	0,237
ASV041	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Bosea</i>	81	0,131
ASV047	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	71	0,114
ASV049	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Methylophilus</i>	60	0,097
ASV050	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodopseudomonas</i>	58	0,094
ASV051	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Ensifer</i>	52	0,084
ASV056	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Tabrizicola</i>	36	0,058
ASV027	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	14	0,023
ASV093	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	3	0,005
ASV092	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Caulobacter</i>	3	0,005
ASV091	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	<i>Iamia</i>	3	0,005
ASV095	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	2	0,003

Таблица 2. Характеристика геномов, восстановленных из метагеномных данных секвенирования неаксеничной культуры *Tychonema* sp. ВВК16. Жирным показаны геномы имеющие более 90% вычитанности и менее 5% контаминации.

Тег генома	Вычитанность, %	Контаминация, %	Статистика N50	Размер генома, пн	Доля GC-пар	Число рамок считывания	Род
bin.1	20,8	0,35	3434	1190380	0,63	1405	<i>Rhodococcus</i>
bin.2	7,19	0,01	149685	412532	0,6	443	<i>Aminobacter</i>
bin.3	99,3	0,09	214065	6110546	0,66	4716	<i>Tahibacter</i>
bin.4	99,15	2,42	108947	5876576	0,44	5150	<i>Tychonema</i>
bin.5	65,82	0,01	39311	2077122	0,69	1999	<i>Hydrogenophaga</i>
bin.6	84,19	2,56	14881	4250091	0,64	4320	<i>Devosia</i>
bin.8	97,44	1,83	134644	5591995	0,63	5427	<i>Aminobacter</i>
bin.9	100	0,26	214794	4356207	0,67	3973	<i>Paucibacter</i>
bin.10	84,96	3,7	10883	5032618	0,66	5129	<i>Bosea</i>
bin.11	99,76	8,07	90952	3846091	0,69	3710	<i>Sphingomonas</i>
bin.12	15,11	0,04	3530	797961	0,67	888	<i>Stenotrophomonas</i>

CheckM2 статистике (дано в скобках), были геномы: *Tychonema* sp. BVK16 (bin.4 — 99.15 / 2.42), *Tahibacter* sp. (bin.3 — 99.3 / 0.09), *Aminobacter* sp. (bin.8 — 97.44 / 1.83), *Paucibacter* sp. (bin.9 — 100 / 0.26), *Sphingomonas* sp. (bin.11 — 99.76 / 8.07). Также следует отметить высокий процент сборки геномов *Devosia*, *Bosea* и *Hydrogenophaga*.

Для оценки сходимости результатов таргетного и метагеномного секвенирования было построено филогенетическое дерево, основанное на выравнивании последовательностей 16S рРНК гена (Рис. 1). В древо также включены ближайшие гомологи согласно BLASTn-поиску. Как показано на рисунке 1, в большинстве случаев удаётся найти пару последовательностей из ASVs и метагенома, принадлежащих одному роду/виду, что говорит о достаточной глубине секвенирования для обоих методов. Даже в случае, если в метагеноме не обнаруживалось маркерного гена 16S рРНК, другие

кодирующие последовательности и фрагменты геномов были аннотированы как представленные на древе таксоны.

Метаболические функции бактериальной составляющей биопленки *Tychonema* sp. BVK16

Суммарно в биопленке-консорциуме выявлено 2387 различных функциональных ортологов (KO) по базе данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Для описания функций бактерий мы представили 8 бинов (Рис. 2). Анализ основных путей метаболизма углерода выявил акцент основных участников сообщества биопленки на метаболизме углеводов и аминокислот, большую долю представляют категории сигнальных и клеточных процессов, нуклеотидного, энергетического метаболизма, транспорта веществ через мембрану, метаболизма кофакторов и витаминов. Дополнительный анализ – сравнение предсказанных функций микроорганизмов и реально

