ISSN 0868-854 (Print); ISSN 2413-5984 (*Online*).
Algologia. 2021. 31(*1*): *93–113*
https://doi.org/10.15407/alg31.01.093

Різноманіття епіпельних ціанобактерій басейну р. Пінанг, Малайзія, виявлене за допомогою метагеномного підходу на основі 16S

Нур Фадзліана А.Р.[1], Ван Мазна В.О.[1], Нор С.А.М.[1], Чун Пін Фонг[1], Ло Вей[2]

[1] *Школа біологічних наук, Малазійський університет Санс, 11800 Пінанг, Малайзія*
[2]*SOA Ключова лабораторія полярних наук, Інститут полярних досліджень Китаю, Шанхай 200136, Китай*
wmaznah@usm.my

Надійшла до редакції 03.09.2020. Після доопрацювання 03.11.2020. Підписана до друку 05.11.2020. Опублікована 22.03.2021

Реферат. Ціанобактерії – найпоширеніша група фотосинтезуючих прокаріотів. Вони є основними продуцентами у різних місцезростаннях і здатні вегетувати в суворих умовах, включаючи забруднені води. Тому метою дослідження було вивчення угруповання ціанобактерій у річках з різним ступенем забруднення. Зразки донних осадів (епіпелон) були відібрані у басейні невеликої річки Пінанг (3,5 км завд.), що утворюється у результаті злиття річок Ейр-Терджун (T1) та Ейр-Ітам (T2); у середній частині басейну до неї впадають річки Донданг (T3) та Джелутонг (T4). Нижня ділянка р. Пінанг (T5), розташована поблизу морської затоки, зазнає впливу солоної води під час припливів. Ідентифікацію ціанобактерій проводили за даними послідовності амплікону гена 16S рРНК. Амплікони генів 16S рРНК, генеровані із зібраних зразків, секвенували за допомогою ілюмінатора Miseq, причому цільові області V3 та V4 давали приблизно 1 млн зчитувань на зразок. У всіх зразках були виявлені *Synechococcus* C. Nägeli, *Phormidium* Kütz. ex Gomont, *Arthronema* Eschscholtz та *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek. Індекс різноманітності Шеннона-Вейнера був найвищим (H' = 1,867) на чистій станції вище за течією (T1), тоді як у помірно забрудненому допливі (T3) зафіксовано найнижчу різноманітність ціанобактерій (H' = 0,399), на відносно забруднених станціях (T4, T5) відмічено досить високі значення H'. Це дослідження дає уявлення про структуру угруповань ціанобактерій у басейні р. Пінанг за допомогою незалежних від культивування методів із використанням послідовності амплікону гена 16S рРНК. Поява деяких морфовидів у певних місцях показала, що угруповання ціанобактерій досить чіткі та мають специфічні екологічні вимоги. Деякі види зафіксовані на всіх досліджених ділянках, що свідчить про їхню здатність переносити різноманітні умови навколишнього середовища.

К л ю ч о в і с л о в а : ціанобактерії, видовий склад, 16S рРНК, Пінанг, Малайзія

© Нур Фадзліана А.Р., Ван Мазна В.О., Нор С.А.М., Чун Пін Фонг, Ло Вей, 2021

Вступ

Ціанобактерії, або синьозелені водорості, є давньою групою мікроорганізмів, що виникла мільярди років тому і характеризується відносно багатим морфологічним різноманіттям (Dvořák et al., 2020). Це прокаріотичні фотосинтетичні автотрофи, отже їх відрізняють від еукаріотичних водоростей (Ho et al., 2010). Фотосинтетичні автотрофи є майже у всіх середовищах існування, куди доступне світло. Вони мають ряд світлопоглинаючих пігментів у функціональній одиниці, відомій як фікобілісома, включаючи фікоеритрин, фікобілін, хлорофіл *a* та фікоціанін, причому останній сприяє появі характерного синювато-зеленого кольору (Singh et al., 2015). Ціанобактерії відомі своєю здатністю колонізувати екстремальні середовища, такі як жаркі пустелі та надзвичайно холодні антарктичні та арктичні регіони (Kaštovská et al., 2005). Ціанобактерії є важливими первинними продуцентами водних екосистем (Paerl et al., 2000). У наземних умовах вони часто першими з фотосинтезуючих організмів колонізують субстрати, бідні на поживні речовини, такі як гірські породи, вулканічний попіл (Lutz et al., 2015) чи піски пустелі (Wierzchos et al., 2013). Ціанобактерії також можуть сприяти процесам вивітрювання гірських порід, таких як вапняки, прискорюючи деградацію їх поверхні (Sigler et al., 2003). Деякі ціанобактерії також здатні здійснювати фіксацію азоту (Ho et al., 2010). Відомі симбіотичні взаємовідносини між різними еукаріотичними організмами та ціанобактеріями, оскільки еукаріоти не здатні фіксувати азот (Krupke et al., 2014). Є також ціанобактерії, які беруть участь у симбіотичних взаємовідносинах з іншими бактеріями, які використовують кисень, що утворюється в результаті фотосинтезу ціанобактеріями, для біодеградації вуглеводнів (Abed et al., 2002b).

