

Original Article

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Metagenome-assembled genomes of non-axenic cyanobacteria: taxonomy, functional potential, and selection of promising strains for agrobiotechnologies

Temraleeva A.D.^{1*}, Arefieva N.A.², Kamenev A.O.³, Didovich S.V.³¹ G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Prospekt Nauki 5, Pushchino, 142290, Russia² Irkutsk State Medical University, Krasnogo Vosstaniya Str. 2, Irkutsk, 664003, Russia³ Research Institute of Agriculture of Crimea, Kievskaya Str. 150, Simferopol, 295043, Russia

ABSTRACT. The search for novel highly effective microbial strains and the engineering of polyfunctional microbial inoculants based on them represents a key vector in the development of modern agrobiotechnologies. In this study, a comprehensive taxonomic and functional characterization of nine non-axenic strains of soil filamentous cyanobacteria belonging to the order Nostocales was conducted using metagenomic whole-genome sequencing. The assembly of metagenome-assembled genomes (MAGs) allowed for the reconstruction of high-quality genomic sequences of the target taxon, bypassing the labor-intensive step of strain axenization. According to the phylogenomic analysis, the studied cultures occupy a distinct position on the phylogenetic tree and can be considered candidates for novel taxa; however, this requires further verification as the current shortage of reference genomes for soil cyanobacteria is overcome. Based on ribosomal marker genes, the composition of the accompanying satellite microbiota localized within the exopolysaccharide sheaths of the hosts was characterized. The presence of beneficial heterotrophic bacteria from the genera *Devosia*, *Lysobacter*, *Brevundimonas*, *Variovorax*, *Bosea*, *Achromobacter*, and *Pseudoflavitalea*, which possess pronounced plant growth-promoting and biocontrol potential, was verified. Functional genome annotation revealed that all strains harbor a complete nitrogen fixation gene cluster and well-developed phosphorus mobilization systems. The strain *Nostoc* sp. VKM Al-56 was distinguished by a unique iron metabolism apparatus, whereas *Nostoc edaphicum* VKM Al-156 stood out for its aromatic compound degradation pathways. An integrated analysis considering taxonomic and biogeographic diversity, as well as the presence of key agronomically valuable traits (the capacity for phytohormone synthesis, nitrogen fixation, phosphate mobilization, pathogen defense, and abiotic stress tolerance), allowed for the selection of three candidate strains for further applied research on the development of biological formulations for crop production: *Nostoc* sp. VKM Al-115, *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158, and *Anabaena pirinica* VKM Al-153.

Keywords: cyanobacteria, Nostocales, metagenome-assembled genomes, synthetic microbial communities, agrobiotechnology

For citation: Temraleeva A.D., Arefieva N.A., Kamenev A.O., Didovich S.V. Metagenome-assembled genomes of non-axenic cyanobacteria: taxonomy, functional potential, and selection of promising strains for agrobiotechnologies // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 4. - P. 283-309. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-4-283

1. Introduction

The search for novel microbial strains to develop effective biological formulations is a key factor in ensuring food security. Global population is projected to reach 9.6 billion people by 2050, which will necessitate at least a 50% increase in annual grain production (Singh et al., 2016). Given the exhaustion of ara-

ble land reserves, the sole viable strategy remains the intensification of agriculture. However, the current model, heavily reliant on synthetic fertilizers and pesticides, leads to soil fertility degradation, ecosystem contamination, and rising production costs. As an alternative or supplement to chemical agronomy, agricultural biologicalization is actively expanding. In this domain, cyanobacteria occupy a prominent place as phototro-

*Corresponding author. E-mail address: temraleeva.anna@gmail.com (A.D. Temraleeva)

Received: July 02, 2026;

Accepted after revised: August 01, 2026;

Available online: August 28, 2026

© Author(s) 2026. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



phs possessing a unique suite of agronomically valuable functions, including nitrogen fixation, phosphate mobilization, and the synthesis of phytohormones and exopolysaccharides (EPS) (Whitton and Potts, 2012; Sharma et al., 2013; Temraleeva et al., 2025). More than two thousand of their secondary metabolites with pronounced antibacterial and fungicidal activities are known (Li et al., 2017; Jones et al., 2021; Abo-Shady et al., 2023), while their polysaccharide matrices form a hydrogel network that ensures soil structural integrity and mediates metabolic dialogue with the rhizosphere (Costa et al., 2018). The current vector in agrobiotechnology is shifting from low-efficiency single-strain cultures toward the engineering of multifunctional synthetic microbial communities (SynComs) (Shayanthan et al., 2022). In such systems, cyanobacteria of the genera *Nostoc* and *Anabaena* serve as a phototrophic backbone, establishing a niche for satellite heterotrophic bacteria that promote plant growth. This interaction triggers a cascading activation of soil enzymes and enhances suppressiveness against pathogens (Santos-Merino et al., 2019; Yanti et al., 2021; Krishnan et al., 2025). This is particularly important because the efficiency of traditional mineral fertilizer uptake does not exceed 30–50%, and only comprehensive microbial action is capable of unlocking the full trophic potential of agroecosystems (Chen et al., 2025). However, the acute shortage of regional reference genomes remains a key limiting factor for the implementation of these technologies (Kouidhi et al., 2025). Pure cultures cover less than 10% of global prokaryotic diversity (Wu et al., 2025), and the efficacy of inoculants often decreases when transferred from the laboratory to the field due to a lack of adaptation to local soil and climatic conditions. The solution to this problem lies in the transition to metagenomic sequencing and metagenome-assembled genome (MAG) assembly – genomic sequences reconstructed from metagenomic data by clustering contigs belonging to a single taxon using binning algorithms. This approach is particularly relevant for cyanobacteria, since obtaining axenic cultures is an extremely complex and labor-intensive task due to tight metabolic connections with the accompanying microbiota and slow growth compared to contaminating heterotrophic bacteria. Metagenomic sequencing of non-axenic strains circumvents the axenization stage and directly reconstructs the genomes of target strains, opening up the opportunity not only to discover novel taxa but also to predict their functional potential *in silico*. Moreover, a non-axenic cyanobacterial culture with its natural bacterial environment can be considered a simplified model of a SynCom, wherein the phototrophic host and satellite heterotrophs exist in metabolic interaction. Investigating the genomic composition of such an association allows for the simultaneous characterization of the cyanobacterial strain and the identification of potential partners for engineering artificial microbial consortia with targeted agronomic properties. In this regard, the discovery and genomic profiling of promising autochthonous cyanobacterial strains becomes a primary task for the development of stable and highly effective next-generation biological formulations.

The **aim** of this study was to perform a comprehensive genomic characterization of nine non-axenic cyanobacterial strains of the order Nostocales from the All-Russian Collection of Microorganisms (VKM) using a MAG approach, including their taxonomic identification, functional profiling, and identification of genetic determinants promising for agrobiotechnological applications, as well as characterization of the satellite microbiota composition. Although metagenomic assembly of cyanobacterial genomes has been employed in several studies, such an approach – integrated with the analysis of satellite microbiota – has not been previously applied to soil cyanobacterial strains from Russian microorganism collections. The novelty of our study lies in the comprehensive analysis of non-axenic cultures as natural prototypes of synthetic microbial consortia, enabling the simultaneous characterization of the target phototrophic strain and the identification of associated PGPB strains with promising potential for biopesticide and biofertilizer formulation.

2. Materials and methods

2.1. Objects of study

The objects of study were 9 strains of soil cyanobacteria obtained from the All-Russian Collection of Microorganisms (VKM; G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino). All strains belong to the order Nostocales: *Anabaena pirinica* VKM Al-153 (isolated from meadow soil, Volgograd region), *Nostoc commune* VKM Al-35 (isolated from solonetz, Volgograd region), *Nostoc punctiforme* VKM Al-37 (isolated from solonetz, Volgograd region), *Nostoc* sp. VKM Al-56 (isolated from grey forest soil, Moscow region), *Nostoc* sp. VKM Al-115 (isolated from grey forest soil, Tula region), *Nostoc edaphicum* VKM Al-156 (isolated from brown semi-desert soil, Republic of Kalmykia), *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158 (isolated from brown semi-desert soil, Republic of Kalmykia), *Nostoc minutum* VKM Al-168 (isolated from chestnut soil, Volgograd region), and *Nostoc* sp. VKM Al-310 (isolated from fallow land, Stavropol Krai). The investigated strains were non-axenic and contained an accompanying bacterial microbiota. Microscopy and photodocumentation of the strain morphology were performed using a Leica DM750 microscope equipped with a Flexacam C3 digital camera (Leica Microsystems, Germany). Morphological identification was performed using the taxonomic key for heterocytous cyanobacteria (Komárek, 2013).

2.2. DNA extraction, high-throughput sequencing, and quality control

DNA library preparation (enzymatic fragmentation, adapter ligation, and amplification) was performed using the VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina V2 (Vazyme, China) accord-

ing to the manufacturer's protocol. Library quality was monitored on a Qsep400 system using the High Sensitivity Cartridge Kit (BioOptic, Taiwan) and a Qubit 4 fluorometer using the Spectra Q HS kit (Raissol Bio, Russia). High-throughput sequencing (PE150) was conducted on the SURFseq5000 platform (GeneMind, China) at Medgen LLC (Russia). Raw read quality was evaluated using FastQC v0.11.9 (assessing Q-score, GC content, adapter contamination, and duplication levels). Trimming and adapter removal were performed via Trimmomatic v0.39 using the SURFseq adapter sequences provided by Medgen with the following parameters: ILLUMINACLIP:SURFseq_adapters.fa:2:30:10, AVGQUAL:25, MINLEN:75. Due to the non-axenic nature of the cyanobacterial strains, sequencing was executed in a deep metagenomic sequencing mode.

2.3. Genome assembly, quality assessment, and decontamination

To eliminate signals from potential contamination stemming from the non-axenic nature of the cyanobacterial strains, a multi-step bioinformatic data filtration approach was applied. *De novo* metagenomic assembly of deep sequencing reads was performed using SPAdes v3.15.5 (Bankevich et al., 2012) with the --meta option and automatic k-mer selection (--k auto). Contigs shorter than 1000 bp were removed using seqkit v2.9.0. For taxonomic purification and isolation of the target cyanobacterial genomes from the associated satellite microbiota, automated binning was carried out using MaxBin2 v2.2.7 (Wu et al., 2016). Potential non-cyanobacterial contamination within the obtained bins was further identified and discarded using Kraken2 (Wood et al., 2019) against the PlusPFP database. At the final stage, the completeness and contamination levels of the assembled genomes were verified using CheckM2 v1.1.0 (Chklovski et al., 2023). For subsequent functional profiling and gene cluster biosynthesis (BGC) annotation, only high-quality bins confidently assigned to the target cyanobacterial taxa – characterized by completeness >98% and contamination <4.5% – were retained. General assembly metrics (N50, total genome size, and contig count) were evaluated using QUAST v5.2.0 (Gurevich et al., 2013).

2.4. Identification and taxonomic analysis of rRNA genes

The identification of regions encoding the large (23S) and small (16S) subunit ribosomal RNA genes within the MAGs was performed by aligning the genomic assembly contigs against the full-length SILVA ribosomal gene database (Quast et al., 2013) using the BLASTn pairwise alignment algorithm (Altschul et al., 1990). BLASTn was executed with the following parameters: -word_size 12 -gapopen 2 -gapextend 1 -reward 1 -penalty -1 -evalue 0.00001. For taxonomic identification based on the 16S rRNA gene, an identity threshold of $\geq 90\%$ was applied (Hackmann, 2025), while a threshold of $\geq 89\%$ was used for the 23S rRNA gene

based on data from closely related taxa (Zimenkov and Ushtanit, 2025). Sequences with values below the specified thresholds were excluded from further analysis as low-quality. The risk of including chimeric ribosomal artifacts in the final analysis was minimized due to a multi-stage decontamination procedure (MaxBin2 and Kraken2), where rRNA genes were analyzed strictly within isolated and verified high-quality bins (MAGs), thereby excluding cross-reads from other taxa. The taxonomic assignment of the detected sequences was determined according to the SILVA database classification framework.

2.5. Phylogenomic analysis

The taxonomic identification and phylogenetic positioning of the studied strains were determined using the Type (Strain) Genome Server (TYGS) online platform (<https://tygs.dsmz.de/>) (Meier-Kolthoff and Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022; Freese et al., 2025). The genome sequences were uploaded to the server and automatically compared against the genomes of type and reference strains available in the up-to-date TYGS database, as well as pairwise against each other. The closest related strains were identified using the MASH algorithm for rapid intergenomic distance estimation, as well as via analysis of 16S rRNA gene sequences extracted from the studied genomes using RNAmmer (Lagesen and Hallin, 2007), followed by a BLAST search (Camacho et al., 2009) against the TYGS type strain database. Based on the intergenomic distances calculated using Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) (Meier-Kolthoff et al., 2013) with the 'trimming' algorithm and formula d5, a phylogenomic tree was constructed using FastME 2.1.6 (Lefort et al., 2015) with 100 pseudo-bootstrap replicates; pseudo-bootstrap support values were displayed at the nodes. The genomes of *Gloeocapsopsis dulcis* AAB1 and *Chroogloeocystis siderophila* 5.2 s.c.1, belonging to distant taxa within the class Cyanophyceae, were used as an outgroup to ensure correct rooting of the phylogenetic tree. Tree visualization was performed using the iTOL platform (Letunic and Bork, 2021).

2.6. Functional annotation

Functional genome annotation was performed using two independent approaches. In the first pipeline, open reading frames (ORFs) were predicted using Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014), after which protein functional assignment was conducted via Hidden Markov Model (HMM) profiles using the KofamScan v1.3.0 utility based on the KEGG database (Release 116.0) (Aramaki et al., 2020). Genomic mapping and metabolic pathway reconstruction were executed within the KEGG PATHWAY framework (Kanehisa et al., 2023). In the second pipeline, genomes were annotated using the RASTtk algorithm with default parameters on the RAST online server (October 2025 version) (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015). Functional categorization followed the SEED subsystems classification framework (Overbeek et al., 2014).

2.7. Data visualization

Data visualization was performed within the R environment using the *ggplot2*, *tidyr*, *dplyr*, *stringr*, *networkD3*, *htmlwidgets*, and *webshot2* packages. Based on the 16S and 23S rRNA gene analysis data, presence/absence heatmaps of the satellite microbiota taxa were constructed, including sequence identity percentages. Taxon distribution across phylogenetic levels (phylum -> class) was displayed using Sankey diagrams. For the comparative analysis of genomic functional profiles across agronomically significant KEGG categories, a heatmap was generated illustrating the gene counts within each category.

3. Results

3.1. Morphological characterization and ecological-geographic diversity of the strains

Morphologically, all investigated strains exhibited a diversity of morphotypes characteristic of representatives of the order Nostocales (Komárek, 2013). *A. pirinica* VKM Al-153 formed straight or slightly curved trichomes surrounded by a wide (up to 12 µm) mucilaginous layer, with barrel-shaped vegetative cells (3.3–4.2 µm wide), ellipsoidal akinetes (12–17.2 × up to 8.2 µm), and intercalary heterocytes (4.3–5.3 µm). Strains of the genus *Nostoc* were characterized by the

presence of dense colonies of various shapes (ranging from spherical to vermiform), colorless mucilaginous sheaths, and barrel-shaped or spherical vegetative cells. The dimensions of the vegetative cells varied depending on the strain, ranging from 2.6–3.4 µm in *Nostoc* sp. VKM Al-310 to 3.3–4.3 µm in *N. commune* VKM Al-35. Akinetes, where observed, were predominantly spherical or ellipsoidal, with diameters ranging from 4.6 to 7.7 µm, except for *A. pirinica* VKM Al-153, whose akinetes reached up to 17.2 µm in length. Heterocytes were located either intercalarily or terminally and exhibited spherical, ellipsoidal, or conical shapes with diameters of 3.4–6.1 µm. *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158 was distinguished by bushy colonies and falsely branched filaments up to 9.4 µm wide with a robust, stratified sheath; its heterocytes were large, measuring up to 10.5 µm in width and 20–30 µm in length. All strains reproduced vegetatively (via fragmentation of filaments or colonies), as well as through hormogonia and akinetes. Micrographs of the strains are presented in Fig. 1.

The studied strains were isolated from soil samples collected across five regions of the European part of the Russian Federation and represent a wide spectrum of soil and ecological conditions: ranging from meadow and grey forest soils of Central Russia to solonetz, chestnut, and brown semi-desert soils of the southern regions.