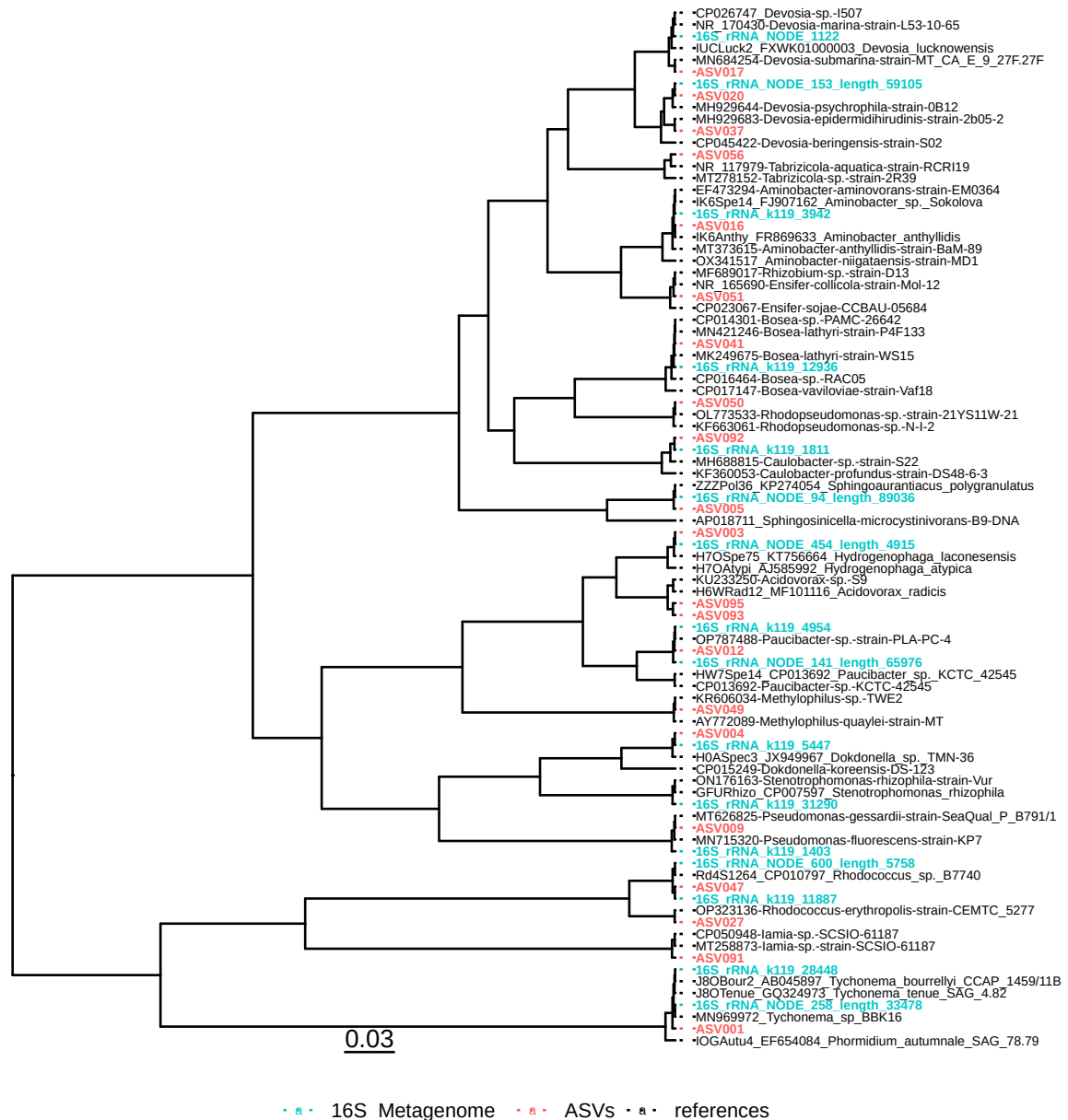


Рис.1. Ультраматрическое филогенетическое древо, основанное на выравнивании ДНК фрагмента 16S рРНК гена. Красным выделены ASV последовательности, синим – фрагменты гена 16S рРНК из метагенома, черным – ближайшие соседи по данным BLASTn-поиска

