

Test of two membrane filter types for biomass collection in community profiling by metabarcoding

Original Article

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Galachyants Yu.P.*, Bolbat A.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P.

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

ABSTRACT. With the rapid development of microorganism biodiversity estimation and community profiling via DNA metabarcoding, there is a growing need to identify key stages affecting the results of experiment. In order to ensure high-quality reproducible results, all potential sources of bias should be explored. While bioinformatic pipelines can be often corrected and optimized to recalculate results, the initial steps of sample collection procedure, potentially influencing the downstream results of bacterial community profiling, are much harder to correct easily, without repeating the whole experiment. We examined the differences of the amplicon bacterial community profiles generated from aquatic microbial communities captured by polycarbonate (PC) and cellulose acetate (CA) filters. The microbial community profiles were shown to be significantly different by biodiversity. When using a PC-filters, alpha- and beta-diversity of communities were significantly higher. Differential abundance analysis showed enrichment of major cyanobacterial OTUs in CA-treated communities. Based on these results, the use of PC-filters is the most optimal for bacterial community profiling by metabarcoding of the 16S rRNA gene fragments.

Keywords: 16S rRNA, bacterial communities, metabarcoding, biodiversity, biomass collection by filtering

For citation: Galachyants Yu.P., Bolbat A.V., Zakharova Yu.R., Petrova D.P. Test of two membrane filter types for biomass collection in community profiling by metabarcoding // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 888-899. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-888

1. Introduction

Profiling of the microbial community composition is one of the basic goals of many biological studies including biomedicine, biotechnology, environmental research, etc. Composition of the community can tell a great deal about its stability, symbiotic relationships and diversity of the available metabolic pathways. Such data can be used in a variety of ways, e.g for tracking seasonal fluctuation in biodiversity, identifying the factors affecting community composition. Comprehensive biodiversity surveys not only facilitate the discovery of seasonal fluctuations on the community composition, but also help to measure the ecological effects of specific environmental factors which is particularly relevant for estimating the anthropogenic impact to natural communities.

While observing the macroorganism community is pretty straightforward (except for cases of cryptic diversity), the microbial diversity is much more difficult to measure. The traditional approach to this issue included cultivating microorganisms on a variety

of growth media with subsequent characterization of colonies and bacterial microscopic morphology which was very labor-intensive and low-resolution due to limited number of well-defined distinguishable traits at a microscopic scale. The shortcomings of such approach quickly became apparent when the number of bacteria counted directly from samples and cultivated on plates differed by several orders of magnitude (Razumov, 1931). A more advanced technique suggested classifying universally-present household gene fragments cloned from environmental samples based on genetic distances and phylogenetics. This technique, revealed that at least half of the bacterial phyla have no culturable members (Rappé and Giovannoni, 2003). Currently the proportion of known unculturable phyla raised to ¾ and the estimates of the proportion of unculturable taxa of bacterial diversity go as high as 99% (Hugon et al., 2017).

The technique of metabarcoding combines the advantages of using high-throughput sequencing (HTS) technologies and commonly established genetic markers for main domains of life: 16S rRNA gene for bac-

*Corresponding author.

E-mail address: yuri.galachyants@lin.irk.ru (Yu.P. Galachyants)

Received: May 28, 2024; **Accepted:** June 10, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



teria and archaea, 18S rRNA gene for eukaryotes in general and mitochondrial 12S rRNA and *cox1* genes for Metazoa. While metabarcoding is less capable of detecting genetic diversity within the sample on the whole-genome scale compared to the full-scale shotgun metagenomic studies, it has lower per-sample cost and sufficient resolution for a majority of studies aimed to initial characterization of the communities and their comparison between each other.

While molecular techniques reached the plateau of their abilities and software side of metabarcoding protocols can be adjusted even after the original study was finished, improper sample collection protocols can hinder the downstream analysis without any way to correct the obtained data. At the very beginning of the metabarcoding protocol of the aquatic communities, the bacterial and/or microeukaryotic cells are often filtered to collect the biomass. There are several types of filters, which are made of different materials: polyethersulfone (PES), polyvinylidene fluoride (PVDF), nylon, cellulose nitrate (CN), mixed cellulose ester (MCE), cellulose acetate (CA), polycarbonate (PC), etc (Moldovan et al., 2020). While the effect of the pore size on the observed biodiversity is intuitive (the smaller the pore – the more diversity is captured) the effect of filter material may be less obvious (Eichmiller et al., 2015; Li et al., 2018). As the number of eDNA (environmental DNA) collection strategies increases, the type of filter membranes used also changes: fiberglass, cellulose paper and other synthetic thermoplastic membranes are often used for eDNA collection (Takahashi et al., 2023). However, there is not enough work on the effect of filters when collecting material for subsequent analysis of the bacterial community by metabarcoding (Moldovan et al., 2020). It has been shown that real pore sizes can vary significantly around the average nominal pore size stated by the manufacturer (Turner et al., 2014). Moreover, the values of these deviations are unpredictable even for derivatives of the same material. As a result, smaller organisms may bypass filter while being larger than the nominal pore size. In addition, the surface characteristics of filters may also play a role: some filter types are intended to serve as a barrier adsorbing all microorganisms on their surface, while others are prone to capturing smaller organisms within their volume (Djurhuus et al., 2017). This, in turn, may affect the ratios of DNA fragments from different organisms because of the difference of the biomass washing-out process from distinct filter types.

In our work, we tested filters made from polycarbonate (PC) and cellulose acetate (CA) to collect the bacterial biomass from freshwater communities in order to identify the effect of the filtering step on the efficiency of total DNA extraction and the downstream results of the bacterial community profiling by 16S rRNA metabarcoding.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Water samples were collected on the 3rd of September 2017 at the central station of the transect

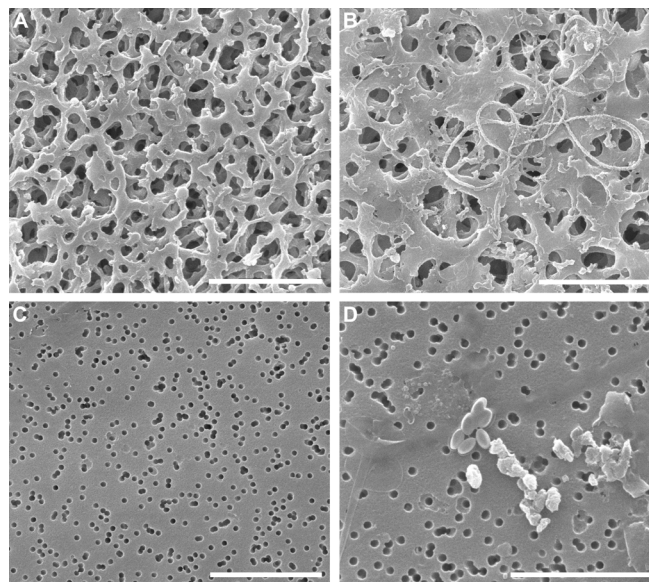


Fig.1. Scanning electron microscopy of filters. A) CA filter; B) CA filter after filtration of water sample; C) PC filter; D) PC filter after filtration of water sample. Scale bar: 5 μm – A, C; 2 μm – B; 4 μm – D.