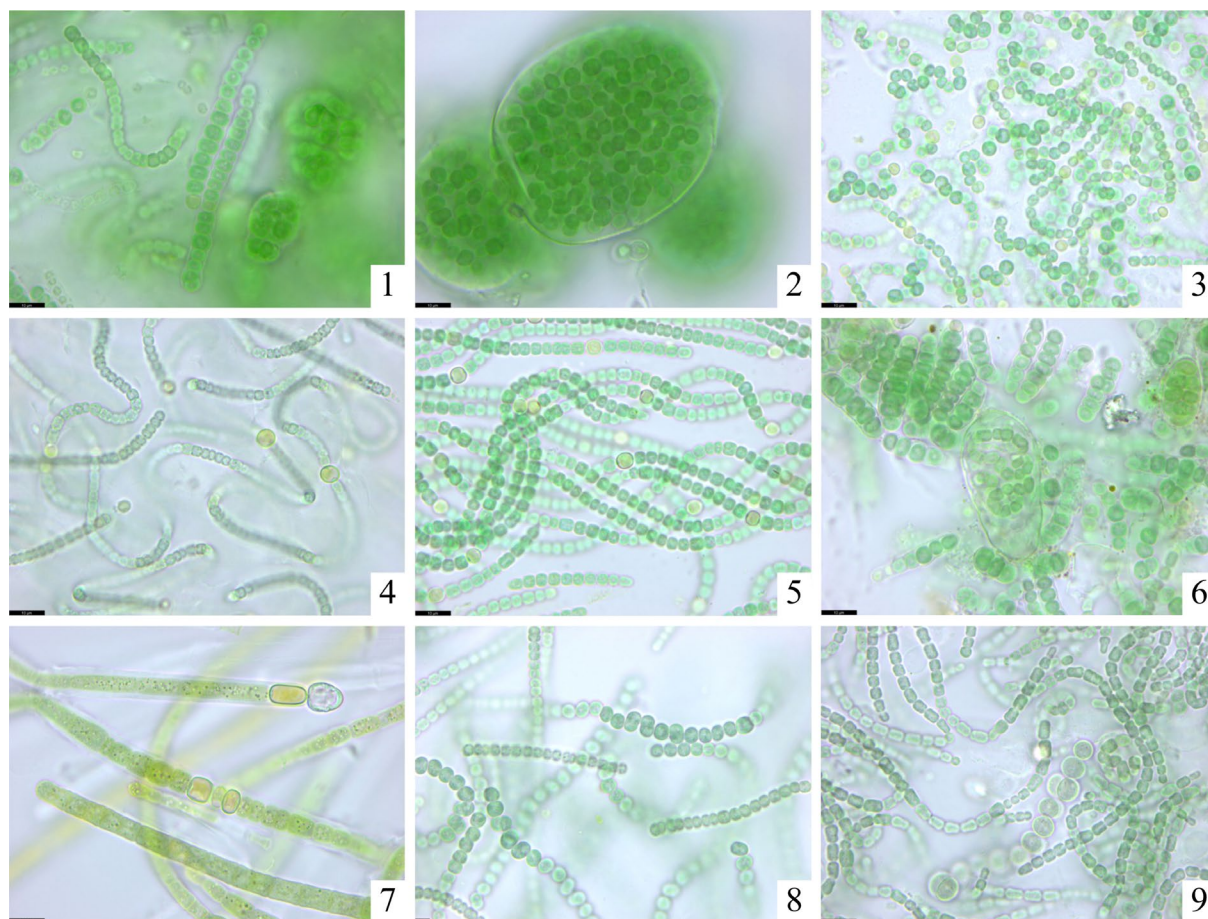


Fig.1. Micrographs of the investigated cyanobacterial strains. 1 – *Nostoc commune* VKM Al-35, 2 – *Nostoc punctiforme* VKM Al-37, 3 – *Nostoc* sp. VKM Al-56, 4 – *Nostoc* sp. VKM Al-115, 5 – *Anabaena pirinica* VKM Al-153, 6 – *Nostoc edaphicum* VKM Al-156, 7 – *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158, 8 – *Nostoc minutum* VKM Al-168, 9 – *Nostoc* sp. VKM Al-310. Scale bar: 10 µm.

3.2. Sequencing quality, assembly, and characterization of MAGs

As a result of deep metagenomic sequencing of the nine non-axenic cyanobacterial strains, between 16.1 and 23.6 million paired-end reads per strain were obtained, corresponding to 2.4–3.5 Gb of raw data (Table 1).

Low-quality reads were absent across all strains, demonstrating the high quality of the initial raw data. The average GC content ranged from 40% to 46% for most strains. The high GC content (65%) in the raw data of strain VKM Al-310 (Table 1), which contrasts with the other cyanobacterial strains, reflects the GC composition of the entire metagenomic dataset, including the dominant satellite microbiota. After filtering and extracting the target MAG, the GC content of this strain was 41% (Table 2), which corresponds to typical values for members of the order Nostocales. The read duplication rate varied from 32.5% (*Nostoc* sp. VKM Al-156) to 51.7% (*Nostoc* sp. VKM Al-310). Following bioinformatic filtration and decontamination, high-quality metagenome-assembled genomes (MAGs) were successfully recovered for each strain (Table 2).

The completeness of the assembled genomes varied from 98.29% (*N. commune* VKM Al-35) to 100% (*Nostoc* sp. VKM Al-115 and *N. minutum* VKM Al-168), while the contamination level did not exceed 4.52% (averaging <1%), which meets the criteria for high-quality MAGs. Genome sizes ranged from 6.32 Mb (*A. pirinica* VKM Al-153) to 9.36 Mb (*N. minutum* VKM Al-168), which falls within the range characteristic of representatives of the order Nostocales. The genomic GC content varied from 40% to 42%, with the exception of VKM Al-310 (41%). The number of predicted coding sequences (CDS) ranged from 5477 (*A. pirinica* VKM Al-153) to 8268 (*N. minutum* VKM Al-168). Gene density varied from 0.787 to 0.824 genes per kilobase. The number of contigs in the assemblies fluctuated from 83 (*A. pirinica* VKM Al-153) to 461 (*Nostoc* sp. VKM Al-310), while the N50 metric, reflecting assembly contiguity, ranged from 46.892 to 126.872 bp, and the maximum contig length reached 421.132 bp (*N. punctiforme* VKM Al-37). Thus, all recovered MAGs met the high-quality draft standard (completeness >98%, contamination <5%) and are suitable for subsequent functional profiling and taxonomic identification (Bowers et al., 2017).

Table 1. Quality metrics of raw sequencing data.

VKM Strain ID	Total Reads	Total Bases (Gb)	Low-Quality Reads	Average GC Content (%)	Duplication Rate (%)
35	23611455	3.5	0	41	46.7
37	21004509	3.1	0	41	45.4
56	19426989	2.9	0	41	45.4
115	19849606	2.9	0	41	46.7
153	18882848	2.8	0	40	35.6
156	18508027	2.7	0	46	32.5
158	17991330	2.6	0	41	44
168	19855856	2.9	0	41	41.4
310	16122818	2.4	0	65	51.7

3.3. Phylogenomic analysis

According to the results of the TYGS identification pipeline, all nine strains were characterized as potentially novel species that could be considered candidates for new taxa; however, this requires further verification incorporating morphological, physiological, and ecological data, as well as the accumulation of soil cyanobacterial genomes in reference databases. Based on the intergenomic GBDP distances, a phylogenomic tree was constructed (Fig. 2) with an average branch pseudo-bootstrap support of 89.2%, demonstrating the high reliability of the tree topology.

Analysis of the phylogenomic tree revealed that strains *N. edaphicum* VKM Al-156 and *H. pseudoramosissima* VKM Al-158 form a well-supported common clade, indicating their close phylogenetic relationship. Strains *N. commune* VKM Al-35, *N. punctiforme* VKM Al-37, *Nostoc* sp. VKM Al-115, and *N. minutum* VKM Al-168 group into a single clade, whereas *Nostoc* sp. VKM Al-56, *A. pirinica* VKM Al-153, and *Nostoc* sp. VKM Al-310 occupy distinct, isolated positions.

3.4. Composition of satellite microbiota in non-axenic cyanobacterial strains

Analysis of the 16S and 23S rRNA genes identified within the metagenomic assemblies of non-axenic cyanobacterial cultures allowed for the characterization of the taxonomic composition of the accompanying bacterial microbiota (Fig. 3, 4). After filtering out sequences with identity levels below the established thresholds $\geq 90\%$ for 16S rRNA, $\geq 89\%$ for 23S rRNA), satellite bacteria belonging to the phyla Pseudomonadota (classes Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria) and Bacteroidota (class Bacteroidia) were detected across the investigated strains. The distribution of satellite phyla among host strains was uneven. The most diverse composition of associated bacteria was observed for *N. edaphicum* VKM Al-156, which, according to the 23S rRNA data, harbored representatives of three genera from the phylum Pseudomonadota. The strain *A. pirinica* VKM Al-153 was associated with two phyla: Pseudomonadota and Bacteroidota. Strains VKM Al-56 and VKM Al-310 contained representatives of the phylum Pseudomonadota. Strains VKM Al-35, VKM Al-37, VKM Al-115, VKM Al-168, and VKM Al-158 harbored no satellite taxa identified by marker genes with reliable identity levels.

Table 2. Genome assembly quality metrics after binning and decontamination.

VKM Strain ID	Completeness (%)	Contamination (%)	Genome Size, Mb	GC, %	Number of CDS	Gene Density (genes/Kb)	Number of Contigs	N50 (bp)	Max Contig Length (bp)
35	98.29	4.52	8.79	42	7695	0.803	175	122592	349144
37	99.99	0.5	8.37	42	7386	0.803	224	92142	421132
56	99.97	0.19	6.90	41	5949	0.822	121	116923	360614
115	100	0.12	9.17	41	7862	0.812	248	78921	250931
153	99.95	0.5	6.32	40	5477	0.824	83	126872	357633
156	99.98	0.95	7.74	42	6869	0.795	176	81748	403056
158	99.86	0.35	7.41	42	6869	0.792	325	46892	171368
168	100	0.6	9.36	42	8268	0.813	311	77873	314191
310	99.99	0.5	8.21	41	7233	0.787	461	50634	197625

Note. CDS – coding sequence.

To quantify the proportion of the satellite microbiota, a genome-size-weighted approach was applied based on the sequence coverage depth and genome sizes of all bins obtained from the binning process. The calculation revealed that satellite bins were not detected in three strains (VKM Al-35, VKM Al-37, and VKM Al-115), with their share remaining below 0.5%. In the

strains with identified satellite microbiota, its proportion ranged from 2.04% (VKM Al-56) to 95.94% (VKM Al-310). Specifically, the satellite bacterium dominated the culture in strain VKM Al-158 (90.84%), while its share reached 29.59% and 26.21% in VKM Al-156 and VKM Al-153, respectively, and 11.19% in VKM Al-168.

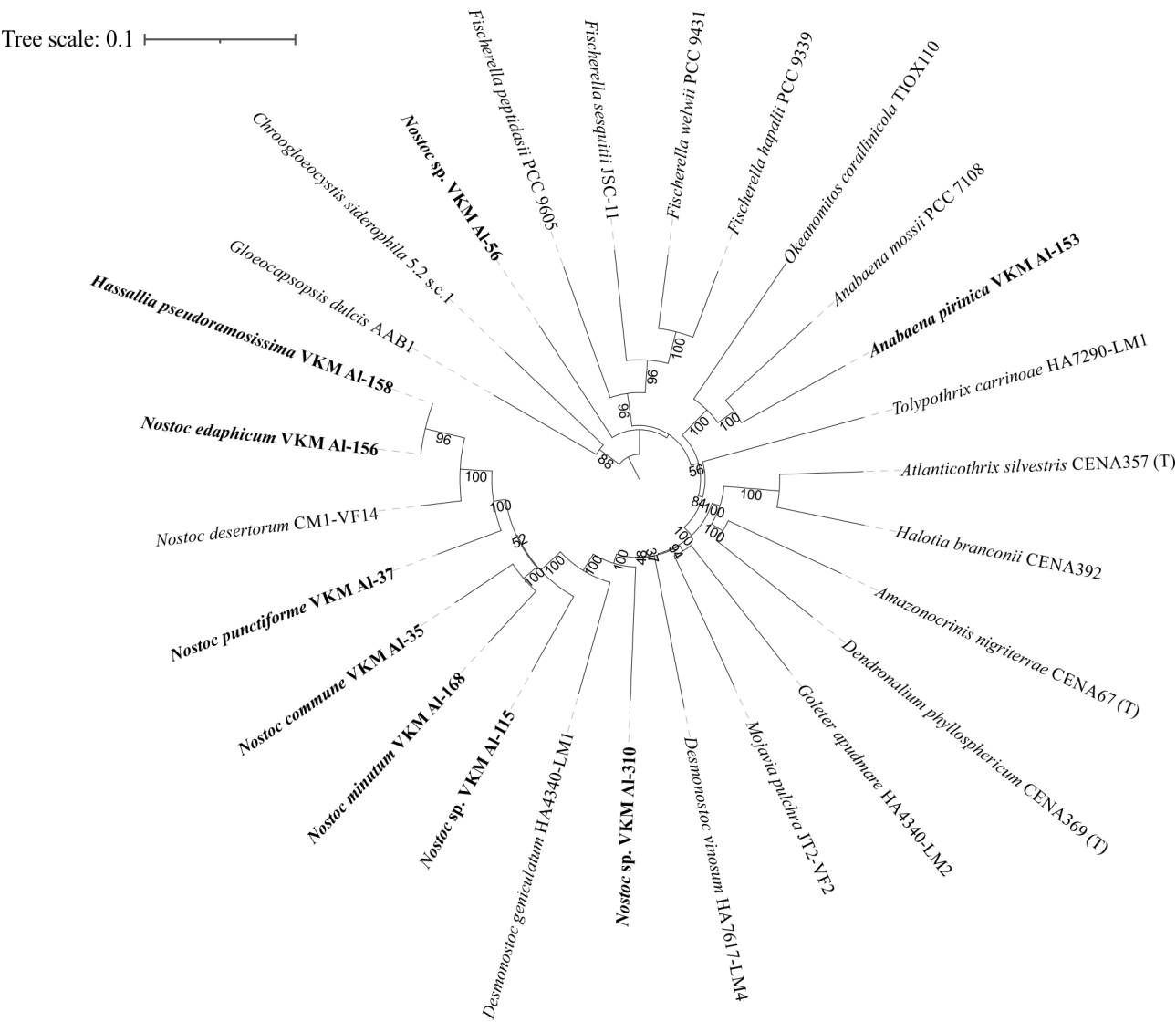


Fig.2. Phylogenomic tree of the investigated cyanobacterial strains constructed using TYGS data. Note. VKM strains are highlighted in bold.

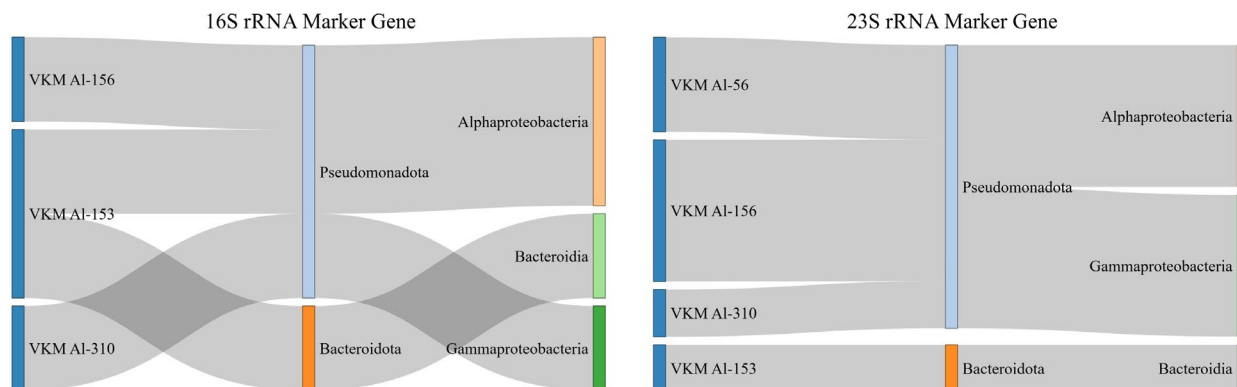


Fig.3. Sankey diagrams illustrating the distribution of satellite bacterial taxa across phylogenetic levels based on 16S and 23S rRNA gene data.

Note. Stream widths are proportional to the number of detected taxa. VKM cyanobacterial strains are highlighted in blue; other bacterial phyla and classes are differentiated by color coding.

Analysis of ribosomal marker genes allowed for a detailed characterization of the composition and structure of the core heterotrophic satellite microbiota localized within the exopolysaccharide sheaths of the investigated cultures (Fig. 4). The strain *A. pirinica* VKM Al-153 was characterized by the presence of the genera *Pseudoflavitalea* and *Devosia*. In the strain *N. edaphicum* VKM Al-156, three genera belonging to the class Alphaproteobacteria were identified: *Bosea*, *Brevundimonas*, and *Variovorax*. In the metagenomic assembly of *Nostoc* sp. VKM Al-56, the genera *Brevundimonas* and *Achromobacter* were detected. The profile of the strain *Nostoc* sp. VKM Al-310 was of particular interest. Due to the high conservation of ribosomal sequences within the family Xanthomonadaceae, the associated bacterial contig of this culture exhibited an ambiguous classification at different levels of bioinformatic resolution. According to the 16S rRNA gene data, the taxon was assigned to the genus *Xanthomonas* with 90.6% sequence identity, whereas the 23S rRNA gene analysis allowed for a more refined systematic classification, verifying this biocontrol strain as

Lysobacter (96.8% sequence identity). For the remaining five strains (VKM Al-35, VKM Al-37, VKM Al-115, VKM Al-158, and VKM Al-168), ribosomal markers of the accompanying microbiota were not detected within the metagenomic contigs at all.

It is worth noting that the lack of detection of satellite ribosomal markers or separate bins of the associated microbiota for a number of strains does not imply complete biological sterility of these cultures. This outcome could be due to a low relative abundance of the associated bacteria, insufficient sequencing depth to ensure their coverage, or the fact that the satellite genomes were not assembled into separate bins due to data fragmentation.