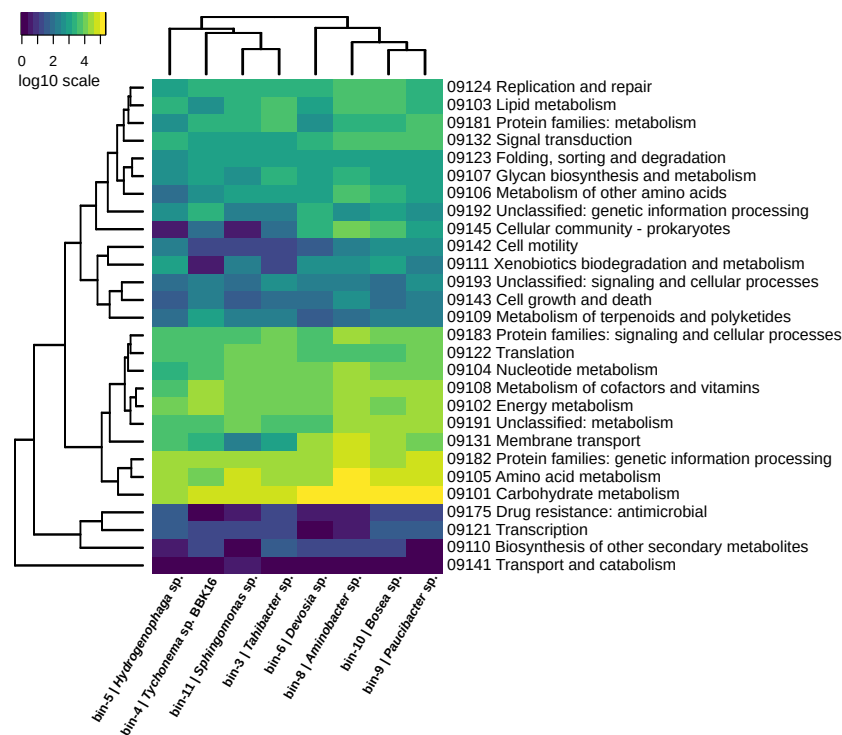


Рис.2. Тепловая карта представленности метаболических путей по базе данных KEGG в метагеноме *Tychonema* sp. BVK16. Цветом обозначено количество генов, аннотированных в каждом из геномов.

присутствующих функциональных генов приведен в Дополнительных Материалах (S1).

При функциональной аннотации собранных геномов выделены белки основных метаболических путей в сообществе биопленки (Таблица 3). Способность к фиксации неорганического углерода подтверждается присутствием ферментов цикла Кальвина – Бенсона – Бассама у микроорганизмов *Tychonema* sp. BVK16 и *Hydrogenophaga* sp., однако для последней этот процесс является факультативным и реализуется при дефиците органических веществ в среде. Способность бактерии *Bosea* sp. использовать энергию солнечного света подтверждается присутствием генов синтеза бактериохлорофилла, каротиноидов, а также ферментов реакционного центра фотосистемы II.

В биопленке происходят процессы образования и разложения соединений биогенных элементов – фосфора, азота и серы. Так, источником фосфора являются фосфаты, которые в замкнутой экосистеме поступают за счет активности щелочной фосфатазы микроорганизмов *Tychonema*, *Paucibacter*, *Spingomonas*. У большинства бактерий найдены транспортные системы для фосфонатов. Эти органические соединения фосфора часто присутствуют в природных экосистемах и когда-то были первыми источниками фосфора для древних микроорганизмов (McGrath et al., 2013). Показано, что фосфонатные транспортные системы могут служить переносчиками фосфатов (Stasi et al., 2019).

Традиционно взаимоотношения автотрофа и гетеротрофных бактерий рассматриваются как метаболический симбиоз «углерод в обмен на азот», подразумевая, что бактерии фиксируют атмос-

ферный азот. Такое сообщество микроорганизмов выделено из почв пустынь и представлено нитчатой цианобактерией *Microcoleus vaginatus* и штаммами Actinobacteria и Proteobacteria, многие из которых являлись фиксаторами атмосферного азота (Nelson et al., 2021). В нашем случае фиксация азота не обнаружена, что подтверждено предиктивным методом (PICRUSt2) и отсутствием в геноме маркерных генов процесса (Дополнительные материалы, S2, S3). Гены, отвечающие за денитрификацию (удаление азота), выявлены у родов *Tahibacter*, *Aminobacter* и *Paucibacter* (Proteobacteria). По геномным характеристикам, основными источниками азота для всех участников консорциума могут являться аммоний, нитраты, нитриты и мочевины (как метаболит и как продукт разложения отмершей биомассы). Гены, связанные с транспортом аммония и ферментами его ассимиляции, выявлены у всех членов консорциума. Гены, кодирующие транспорт мочевины и ее разложение до аммония выявлены у цианобактерии и гетеротрофных бактерий, кроме *Spingomonas*, *Paucibacter* и *Tahibacter*.