Listvyanka-Tankhoi (Lake Baikal, Russia) from the photic zone at the depths 0, 5, 10, 15, 20 and 25 m using a Niskin bottle and combined into single integral sample. Twenty liters of the integral sample were filtered through PC filter (Whatman, USA) with 0.2 μm pore size (Fig. 1C) and CA filter (Vladisart, Russia) with 0.2 μm pore size (Fig. 1A) in two repetitions. Each filter with the biomass was transferred into sterile bottle, stretched with the forceps and the biomass was washed out of the filter with 10 ml of TE buffer (1mM EDTA and 10 mM Tris-HCl; pH 7.5) using automatic pipette. The washed-out sample was frozen and stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ until further analysis. Total DNA was extracted from samples with lysozyme (1 mg·mL⁻¹), proteinase K (310 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10% SDS and phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1) (Bukin et al., 2023).

2.2. Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), 20 mL from 200 mL of the samples was precipitated by filtration onto a filter with a diameter of 13 mm and pore diameter of 0.2 μm on PC and CA filters. Then, 20 mL of 70% ethanol was passed through the filter. The filter with the studied material and clean filter dried at room temperature was attached to the SEM stub with double tape, coated with gold in an SDC 004 vacuum evaporator (SD 004 Balzers, Liechtenstein) and examined using a QUANTA 200 SEM (FEI Company; Hillsboro, OR, USA).

2.3. DNA library preparation and sequencing

Preparation of the amplicon libraries was performed as described in “Illumina 16S Metagenomic Library Preparation Guide #15044223 Rev. B”. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using uni-

versal primers U341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') and U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3') (Baker et al., 2003). Libraries were analyzed using Illumina MiSeq (San Diego, USA) in Evrogen company (Moscow, Russia) with Reagent Kit v2 to obtain 250 bp paired-end reads. Two amplicon libraries were generated for each filter type.

2.4. OTU detection and diversity analysis

Read pairs merging and quality filtering was conducted using Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010), with maximum expected error of 1 bp per read and minimum length of 350 bps. Sequence dereplication was conducted in Vsearch v2.16.0 (Rognes et al., 2016) with minimum abundance of 2. Sequence pre-clustering with 97% identity threshold and subsequent *de novo* and reference-based chimera filtering was conducted in Vsearch. Chimera-free sequences were then preclustered in Vsearch with the same 97% identity threshold. Taxonomic classification of the resulting OTUs was conducted in Mothur v.1.48.0 (Schloss et al., 2009) with Silva v.138.1 database using Wang method and the cutoff value of 80. Unidentified OTUs were omitted from the analysis.

Alpha-diversity metrics and Bray-Curtis dissimilarity were calculated using the diversity function of the vegan 2.6.4 package (Oksanen et al., 2022). The Weighted Unifrac distance was calculated in phyloseq 1.40.0 package (McMurdie and Holmes, 2013) using IQ-TREE 2.2.0 (Minh et al., 2020) consensus phylogeny generated with GTR+G+I substitution model and 1000 ultrafast bootstrap replicates (Hoang et al., 2018). Differential abundance analysis was conducted in DESeq2 1.36.0 package (Love et al., 2014) with local fit type.

3. Results and discussion

We performed a qualitative assessment of PC and CA filters by the SEM method (Fig. 1). This allowed us to identify the structure and morphology of pores depending on type of the filter material. Bacterial cells are located separately or as conglomerates on the surface of the PC filter (Fig. 1D). When using CA filters, bacterial cells were located both on the filter surface and inside the filter pores (Fig. 1B). We assume this feature of the CA filters contributed to the fact the biomass was not completely washed off the filter surface, and some cell remained inside the filter material. This may alter the community profiles collected with CA filters.

As a result of sequencing, the total number of raw reads for 16S rRNA was 313 500, of which 289 100 (92.22%) were merged and aligned. Out of remaining reads, 16% were discarded due to >1 expected errors. Read pre-clustering was performed with 3% identity threshold which resulted in 590 clusters, out of which 49.3% were *de novo* identified as chimeras and 50.7% as non-chimeras. This seemingly high proportion of chimeric reads is, in fact, common for different pipelines (e.g. Fonseca et al., 2012, Salonen et al., 2021). Subsequent reference-based filtering discarded 5.4% of

the resulting clusters as chimeras. Reclustering of these filtered sequences with the same threshold and omitting unidentifiable OTUs resulted of 277 OTUs for the analysis. The final sequencing depth was in range from 40 000 to 52 000 reads per sample, that is sufficient for downstream analyses of community profiles (Fig. 2).

A very noticeable difference of samples was observed by alpha-diversity metrics. PC filter allowed for capturing 1.425 times more OTUs than CA filter (Fig. 2, Table 1). The samples' Shannon's and Simpson's diversity indices differed 1.512-fold ($p = 0.02$) and 1.169-fold ($p = 0.03$) accordingly between the filter materials. Considering the commonly used 97% identity threshold, such differences may influence the downstream interpretation of seasonal dynamics, trophic networks or metabolic pathways of the communities. Interestingly, membranes of mixed cellulose ether, cellulose acetate and cellulose nitrate were previously reported to be the best filter types for bacterial communities of karst sources (Moldovan et al., 2020). As expected from alpha-diversity metrics, beta-diversity was also different between PC and CA profiles (Table 2), while the profiles of the same filter type were very close each other.