3.5. General characterization of the genomic functional profile

Functional annotation of the nine cyanobacterial metagenome-assembled genomes (MAGs) was performed using Prokka in combination with KofamScan (KEGG) (Table 3).

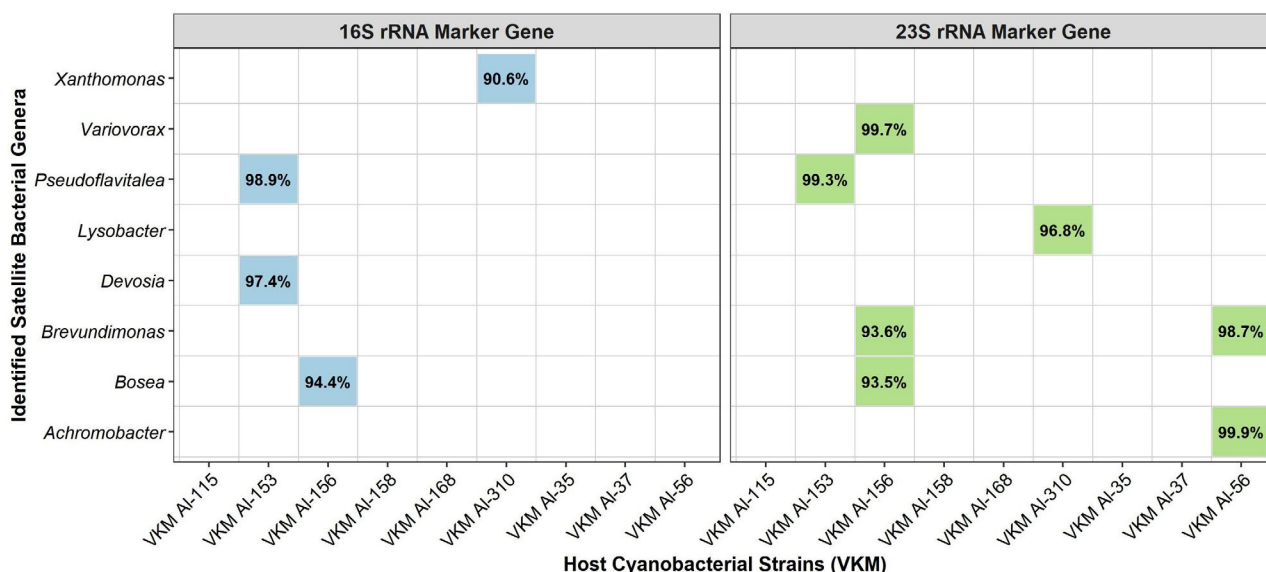


Fig.4. Presence of satellite bacterial taxa within non-axenic VKM cyanobacterial strains based on 16S and 23S rRNA gene data.

Note. Cells indicate the sequence identity percentage against the SILVA reference database.

Table 3. Results of functional genome annotation based on Prokka and KofamScan data.

VKM Strain ID	Number of Predicted Genes	Number of Protein-Coding Genes	Number of Non-Hypothetical Proteins	Number of Enzyme-Commission Assigned Genes
35	7680	7583	2995	1367
37	7361	7268	2950	1345
56	5998	5904	2637	1224
115	7834	7741	2995	1394
153	5701	5650	2337	1115
156	6858	6786	2759	1288
158	6613	6544	2614	1214
168	8157	8063	3011	1397
310	7031	6943	2933	1358

The total number of predicted genes varied from 5701 (*A. pirinica* VKM Al-153) to 8157 (*N. minutum* VKM Al-168). The proportion of CDS accounted for 98.1–99.1% of the total number of predicted genes. The number of hypothetical proteins with unassigned functions fluctuated from 2337 (*A. pirinica* VKM Al-153) to 3011 (*N. minutum* VKM Al-168). The number of genes with assigned enzymatic functions ranged from 1115 (*A. pirinica* VKM Al-153) to 1397 (*N. minutum* VKM Al-168), corresponding to 17.8–19.6% of the total predicted genes. The obtained data demonstrate a functional repertoire typical for representatives of the order Nostocales, while the variations in the number of predicted genes and annotated functions reflect the taxonomic diversity of the investigated strains. The complete functional profiles based on KEGG and RAST annotations for all nine studied genomes are provided in Tables S1 and S2, respectively.

3.6. Analysis of the agrobiotechnological potential of the strains

A comprehensive comparative analysis of the genomic functional profiles allowed for the distribution of metabolic pathways into key agronomically significant categories and revealed a pronounced specialization among the strains (Fig. 5, Tables S1 and S2).

As expected, the highest number of genes across all investigated cyanobacteria is concentrated within the core metabolism and cellular signaling blocks. In particular, the regulatory pathways “Carbohydrate metabolism” (ranging from 311 in strain VKM Al-153 to 417 in VKM Al-115) and “Amino acid metabolism” (from 246 in VKM Al-153 to 341 in VKM Al-115) proved to be the most representative. Such redundancy in fundamental pathways reflects the high energetic and biosynthetic demands of photoautotrophic microorganisms. Notably, the high saturation of genes associated with carbohydrate metabolism and glycan biosynthesis in strains of the genus *Nostoc* (primarily VKM Al-115) genetically determines their capacity for active formation of the exopolysaccharide matrix, which plays a key role in soil structuring and protecting the rhizosphere from desiccation. The categories forming the “Plant growth promotion and biocontrol of phytopathogens” block are moderately represented. Specifically,

the “Biosynthesis of secondary metabolites” and “Metabolism of terpenoids and polyketides” pathways comprise 61–120 and 71–120 genes, respectively. The highest potential for the synthesis of antimicrobial compounds and non-ribosomal peptides involved in phytopathogen suppression is observed in strains VKM Al-115 and VKM Al-168. Interestingly, these same strains also demonstrate the highest metrics for regulatory systems, including “Signal transduction” (375 and 356 genes), “Metabolism of cofactors and vitamins” (327 and 315 genes), and “Environmental adaptation” (16 and 17 genes, respectively), which may indicate their high physiological plasticity and competitiveness during plant tissue colonization. Within the mineral nutrition block, a complete functional nitrogen fixation gene cluster (*nif* cluster) was detected in all studied cultures, along with a well-developed complex of phosphate mobilization genes (including phytases, phosphatases, and specialized transport systems). However, a clear organismal specificity was revealed regarding iron metabolism: strain VKM Al-56 sharply stands out against the general background due to the presence of 14 iron utilization and transport (siderophore) genes, whereas in the other investigated strains, this metric varies within a range of only 1–4 genes. This allows for the consideration of VKM Al-56 as a potential agent for overcoming iron deficiency in agrocenoses.

4. Discussion

In the present study, based on deep metagenomic sequencing of non-axenic cultures, MAGs of nine cyanobacterial strains belonging to the order Nostocales, isolated from various soil and climatic zones of the European part of Russia, were successfully recovered. The applied approach confirmed its efficacy for working with non-axenic strains and allowed for a comprehensive taxonomic and functional analysis without the axenization stage, which remains an extremely challenging task for cyanobacteria due to their slow growth rates and tight metabolic interactions with the accompanying microbiota (Wu et al., 2025). The obtained high-quality MAGs provided a robust foundation for taxonomic identification and functional profiling. The results of the analysis performed on the TYGS server indicated that all nine strains represent potentially novel species, which is consistent with data regarding

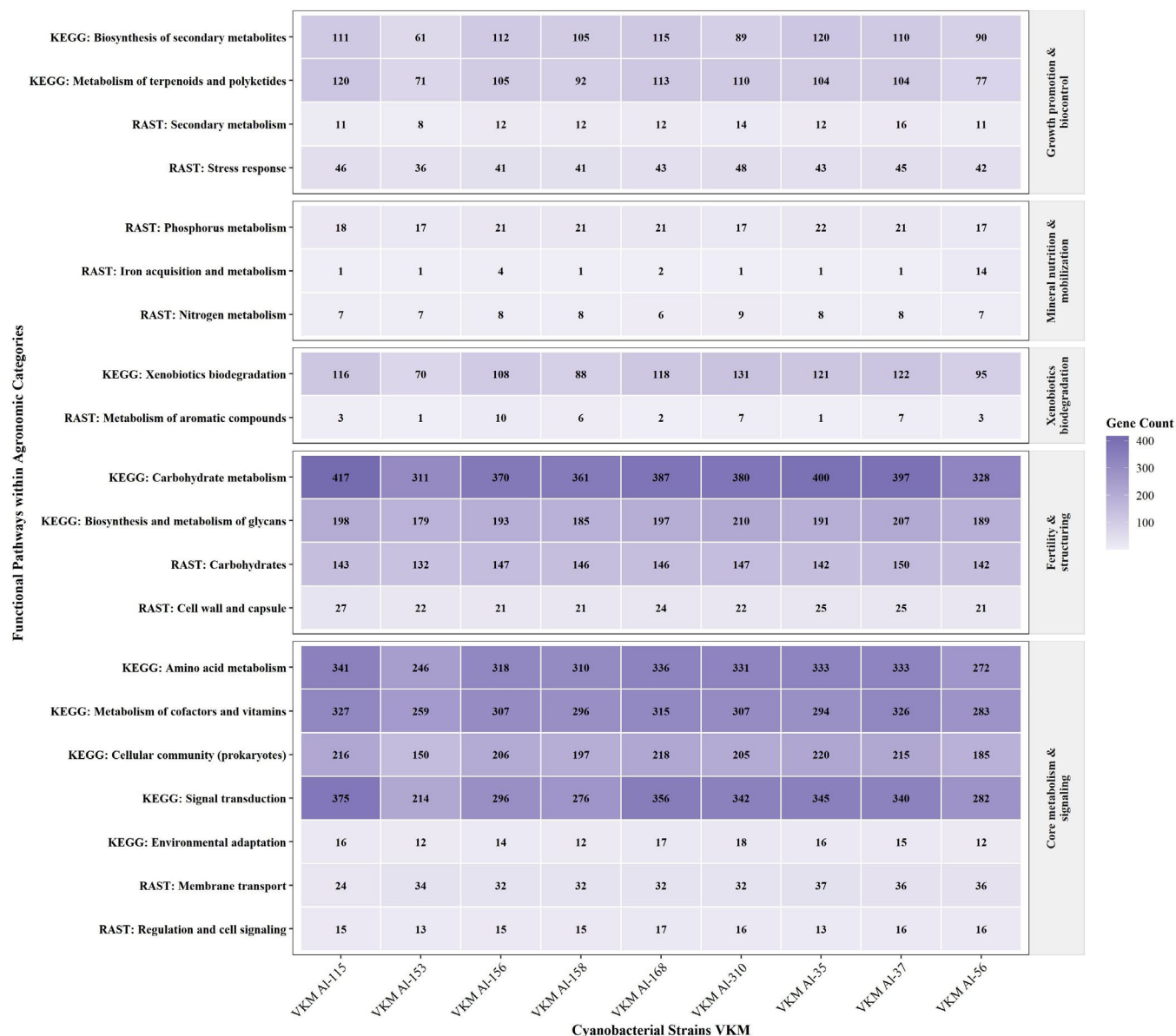


Fig.5. Heatmap illustrating gene abundance within agronomically significant functional categories across the genomes of the investigated cyanobacterial strains.

the insufficient knowledge of terrestrial cyanobacteria, but may also be due to a shortage of reference genomes in international genetic information databases. Notably, clustering based on whole-genome data does not always align with 16S rRNA gene phylogeny, which is likely due to differences in the resolution capacity of these approaches (Prabha and Singh, 2019; Dvořák et al., 2023).

Morphological observations confirmed the presence of well-developed mucilaginous sheaths in all investigated strains. According to multi-omics models of rhizospheric interactions, intensive EPS production enables microbial consortia to retain moisture near the roots, optimize metabolite exchange, and protect partners under conditions of oxidative and osmotic stress (Costa et al., 2018; Kimotho and Maina, 2024). The well-developed EPS apparatus also performs a biomechanical function, enhancing the anti-erosion resistance of soils (Chamizo et al., 2018). Based on the number of glycan biosynthesis genes, strains *Nostoc* sp. VKM Al-115 and *N. minutum* VKM Al-168 demonstrated

the highest potential for EPS matrix formation, making them preferred candidates for application in soils prone to erosion and degradation.

The wide spectrum of soil and climatic conditions from which the investigated strains were isolated suggests the presence of genetic adaptations to various stress factors, such as salinity, drought, and nutrient deficiency. This makes them promising candidates for the development of biological formulations effective across a broad range of agroecological conditions, which is particularly relevant for the soils of the southern regions of Russia that are prone to degradation (Chen et al., 2025). Bioinformatic analysis suggests a certain correlation between the ecological characteristics of the strains' sites of origin and their functional profiles. In particular, the isolation of strains *N. commune* VKM Al-35 and *N. punctiforme* VKM Al-37 from the solonetz soils of the Volgograd region coincides with the recording of the highest metrics for carbohydrate and amino acid metabolism pathways in these strains. This may indicate a well-developed genetic potential for the syn-

thesis of intracellular osmoprotectants necessary for survival under elevated osmotic pressure. Conversely, adaptation to the arid conditions of the semi-desert soils of the Republic of Kalmykia might have stimulated the formation of a coupled biosynthesis apparatus for three key classes of phytohormones (auxins, cytokinins, and gibberellins) in the strain *H. pseudoramosissima* VKM Al-158, and gene cassettes potentially involved in the degradation of aromatic compounds in the strain *N. edaphicum* VKM Al-156. Similar trends can be traced for other southern isolates. For instance, the origin of the strain *A. pirinica* VKM Al-153 from a meadow soil is associated with the recording of the maximum number of signal transduction genes within the studied sample, which theoretically could provide it with higher sensitivity to root exudates during rhizosphere colonization. The specificity of the chestnut soils of the dry steppe, characterized by a severe moisture deficit, may explain the enrichment of the genome of strain *N. minutum* VKM Al-168 with terpenoid and polyketide synthesis pathways potentially involved in interspecies competition. Strains *Nostoc* sp. VKM Al-115 (Tula region) and *Nostoc* sp. VKM Al-56 (Moscow region), isolated from forest soils, demonstrate an increased abundance of carbohydrate and iron transport pathways.

Functional genome profiling revealed a complete nitrogen fixation gene cluster (*nif* cluster) and well-developed phosphate mobilization systems across all strains, which represents a key advantage of cyanobacteria as agrobiotechnological agents (Sharma et al., 2013; Chen et al., 2025). The high abundance of signal transduction and membrane transport genes indicates an ability to efficiently recognize root exudates, migrate into the rhizosphere, and utilize organic compounds secreted by the plant (Santos-Merino et al., 2019; Li et al., 2024). Strain VKM Al-56 is distinguished by the presence of 14 iron metabolism (siderophore) genes, which provides a competitive advantage by limiting iron availability to phytopathogens (Krishnan et al., 2025). The aromatic compound metabolism apparatus identified in *N. edaphicum* VKM Al-156 indicates a potential capacity for herbicide detoxification and the bioremediation of agroecosystems (Książek-Trela et al., 2025). The utilization of non-axenic cultures minimizes the carbon burden on the plant, as the phototrophic backbone independently satisfies the trophic demands of the satellite PGPB “helpers” (Palkina et al., 2025). According to modern concepts, the division of labor between the host and satellites accelerates the mineralization of aromatic structures in the soil (Raj and Shahid, 2026).

A key aspect of this study is that non-axenic cyanobacterial cultures with their natural bacterial environment can be conceptually viewed as natural prototypes and biological models of synthetic microbial communities. In such systems, the phototrophic host acts as a keystone species responsible for primary element fixation and the production of the exopolysaccharide matrix, whereas the heterotrophic satellites function as helper species that protect the consortium from pathogens and enhance its rhizospheric fitness (Li et al., 2024). Analysis of the satellite microbi-

ota revealed the presence of bacteria from the phyla Pseudomonadota and Bacteroidota. The identification of plant growth-promoting bacteria belonging to the genera *Lysobacter*, *Devosia*, and *Achromobacter* aligns with current concepts regarding their crucial role as functional helpers in the rhizosphere. The presence of the genera *Lysobacter* and *Devosia* is traditionally associated with the mechanisms of induced systemic resistance in plants and the biocontrol of pathogens (Abbasi et al., 2021). In the rhizosphere and soil consortia, species of the genus *Lysobacter* are capable of actively suppressing the growth of fungal phytopathogens due to the production of a wide range of extracellular lytic enzymes (Gómez Expósito et al., 2015), while representatives of *Devosia* effectively mitigate the adverse effects of abiotic stresses and enhance seedling vigor (Monjezi et al., 2023). The involvement of *Achromobacter* and *Brevundimonas* in consortium metabolism contributes significantly to nutrient cycling. *Achromobacter* strains complement the general model of metabolic labor division within microbial systems due to their high phosphate-solubilizing activity (Ma et al., 2011; Zhang et al., 2026). In turn, the associated bacteria of the genus *Brevundimonas* demonstrate a pronounced synergistic activity within complex biostimulants, not only intensifying auxin production and phosphorus mobilization (Mukherjee et al., 2022) but also performing biological nitrogen fixation (Naqqash et al., 2020), which directly accelerates root system development and biomass growth of the hosts.