Таким образом, все метаболические процессы необходимы для поддержания жизни всего сообщества. Автотроф цианобактерия *Tychonema* sp. BVK16 образует органическое вещество для бактерий, наряду с факультативными автотрофами *Hydrogenophaga* и *Spingomonas*. Однако одновременно она имеет гены для усвоения органических веществ, являясь миксотрофом (Evseev et al., 2023). Факультативная автотрофия водородных бактерий является индуцируемым процессом, они являются успешными органотрофами при наличии простых органических веществ (Заварзин, 1972). Бактерии

Таблица 3. Микробные процессы в биопленке *Tychonema* sp. ВВК16

Род	Особенности метаболизма	Подтверждающие гены
<i>Tychonema</i> sp. ВВК16	Автотроф. Использует нитраты, нитриты, аммоний и мочевины. Усваивает фосфаты неорганических и органических соединений, синтезирует щелочную фосфатазу. Ассимилирует сульфаты и тиосульфаты.	rbcL, prkB, amt, nrtA, narB, nirA, glnA, ureABC, urtABCE, pstB, pstS, phoD, cysU, cysW
<i>Tahibacter</i> sp.	Органотроф, использующий фосфаты, фосфонаты, аммоний, гидролизует гликаны. Денитрификатор	argH, amt, phnA, pstBS, nirK, norB
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	Хемоорганотроф/хемолитоавтотроф, окисляет водород в качестве источника энергии и CO ₂ или простые органические вещества в качестве источника углерода. Предпочтительный источник азота – мочевина, глутамат. Способна к деградации олигосахаридов. Транспортирует нитраты и фосфаты. Участвует в окислении тиосульфата с помощью периплазматического ферментного комплекса SOX.	rbcL, prkB, soxABCDXZ, urtABCE, ureABC, urea carboxylase, amt, asnB, cysU, cysW
<i>Devosia</i> sp.	Органотроф, использующий органические и неорганические источники азота и фосфора, детоксифицирует мочевины разложением или включением в органические соединения. Ассимилирует олигопептиды и простые органические вещества, модифицирует ароматические соединения. Владелец мощной системы хемотаксиса.	glgX, nasC, nasABED, nrtABC, oppABCD, mppA, phnCIJMP, pstBS, urtAE, ureaABC, urea carboxylase, vanA
<i>Aminobacter</i> sp.	Органотроф, подвижный за счет пилей, гидролизует полисахариды, катехолы, гликоген, мочевины, ассимилирует нитраты, фосфаты, сульфаты, тиосульфаты. Денитрификатор. Окисляет монооксид углерода до углекислого газа. Метилотроф, участвует в деградации метиламинов	amt, argH, glgX, dmpB, xylE, nasABED, nosZ, nrtABC, pstBS, phnACDIJKLMPWY; soxABG, cysU, cysW, urtABCE, ureABC, gmaS, mgsABC, mgdABCD, coxMLS, cutML
<i>Paucibacter</i> sp.	Аэробный гетеротроф, способный гидролизовать сложные полисахариды, бактерия-спутник цианобактерий в природе и культурах, использует нитраты, фосфаты, сульфаты, тиосульфаты. Денитрификатор?	amt, argH, narGHI, nasABED, nrtABC, phoD, pstBS, phnDEX, soxBCDXZ, cysU, cysW, susA, coxMLS, cutML
<i>Bosea</i> sp.	Аноксигенный аэробный фототроф, содержит бактериохлорофилл а и фотосистему II. Ассимилирует нитраты и фосфаты	amt, glgX, argH, bchM, chlM, bchO, bchX,Y,Z, pufM,L, nrtAC, nasDF, urtABC, pstBS, phnCIJKMPXY
<i>Sphingomonas</i> sp.	Универсальный органотроф, способный к углеродной автотрофии, фиксирует углекислый газ с помощью альтернативного углеродного пути – глиоксилатного цикла. Гидролизует полисахариды. Ассимилирует фосфаты и фосфонаты, имеет щелочную фосфатазу для получения фосфора из органических соединений	amt, argH, mct, phoD, pstBS