Analysis of differential abundance of OTU profiles (Fig. 3, Table 3) revealed, that both major and minor OTUs can be specifically abundant on the filters made of different materials. Most noticeably, PC-treated profiles had a greater fraction of minor OTUs than CA ones. At the same time, PC-treated profiles had a greater proportion of chloroplast-specific sequences, uncultured Methylacidiphilaceae, unclassified Sporichthyaceae and CL500-29 marine group while having a lower proportion of *Cyanobium gracile* PCC-6307 and unclassified Cyanobiaceae OTUs. Enrichment of different bacterial OTUs may be explained by bacteria being trapped in the CA filter or even passing through its pores. An alternative explanation might be a release of chemical compounds by the CA filter, affecting the PCR. Hypothetically, such compounds may influence the

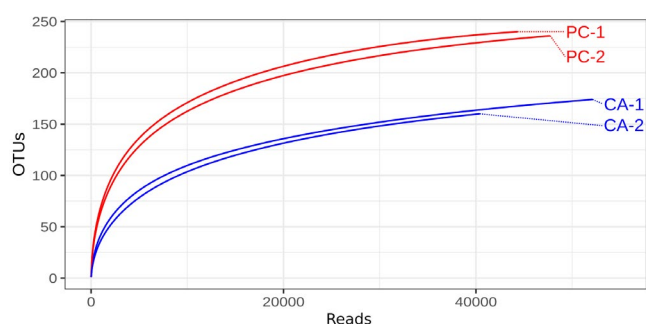


Fig. 2. Rarefaction curves for analyzed bacterial community profiles.

Table 1. Alpha-diversity of bacterial communities

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
Species richness (OTUs)	240	236	174	160
Shannon's index	2.29	2.2	1.56	1.41
Simpson's index	0.77	0.75	0.66	0.64

PCR at the primer annealing stage causing primer binding only to the most conservative motifs thus increasing the specificity of the PCR which can result in preferential amplification of certain taxa (Chua et al., 2015).

Analysis of differential abundance by DESeq2 revealed 15 OTUs that differed significantly between PC- and CA-treated community profiles ($p < 0.05$, $\text{abs}(\log_2\text{FC}) > 1.5$) (Table 3). These OTUs belonged to *Cyanobium gracile* PCC-6307, CL500-29 marine group, *Sphingomonas*, Methyacidiphilaceae, SAR11 Clade III, *Williamsia*, Sporichthyaceae hgcl clade and Nocardioideles. Relative abundance of 12 out of these 15 OTUs was above 0.1%. The composition of the identified bacterial community is consistent with previously obtained data for Lake Baikal during this time period (Mikhailov et al., 2022).

4. Conclusions

In this study we tested two filter types to collect biomass from freshwater samples. We believe that such testing is necessary for better control of potential biases and batch effects when designing the complex metabarcoding experiments and comparing data from different metabarcoding studies. When choosing an appropriate membrane filter type, it is necessary to account for the filter's ability to collect microorganisms. It is evident that PC-treated amplicon profiles have higher alpha- and beta-diversity than those of CA-treated ones. Possible explanations of this effect may be: i) the structure of the CA-filter, as the three-dimensional maze-like CA-membrane pores able to irreversibly capture some part of the biomass inside the filter or even on the membrane surface; ii) the release of chemical compounds that can potentially affect the specificity of the polymerase chain reaction.

The bias introduced by the filter material indicates that results obtained on different filters must not

Table 2. Beta-diversity of bacterial communities: Bray-Curtis dissimilarity (above diagonal) and weighted unifrac (below diagonal) distances

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
PC-1		0.074	0.237	0.173
PC-2	0.009		0.202	0.173
CA-1	0.058	0.054		0.129
CA-2	0.065	0.061	0.008	

be compared, except with the express purpose to estimate their difference in filtration efficiency. Filter manufacturer, type and preferably, batch should be selected for studies considering the comparison of the community structure and composition. Chemical inertness of the filter material should also be considered to avoid the release of compounds affecting DNA extraction and amplification. According to our results, PC filters turned out to be superior compared to CA filters for profiling the freshwater bacterial communities.

Acknowledgements

The authors acknowledge co-workers of LIN SB RAS: Mikhailov I.S. for their assistance during the field studies and E.V. Likhoshway for valuable advices during the preparation of the manuscript. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation projects: No. 0279-2021-0009 The study was performed using microscopes of the The Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS. We also gratefully acknowledge the Irkutsk Supercomputer Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for providing the access to HPC-cluster

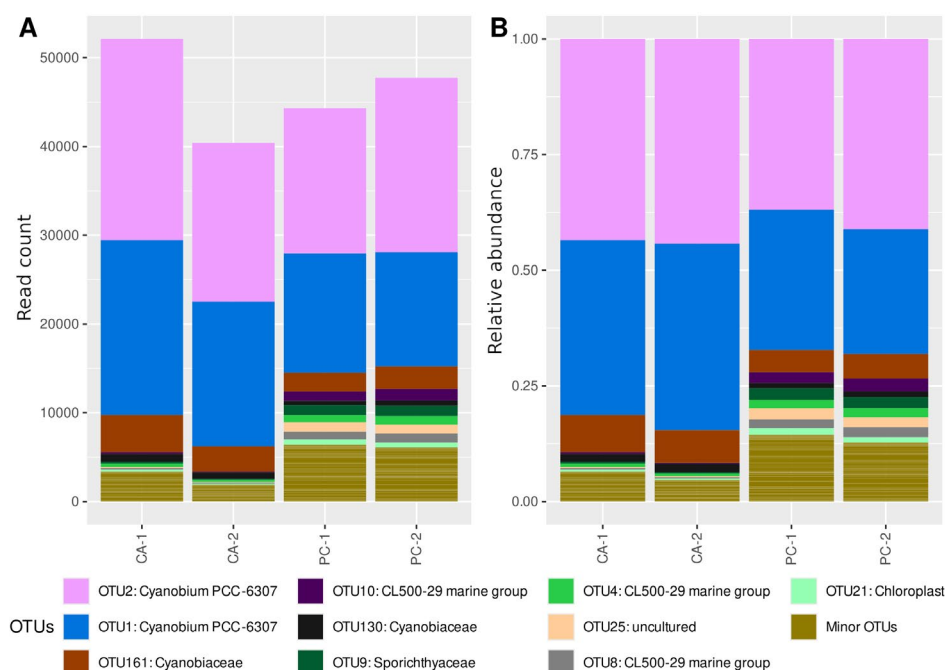


Fig.3. Abundance of OTUs in absolute values (A) and proportions (B). The top 10 most abundant OTUs are shown using distinct colors. The rest of the OTUs are merged into the “Minor OTUs” category.