In accordance with the diversity-stability hypothesis, the maximum biocontrol potential and stable manifestation of complex applied traits in the rhizosphere depend on synergistic interspecies interactions at the level of the entire consortium, rather than isolated monocultures (Niu et al., 2017; Trivedi et al., 2020). This theoretically substantiates the applied value of non-axenic cyanobacterial cultures as natural prototypes of synthetic microbial communities, making the selection of such multifunctional natural associations a priority direction for modern agrobiotechnologies.

Concurrently, comprehensive *de novo* profiling (the MAG approach) allows not only for the effective resolution of polyphasic taxonomy issues in terrestrial cyanobacteria (Sudianto et al., 2026) but also for a detailed characterization of the associated microbiota composition, which plays a pivotal role in the functional stability and biotechnological potential of soil consortia (Garcia et al., 2025; Palmer et al., 2025).

Despite the high significance of the findings, the present study has several limitations. The functional characterization of the strains is based exclusively on *in silico* bioinformatic predictions. Although the presence of genetic determinants, such as *nif* clusters or phytohormone biosynthesis pathways, indicates metabolic potential, their actual expression and applied efficiency *in vivo* are heavily dependent on dynamic soil-climatic factors, plant root exudates, and complex epigenetic regulatory networks. An additional challenge when transitioning from laboratory models to real agroecosystems remains the field stability of the consortia, as associative diazotrophs inevitably face intense com-

petition from the native soil microbiome for trophic resources and ecological niches during root colonization. Finally, a significant limitation of current annotation methods is the high proportion of unclassified genes and hypothetical proteins, the number of which in the investigated genomes significantly exceeds that of functionally characterized CDS. This indicates that the actual biotechnological and metabolic potential of the studied autochthonous strains may be substantially higher than predicted; however, its precise identification is currently limited by the fragmentation of reference genetic databases for soil cyanobacteria.

5. Conclusions

As a result of the conducted study, a comprehensive genomic characterization of nine non-axenic soil cyanobacterial strains of the order Nostocales from the All-Russian Collection of Microorganisms was achieved using metagenomic whole-genome sequencing approaches. The application of a *de novo* metagenomic assembly strategy followed by bioinformatic binning allowed for the reconstruction of high-quality genomes of the target phototrophic strains, bypassing the classical step of obtaining pure isolated cultures. Phylogenomic analysis revealed a high degree of distinctness among the investigated strain repository, which allows for the consideration of these strains as candidates for novel species. Nevertheless, the observed novelty may be partially attributed to the current fragmentation of global databases and the shortage of reference sequences for soil cyanobacteria. Profiling of marker ribosomal genes revealed the presence of heterotrophic bacteria belonging to the genera *Devosia*, *Lysobacter*, *Brevundimonas*, *Variovorax*, *Bosea*, *Achromobacter*, and *Pseudoflavitalea*, which confirms the presence of taxa possessing pronounced plant growth-promoting and biocontrol properties within the non-axenic cyanobacterial cultures. Screening of the agrobiotechnological potential confirmed the presence of a universal genetic basis for nitrogen fixation and phosphorus mobilization systems across all nine studied strains. Based on an integrated analysis of genomic profiles for the presence of key agronomically valuable traits (the capacity for phytohormone synthesis, nitrogen fixation, phosphate mobilization, pathogen defense, and abiotic stress tolerance), and considering their taxonomic and biogeographic diversity, the strains *A. pirinica* VKM Al-153, *H. pseudoramosissima* VKM Al-158, and *Nostoc* sp. VKM Al-115 were identified as promising candidates for further plant growth experiments aimed at developing stable, next-generation biological formulations.

Acknowledgements

The authors are deeply grateful to Y.S. Bukin (Laboratory of Genosystematics, Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) for valuable consultations and assistance in the preparation of this study.

This work was supported by the Russian Science Foundation under project no. 25-26-00311.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abo-Shady A.M., Osman M.E.A.H., Gaafar R.M. et al. 2023. Cyanobacteria as a valuable natural resource for improved agriculture, environment, and plant protection. *Water, Air, & Soil Pollution* 234: 313. DOI: [10.1007/s11270-023-06331-7](https://doi.org/10.1007/s11270-023-06331-7)
- Abbasi S., Spor A., Sadeghi A. et al. 2021. Streptomyces strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. *Scientific Reports* 11: 9317. DOI: [10.1038/s41598-021-88495-y](https://doi.org/10.1038/s41598-021-88495-y)
- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403–410. DOI: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aramaki T., Blanc-Mathieu R., Endo H. et al. 2020. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 36: 2251–2252. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz859](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859)
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A. et al. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9: 75. DOI: [10.1186/1471-2164-9-75](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75)
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19: 455–477. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Bowers R.M., Kyrpides N.C., Stepanauskas R. et al. 2017. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology* 35: 725–731. DOI: [10.1038/nbt.3893](https://doi.org/10.1038/nbt.3893)
- Brettin T., Davis J.J., Disz T. et al. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports* 5: 8365. DOI: [10.1038/srep08365](https://doi.org/10.1038/srep08365)
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. DOI: [10.1186/1471-2105-10-421](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421)
- Chamizo S., Mugnai G., Rossi F. et al. 2018. Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: gaining insights for applicability in soil restoration. *Frontiers in Environmental Science* 6: 49. DOI: [10.3389/fenvs.2018.00049](https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00049)
- Chen J., Wang L., Wei X. et al. 2025. Engineering of plant growth-promoting bacteria for sustainable nutrient management and agricultural sustainability. *Journal of Integrative Agriculture* 25(5): 2178–2182. DOI: [10.1016/j.jia.2025.10.021](https://doi.org/10.1016/j.jia.2025.10.021)
- Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20: 1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)
- Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E. 2018. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology* 9: 1636. DOI: [10.3389/fmicb.2018.01636](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636)
- Dvořák P., Jahodářová E., Stanojković A. et al. 2023. Population genomics meets the taxonomy of cyanobacteria. *Algal Research* 72: 103128. DOI: [10.1016/j.algal.2023.103128](https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103128)
- Freese H.M., Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J. et al. 2025. TYGS and LPSN in 2025: a Global Core Biodata Resource for genome-based classification and nomenclature of prokaryotes within DSMZ Digital Diversity. *Nucleic Acids Research* 54(D1): D884–D891. DOI: [10.1093/nar/gkaf1110](https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1110)

- Garcia M., Bruna P., Duran P. et al. 2025. Cyanobacteria and Soil Restoration: Bridging Molecular Insights with Practical Solutions. *Microorganisms* 13(7): 1468. DOI: [10.3390/microorganisms13071468](https://doi.org/10.3390/microorganisms13071468)
- Gómez Expósito R., Postma J., Raaijmakers J.M. et al. 2015. Diversity and Activity of Lysobacter Species from Disease Suppressive Soils. *Frontiers in Microbiology* 6: 1243. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01243](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01243)
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N. et al. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29: 1072–1075. DOI: [10.1093/bioinformatics/btt086](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086)
- Hackmann T.J. 2025. Setting new boundaries of 16S rRNA gene identity for prokaryotic taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 75(4): 006747. DOI: [10.1099/ijsem.0.006747](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006747)
- Jones M.R., Pinto E., Torres M.A. et al. 2021. CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Research* 196: 117017. DOI: [10.1016/j.watres.2021.117017](https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017)
- Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y. et al. 2023. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research* 51: D587–D592. DOI: [10.1093/nar/gkac963](https://doi.org/10.1093/nar/gkac963)
- Kimotho R.N., Maina S. 2024. Unraveling plant–microbe interactions: can integrated omics approaches offer concrete answers? *Journal of Experimental Botany* 75(5): 1289–1313. DOI: [10.1093/jxb/erad448](https://doi.org/10.1093/jxb/erad448)
- Komárek J. 2013. Cyanoprokaryota 3: Heterocytous Genera. In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L., Schagerl M. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. V. 19/3. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kouidhi S., Passmore J.A.S., Setati M.E. et al. 2025. Bridging data gaps: African reference genomes advancing inclusive microbiome research. *Trends in Microbiology* 33(5): 479–482. DOI: [10.1016/j.tim.2025.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.02.001)
- Krishnan K.S., Rangasamy A., Arunan Y.E. et al. 2025. Microbial inoculants – fostering sustainability in groundnut production. *Science Progress* 108(2): 1–39. DOI: [10.1177/00368504251338943](https://doi.org/10.1177/00368504251338943)
- Książek-Trela P., Potocki L., Szpyrka E. 2025. The impact of novel bacterial strains and their consortium on diflufenican degradation in the mineral medium and soil. *Scientific Reports* 15(1): 18051. DOI: [10.1038/s41598-025-02696-3](https://doi.org/10.1038/s41598-025-02696-3)
- Lagesen K., Hallin P. 2007. RNAMmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* 35: 3100–3108. DOI: [10.1093/nar/gkm160](https://doi.org/10.1093/nar/gkm160)
- Lefort V., Desper R., Gascuel O. 2015. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution* 32: 2798–2800. DOI: [10.1093/molbev/msv150](https://doi.org/10.1093/molbev/msv150)
- Letunic I., Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49(W1): W293–W296. DOI: [10.1093/nar/gkab301](https://doi.org/10.1093/nar/gkab301)
- Li J., Li C., Smith S.M. 2017. *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Academic Press Elsevier: London, UK. DOI: [10.1016/B978-0-12-811562-6.00001-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00001-3)
- Li M., Hu J., Wei Z. et al. 2024. Synthetic microbial communities: Sandbox and blueprint for soil health enhancement. *iMeta* 3: e172. DOI: [10.1002/imt2.172](https://doi.org/10.1002/imt2.172)
- Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M. et al. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29(2): 248–258. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.12.001)
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P. et al. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14: 60. DOI: [10.1186/1471-2105-14-60](https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60)
- Meier-Kolthoff J.P., Göker M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 10: 2182. DOI: [10.1038/s41467-019-10210-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3)
- Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J., Peinado-Olarte R.L. et al. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 50: D801–D807. DOI: [10.1093/nar/gkab902](https://doi.org/10.1093/nar/gkab902)
- Monjezi N., Yaghoobian I., Smith D.L. 2023. Cell-free supernatant of *Devosia* sp. (strain SL43) mitigates the adverse effects of salt stress on soybean (*Glycine max* L.) seed vigor index. *Frontiers in Plant Science* 14: 1071346. DOI: [10.3389/fpls.2023.1071346](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1071346)
- Mukherjee A., Singh S., Gaurav A.K. et al. 2022. Harnessing of phytomicrobiome for developing potential bio-stimulant consortium for enhancing the productivity of chickpea and soil health under sustainable agriculture. *Science of the Total Environment* 836: 155550. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.155550](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155550)
- Naqqash T., Imran A., Hameed S. et al. 2020. First report of diazotrophic *Brevundimonas* spp. as growth enhancer and root colonizer of potato. *Scientific Reports* 10: 12893. DOI: [10.1038/s41598-020-69782-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69782-6)
- Niu B., Paulson J.N., Zheng X. et al. 2017. Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(12): E2450–E2459. DOI: [10.1073/pnas.1616148114](https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114)
- Overbeek R., Olson R., Pusch G.D. et al. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42: D206–D214. DOI: [10.1093/nar/gkt1226](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226)
- Palkina K.A., Choob V.V., Yampolsky I.V. et al. 2025. Pros and Cons of Interactions Between Crops and Beneficial Microbes. *Agriculture* 15(12): 2526. DOI: [10.3390/agriculture15242526](https://doi.org/10.3390/agriculture15242526)
- Palmer B., Couradeau E.M., Johansen J.R. et al. 2025. Unraveling the diversity and functional potential of cyanosphere microbiomes assembled from terrestrial cyanobacteria. *bioRxiv*. DOI: [10.1101/2025.06.10.658773](https://doi.org/10.1101/2025.06.10.658773)
- Prabha R., Singh D.P. 2019. Cyanobacterial phylogenetic analysis based on phylogenomics approaches render evolutionary diversification and adaptation: an overview of representative orders. *3 Biotech* 9(3): 87. DOI: [10.1007/s13205-019-1635-6](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1635-6)
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(Database issue): D590–596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)
- Raj A., Shahid M. 2026. In-silico-driven SynCom engineering with cyanobacteria for efficient pesticide degradation: A review. *Algal Research* 95: 104636. DOI: [10.1016/j.algal.2026.104636](https://doi.org/10.1016/j.algal.2026.104636)
- Santos-Merino M., Singh A.K., Ducat D.C. 2019. New applications of synthetic biology tools for cyanobacterial metabolic engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7: 33. DOI: [10.3389/fbioe.2019.00033](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00033)
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30: 2068–2069. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu153](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153)
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H. et al. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2: 587. DOI: [10.1186/2193-1801-2-587](https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587)
- Shayanthan A., Ordoñez P.A.C., Oresnik I.J. 2022. The Role of Synthetic Microbial Communities (SynCom) in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Agronomy* 4: 896307. DOI: [10.3389/fagro.2022.896307](https://doi.org/10.3389/fagro.2022.896307)

Singh J.S., Kumar A., Rai A.N. et al. 2016. Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Frontiers in Microbiology* 7: 529. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00529](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00529)

Sudianto E., Shlafstein M.D., Durieu B. et al. 2026. Taxonomic description of cyanobacteria from extreme habitats through genome-based classification. *Frontiers in Microbiology* 17: 1824103. DOI: [10.3389/fmicb.2026.1824103](https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1824103)

Temraleeva A.D., Sinetova M.A., Gabrielyan D.A. et al. 2025. Cyanobacteria for Plant Growth Promotion: From Taxon and Metabolite Diversity to Large-Scale Cultivation and Agricultural Applications. *Biologia et Biotechnologia* 3: 1. DOI: [10.61847/pbcras.bbt.2025.3.1](https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2025.3.1)

Trivedi P., Leach J.E., Tringe S.G. et al. 2020. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 18(11): 607–621. DOI: [10.1038/s41579-020-0412-1](https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1)

Whitton B.A., Potts M. 2012. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. DOI: [10.1007/978-94-007-3855-3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3)

Wood D.E., Lu J., Langmead B. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20: 257. DOI: [10.1186/s13059-019-1891-0](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0)

Wu D., Seshadri R., Kyrpides N.C. et al. 2025. A metagenomic perspective on the microbial prokaryotic genome census. *Science Advances* 11(3): eadq2166. DOI: [10.1126/sciadv.adq2166](https://doi.org/10.1126/sciadv.adq2166)

Wu Y.W., Simmons B.A., Singer S.W. 2016. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 32: 605–607. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv638](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638)

Yanti Y., Hamid H., Reflin. 2021. Development of the PGPR and Cyanobacteria Consortium for Growth Promotion and Control *Ralstonia syzigii* subsp. *indonesiensis* of Tomato. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 709(1): 012085. DOI: [10.1088/1755-1315/709/1/012085](https://doi.org/10.1088/1755-1315/709/1/012085)

Zhang Y., Jing M., Lyu L. et al. 2026. Principles for Rigorous Design and Application of Synthetic Microbial Communities. *Advanced Science* 13(1): e14750. DOI: [10.1002/advs.202514750](https://doi.org/10.1002/advs.202514750)

Zimenkov D., Ushtanit A. 2025. Comparative Analysis of Evolutionary Distances Using the Genus *Mycobacterium*. *International Journal of Molecular Sciences* 26(21): 10471. DOI: [10.3390/ijms262110471](https://doi.org/10.3390/ijms262110471)

Метагеномно-ассоциированные геномы неаксеничных цианобактерий: таксономия, функциональный потенциал и отбор перспективных штаммов для агrobiотехнологий

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYТемралеева А.Д.^{1*}, Арефьева Н.А.², Каменев А.О.³, Дидович С.В.³¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, проспект Науки, 5, Пушкино, 142290, Россия² Иркутский государственный медицинский университет, ул. Красного Восстания, 2, Иркутск, 664003, Россия³ ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», ул. Киевская, 150, Симферополь, 295043, Россия

АННОТАЦИЯ. Поиск новых высокоэффективных штаммов микроорганизмов и конструирование на их основе полифункциональных микробных препаратов является одним из ключевых векторов развития современных агrobiотехнологий. В настоящей работе с использованием методов полногеномного анализа метагеномов проведена комплексная таксономическая и функциональная характеристика девяти неаксеничных штаммов почвенных нитчатых цианобактерий порядка Nostocales. Сборка геномов, собранных из метагеномов, позволила реконструировать высококачественные геномные последовательности целевых таксонов без трудоемкого этапа аксенизации штаммов. Согласно филогеномному анализу, исследованные культуры занимают обособленное положение на филогенетическом дереве и могут рассматриваться в качестве кандидатов в новые таксоны, что, однако, требует дальнейшей верификации по мере преодоления существующего дефицита референсных геномов почвенных цианобактерий. На основе маркерных рибосомальных генов охарактеризован состав сопутствующей сателлитной микробиоты, локализованной в экзополисахаридных чехлах хозяев. Верифицировано присутствие полезных гетеротрофных бактерий из родов *Devosia*, *Lysobacter*, *Brevundimonas*, *Variovorax*, *Bosea*, *Achromobacter* и *Pseudoflavitalea*, обладающих выраженным ростостимулирующим и биоконтрольным потенциалом. Функциональная аннотация геномов выявила у всех штаммов наличие полного кластера генов азотфиксации и развитых систем мобилизации фосфора. Штамм *Nostoc* sp. VKM Al-56 выделялся уникальным аппаратом метаболизма железа, а *Nostoc edaphicum* VKM Al-156 – путями расщепления ароматических соединений. Интегральный анализ, учитывающий таксономическое и биогеографическое разнообразие, а также наличие ключевых агрономически ценных признаков (способность к синтезу фитогормонов, азотфиксации, мобилизации фосфатов, защите от патогенов и устойчивости к абиотическим стрессам), позволил отобрать три штамма-кандидата для дальнейших прикладных исследований по разработке биопрепаратов для растениеводства: *Nostoc* sp. VKM Al-115, *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158 и *Anabaena pirinica* VKM Al-153.