Aminobacter, *Tahibacter*, *Devosia* и *Paucibacter* способны потреблять полисахариды, которые в избытке присутствуют в цианобактериальной биопленке. *Aminobacter* имеет самый разветвленный обмен веществ, являясь активным деструктором полисахаридов, метилотрофом, денитрификатором, и, вместе с *Paucibacter*, поставщиком водорода для водородных бактерий. Также водород выделяется при аноксигенном фотосинтезе бактерии *Bosea*. Бактерии рода *Devosia* способны выживать в средах, богатых органическими соединениями, таких как сточные воды, биопленки, благодаря транспортным белкам – пермеазам, которые позволяют усваивать короткие пептиды различного аминокислотного состава и удовлетворять их потребности в углероде и азоте (Talwar et al., 2020) В период истощения фосфатов *Tychonema*, *Sphingomonas*, *Paucibacter* дополнительно выделяют щелочную фосфатазу для гидролиза фосфат-содержащих органических

веществ. Цианобактерия зависит от других участников сообщества, поскольку, когда в замкнутой системе нитраты и нитриты не поступают извне, аммоний высвобождается в результате разложения бактериями азотсодержащих полисахаридов и гликозидов, белков и аминокислот.

Ранее высказано утверждение, что ассоциированный с цианобактериями микробиом представляет собой «экологический след» их среды обитания (Cornet et al., 2018). Мы показали, что микробный консорциум цианобактерии *Tychonema* представлен типичными обитателями богатых органикой субстратов, которые имеют все необходимое для их преобразования и ассимиляции: ферменты денитрификации, метилотрофии, гидролиза ароматических соединений и сложных полисахаридов, а также органических соединений азота, фосфора и серы. Некоторые из описанных видов также встречаются в культурах диатомовых водорослей озера Байкал

(Mikhailov et al., 2018). Обнаружены бактерии-ассоцианты *Hydrogenophaga*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*, которые также выявлены и в нашей работе. Также показали, что актинобактерии порядка *Nocardioides* являются спутниками байкальских культивируемых водорослей.

4. Заключение

Нами показано, что Proteobacteria – главные симбионты нитчатой цианобактерии *Tychonema* sp. ВВК16. Доминантными являются рода *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*. В исследуемом сообществе протекали процессы оксигенного и аноксигенного фотосинтеза (фототрофия и фотогетеротрофия), факультативная фиксация углекислого газа с помощью глиоксилатного пути и КББ, метилотрофия, деструкция полисахаридов и ароматических соединений до олигосахаридов, органических кислот, альдегидов, пептидов и моносахаров, а также органических полимеров азота и фосфора.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Букину Ю.С., Павловой О.Н., Букину С.В., Михайлову И.С., Захаровой Ю.Р. за конструктивные замечания и помощь в обсуждении материалов работы. Метагеномное секвенирование по технологии DNA nanoball sequencing (MGI) проведено при поддержке компании Хеликон (Москва). Исследования проведены за счет государственной бюджетной темы № 0279-2021-0015 «Вирусные и бактериальные сообщества как основа устойчивого функционирования пресноводных экосистем...».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Заварзин Г.А. 1972. Водородные бактерии Литотрофные микроорганизмы. Москва, Наука: 54-99

Aguilar P., Dorador C., Vila I. et al. 2019. Bacterial Communities associated With Spherical Nostoc Macrocolonies. *Frontiers in Microbiology* 10: 483. DOI:[10.3389/fmicb.2019.00483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00483)

Azam F., Fenchel T., Field J. et al. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology – Progress Series* 10: 257-263. DOI:[10.3354/meps010257](https://doi.org/10.3354/meps010257)

Berg K., Lyra C., Sivonen K. et al. 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME Journal* 3: 314–325. DOI:[10.1038/ismej.2008.110](https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110)

Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods* 18: 366–368. DOI:[10.1038/s41592-021-01101-x](https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x)

Callahan B., McMurdie P., Rosen M. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583. DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)

[nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)

Chkhlovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2022. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20:1203–1212. DOI: [10.1101/2022.07.11.499243](https://doi.org/10.1101/2022.07.11.499243)

Chun S.J., Cui Y., Ko S.R. et al. 2017. *Acidovorax lacteus* sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* sp. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1199–1205. DOI: [10.1007/s10482-017-0892-9](https://doi.org/10.1007/s10482-017-0892-9)

Cornet L., Bertrand A., Hanikenne M. et al. 2018. Metagenomic assembly of new subpolar Cyanobacteria and their associated microbiome from non-axenic cultures. *Microbial Genomics* 4: e000212. 1. DOI: [10.1099/mgen.0.000212](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000212)

Danecek P., Bonfield J., Liddle J. et al. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools, *GigaScience*. 10:1-4. DOI:[10.1093/gigascience/giab008](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008)

Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214. DOI: [10.1186/1471-2148-7-214](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214)

Evseev P., Tikhonova I., Krasnopeev A. et al. 2023. *Tychonema* sp. BBK16 characterisation: lifestyle, phylogeny and related phages. *Viruses* 15: 442. DOI:[10.3390/v15020442](https://doi.org/10.3390/v15020442)

Ewels Ph., Magnusson M., Lundin S. et al. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32:3047–3048. DOI:[10.1093/bioinformatics/btw354](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354)

Garner R.E., Kraemer S.A., Onana V.E. et al. 2023. A genome catalogue of lake bacterial diversity and its drivers at continental scale. *Nature Microbiology* 8:1920–1934. DOI:[10.1038/s41564-023-01435-6](https://doi.org/10.1038/s41564-023-01435-6)

Heng L., Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics* 25:1754–1760. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)

Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F. et al. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119

Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Molecular Biology* 42(4): 726-731. DOI:[10.1016/j.jmb.2015.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006)

Kang D.D., Li F., Kirton E. et al. 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 26:7:e7359. DOI:[10.7717/peerj.7359](https://doi.org/10.7717/peerj.7359)

McGrath J., Chin J., Quinn J. 2013. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Microbiology* 11:412–419. DOI:[10.1038/nrmicro3011](https://doi.org/10.1038/nrmicro3011)

Menzel P., Ng K., Krogh A. 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications* 7:11257. DOI:[10.1038/ncomms11257](https://doi.org/10.1038/ncomms11257)

Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Volokitina N.A. et al. 2018. Bacteria associated with planktonic diatoms from Lake Baikal. *Acta Biologica Sibirica*, 4(4):89-94. DOI: [10.14258/abs.v4.i4.4880](https://doi.org/10.14258/abs.v4.i4.4880)

Nelson C., Giraldo-Silva A., Garcia-Pichel F. 2021. A symbiotic nutrient exchange within the cyanosphere microbiome of the biocrust cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *ISME Journal* 15: 282–292. DOI:[10.1038/s41396-020-00781-1](https://doi.org/10.1038/s41396-020-00781-1)

Park M., Kim M., Park T. 2021. Effect of cryopreservation on the bacterial community structure of filamentous cyanobacteria *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Cryobiology* 98:87–95. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.003)

Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current protocols in bioinformatics* 70(1): 102. DOI:[10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Seemann T. 2013. Barrnap 0.9: rapid ribosomal RNA prediction.

Shaw C., Brooke C., Hawley E. et al. 2020. Phototrophic co-cultures from extreme environments: community structure and potential value for fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology* 11: 572131. DOI:[10.3389/fmicb.2020.572131](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572131)

Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539. DOI: [10.1038/msb.2011.75](https://doi.org/10.1038/msb.2011.75)

Stasi R., Neves H.I., Spira B. 2019. Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology* 19:79. DOI:[10.1186/s12866-019-1445-3](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1445-3)

Talwar C., Nagar S., Kumar R. et al. 2020. Defining the environmental adaptations of genus *Devosia*: insights into its expansive short peptide transport system and positively selected genes. *Scientific Reports* 10: 1151. DOI:[10.1038/s41598-020-58163-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58163-8)

Tan B.F., Te S.H., Boo C.Y. et al. 2016. Insights from the draft genome of the subsection V (Stigonematales) cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. Strain MRB220 associated with 2-MIB production. *Stand in Genomic Science* 11: 58. DOI:[10.1186/s40793-016-0175-5](https://doi.org/10.1186/s40793-016-0175-5)

Thorat V., Tiwarekar B., Kirdat K. et al. 2022. *Hydrogenophaga crocea* sp. nov. associated with cyanobacterial mat isolated from farmland mud. *Archives of Microbiology* 204: 265. DOI:[10.1007/s00203-022-02865-2](https://doi.org/10.1007/s00203-022-02865-2)

Tikhonova I.V., Kuzmin A.V., Sorokovikova E.G. et al. 2022. Microcystin-producing cyanobacteria *Tychonema* sp. from Biofilms of Lake Baikal. *Chemistry for Sustainable Development*. 30: 415-423. DOI: [10.15372/CSD2022399](https://doi.org/10.15372/CSD2022399)

Woodhouse J.N., Ziegler J., Grossart H.-P. et al. 2018. Cyanobacterial community composition and bacteria-bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 9:777. DOI:[10.3389/fmicb.2018.00777](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777)