Table 3. Differential abundance of OTUs by filter material

ID	Taxon	P_{adj}	\log_2 -fold change	CA*	PC*
OTU161	Cyanobiaceae unclassified	5.18e-13	-1.79	5262.58	1518
OTU1	Cyanobium PCC-6307	6.85e-11	-1.67	27504.73	8613.97
OTU25	Methylacidiphilaceae uncultured	1.83e-09	1.85	188.74	684
OTU130	Cyanobiaceae unclassified	6.78e-09	-1.79	1229.24	355.35
OTU9	Sporichthyaceae unclassified	4.60e-06	1.81	209.26	739.81
OTU10	CL500-29 marine group	3.33e-05	1.73	233.16	780.59
OTU2	Cyanobium PCC-6307	9.74e-05	-1.38	30819.91	11809.67
OTU8	CL500-29 marine group	9.74e-05	1.59	203.45	610.51
OTU19	Sporichthyaceae unclassified	4.44e-03	2.35	16.58	86.64
OTU20	Sporichthyaceae unclassified	5.83e-03	2.4	14.05	75.02
OTU14	Clade III	1.17e-02	1.86	30.81	110.69
OTU80	Nocardioiodes	1.71e-02	5.64	0	14.02
OTU13	Methylacidiphilaceae uncultured	2.68e-02	1.54	51.42	149.39
OTU114	Sphingomonadaceae unclassified	2.73e-02	2.6	8.35	47.39
OTU149	Actinobacteria unclassified	4.86e-02	-2.58	25.04	4.25

Note: * Mean count of taxon abundance in the corresponding group (CA or PC)

“Akademik V.M. Matrosov” and Shared Equipment Center for Integrated information and computing network of Irkutsk Research and Educational Complex for the data storage infrastructure.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541-555. DOI: [10.1016/j.mimet.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009)

Bukin Y.S., Mikhailov I.S., Petrova D.P. et al. 2023. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 229 DOI: [10.1007/s11274-023-03678-1](https://doi.org/10.1007/s11274-023-03678-1)

Chua E-W., Miller A.L., Kennedy M.A. 2015. Choice of PCR microtube can impact on the success of long-range PCRs. *Analytical Biochemistry* 477: 115-117. DOI: [10.1016/j.ab.2015.02.023](https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.023)

Djurhuus A., Port J., Closek C.J. et al. 2017. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science* 4: 314. DOI: [10.3389/fmars.2017.00314](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314)

Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)

Eichmiller J.J., Miller L.M., Sorensen P.W. 2015. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources* 16(1): 56-68. DOI: [10.1111/1755-0998.12421](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421)

Fonseca V.G., Nichols B., Lallias D. et al. 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSUmetagenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 40(9):

e66. DOI: [10.1093/nar/gks002](https://doi.org/10.1093/nar/gks002)

Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35(2): 518-522. DOI: [10.1093/molbev/msx281](https://doi.org/10.1093/molbev/msx281)

Hugon P., Lagier J., Colson P. et al. 2017. Repertoire of human gut microbes. *Microbial Pathogenesis* 106: 103-112. DOI: [10.1016/j.micpath.2016.06.020](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020)

Li J., Lawson Handley L.J., Read D.S. et al. 2018. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*. DOI: [10.1111/1755-0998.12899](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899) Epub ahead of print. PMID: 29766663

Love M.I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12): 550. DOI: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)

McMurdie P.J., Holmes S. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8(4): e61217. DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)

Mikhailov I.S., Galachyants Y.P., Bukin Y.S. et al. 2022. Seasonal Succession and Coherence Among Bacteria and Microeukaryotes in Lake Baikal. *Microbial Ecology* 84(2): 404-422. DOI: [10.1007/s00248-021-01860-2](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01860-2)

Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1530-1534. DOI: [10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015)

Moldovan O.T., Baricz A., Szekeres E. et al. 2020. Testing Different Membrane Filters for 16S rRNA Gene-Based Metabarcoding in Karstic Springs. *Water* 12(12): 3400. DOI: [10.3390/w12123400](https://doi.org/10.3390/w12123400)

Oksanen J., Simpson G., Blanchet F. et al. 2022. vegan: Community Ecology Package. URL: cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf

Rappé M.S., Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-94. DOI: [10.1146/annurev.micro.57.030502.090759](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759)

Razumov A.S. 1931. Direct method of aquatic bacteria counting and its comparison to Koch's method. *Mikrobiologija*

1(2): 131-136. (in Russian)

Rognes T., Flouri T., Nichols B. et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584. DOI: [10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)

Salonen I.S., Chronopoulou P., Nomaki H. et al. 2021. 16S rRNA Gene Metabarcoding Indicates Species-Characteristic Microbiomes in Deep-Sea Benthic Foraminifera. *Frontiers in Microbiology* 12: 694406. DOI: [10.3389/fmicb.2021.694406](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694406)

Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and compar-

ing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-41. DOI: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)

Takahashi M., Saccò M., Kestel J.H. et al. 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal bio-monitoring revolution. *Science of the Total Environment* 873: 162322. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.162322](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322)

Turner C.R., Barnes M.A., Xu C.C. et al. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676–684. DOI: [10.1111/2041-210X.12206](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206)

Тестирование двух типов мембранных фильтров для сбора биомассы при профилировании бактериальных сообществ методом метабаркодирования

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Галачянц Ю.П.*, Болбат А.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П.

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

АННОТАЦИЯ. В связи с быстрым развитием методов оценки биоразнообразия микроорганизмов и профилирования сообществ с помощью метабаркодирования ДНК растет потребность в выявлении ключевых этапов, влияющих на результаты экспериментов. Чтобы обеспечить высококачественные воспроизводимые результаты, необходимо изучить все потенциальные источники систематической ошибки. Хотя биоинформационные конвейеры часто можно исправить и оптимизировать для пересчета результатов, начальные этапы процедуры сбора образцов, потенциально влияющие на последующие результаты профилирования бактериального сообщества, гораздо сложнее исправить без повторения всего эксперимента. Мы исследовали различия в ампликонных профилях бактериальных сообществ, полученных из водных образцов при сборе биомассы с помощью фильтров из разного материала: поликарбоната (PC) и ацетата целлюлозы (CA). Показано, что профили микробных сообществ существенно различаются по биоразнообразию. При использовании PC-фильтров альфа- и бета-разнообразие сообществ было значительно выше. Дифференциальный анализ численности показал обогащение многочисленных цианобактериальных OTU в профилях сообществ, полученных с помощью CA. На основании этих результатов использование PC-фильтров является наиболее оптимальным для профилирования бактериальных сообществ путем метабаркодирования фрагментов гена 16S рРНК.

Ключевые слова: 16S рРНК, бактериальные сообщества, метабаркодирование, биоразнообразие, сбор биомассы фильтрованием

Для цитирования: Галачянц Ю.П., Болбат А.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П. Тестирование двух типов мембранных фильтров для сбора биомассы при профилировании бактериальных сообществ методом метабаркодирования // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 888-899. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-888](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-888)

1. Введение

Профилирование состава микробных сообществ является одной из основных целей многих биологических исследований, в таких областях как биомедицина, биотехнология, исследования окружающей среды и т. д. Состав сообщества может многое рассказать о его стабильности, симбиотических отношениях и разнообразии доступных метаболических путей. Такие данные можно использовать для различных целей, например, для отслеживания сезонных колебаний биоразнообразия, выявления факторов, влияющих на состав сообщества. Всесторонние исследования биоразнообразия не только способствуют выявлению сезонных коле-

баний состава сообществ, но и помогают оценить экологическое воздействие конкретных факторов окружающей среды, что особенно актуально для оценки антропогенного воздействия на природные сообщества.