Ключевые слова: цианобактерии, Nostocales, метагеномно-ассоциированные геномы, синтетические микробные сообщества, агrobiотехнология

Для цитирования: Темралеева А.Д., Арефьева Н.А., Каменев А.О., Дидович С.В. Метагеномно-ассоциированные геномы неаксеничных цианобактерий: таксономия, функциональный потенциал и отбор перспективных штаммов для агrobiотехнологий // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 4. - С. 283-309. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-4-283

1. Введение

Поиск новых штаммов микроорганизмов для создания эффективных биопрепаратов является ключевым фактором обеспечения продовольственной безопасности. По прогнозам, к 2050 году насе-

ление Земли достигнет 9,6 миллиардов человек, что потребует увеличения годового производства зерновых как минимум на 50% (Singh et al., 2016). В условиях истощения резервов новых земель единственной стратегией остается интенсифика-

*Автор для переписки. Адрес e-mail: temraleeva.anna@gmail.com (А.Д. Темралеева)

Поступила: 02 июля 2026;

Принята после доработки: 01 августа 2026;

Опубликована online: 28 августа 2026

© Автор(ы) 2026. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



ция сельского хозяйства, однако существующая модель, основанная на синтетических удобрениях и пестицидах, приводит к деградации плодородия, загрязнению экосистем и росту себестоимости продукции. В качестве альтернативы или дополнения к химической агрономии активно развивается биологизация сельского хозяйства, в которой важное место занимают цианобактерии – фототрофы с уникальным набором агрономически ценных функций: азотфиксация, фосфатмобилизация, синтез фитогормонов и экзополисахаридов (ЭПС) (Whitton and Potts, 2012; Sharma et al., 2013; Temraleeva et al., 2025). Известно более двух тысяч их вторичных метаболитов с выраженной антибактериальной и фунгицидной активностью (Li et al., 2017; Jones et al., 2021; Abo-Shady et al., 2023), а их полисахаридные матриксы формируют гидрогелевую сеть, обеспечивающую структурную целостность почвы и метаболический диалог с ризосферой (Costa et al., 2018).

Современный вектор агробиотехнологии смещается от малоэффективных моноштаммовых культур к конструированию многофункциональных синтетических сообществ (SynCom) (Shayanthan et al., 2022). В таких системах цианобактерии родов *Nostoc* и *Anabaena* выступают в роли фототрофного остова, создающего нишу для сателлитных гетеротрофных бактерий, стимулирующих рост растений, что позволяет запустить каскадную активацию почвенных ферментов и повысить супрессивность к патогенам (Santos-Merino et al., 2019; Yanti et al., 2021; Krishnan et al., 2025). Это особенно важно, поскольку усвояемость традиционных минеральных удобрений не превышает 30-50%, и лишь комплексное микробное воздействие способно раскрыть полноценный трофический потенциал агроэкосистем (Chen et al., 2025).

Однако ключевым лимитирующим фактором внедрения таких технологий остается острый дефицит региональных референсных геномов (Kouidhi et al., 2025). Чистые культуры охватывают менее 10% глобального прокариотического разнообразия (Wu et al., 2025), а эффективность инокулянтов часто снижается при переносе из лаборатории в поле из-за отсутствия адаптации к местным почвенно-климатическим условиям. Решение этой проблемы лежит в переходе к метагеномному секвенированию и сборке геномов из метагеномов (MAG, metagenome-assembled genomes) – геномных последовательностей, реконструируемых из метагеномных данных путем кластеризации контигов, принадлежащих одному таксону, с использованием алгоритмов биннинга. Такой подход особенно актуален для цианобактерий, поскольку получение их аксеничных культур представляет собой крайне сложную и трудоемкую задачу из-за тесных метаболических связей с сопутствующей микробиотой и медленного роста в сравнении с гетеротрофными бактериями-контаминантами. Метагеномное секвенирование неаксеничных штаммов позволяет обойти этап аксенизации и напрямую реконструировать геномы целевых штаммов, что открывает

возможность не только выявлять новые таксоны, но и прогнозировать их функциональный потенциал *in silico*. Более того, сама неаксеничная культура цианобактерий с ее естественным бактериальным окружением может рассматриваться как упрощенная модель SynCom, где фототрофный хозяин и сателлитные гетеротрофы находятся в метаболическом взаимодействии. Изучение геномного состава такой ассоциации позволяет одновременно охарактеризовать цианобактериальный штамм и идентифицировать потенциальных партнеров для конструирования искусственных микробных консорциумов с заданными агрономическими свойствами. В связи с этим поиск и геномная паспортизация перспективных автохтонных штаммов цианобактерий становится первоочередной задачей для разработки стабильных и высокоэффективных биопрепаратов нового поколения.

Целью работы являлась комплексная геномная паспортизация девяти неаксеничных штаммов цианобактерий порядка Nostocales из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) с использованием MAG-подхода, включая их таксономическую идентификацию, функциональное профилирование и идентификацию генетических детерминант, перспективных для агробиотехнологических применений, а также характеристику состава сателлитной микробиоты. Хотя метагеномная сборка геномов цианобактерий уже применялась в ряде исследований, для почвенных штаммов цианобактерий из российских коллекций микроорганизмов такой подход в комплексе с анализом сателлитной микробиоты ранее не применялся. Новизна нашей работы заключается в интегральном анализе неаксеничных культур как природных прототипов синтетических микробных сообществ, что позволяет одновременно охарактеризовать целевой фототрофный штамм и идентифицировать сопутствующие RGPB-бактерии, перспективные для конструирования биопрепаратов.

2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования послужили 9 штаммов почвенных цианобактерий из ВКМ (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино), принадлежащие порядку Nostocales: *Anabaena pirinica* VKM Al-153 (луговая почва, Волгоградская область), *Nostoc commune* VKM Al-35 (солонец, Волгоградская область), *Nostoc punctiforme* VKM Al-37 (солонец, Волгоградская область), *Nostoc* sp. VKM Al-56 (серая лесная почва, Московская область), *Nostoc* sp. VKM Al-115 (серая лесная почва, Тульская область), *Nostoc edaphicum* VKM Al-156 (бурая полупустынная почва, Республика Калмыкия), *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158 (бурая полупустынная почва, Республика Калмыкия), *Nostoc minutum* VKM Al-168 (каштановая почва, Волгоградская область), *Nostoc* sp. VKM Al-310 (залежь, Ставропольский край). Исследуемые штаммы не являлись аксенич-

ными и содержали сопутствующую бактериальную микробиоту. Микроскопию и фотодокументацию морфологии штаммов проводили с помощью микроскопа Leica DM750 с цифровой камерой Flexacam C3 (Leica Microsystems, Германия). Морфологическую идентификацию проводили с использованием определителя гетероцитных цианобактерий (Komárek, 2013).

2.2. Выделение ДНК, высокопроизводительное секвенирование и контроль качества

Подготовку ДНК-библиотек (ферментативная фрагментация, лигирование адаптеров, амплификация) выполняли с использованием набора VANTs Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina V2 (Vazyme, Китай) по протоколу производителя. Качество библиотек контролировали на системе Qsep400 с набором High Sensitivity Cartridge Kit (BiOptic, Тайвань) и флуориметре Qubit 4 с набором Spectra Q HS (Raissol Bio, Россия). Секвенирование (PE150) проводили на платформе SURFseq5000 (GeneMind, Китай) в компании «Медген» (Россия). Качество сырых ридов оценивали в FastQC v0.11.9 (Q-score, GC-состав, адаптерная контаминация, дубликация). Тримминг и удаление адаптеров — в Trimmomatic v0.39 с адаптерными последовательностями SURFseq от «Медген» и параметрами: ILLUMINACLIP:SURFseq_adapters.fa:2:30:10, AVGQUAL:25, MINLEN:75. Ввиду неаксеничности штаммов цианобактерий секвенирование выполнено в режиме глубокой метагеномики.

2.3. Сборка геномов, оценка качества и деконтаминация

Для устранения сигналов от потенциальной контаминации, обусловленной неаксеничным характером цианобактериальных штаммов, был применен многоступенчатый биоинформатический подход к фильтрации данных. *De novo* метагеномную сборку прочтений глубокого секвенирования выполняли с использованием SPAdes v3.15.5 (Bankevich et al., 2012) с опцией --meta и автоматическим подбором k-меров (--k auto). Контиги длиной менее 1000 п.н. удаляли с помощью seqkit v2.9.0. Для таксономической очистки и выделения целевых цианобактериальных геномов из состава ассоциированной сателлитной микробиоты проводили автоматическое бинирование с использованием MaxBin2 v2.2.7 (Wu et al., 2016). Потенциальную нецианобактериальную контаминацию в полученных бинах дополнительно идентифицировали и удаляли с помощью Kraken2 (Wood et al., 2019) по базе данных PlusPFP. На финальном этапе полноту собранных геномов и уровень контаминации верифицировали с использованием CheckM2 v1.1.0 (Chklovski et al., 2023). Для последующего функционального профилирования и аннотации кластеров биосинтеза генов (BGC) оставляли только бины высокого качества, уве-

ренно отнесенные к целевым таксонам цианобактерий, с полнотой > 98% и контаминацией < 4,5%. Общие метрики сборки (N50, общий размер генома, количество контигов) оценивали с помощью QUAST v5.2.0 (Gurevich et al., 2013).

2.4. Идентификация и таксономический анализ генов рРНК

Идентификацию участков, кодирующих гены большой (23S) и малой (16S) субъединиц рибосомальных генов в MAG, проводили путем сопоставления контигов геномных сборок с помощью алгоритма парного выравнивания BLASTn (Altschul et al., 1990) с полноразмерной базой данных рибосомальных генов SILVA (Quast et al., 2013). BLASTn запускали с параметрами: -word_size 12 -gapopen 2 -gapextend 1 -reward 1 -penalty -1 -eval 0,00001. Для таксономической идентификации по 16S рРНК использовали порог идентичности ≥ 90% (Hackmann, 2025), по 23S рРНК — ≥ 89% на основе данных для близкородственных таксонов (Zimenkov and Ushtanit, 2025). Последовательности со значениями ниже указанных порогов исключали из дальнейшего анализа как низкокачественные. Риск включения химерных рибосомальных артефактов в финальный анализ был минимизирован за счет многоступенчатой процедуры деконтаминации (MaxBin2 и Kraken2), при которой гены рРНК анализировались строго в составе изолированных и верифицированных высококачественных бинов (MAGs), исключая попадание перекрестных прочтений из других таксонов. Таксономическая принадлежность детектированных последовательностей определялась согласно классификации базы SILVA.

2.5. Филогеномный анализ

Таксономическую идентификацию и филогенетическое положение исследуемых штаммов определяли с использованием онлайн-платформы Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>) (Meier-Kolthoff and Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022; Freese et al., 2025). Геномные последовательности загружали на сервер и в автоматическом режиме сравнивали с геномами типовых и референсных штаммов, доступными в актуальной базе данных TYGS, а также попарно между собой. Ближайшие родственные штаммы определяли с помощью алгоритма MASH для быстрой оценки межгеномного родства, а также на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, извлеченных из исследуемых геномов с использованием RNAmmer (Lagesen and Hallin, 2007), с последующим BLAST-поиском (Camacho et al., 2009) по базе данных типовых штаммов TYGS. На основании межгеномных расстояний, рассчитанных с использованием Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) (Meier-Kolthoff et al., 2013) по алгоритму 'trimming' и формуле d5, строили филогеномное дерево с помощью FastME 2.1.6 (Lefort et al., 2015) со 100 псевдобутстреп-репликами; значения псевдобутстреп-под-

держки отображали на узлах. В качестве внешней группы использовали геномы *Gloeocapsopsis dulcis* AAB1 и *Chroogloeocystis siderophila* 5.2 s.c.1, относящиеся к отдаленным таксонам класса Cyanophyceae, что обеспечивает корректное укоренение филогенетического дерева. Визуализацию дерева выполняли с использованием платформы iTOL (Letunic and Bork, 2021).

2.6. Функциональная аннотация

Функциональную аннотацию геномов проводили двумя независимыми методами. В первом случае предсказание открытых рамок считывания (ORF) осуществляли с помощью Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014), после чего определяли функциональную принадлежность белков по профилям скрытых марковских моделей (HMM) с использованием утилиты KofamScan v1.3.0 на основе базы данных KEGG (Release 116.0) (Aramaki et al., 2020). Геномное картирование и реконструкцию метаболических путей выполняли в среде KEGG PATHWAY (Kanehisa et al., 2023). Во втором случае аннотацию геномов проводили с использованием алгоритма RASTtk с параметрами по умолчанию на онлайн-сервере RAST (октябрь 2025 г.) (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015). Функциональную категоризацию осуществляли в соответствии с классификацией подсистем SEED (Overbeek et al., 2014).

2.7. Визуализация данных

Визуализацию данных выполняли в среде R с использованием пакетов *ggplot2*, *tidyr*, *dplyr*, *stringr*, *networkD3*, *htmlwidgets* и *webshot2*. На основе данных анализа генов 16S и 23S рРНК строили тепловые карты присутствия/отсутствия таксонов сателлитной микробиоты с указанием процента идентичности. Распределение таксонов по филогенетическим уровням (филум -> класс) отображали в виде санкей-диаграмм. Для сравнительного анализа функционального профиля геномов по агрономически значимым категориям KEGG строили тепловую карту с отображением количества генов в каждой категории.

3. Результаты

3.1. Морфологическая характеристика и эколого-географическое разнообразие штаммов

Морфологически все исследованные штаммы демонстрировали разнообразие морфотипов, характерное для представителей порядка Nostocales (Komárek, 2013). *A. pirinica* VKM Al-153 формировала прямые или слегка изогнутые трихомы, окруженные широким (до 12 мкм) слоем слизи, с бочонковидными вегетативными клетками (3,3-4,2 мкм шириной), эллипсоидными акинетами (12-17,2 × до 8,2 мкм) и интеркалярными гетероцитами (4,3-5,3 мкм). Штаммы рода *Nostoc* характеризовались

наличием плотных колоний различной формы (от шаровидных до червеобразных), бесцветных слизистых оболочек и вегетативных клеток бочонковидной или шаровидной формы. Размеры вегетативных клеток варьировали в зависимости от штамма: от 2,6-3,4 мкм у *Nostoc* sp. VKM Al-310 до 3,3-4,3 мкм у *N. commune* VKM Al-35. Акинеты, где они наблюдались, были преимущественно шаровидными или эллипсоидными, диаметром от 4,6 до 7,7 мкм, за исключением *A. pirinica* VKM Al-153, у которой акинеты достигали 17,2 мкм в длину. Гетероциты располагались интеркалярно или терминально, имели шаровидную, эллипсоидную или конусовидную форму диаметром 3,4-6,1 мкм. *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158 выделялась кустистыми колониями и ложноветвящимися нитями шириной до 9,4 мкм с прочным слоистым влагалищем; ее гетероциты были крупными (до 10,5 мкм шириной и до 20-30 мкм в длину). Все штаммы размножались вегетативно (фрагментацией нитей или колоний), а также с помощью гормогониев и акинет. Микрофотографии штаммов представлены на Рисунке 1.

Изученные штаммы были изолированы из почвенных образцов, отобранных в пяти регионах европейской части Российской Федерации, и представляют широкий спектр почвенно-экологических условий: от луговых и серых лесных почв центральной России до солонцов, каштановых и бурых полупустынных почв южных регионов.

3.2. Качество секвенирования, сборка и характеристика MAG

В результате глубокого метагеномного секвенирования девяти неаксеничных штаммов цианобактерий получено от 16,1 до 23,6 млн парноконцевых прочтений на штамм, что соответствовало 2,4-3,5 Гб сырых данных (Таблица 1).

Прочтения с низким качеством отсутствовали для всех штаммов, что свидетельствует о высоком качестве исходных данных. Среднее содержание GC варьировало от 40 до 46% для большинства штаммов. Высокое содержание GC (65%) в сырых данных штамма VKM Al-310 (Таблица 1), контрастирующее с остальными цианобактериальными штаммами, отражает GC-состав всей метагеномной выборки, включая доминирующую сателлитную микробиоту. После фильтрации и выделения целевого MAG GC-состав этого штамма составил 41% (Таблица 2), что соответствует типичным значениям для представителей порядка Nostocales. Степень дупликации прочтений составила от 32,5% (*Nostoc* sp. VKM Al-156) до 51,7% (*Nostoc* sp. VKM Al-310). После биоинформатической фильтрации и деконтаминации для каждого штамма получены метагеномно-ассоциированные геномы (MAG) высокого качества (Таблица 2).

Полнота собранных геномов варьировала от 98,29% (*N. commune* VKM Al-35) до 100% (*Nostoc* sp. VKM Al-115 и *N. minutum* VKM Al-168), при этом уровень контаминации не превышал 4,52% (в сред-

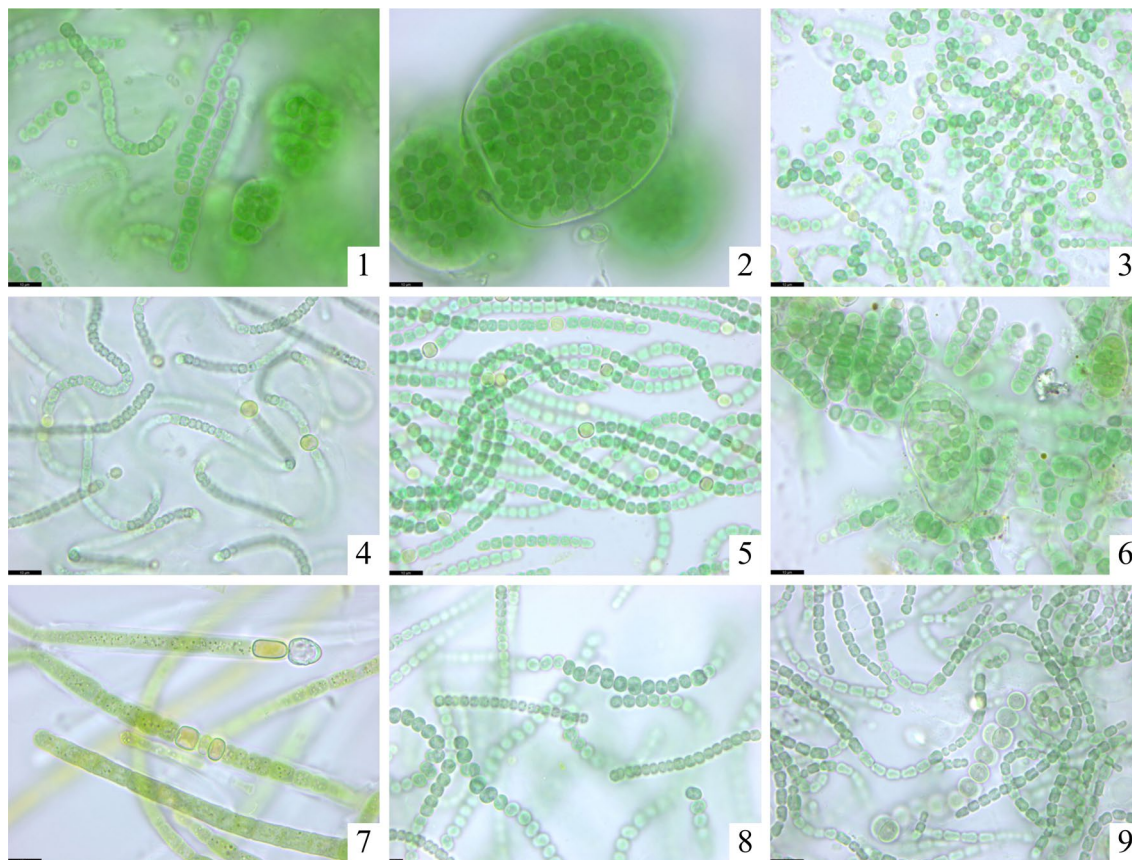


Рис.1. Микрофотографии исследованных штаммов цианобактерий. 1 – *Nostoc commune* VKM Al-35, 2 – *Nostoc punctiforme* VKM Al-37, 3 – *Nostoc* sp. VKM Al-56, 4 – *Nostoc* sp. VKM Al-115, 5 – *Anabaena pirinica* VKM Al-153, 6 – *Nostoc edaphicum* VKM Al-156, 7 – *Hassallia pseudoramosissima* VKM Al-158, 8 – *Nostoc minutum* VKM Al-168, 9 – *Nostoc* sp. VKM Al-310. Шкала 10 мкм.

нем <1%), что соответствует критериям высококачественных MAG. Размеры геномов составляли от 6,32 Мб (*A. pirinica* VKM Al-153) до 9,36 Мб (*N. minutum* VKM Al-168), что находится в диапазоне, характерном для представителей порядка Nostocales. Содержание GC в геномах варьировало от 40 до 42%, за исключением VKM Al-310 (41%). Количество предсказанных CDS составляло от 5477 (*A. pirinica* VKM Al-153) до 8268 (*N. minutum* VKM Al-168). Плотность генов варьировала от 0,787 до 0,824 генов на тысячу пар оснований. Количество контигов в сборках колебалось от 83 (*A. pirinica* VKM Al-153) до 461 (*Nostoc* sp. VKM Al-310), при этом показатель N50, характеризующий непрерывность сборки, варьировал от 46 892 до 126 872 п.н., а максимальная длина контига достигала 421 132 п.н. (*N. punctiforme* VKM Al-37). Таким образом, все

полученные MAG соответствовали критериям высокого качества (полнота >98%, контаминация <5%) и пригодны для последующего функционального профилирования и таксономической идентификации (Bowers et al., 2017).

3.3. Филогеномный анализ

Согласно результатам идентификационной процедуры TYGS, все девять штаммов были охарактеризованы как потенциально новые виды, которые могут рассматриваться в качестве кандидатов в новые таксоны, что, однако, требует дальнейшей верификации с привлечением данных по морфологии, физиологии и экологии, а также по мере пополнения референсных баз данных геномами почвенных цианобактерий. На основании межгеномных

Таблица 1. Метрики качества сырых данных секвенирования

Номер штамма VKM Al	Всего прочтений	Всего оснований, Гб	Прочтения с низким качеством	Среднее содержание GC, %	Степень дублирования, %
35	23611455	3,5	0	41	46,7
37	21004509	3,1	0	41	45,4
56	19426989	2,9	0	41	45,4
115	19849606	2,9	0	41	46,7
153	18882848	2,8	0	40	35,6
156	18508027	2,7	0	46	32,5
158	17991330	2,6	0	41	44
168	19855856	2,9	0	41	41,4
310	16122818	2,4	0	65	51,7

Таблица 2. Метрики качества сборки геномов после биннинга и деконтаминации

Номер штамма VKM AI	Степень полноты генома, %	Контаминация, %	Размер генома, Мб	GC, %	Количество CDS	Плотность генов, (генов/Кб)	Количество контигов	N50, п.н.	Макс. длина Контига, п.н.
35	98,29	4,52	8,79	42	7695	0,803	175	122592	349144
37	99,99	0,5	8,37	42	7386	0,803	224	92142	421132
56	99,97	0,19	6,90	41	5949	0,822	121	116923	360614
115	100	0,12	9,17	41	7862	0,812	248	78921	250931
153	99,95	0,5	6,32	40	5477	0,824	83	126872	357633
156	99,98	0,95	7,74	42	6869	0,795	176	81748	403056
158	99,86	0,35	7,41	42	6869	0,792	325	46892	171368
168	100	0,6	9,36	42	8268	0,813	311	77873	314191
310	99,99	0,5	8,21	41	7233	0,787	461	50634	197625

Примечание. CDS – кодирующая последовательность.

GBDP-расстояний было построено филогенное дерево (Рис. 2), со средней псевдобутстреп-поддержкой ветвей 89,2%, что свидетельствует о высокой надежности топологии дерева.

Анализ филогенного дерева показал, что штаммы *N. edaphicum* VKM AI-156 и *H.*

pseudoramosissima VKM AI-158 формируют общую кладу с высокой поддержкой, что указывает на их близкое родство. Штаммы *N. commune* VKM AI-35, *N. punctiforme* VKM AI-37, *Nostoc* sp. VKM AI-115 и *N. minutum* VKM AI-168 группируются в одну кладу, тогда как *Nostoc* sp. VKM AI-56, *A. pirinica* VKM AI-153

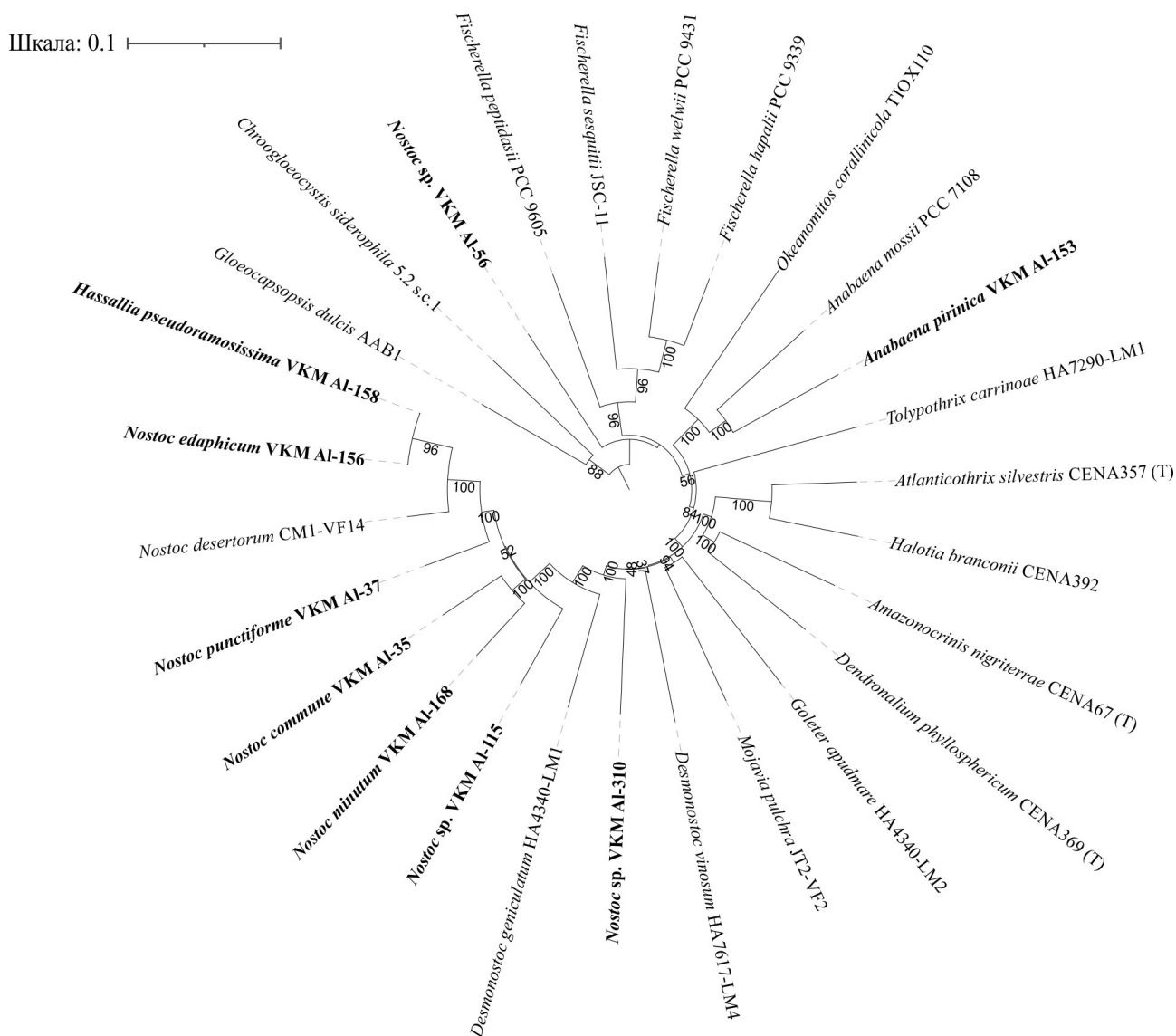


Рис.2. Филогенное дерево исследуемых штаммов цианобактерий, построенное по данным TYGS.

Примечание. Штаммы VKM выделены жирным шрифтом.

и *Nostoc* sp. VKM Al-310 занимают обособленные положения. Следует отметить, что кластеризация на основе полногеномных данных не всегда согласуется с филогенией по 16S рРНК, что, вероятно, обусловлено различиями в разрешающей способности маркеров (Prabha and Singh, 2019; Dvořák et al., 2023).

3.4. Состав сателлитной микробиоты в неаксеничных штаммах цианобактерий

Анализ генов 16S и 23S рРНК, идентифицированных в метагеномных сборках неаксеничных культур цианобактерий, позволил охарактеризовать таксономический состав сопутствующей бактериальной микробиоты (Рис. 3, 4). После фильтрации последовательностей с идентичностью ниже установленных порогов ($\geq 90\%$ для 16S рРНК, $\geq 89\%$ для 23S рРНК) в исследованных штаммах детектированы сателлитные бактерии, относящиеся к филумам Pseudomonadota (классы Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria) и Bacteroidota (класс Bacteroidia). Распределение сателлитных филумов по штаммам-хозяевам было неравномерным. Наиболее разнообразный состав ассоциированных бактерий отмечен для *N. edaphicum* VKM Al-156, у которого по данным 23S рРНК выявлены представители трех родов филума Pseudomonadota. Штамм *A. pirinica* VKM Al-153 ассоциирован с двумя филумами – Pseudomonadota и Bacteroidota. Штаммы VKM Al-56 и VKM Al-310 содержали представителей филума Pseudomonadota. Штаммы VKM Al-35, VKM Al-37, VKM Al-115, VKM Al-168 и VKM Al-158 не содержали сателлитных таксонов, идентифицированных по маркерным генам с надежной идентичностью.

Для количественной оценки доли сателлитной микробиоты использовали взвешенный по размеру генома подход на основе данных о глубине покрытия и размерах геномов всех бинов, полученных в результате биннинга. Расчет показал, что в трех штаммах (VKM Al-35, VKM Al-37, VKM Al-115) сателлитные бины не были детектированы (доля $< 0,5\%$). В штаммах с выявленной сателлитной

микробиотой ее доля варьировала от 2,04% (VKM Al-56) до 95,94% (VKM Al-310). В штамме VKM Al-158 сателлитная бактерия доминировала в культуре (90,84%), в VKM Al-156 и VKM Al-153 ее доля составила 29,59% и 26,21% соответственно, а в VKM Al-168 – 11,19%.

Анализ маркерных рибосомальных генов позволил детально охарактеризовать состав и структуру консервативного ядра гетеротрофной сателлитной микробиоты, локализованной в экзополисахаридных чехлах исследованных культур (Рис. 4). Штамм *A. pirinica* VKM Al-153 характеризовался наличием родов *Pseudoflavitalea* и *Devosia*. У штамма *N. edaphicum* VKM Al-156 были идентифицированы три рода класса Alphaproteobacteria: *Bosea*, *Brevundimonas* и *Variovorax*. У штамма *Nostoc* sp. VKM Al-56 в метагеномной сборке были обнаружены роды *Brevundimonas* и *Achromobacter*. Особый интерес вызвал профиль штамма *Nostoc* sp. VKM Al-310. Из-за высокой консервативности рибосомальных последовательностей внутри общего семейства Xanthomonadaceae ассоциированный бактериальный контиг этой культуры показал неоднозначную классификацию на разных уровнях биоинформатического разрешения. По данным гена 16S рРНК таксон был отнесен к роду *Xanthomonas* со сходством 90,6%, тогда как анализ гена 23S рРНК позволил уточнить систематику и верифицировать этот биоконтрольный штамм как *Lysobacter* (сходство 96,8%). Для остальных пяти штаммов (VKM Al-35, VKM Al-37, VKM Al-115, VKM Al-158 и VKM Al-168) рибосомальные маркеры сопутствующей микробиоты в метагеномных контигах не были детектированы вовсе.

Важно отметить, что отсутствие детекции сателлитных рибосомальных маркеров или отдельных бинов сопутствующей микробиоты для ряда штаммов не означает полной биологической стерильности данных культур. Подобный результат может быть связан с низким относительным обилием сопутствующих бактерий, недостаточной глубиной секвенирования для их покрытия, либо с тем, что геномы сателлитов не были ассемблированы в отдельные бины в силу фрагментарности данных.

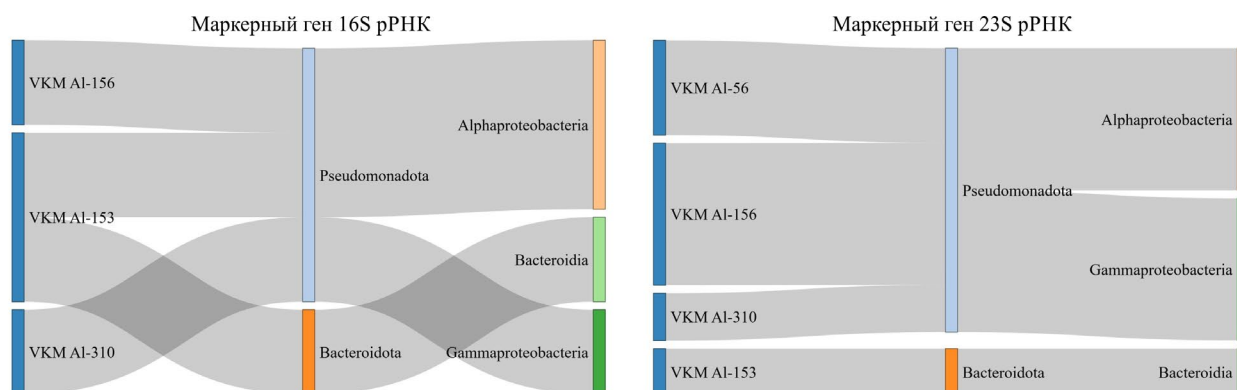


Рис.3. Санкей-диаграммы распределения сателлитных таксонов бактерий по филогенетическим уровням на основе данных 16S и 23S рРНК генов.