Хотя наблюдать за сообществом макроорганизмов довольно просто (за исключением случаев скрытого или т.н. *криптического* разнообразия), микробное разнообразие оценить гораздо труднее. Традиционный подход к этому вопросу включал культивирование микроорганизмов на различных питательных средах с последующей характеристикой колоний и бактериальной микроскопической морфологии. Однако этот метод был трудоемким

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: yuri.galachyants@lin.irk.ru (Ю.П. Галачянц)

Поступила: 28 мая 2024; Принята: 10 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



и имел низкое разрешение из-за ограниченного числа четко определенных различимых признаков в микроскопическом масштабе. Недостатки такого подхода быстро стали очевидны, когда число бактерий, подсчитанное непосредственно из проб и культивируемых на чашках, различалось на несколько порядков (Разумов, 1931). Более продвинутый метод предполагает классификацию и группировку фрагментов повсеместно присутствующих генов домашнего хозяйства, клонированных из образцов окружающей среды, на основе генетических расстояний и филогенетики. Этот метод показал, что по крайней мере для половины определяемых бактериальных фрагментов 16S рРНК не имеется культивируемых представителей ранга того же филума (Rappé and Giovannoni, 2003). В настоящее время доля известных некультивируемых филумов увеличена до $\frac{3}{4}$, а оценки доли некультивируемых таксонов бактериального разнообразия достигают 99% (Hugon et al., 2017).

Методика метабаркодирования сочетает в себе преимущества использования технологий высокопроизводительного секвенирования (HTS) и общепринятых генетических маркеров основных доменов жизни: ген 16S рРНК для бактерий и архей, ген 18S рРНК для эукариот в целом и гены митохондриальной 12S рРНК и *cox1* конкретно для Metazoa. Хотя способность метабаркодирования обнаружить генетическое разнообразие в образце в масштабе всего генома ниже по сравнению с полномасштабными метагеномными исследованиями, оно имеет меньшую стоимость на образец и достаточное разрешение для большинства исследований, направленных на первоначальную характеристику сообществ и их сравнение друг с другом.

В то время как молекулярные методы достигли плато своих возможностей, а программная часть протоколов метабаркодирования может быть скорректирована даже после завершения первоначального исследования, неправильные протоколы сбора образцов могут затруднить последующий анализ без какой-либо возможности исправить полученные данные. На первых шагах протокола метабаркодирования при анализе водных сообществ бактериальные и/или микроэукариотические клетки часто фильтруют из проб воды для сбора биомассы. Существует несколько типов материалов, из которых изготавливают фильтры: полиэфирсульфон (PES), поливинилиденфторид (PVDF), нейлон, нитрат целлюлозы (CN), смешанные эфиры целлюлозы (MCE), ацетат целлюлозы (CA), поликарбонат (PC) и т. д. (Moldovan et al., 2020). Хотя влияние размера пор на наблюдаемое биоразнообразие интуитивно понятно (чем меньше поры, тем большее разнообразие можно получить в итоговом профиле сообщества), влияние фильтрующего материала может быть менее очевидным (Li et al., 2018; Eichmiller et al., 2015). По мере увеличения количества стратегий сбора eDNA (environmental DNA) тип используемых фильтрующих мембран также меняется: для сбора eDNA часто используются стекловолокно, целлюлозная бумага и другие синте-

тические термопластичные мембраны (Takahashi et al., 2023). Однако работ по влиянию фильтров при сборе материала для последующего анализа бактериальных сообществ методом метабаркодирования недостаточно (Moldovan et al., 2020). Ранее показано, что реальные размеры пор могут значительно отличаться от среднего номинального размера пор, указанного производителем (Turner et al., 2014). Причем значения этих отклонений непредсказуемы даже для производных одного и того же материала. В результате более мелкие клетки могут проходить через поры фильтра при сборе биомассы, хотя формально размер клетки превышает заявленный диаметр пор. Кроме того, значительную роль могут играть и характеристики поверхности фильтров: некоторые типы фильтров предназначены служить барьером, адсорбирующим все микроорганизмы на своей поверхности, тогда как другие склонны улавливать более мелкие организмы в своем объеме (Djurhuus et al., 2017). Это, в свою очередь, может повлиять на соотношение фрагментов ДНК разных организмов из-за различной эффективности смыывания собранной биомассы с фильтров, сделанных из разного материала.

В нашей работе мы протестировали фильтры из поликарбоната (PC) и ацетата целлюлозы (CA) для сбора бактериальной биомассы из пресноводных сообществ, чтобы определить влияние этапа фильтрации на эффективность выделения суммарной ДНК и последующие результаты профилирования бактериального сообщества с помощью метабаркодирования 16S рРНК.

2. Материалы и методы

2.1. Сбор проб и выделение ДНК

Пробы воды отобраны третьего сентября 2017 года на центральной станции разреза пос. Листвянка - пос. Танхой (оз. Байкал, Россия) из фотической зоны на глубинах 0, 5, 10, 15, 20 и 25 м с помощью батометра Нискина и объединены в одну интегральную пробу. Двадцать литров интегрального образца фильтровали в двух повторностях через фильтры PC (Whatman, США) с размером пор 0,2 мкм (Рис. 1В) и фильтры CA (Владисарт, Россия) с размером пор 0,2 мкм (Рис. 1А). Фильтр с биомассой помещали во флакон с 10 мл стерильного ТЕ-буфера (1 мМ ЭДТА и 10 мМ Трис-НСI; рН 7,5), расправляли при помощи пинцета, и смывали биомассу с поверхности фильтра при помощи автоматического дозатора. Смывы замораживали и хранили при -80°C до дальнейшего анализа. Суммарную ДНК экстрагировали из образцов лизоцимом (1 мг/мл), протеиназой К (310 мкг/мл), 10% ДСН и смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) (Bukin et al., 2023).

2.2. Сканирующая электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) 20 мл из 200 мл образцов осаждали филь-

трованием на фильтрах PC и CA диаметром 13 мм и размером пор 0,2 мкм. Затем через фильтр пропускали 20 мл 70% этанола. Фильтр с исследуемым материалом и чистый фильтр, высушенный при комнатной температуре, прикрепляли к заглушке СЭМ двойной лентой, покрывали золотом в вакуумной напылительной установке SDC 004 (SD 004 Balzers, Лихтенштейн) и исследовали с помощью СЭМ QUANTA 200 (FEI Company; Хиллсборо, Орегон, США).

2.3. Подготовка и секвенирование библиотек ДНК

Подготовку библиотек ампликонов проводили, как описано в «Руководстве по подготовке метагеномной библиотеки Illumina 16S № 15044223 Ред. В». Область V3–V4 гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров U341F (5'-CCTACGGGRCAGCAG-3') и U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3') (Baker et al., 2003). Библиотеки анализировали с помощью секвенатора Illumina MiSeq (San Diego, USA) с набором реагентов v2 для получения парных концевых прочтений длиной 250 н.о. в компании Евроген (Москва, Россия) Были созданы две библиотеки ампликонов для каждого типа фильтра.

2.4. Обнаружение OTU и анализ разнообразия

Слияние пар прочтений и фильтрация данных по качеству проводили с использованием Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010) с максимальной ожидаемой ошибкой 1 н.о. на прочтение и минимальной длиной 350 н.о. Дерепликацию последовательностей проводили в Vsearch v2.16.0 (Rognes et al., 2016) с минимальной численностью 2. Предварительную кластеризацию последовательностей с порогом идентичности 97% и последующую фильтрацию химер *de novo* и на основе референсных последовательностей 16S рРНК проводили в Vsearch. Затем набор последовательностей без химер был предварительно кластеризован в Vsearch с тем же порогом идентичности 97%. Таксономическую классификацию полученных OTU проводили в mothur v.1.48.0 (Schloss et al., 2009) при помощи базы данных Silva v.138.1 с использованием метода Ванга и порогового значения 80. Неидентифицированные OTU были исключены из анализа.

Метрики альфа-разнообразия и несходство Брея-Кертиса рассчитывались с использованием функции разнообразия пакета Vegan 2.6.4 (Oksanen et al., 2022). Взвешенный индекс Unifrac рассчитывали в пакете phyloseq 1.40.0 (McMurdie and Holmes, 2013) с использованием консенсусной филогении IQ-TREE 2.2.0 (Minh et al., 2020), созданной с помощью модели замещения GTR+G+I и 1000 сверхбыстрых бутстреп-репликаций (Hoang et al., 2018). Дифференциальный анализ численности проводили в пакете DESeq2 1.36.0 (Love et al., 2014), используя локальный тип подгонки.

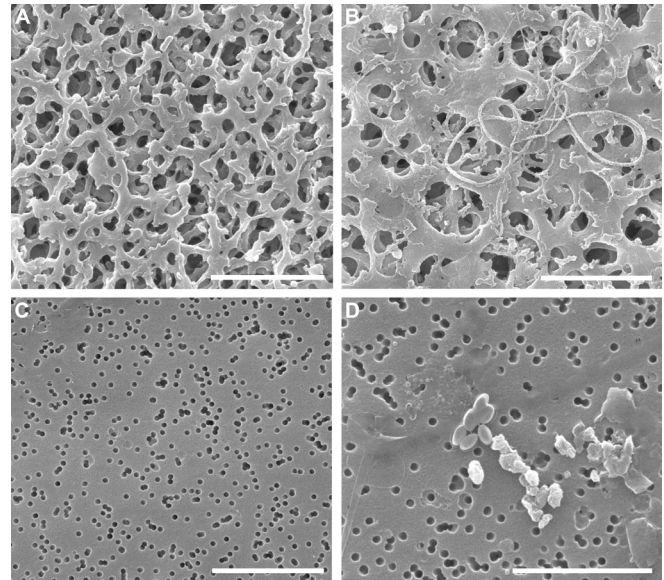


Рис.1. Сканирующая электронная микроскопия фильтров. А) СА-фильтр; В) СА-фильтр после фильтрации пробы воды; С) РС-фильтр; D) РС-фильтр после фильтрации пробы воды. Масштабная линейка: 5 мкм – А, С; 2 мкм – В; 4 мкм – D.

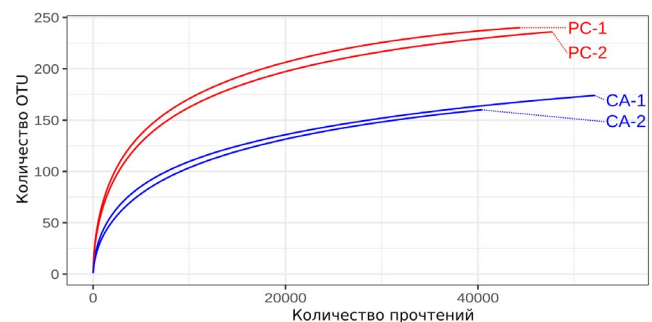


Рис.2. Кривые разрежения для анализируемых профилей бактериальных сообществ.

Таблица 1. Альфа-разнообразие бактериальных сообществ

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
Species richness (OTUs)	240	236	174	160
Shannon's index	2.29	2.2	1.56	1.41
Simpson's index	0.77	0.75	0.66	0.64

3. Результаты и обсуждение

Качественная оценка фильтров PC и CA проведена методом СЭМ (Рис. 1). Это позволило определить структуру и морфологию пор в зависимости от типа фильтрующего материала. Бактериальные клетки располагаются отдельно или в виде конгломератов на поверхности PC-фильтра (Рис. 1D). При использовании фильтров CA бактериальные клетки располагались как на поверхности фильтра, так и внутри пор фильтра (Рис. 1B). Мы предполагаем, что эта особенность фильтров CA способствовала тому, что биомасса не полностью смывалась

с поверхности фильтра, а часть клеток оставалась внутри фильтрующего материала. Это может изменить профили сообщества, собранные с помощью фильтров СА.

В результате секвенирования общее количество необработанных прочтений 16S рРНК составило 313 500, из них 289 100 (92.22%) были объединены и выровнены. Из них 16% прочтений были исключены из-за ожидаемой ошибки > 1. Предварительную кластеризацию прочтений проводили с порогом идентичности 3%, в результате чего было получено 590 кластеров, из которых 49.3% идентифицированы *de novo* как химеры и 50.7% как не химеры. Эта, казалось бы, высокая доля химерных чтений на самом деле является общей для разных конвейеров (например, Fonseca et al., 2012; Salonen et al., 2021). Последующая фильтрация на основе референсной базы данных 16S рРНК позволила отбросить 5.4% полученных кластеров как химеры. При повторной кластеризации этих отфильтрованных последовательностей с тем же порогом и исключением неидентифицируемых OTU было получено 277 OTU, использованных для дальнейшего анализа. Итоговая глубина секвенирования находилась в диапазоне от 40 000 до 52 000 прочтений на образец, что достаточно для последующего анализа профилей сообществ (Рис. 2).