Примечание. Ширина потоков пропорциональна числу детектированных таксонов. Штаммы цианобактерий VKM выделены синим цветом; другие бактериальные филумы и классы дифференцированы цветовой кодировкой.

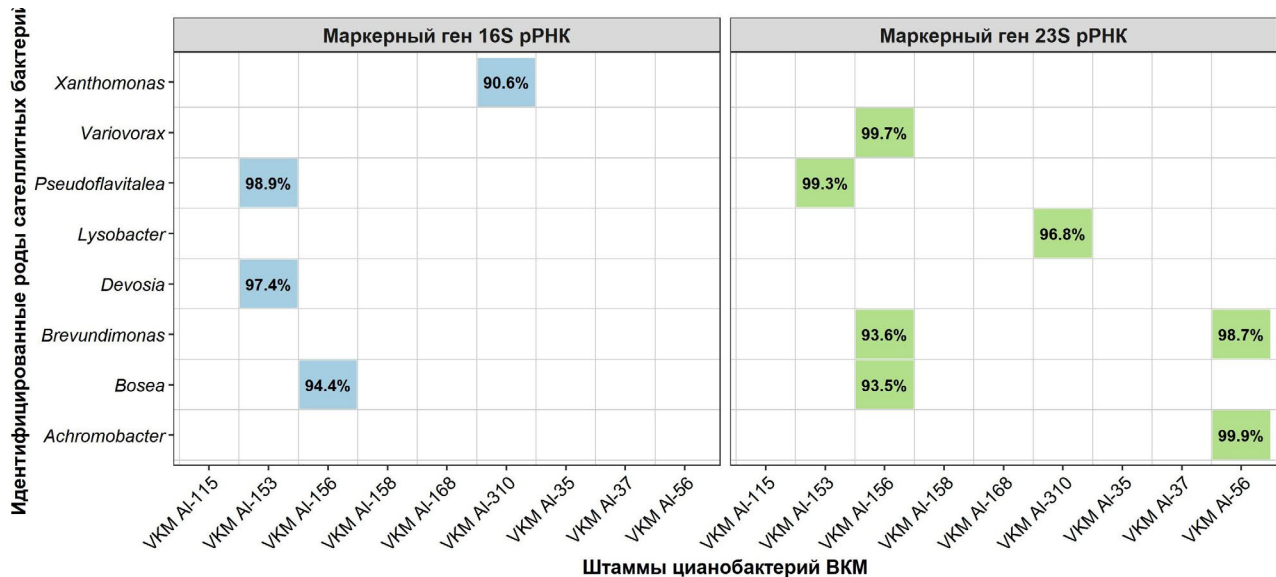


Рис.4. Присутствие спутанных бактериальных таксонов в неаксеничных штаммах цианобактерий VKM по данным генов 16S и 23S рРНК.
Примечание. В ячейках указан процент идентичности последовательности с референсной базой SILVA.

3.5. Общая характеристика функционального профиля геномов

Функциональную аннотацию девяти метабеномно-ассоциированных геномов (MAG) цианобактерий проводили с использованием Prokka в сочетании с KofamScan (KEGG) (Таблица 3).
Общее количество предсказанных генов варьировало от 5701 (*A. pirinica* VKM AI-153) до 8157 (*N. minutum* VKM AI-168). Доля белок-кодирующих генов (CDS) составляла 98,1-99,1% от общего числа предсказанных генов. Количество гипотетических белков, для которых не удалось определить функцию, колебалось от 2337 (*A. pirinica* VKM AI-153) до 3011 (*N. minutum* VKM AI-168). Число генов с идентифицированной ферментативной функцией составило от 1115 (*A. pirinica* VKM AI-153) до 1397 (*N. minutum* VKM AI-168), что соответствует 17,8-19,6% от общего числа предсказанных генов. Полученные данные свидетельствуют о типичном для представителей порядка Nostocales функциональном репертуаре, при этом различия в количестве предсказанных

генов и аннотированных функций отражают таксономическое разнообразие исследованных штаммов. Полные функциональные профили по аннотации KEGG и RAST для всех девяти исследуемых геномов приведены в таблицах S1 и S2 соответственно.

3.6. Анализ агробиотехнологического потенциала штаммов

Комплексный сравнительный анализ функциональных профилей исследуемых геномов позволил распределить метаболические пути по ключевым агрономически значимым категориям и выявить выраженную специализацию штаммов (Рис. 5, Таблица S1, S2).
Максимальное число генов у всех исследованных цианобактерий ожидаемо сосредоточено в блоках общего метаболизма и клеточной сигнализации. В частности, наиболее репрезентативными оказались регуляторные пути «Метаболизм углеводов» (от 311 у штамма VKM AI-153 до 417 у VKM

Таблица 3. Результаты функциональной аннотации геномов по данным Prokka и KofamScan.

Номер штамма VKM AI	Количество предсказанных генов	Количество белок-кодирующих генов	Количество не гипотетических белков	Количество генов, для которых определена ферментативная функция
35	7680	7583	2995	1367
37	7361	7268	2950	1345
56	5998	5904	2637	1224
115	7834	7741	2995	1394
153	5701	5650	2337	1115
156	6858	6786	2759	1288
158	6613	6544	2614	1214
168	8157	8063	3011	1397
310	7031	6943	2933	1358

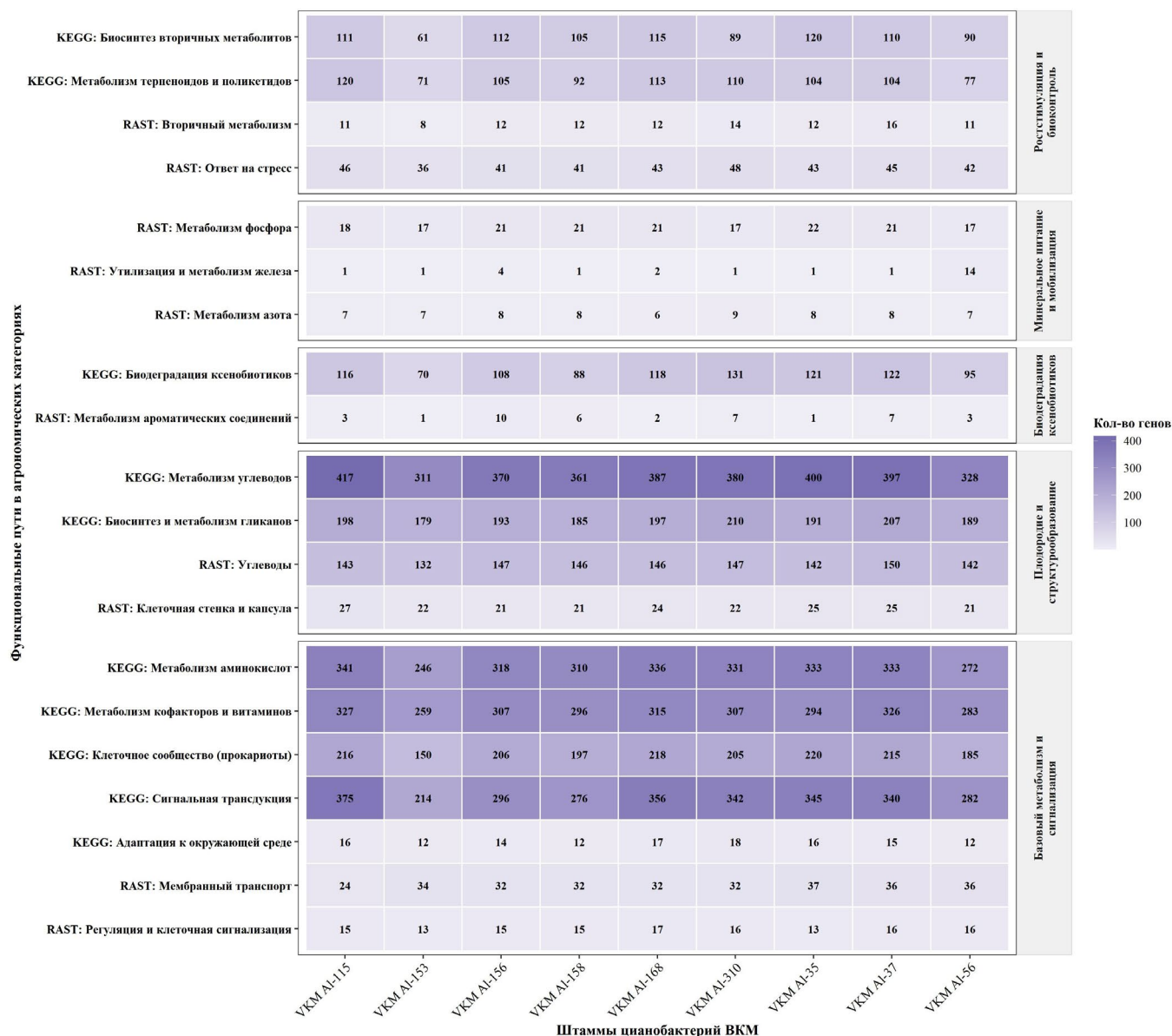


Рис.5. Тепловая карта представленности генов в агрономически значимых функциональных категориях в геномах исследованных штаммов цианобактерий.

Al-115) и «Метаболизм аминокислот» (от 246 у VKM Al-153 до 341 у VKM Al-115). Подобная избыточность фундаментальных путей отражает высокие энергетические и пластические потребности фотоавтотрофных микроорганизмов. Примечательно, что высокая насыщенность генами углеводного обмена и биосинтеза гликанов у штаммов рода *Nostoc* (в первую очередь VKM Al-115) генетически определяет их способность к активному формированию экзополисахаридного матрикса, играющего ключевую роль в структурообразовании почвы и защите ризосферы от высыхания. Категории, формирующие блок «Стимуляция роста растений и биоконтроль фитопатогенов», представлены умеренно. Так, пути «Биосинтез вторичных метаболитов» и «Метаболизм терпеноидов и поликетидов» включают от 61 до 120 и от 71 до 120 генов соответственно. Наибольший потенциал к синтезу антимикробных соединений и нерибосомальных пептидов, вовлеченных в супрессию фитопатогенов, наблюдается у штаммов VKM Al-115 и VKM Al-168. Интересно, что эти же штаммы демонстри-

руют и самые высокие показатели регуляторных систем, включая «Сигнальную трансдукцию» (375 и 356 генов), «Метаболизм кофакторов и витаминов» (327 и 315 генов) и «Адаптацию к окружающей среде» (16 и 17 генов соответственно), что может указывать на их высокую лабильность и конкурентоспособность при колонизации растительных тканей. В блоке минерального питания у всех изученных культур обнаружен полный функциональный кластер генов азотфиксации (*nif*-кластер), а также развитый комплекс генов мобилизации фосфатов (включая фитазы, фосфатазы и специализированные транспортные системы). Однако в отношении метаболизма железа выявлена определенная специфика: штамм VKM Al-56 резко выделяется на общем фоне наличием 14 генов утилизации и транспорта железа (сидерофоров), тогда как у остальных исследованных штаммов этот показатель варьирует в пределах всего 1-4 генов. Это позволяет рассматривать VKM Al-56 в качестве возможного агента для преодоления железодефицита в агроценозах.

4. Обсуждение

В настоящей работе на основе глубокого метагеномного секвенирования неаксеничных культур получены метагеномно-ассоциированные геномы девяти штаммов цианобактерий порядка *Nostocales*, выделенных из различных почвенно-климатических зон европейской части России. Используемый подход подтвердил свою эффективность для работы с неаксеничными штаммами и позволил провести полноценный таксономический и функциональный анализ без этапа аксенизации, которая для цианобактерий представляет собой крайне сложную задачу из-за медленного роста и тесных метаболических связей с сопутствующей микробиотой (Wu et al., 2025). Полученные MAG высокого качества обеспечили надежную основу для таксономической идентификации и функционального профилирования. Результаты анализа на сервере TYGS показали, что все девять штаммов представляют собой потенциально новые виды, что согласуется с данными о недостаточной изученности почвенных цианобактерий, но может быть обусловлено также дефицитом референсных геномов в международных базах генетической информации. Отметим, что кластеризация на основе полногеномных данных не всегда согласуется с филогенией по гену 16S рРНК, что, вероятно, обусловлено различиями в разрешающей способности этих подходов (Prabha and Singh, 2019; Dvořák et al., 2023).

Морфологические наблюдения подтвердили наличие развитых слизистых чехлов у всех исследованных штаммов. Согласно мультиомиксным моделям ризосферных взаимодействий, интенсивное производство ЭПС позволяет микробным консорциумам удерживать влагу у корней, оптимизировать обмен метаболитами и защищать партнеров в условиях окислительного и осмотического стресса (Costa et al., 2018; Kimotho and Maina, 2024). Развитый ЭПС-аппарат также выполняет биомеханическую функцию, повышая противозерозионную стойкость почв (Chamizo et al., 2018). Наибольший потенциал к формированию ЭПС-матрикса, согласно числу генов биосинтеза гликанов, продемонстрировали штаммы *Nostoc* sp. VKM Al-115 и *N. minutum* VKM Al-168, что делает их предпочтительными кандидатами для применения в почвах, подверженных эрозии и деградации.

Широкий спектр почвенно-климатических условий, из которых были изолированы исследованные штаммы, позволяет предполагать наличие у них генетических адаптаций к различным стрессовым факторам – засолению, засухе, дефициту питательных веществ. Это делает их перспективными кандидатами для разработки биопрепаратов, эффективных в широком диапазоне агроэкологических условий, что особенно актуально для почв южных регионов России, подверженных деградации (Chen et al., 2025). Биоинформационный анализ позволяет предположить наличие определенной связи между экологическими особенностями мест происхождения штаммов и функциональным профилем. В частности, изоляция штаммов *N. commune*

VKM Al-35 и *N. punctiforme* VKM Al-37 из солонцовых почв Волгоградской области совпадает с фиксацией у них наиболее высоких показателей по путям углеводного и аминокислотного обменов. Это может указывать на развитый генетический потенциал к синтезу внутриклеточных осмопротекторов, необходимых для выживания при повышенном осмотическом давлении. Напротив, адаптация к засушливым условиям полупустынных почв Республики Калмыкия могла стимулировать формирование у штамма *N. pseudoramosissima* VKM Al-158 сопряженного аппарата биосинтеза фитогормонов трех ключевых классов (ауксинов, цитокининов и гиббереллинов), а у штамма *N. edaphicum* VKM Al-156 – каскет, потенциально вовлеченных в деградацию ароматических соединений. Сходные тренды прослеживаются и для других южных изолятов. Так, происхождение штамма *A. pirinica* VKM Al-153 из луговой почвы сопряжено с фиксацией максимального для исследованной выборки числа генов сигнальной трансдукции, что теоретически может обеспечивать ему более высокую чувствительность к корневым экссудатам при колонизации ризосферы. Специфика каштановых почв сухой степи, характеризующихся жестким дефицитом влаги, может объяснять обогащение генома штамма *N. minutum* VKM Al-168 путями синтеза терпеноидов и поликетидов, потенциально участвующих в межвидовой конкуренции. Штаммы *Nostoc* sp. VKM Al-115 (Тульская область) и *Nostoc* sp. VKM Al-56 (Московская область), выделенные из лесных почв, демонстрируют повышенную представленность углеводных и железо-транспортных путей.

Функциональное профилирование геномов выявило у всех штаммов полный кластер генов азотфиксации (*nif*-кластер) и развитые системы мобилизации фосфатов, что является ключевым преимуществом цианобактерий как агробιοтехнологических агентов (Sharma et al., 2013; Chen et al., 2025). Высокая представленность генов сигнальной трансдукции и мембранного транспорта указывает на способность эффективно распознавать корневые экссудаты, мигрировать в ризосферу и утилизировать органические соединения, выделяемые растением (Santos-Merino et al., 2019; Li et al., 2024). Штамм VKM Al-56 выделяется наличием 14 генов метаболизма железа (сидерофоры), что обеспечивает конкурентное преимущество за счет ограничения доступности железа для фитопатогенов (Krishnan et al., 2025). Выявленный у *N. edaphicum* VKM Al-156 аппарат метаболизма ароматических соединений указывает на возможный потенциал для детоксикации гербицидов и биологической очистки агроэкосистем (Książek-Trela et al., 2025). Использование неаксеничных культур минимизирует углеродное бремя на растение, поскольку фототрофный остов самостоятельно обеспечивает трофические потребности сателлитных PGPB-«помощников» (Palkina et al., 2025). Согласно современным представлениям, разделение труда между хозяином и сателлитами ускоряет минерализацию ароматических структур в почве (Raj and Shahid, 2026).