Заметная разница выборок наблюдалась по метрикам альфа-разнообразия. При использовании РС-фильтров наблюдается в 1.425 раза больше OTU, чем при использовании СА-фильтров (Рис. 2, Таблица 1). Индексы разнообразия Шеннона и Симпсона различались в 1.512 раза ($p = 0.02$) и 1.169 раза ($p = 0.03$) соответственно между фильтрующими материалами. Учитывая широко используемый порог идентичности в 97%, такие различия могут влиять на последующую интерпретацию сезонной динамики, трофических сетей или метаболических путей сообществ. Интересно отметить, что, как сообщалось ранее, мембраны из смешанных эфиров целлюлозы, ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы успешно использовали при анализе бактериальных сообществ карстовых источников (Moldovan et al., 2020).

Как и ожидалось на основе показателей альфа-разнообразия, бета-разнообразие также различалось между профилями РС и СА (Таблица 2), в то время как профили одного и того же типа фильтра были очень близки друг к другу.

Анализ представленности OTU (Рис. 3, Таблица 3) показал, что как многочисленные, так и малочисленные OTU могут быть обогащены на фильтрах, изготовленных из разных материалов. Наиболее заметно, что профили, полученные при использовании РС-фильтров, имели большую долю малочисленных OTU, чем профили СА-фильтров. В то же время РС-профили имели большую долю последовательностей, специфичных для некультивируемых *Methylacidiphilaceae*, неклассифицированных *Sporichthyaceae* и *marine group CL500-29*, но при этом имели меньшую долю *Cyanobium gracile* PCC-6307 и неклассифицированных *Cyanobiaceae*

OTU. Обогащение различных бактериальных OTU можно объяснить тем, что бактерии задерживаются в СА-фильтре или даже проходят через его поры. Альтернативным объяснением может быть выброс химических соединений из фильтра СА, влияющих на ПЦР. Гипотетически такие соединения могут влиять на ПЦР на стадии отжига праймера, вызывая связывание праймера только с наиболее консервативными мотивами, тем самым повышая специфичность ПЦР, что может привести к преимущественной амплификации определенных таксонов (Chua et al., 2015).

Анализ дифференциальной численности с помощью DESeq2 выявил 15 OTU, которые значительно различались между профилями сообществ, обработанных РС и СА ($p < 0.05$, $\text{abs}(\log_2 FC) > 1.5$) (Таблица 3). Эти OTU принадлежали *Cyanobium gracile* PCC-6307, морской группе CL500-29, *Sphingomonas*, *Methylacidiphilaceae*, SAR11 Clade III, *Williamsia*, *Sporichthyaceae* hgcI clade и *Nocardioides*. Относительная численность 12 из этих 15 OTU была выше 0.1%. Состав выявленного бактериального сообщества согласуется с полученными ранее данными для оз. Байкал в этот временной период (Mikhailov et al., 2022).

4. Выводы

В этом исследовании мы протестировали два типа фильтров для сбора биомассы из образцов пресной воды и оценили профили бактериальных сообществ. Мы считаем, что такое тестирование необходимо для лучшего контроля потенциальных ошибок и пакетного эффекта при планировании сложных экспериментов и сравнении данных различных исследований метабаркодирования. При выборе подходящего типа мембранного фильтра необходимо учитывать способность фильтра концентрировать микроорганизмы и смывать их с его поверхности. Очевидно, что профили ампликонов, обработанных РС, имеют более высокое альфа- и бета-разнообразие, чем профили, обработанные СА. Наиболее вероятными причинами этого эффекта могут быть: 1) структура СА-фильтра, представляющая лабиринтные трехмерные поры, способные необратимо захватывать некоторую часть биомассы внутри фильтра или даже на поверхности мембраны; 2) высвобождение химических соединений, которые потенциально могут повлиять на эффективность полимеразной цепной реакции.

Таблица 2. Бета-разнообразие бактериальных сообществ: индекс несходства Брея-Кертиса (над диагональю) и взвешенные расстояния Unifrac (под диагональю)

	PC-1	PC-2	CA-1	CA-2
PC-1		0.074	0.237	0.173
PC-2	0.009		0.202	0.173
CA-1	0.058	0.054		0.129
CA-2	0.065	0.061	0.008	

Таблица 3. Численность OTU в зависимости от материала фильтра

ID	Taxon	P_{adj}	\log_2 -fold change	CA*	PC*
OTU161	Cyanobiaceae unclassified	5.18e-13	-1.79	5262.58	1518
OTU1	Cyanobium PCC-6307	6.85e-11	-1.67	27504.73	8613.97
OTU25	Methylacidiphilaceae uncultured	1.83e-09	1.85	188.74	684
OTU130	Cyanobiaceae unclassified	6.78e-09	-1.79	1229.24	355.35
OTU9	Sporichthyaceae unclassified	4.60e-06	1.81	209.26	739.81
OTU10	CL500-29 marine group	3.33e-05	1.73	233.16	780.59
OTU2	Cyanobium PCC-6307	9.74e-05	-1.38	30819.91	11809.67
OTU8	CL500-29 marine group	9.74e-05	1.59	203.45	610.51
OTU19	Sporichthyaceae unclassified	4.44e-03	2.35	16.58	86.64
OTU20	Sporichthyaceae unclassified	5.83e-03	2.4	14.05	75.02
OTU14	Clade III	1.17e-02	1.86	30.81	110.69
OTU80	Nocardioides	1.71e-02	5.64	0	14.02
OTU13	Methylacidiphilaceae uncultured	2.68e-02	1.54	51.42	149.39
OTU114	Sphingomonadaceae unclassified	2.73e-02	2.6	8.35	47.39
OTU149	Actinobacteria unclassified	4.86e-02	-2.58	25.04	4.25

Примечание: * Среднее значение численности в соответствующей группе (CA или PC)

Различия, наблюдаемые при профилировании сообществ с использованием разных фильтрующих материалов, указывает на то, что результаты, полученные на разных фильтрах, нельзя сравнивать, за исключением случаев, когда это специально сделано для оценки их разницы в эффективности фильтрации. Для проведения исследований следует выбирать производителя, тип и предпочтительно партию фильтра с учетом сравнения структуры и состава сообщества. Также следует учитывать химическую инертность фильтрующего материала, чтобы избежать выделения соединений, влияющих на экстрак-

цию и амплификацию ДНК. По нашим результатам, фильтры PC оказались более эффективными по сравнению с фильтрами CA при профилировании пресноводных бактериальных сообществ.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЛИН СО РАН: И.С. Михайлову за помощь в проведении полевых исследований и Е.В. Лихошвай за ценные советы при написании рукописи. Работа выполнена при поддержке проекта Министерства науки

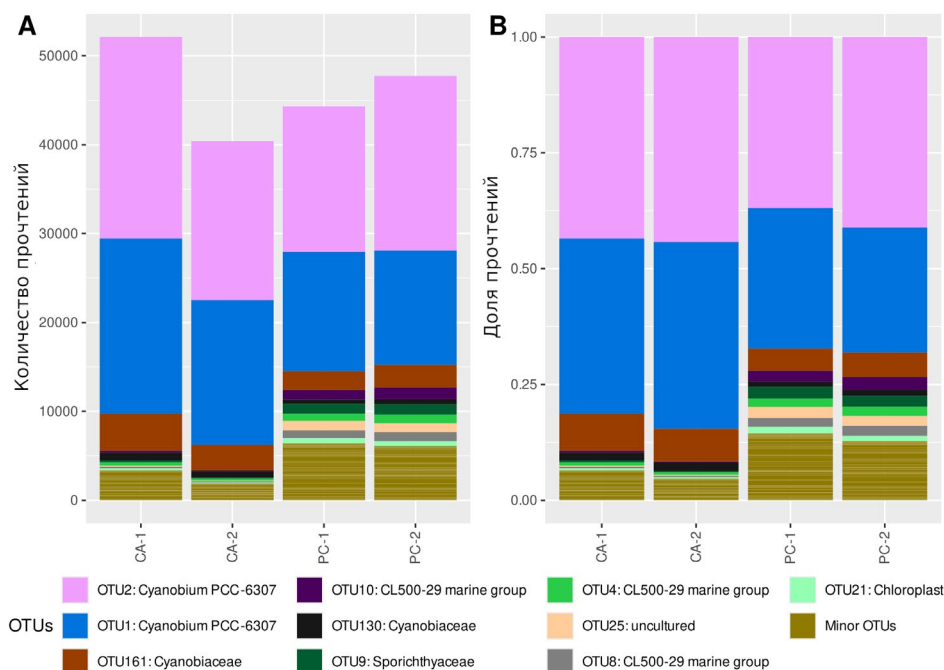


Рис.3. Численность OTU в абсолютных значениях (А) и долях (В). Представлены топ-10 наиболее распространенных OTU. Остальные OTU объединены в категорию «Minor OTUs».

и высшего образования РФ: № 0279-2021-0009. Исследование выполнено с использованием микроскопов Приборный центр коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ»). Также выражаем благодарность Иркутскому суперкомпьютерному центру Сибирского отделения Российской академии наук за предоставление доступа к высокопроизводительному кластеру «Академик В.М. Матросов» и Центру коллективного пользования Единой информационно-вычислительной сети Иркутского научно-образовательного комплекса за предоставление инфраструктуры для хранения данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что нет никаких конфликтов интересов.

Список литературы

- Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541-555. DOI: [10.1016/j.mimet.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009)
- Bukin Y.S., Mikhailov I.S., Petrova D.P. et al. 2023. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 229 DOI: [10.1007/s11274-023-03678-1](https://doi.org/10.1007/s11274-023-03678-1)
- Chua E-W., Miller A.L., Kennedy M.A. 2015. Choice of PCR microtube can impact on the success of long-range PCRs. *Analytical Biochemistry* 477: 115-117. DOI: [10.1016/j.ab.2015.02.023](https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.023)
- Djurhuus A., Port J., Closek C.J. et al. 2017. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science* 4: 314. DOI: [10.3389/fmars.2017.00314](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314)
- Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
- Eichmiller J.J., Miller L.M., Sorensen P.W. 2015. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources* 16(1): 56-68. DOI: [10.1111/1755-0998.12421](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421)
- Fonseca V.G., Nichols B., Lallias D. et al. 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSUmetagenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 40(9): e66. DOI: [10.1093/nar/gks002](https://doi.org/10.1093/nar/gks002)
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular biology and evolution* 35(2): 518-522. DOI: [10.1093/molbev/msx281](https://doi.org/10.1093/molbev/msx281)
- Hugon P., Lagier J., Colson P. et al. 2017. Repertoire of human gut microbes. *Microbial Pathogenesis* 106: 103-112. DOI: [10.1016/j.micpath.2016.06.020](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020)
- Li J., Lawson Handley L.J., Read D.S. et al. 2018. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*. DOI: [10.1111/1755-0998.12899](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899) Epub ahead of print. PMID: 29766663
- Love M.I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12): 550. DOI: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)
- McMurdie P.J., Holmes S. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8(4): e61217. DOI: [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)
- Mikhailov I.S., Galachyants Y.P., Bukin Y.S. et al. 2022. Seasonal Succession and Coherence Among Bacteria and Microeukaryotes in Lake Baikal. *Microbial Ecology* 84(2): 404-422. DOI: [10.1007/s00248-021-01860-2](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01860-2)
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1530-1534. DOI: [10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015)
- Moldovan O.T., Baricz A., Szekeres E. et al. 2020. Testing Different Membrane Filters for 16S rRNA Gene-Based Metabarcoding in Karstic Springs. *Water* 12(12): 3400. DOI: [10.3390/w12123400](https://doi.org/10.3390/w12123400)
- Oksanen J., Simpson G., Blanchet F. et al. 2022. vegan: Community Ecology Package. URL: cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf
- Rappé M.S., Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-94. DOI: [10.1146/annurev.micro.57.030502.090759](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759)
- Rognes T., Flouri T., Nichols B. et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584. DOI: [10.7717/peerj.2584](https://doi.org/10.7717/peerj.2584)
- Salonen I.S., Chronopoulou P., Nomaki H. et al. 2021. 16S rRNA Gene Metabarcoding Indicates Species-Characteristic Microbiomes in Deep-Sea Benthic Foraminifera. *Frontiers in Microbiology* 12: 694406. DOI: [10.3389/fmicb.2021.694406](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694406)
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-41. DOI: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09)
- Takahashi M., Saccò M., Kestel J.H. et al. 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal bio-monitoring revolution. *Science of the Total Environment* 873: 162322. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.162322](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322)
- Turner C.R., Barnes M.A., Xu C.C. et al. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676-684. DOI: [10.1111/2041-210X.12206](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206)
- Разумов А.С. 1931. Прямой метод учета бактерии в воде. Сравнение его с методом Коха. *Микробиология* 1(2): 131-136.