Ключевым аспектом данного исследования является то, что неаксеничные культуры цианобактерий с их естественным бактериальным окружением могут концептуально рассматриваться в качестве природных прототипов и биологических моделей искусственных микробных сообществ. В таких системах фототрофный хозяин выступает в роли ключевого вида (*keystone species*), ответственного за первичную фиксацию элементов и наработку экзополисахаридного матрикса, тогда как гетеротрофные сателлиты выполняют функции видов-помощников (*helper species*), защищающих консорциум от патогенов и повышающих его ризосферный фитнес (Li et al., 2024). Анализ сателлитной микробиоты выявил присутствие бактерий филумов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Идентификация бактерий, стимулирующих рост растений, из родов *Lysobacter*, *Devosia* и *Achromobacter* согласуется с современными представлениями об их важной роли в качестве функциональных помощников в ризосфере. Присутствие родов *Lysobacter* и *Devosia* традиционно связывают с механизмами индукции системной устойчивости растений и биоконтроля патогенов (Abbasi et al., 2021). В ризосфере и почвенных консорциумах виды рода *Lysobacter* способны активно подавлять рост грибных фитопатогенов за счет продукции широкого спектра внеклеточных литических ферментов (Gómez Expósito et al., 2015), а представители *Devosia* эффективно нивелируют негативные последствия абиотических стрессов и повышают силу проростков (Monjezi et al., 2023). Участие *Achromobacter* и *Brevundimonas* в метаболизме консорциумов вносит существенный вклад в круговорот элементов питания. Штаммы *Achromobacter* дополняют общую модель разделения метаболического труда внутри микробных систем за счёт высокой фосфатмобилизующей активности (Ma et al., 2011; Zhang et al., 2026). В свою очередь, ассоциированные бактерии рода *Brevundimonas* демонстрируют выраженную синергетическую активность в составе комплексных биостимуляторов, не только интенсифицируя продукцию ауксинов и мобилизацию фосфора (Mukherjee et al., 2022), но и осуществляя биологическую азотфиксацию (Naqqash et al., 2020), что напрямую ускоряет развитие корневой системы и рост биомассы хозяев.

В соответствии с гипотезой устойчивости за счет разнообразия, максимальный биоконтрольный потенциал и стабильное проявление комплексных прикладных признаков в ризосфере зависят от синергетических межвидовых взаимодействий на уровне всего консорциума, а не изолированных монокультур (Niu et al., 2017; Trivedi et al., 2020). Это теоретически обосновывает прикладную ценность неаксеничных культур цианобактерий как естественных прототипов искусственных микробных сообществ, делая отбор таких многофункциональных природных ассоциаций приоритетным направлением для современных агробиотехнологий.

В то же время комплексное *de novo* профилирование (MAG-подход) позволяет не только эффективно решать проблемы полифазной таксономии

почвенных цианобактерий (Sudianto et al., 2026), но и детально охарактеризовать состав ассоциированной микробиоты, играющей ключевую роль в функциональной стабильности и биотехнологическом потенциале почвенных консорциумов (Garcia et al., 2025; Palmer et al., 2025).

Несмотря на высокую значимость полученных результатов, настоящее исследование имеет ряд ограничений. Функциональная характеристика штаммов основана исключительно на биоинформатическом прогнозировании *in silico*. Хотя присутствие таких детерминант, как *nif*-кластеры или пути биосинтеза фитогормонов, указывает на метаболический потенциал штаммов, их фактическая экспрессия и прикладная эффективность *in vivo* в значительной степени зависят от динамических почвенно-климатических факторов, корневых экссудатов растений и сложных эпигенетических регуляторных сетей. Дополнительным вызовом при переходе от лабораторных моделей к реальным агроэкосистемам остается полевая стабильность консорциумов: ассоциативные diaзотрофы неизбежно сталкиваются с жесткой конкуренцией со стороны нативного почвенного микробиома за трофические ресурсы и экологические ниши колонизации корней. Наконец, существенным ограничением современных методов аннотации является высокая доля неклассифицированных генов и гипотетических белков, количество которых в исследованных геномах значительно превышает число функционально охарактеризованных CDS. Это указывает на то, что реальный биотехнологический и метаболический потенциал изученных аборигенных штаммов может быть существенно выше выявленного, однако его точная идентификация в настоящее время лимитирована фрагментарностью референсных баз данных генетической информации для почвенных цианобактерий.

5. Заключение

В результате проведенного исследования осуществлена комплексная геномная паспортизация девяти неаксеничных штаммов почвенных цианобактерий порядка *Nostocales* из Всероссийской коллекции микроорганизмов с использованием подходов полногеномного анализа метагеномов. Применение стратегии *de novo* метагеномной сборки и последующего биоинформатического биннинга позволило реконструировать высококачественные геномы целевых фототрофных штаммов, минуя классический этап получения чистых изолированных линий. Филогеномный анализ выявил высокую степень обособленности исследованного фонда, что позволяет рассматривать данные штаммы в качестве кандидатов в новые виды. Тем не менее, наблюдаемая новизна может быть частично обусловлена текущей фрагментарностью глобальных баз данных и дефицитом референсных последовательностей почвенных цианобактерий. Профилирование маркерных рибосомальных генов выявило присутствие гетеротрофных бактерий родов *Devosia*, *Lysobacter*,

Brevundimonas, *Variovorax*, *Bosea*, *Achromobacter* и *Pseudoflavitalea*, что подтверждает наличие в неаксеничных цианобактериальных культурах таксонов, обладающих выраженными ростостимулирующими и биоконтрольными свойствами. Скрининг агро-биотехнологического потенциала подтвердил наличие универсального генетического базиса азотфиксации и систем мобилизации фосфора у всех девяти изученных штаммов. На основании интегрального анализа геномных профилей на наличие ключевых агрономически ценных признаков (способность к синтезу фитогормонов, азотфиксации, мобилизации фосфатов, защите от патогенов и устойчивости к абиотическим стрессам), а также учитывая таксономическое и биогеографическое разнообразие, штаммы *A. pirinica* VKM Al-153, *H. pseudoramosissima* VKM Al-158 и *Nostoc* sp. VKM Al-115 были определены как перспективные кандидаты для проведения дальнейших вегетационных экспериментов в целях создания стабильных биопрепаратов нового поколения.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность к.б.н., с.н.с. лаборатории геносистематики ЛИН СО РАН Ю.С. Букину за ценные консультации и помощь при подготовке данной работы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №25-26-00311.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Abo-Shady A.M., Osman M.E.A.H., Gaafar R.M. et al. 2023. Cyanobacteria as a valuable natural resource for improved agriculture, environment, and plant protection. *Water, Air, & Soil Pollution* 234: 313. DOI: [10.1007/s11270-023-06331-7](https://doi.org/10.1007/s11270-023-06331-7)
- Abbasi S., Spor A., Sadeghi A. et al. 2021. Streptomyces strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. *Scientific Reports* 11: 9317. DOI: [10.1038/s41598-021-88495-y](https://doi.org/10.1038/s41598-021-88495-y)
- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403–410. DOI: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aramaki T., Blanc-Mathieu R., Endo H. et al. 2020. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 36: 2251–2252. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz859](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859)
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A. et al. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9: 75. DOI: [10.1186/1471-2164-9-75](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75)
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19: 455–477. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Bowers R.M., Kyrpidis N.C., Stepanauskas R. et al. 2017. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG)

of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology* 35: 725–731. DOI: [10.1038/nbt.3893](https://doi.org/10.1038/nbt.3893)

Brettin T., Davis J.J., Disz T. et al. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports* 5: 8365. DOI: [10.1038/srep08365](https://doi.org/10.1038/srep08365)

Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. DOI: [10.1186/1471-2105-10-421](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421)

Chamizo S., Mugnai G., Rossi F. et al. 2018. Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: gaining insights for applicability in soil restoration. *Frontiers in Environmental Science* 6: 49. DOI: [10.3389/fenvs.2018.00049](https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00049)

Chen J., Wang L., Wei X. et al. 2025. Engineering of plant growth-promoting bacteria for sustainable nutrient management and agricultural sustainability. *Journal of Integrative Agriculture* 25(5): 2178–2182. DOI: [10.1016/j.jia.2025.10.021](https://doi.org/10.1016/j.jia.2025.10.021)

Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2023. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20: 1203–1212. DOI: [10.1038/s41592-023-01940-w](https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w)

Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E. 2018. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology* 9: 1636. DOI: [10.3389/fmicb.2018.01636](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636)

Dvořák P., Jahodářová E., Stanojković A. et al. 2023. Population genomics meets the taxonomy of cyanobacteria. *Algal Research* 72: 103128. DOI: [10.1016/j.algal.2023.103128](https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103128)

Freese H.M., Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J. et al. 2025. TYGS and LPSN in 2025: a Global Core Biodata Resource for genome-based classification and nomenclature of prokaryotes within DSMZ Digital Diversity. *Nucleic Acids Research* 54(D1): D884–D891. DOI: [10.1093/nar/gkaf1110](https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1110)

Garcia M., Bruna P., Duran P. et al. 2025. Cyanobacteria and Soil Restoration: Bridging Molecular Insights with Practical Solutions. *Microorganisms* 13(7): 1468. DOI: [10.3390/microorganisms13071468](https://doi.org/10.3390/microorganisms13071468)

Gómez Expósito R., Postma J., Raaijmakers J.M. et al. 2015. Diversity and Activity of Lysobacter Species from Disease Suppressive Soils. *Frontiers in Microbiology* 6: 1243. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01243](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01243)

Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N. et al. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29: 1072–1075. DOI: [10.1093/bioinformatics/btt086](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086)

Hackmann T.J. 2025. Setting new boundaries of 16S rRNA gene identity for prokaryotic taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 75(4): 006747. DOI: [10.1099/ijsem.0.006747](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006747)

Jones M.R., Pinto E., Torres M.A. et al. 2021. CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Research* 196: 117017. DOI: [10.1016/j.watres.2021.117017](https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017)

Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y. et al. 2023. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research* 51: D587–D592. DOI: [10.1093/nar/gkac963](https://doi.org/10.1093/nar/gkac963)

Kimotho R.N., Maina S. 2024. Unraveling plant–microbe interactions: can integrated omics approaches offer concrete answers? *Journal of Experimental Botany* 75(5): 1289–1313. DOI: [10.1093/jxb/erad448](https://doi.org/10.1093/jxb/erad448)

Komárek J. 2013. Cyanoprokaryota 3: Heterocytous Genera. In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L., Schagerl M. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. V. 19/3. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Kouidhi S., Passmore J.A.S., Setati M.E. et al. 2025. Bridging data gaps: African reference genomes advancing inclusive microbiome research. *Trends in Microbiology* 33(5): 479–482. DOI: [10.1016/j.tim.2025.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.02.001)

- Krishnan K.S., Rangasamy A., Arunan Y.E. et al. 2025. Microbial inoculants – fostering sustainability in groundnut production. *Science Progress* 108(2): 1–39. DOI: [10.1177/00368504251338943](https://doi.org/10.1177/00368504251338943)
- Książek-Trela P., Potocki L., Szpyrka E. 2025. The impact of novel bacterial strains and their consortium on diflufenican degradation in the mineral medium and soil. *Scientific Reports* 15(1): 18051. DOI: [10.1038/s41598-025-02696-3](https://doi.org/10.1038/s41598-025-02696-3)
- Lagesen K., Hallin P. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* 35: 3100–3108. DOI: [10.1093/nar/gkm160](https://doi.org/10.1093/nar/gkm160)
- Lefort V., Desper R., Gascuel O. 2015. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution* 32: 2798–2800. DOI: [10.1093/molbev/msv150](https://doi.org/10.1093/molbev/msv150)
- Letunic I., Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49(W1): W293–W296. DOI: [10.1093/nar/gkab301](https://doi.org/10.1093/nar/gkab301)
- Li J., Li C., Smith S.M. 2017. Hormone Metabolism and Signaling in Plants. Academic Press Elsevier: London, UK. DOI: [10.1016/B978-0-12-811562-6.00001-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00001-3)
- Li M., Hu J., Wei Z. et al. 2024. Synthetic microbial communities: Sandbox and blueprint for soil health enhancement. *iMeta* 3: e172. DOI: [10.1002/imt2.172](https://doi.org/10.1002/imt2.172)
- Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M. et al. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29(2): 248–258. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.12.001)
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P. et al. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14: 60. DOI: [10.1186/1471-2105-14-60](https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60)
- Meier-Kolthoff J.P., Göker M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 10: 2182. DOI: [10.1038/s41467-019-10210-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3)
- Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J., Peinado-Olarte R.L. et al. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 50: D801–D807. DOI: [10.1093/nar/gkab902](https://doi.org/10.1093/nar/gkab902)
- Monjezi N., Yaghoubian I., Smith D.L. 2023. Cell-free supernatant of *Devosia* sp. (strain SL43) mitigates the adverse effects of salt stress on soybean (*Glycine max* L.) seed vigor index. *Frontiers in Plant Science* 14: 1071346. DOI: [10.3389/fpls.2023.1071346](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1071346)
- Mukherjee A., Singh S., Gaurav A.K. et al. 2022. Harnessing of phytomicrobiome for developing potential bio-stimulant consortium for enhancing the productivity of chickpea and soil health under sustainable agriculture. *Science of the Total Environment* 836: 155550. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.155550](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155550)
- Naqqash T., Imran A., Hameed S. et al. 2020. First report of diazotrophic *Brevundimonas* spp. as growth enhancer and root colonizer of potato. *Scientific Reports* 10: 12893. DOI: [10.1038/s41598-020-69782-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69782-6)
- Niu B., Paulson J.N., Zheng X. et al. 2017. Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(12): E2450–E2459. DOI: [10.1073/pnas.1616148114](https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114)
- Overbeek R., Olson R., Pusch G.D. et al. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42: D206–D214. DOI: [10.1093/nar/gkt1226](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226)
- Palkina K.A., Choob V.V., Yampolsky I.V. et al. 2025. Pros and Cons of Interactions Between Crops and Beneficial Microbes. *Agriculture* 15(12): 2526. DOI: [10.3390/agriculture15242526](https://doi.org/10.3390/agriculture15242526)
- Palmer B., Couradeau E.M., Johansen J.R. et al. 2025. Unraveling the diversity and functional potential of cyanosphere microbiomes assembled from terrestrial cyanobacteria. *bioRxiv*. DOI: [10.1101/2025.06.10.658773](https://doi.org/10.1101/2025.06.10.658773)
- Prabha R., Singh D.P. 2019. Cyanobacterial phylogenetic analysis based on phylogenomics approaches render evolutionary diversification and adaptation: an overview of representative orders. *3 Biotech* 9(3): 87. DOI: [10.1007/s13205-019-1635-6](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1635-6)
- Quast C., Priesse E., Yilmaz P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(Database issue): D590–596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)
- Raj A., Shahid M. 2026. In-silico-driven SynCom engineering with cyanobacteria for efficient pesticide degradation: A review. *Algal Research* 95: 104636. DOI: [10.1016/j.algal.2026.104636](https://doi.org/10.1016/j.algal.2026.104636)
- Santos-Merino M., Singh A.K., Ducat D.C. 2019. New applications of synthetic biology tools for cyanobacterial metabolic engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7: 33. DOI: [10.3389/fbioe.2019.00033](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00033)
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30: 2068–2069. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu153](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153)
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H. et al. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2: 587. DOI: [10.1186/2193-1801-2-587](https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587)
- Shayanthan A., Ordoñez P.A.C., Oresnik I.J. 2022. The Role of Synthetic Microbial Communities (SynCom) in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Agronomy* 4: 896307. DOI: [10.3389/fagro.2022.896307](https://doi.org/10.3389/fagro.2022.896307)
- Singh J.S., Kumar A., Rai A.N. et al. 2016. Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Frontiers in Microbiology* 7: 529. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00529](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00529)
- Sudianto E., Shlafstein M.D., Durieu B. et al. 2026. Taxonomic description of cyanobacteria from extreme habitats through genome-based classification. *Frontiers in Microbiology* 17: 1824103. DOI: [10.3389/fmicb.2026.1824103](https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1824103)
- Темралева А.Д., Синетова М.А., Габриелян Д.А. et al. 2025. Cyanobacteria for Plant Growth Promotion: From Taxon and Metabolite Diversity to Large-Scale Cultivation and Agricultural Applications. *Biologia et Biotechnologia* 3: 1. DOI: [10.61847/pbcraas.bbt.2025.3.1](https://doi.org/10.61847/pbcraas.bbt.2025.3.1)
- Trivedi P., Leach J.E., Tringe S.G. et al. 2020. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 18(11): 607–621. DOI: [10.1038/s41579-020-0412-1](https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1)
- Whitton B.A., Potts M. 2012. Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. DOI: [10.1007/978-94-007-3855-3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3)
- Wood D.E., Lu J., Langmead B. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20: 257. DOI: [10.1186/s13059-019-1891-0](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0)
- Wu D., Seshadri R., Kyrpides N.C. et al. 2025. A metagenomic perspective on the microbial prokaryotic genome census. *Science Advances* 11(3): eadq2166. DOI: [10.1126/sciadv.adq2166](https://doi.org/10.1126/sciadv.adq2166)
- Wu Y.W., Simmons B.A., Singer S.W. 2016. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 32: 605–607. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv638](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638)
- Yanti Y., Hamid H., Reflin. 2021. Development of the PGPR and Cyanobacteria Consortium for Growth Promotion and Control *Ralstonia syzigii* subsp. *indonesiensis* of Tomato. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 709(1): 012085. DOI: [10.1088/1755-1315/709/1/012085](https://doi.org/10.1088/1755-1315/709/1/012085)

Zhang Y., Jing M., Lyu L. et al. 2026. Principles for Rigorous Design and Application of Synthetic Microbial Communities. *Advanced Science* 13(1): e14750. DOI: [10.1002/advs.202514750](https://doi.org/10.1002/advs.202514750)

Zimenkov D., Ushtanit A. 2025. Comparative Analysis of Evolutionary Distances Using the Genus *Mycobacterium*. *International Journal of Molecular Sciences* 26(21): 10471. DOI: [10.3390/ijms262110471](https://doi.org/10.3390/ijms262110471)