Такі тропічні регіони, як Малайзія, характеризуються стабільним кліматом, і ці умови стимулюють ріст майже всіх груп організмів, а не лише мікробіоти (Schluter, Pennell, 2017). Мікроорганізми в цих регіонах, як правило, не стикаються з такими стресами, як низька доступність води або температура замерзання, тому біомаса та різноманітність ціанобактерій більші в тропіках порівняно з полярними регіонами (Cavicchioli, Erdmann, 2015). Басейн річки Пінанг розташований на півночі о-ва Пенанг і є найбільшим водозбором на цьому острові. Він був одним з найбільш забруднених річкових басейнів Малайзії, причому комунальні стоки м. Джорджтауна, другої за розміром міської агломерації Малайзії, забруднюють основну нижчу частину басейну (Wan Maznah, Mansor, 2002). Водозбір включає декілька приток, води яких поступово приєднуються до Пінангу і стікають за течією до затоки Андаманського моря. Ці притоки мають різний ступінь забруднення: від відносно незабрудненої річки Ейр-Терджун (у верхів'ї) до слабко забруднених річок Ейр-Ітам і Донданг (середня течія), розташованих у високорозвиненому

районі, до сильно забруднених річок Джелутонг та Пінанг (Wan Ruslan Ismail, 2000).

Історично ідентифікація ціанобактерій неодмінно спиралася на підходи, які базувалися на виділенні природного матеріалу в культуру з подальшою оцінкою морфологічних та інших характеристик. В останні десятиліття здійснено стрімкий прогрес у молекулярно-біологічному аналізі, що дозволяє проводити ідентифікацію шляхом екстракції та ампліфікації ДНК (Creer et al., 2016). Молекулярні підходи нині широко використовуються в усьому світі, долаючи багато обмежень, пов'язаних з виділенням та культивуванням ціанобактерій (Crispim, Gaylarde, 2005). Найбільш поширеним маркерним геном, що використовується для створення профілів цієї групи, є ген 16S рРНК.

Головна мета нашого дослідження – за допомогою секвенування амплікону гена 16S рРНК оцінити різноманіття та закономірності розподілу ціанобактерій на ділянках басейну річки Пінанг, що відрізняються за показниками якості води. Отримані дані та їх аналіз забезпечують відправні показники для майбутніх досліджень, спрямованих на розуміння та прогнозування зв’язку угруповань ціанобактерій та їх різноманітності з екологічним станом у басейні річки.

Матеріали та методи

Місця дослідження, відбір зразків. Матеріалом для досліджень були зразки, відібрані у басейні р. Пінанг від верхів’я до гирлової ділянки (рис. 1).

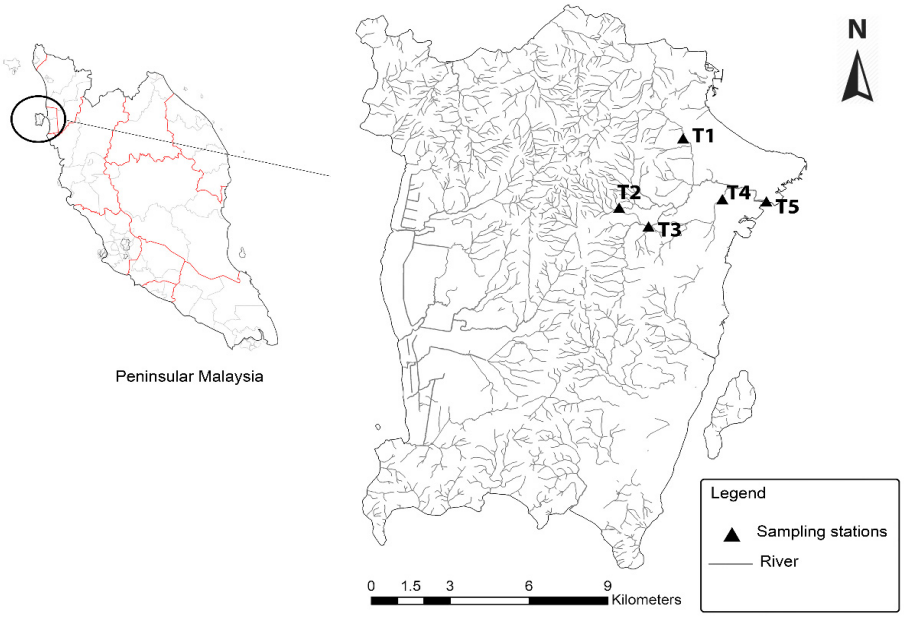

Рис. 1. Карта-схема басейну р. Пінанг зі станціями відбору зразків у річках Ейр-Терджун – Т1, Ейр-Ітам – Т2, Донданг – Т3, Джелутонг – Т4, Пінанг – Т5

Станції відбору проб, розташовані на річках Ейр-Терджун (Т1) та Ейр-Ітам (Т2), представляли верхню частину басейну річки Пінанг, тоді як станції на річках Донданг (Т3) та Джелутонг (Т4) – середню частину басейну. Місце відбору проб на річці Пінанг (Т5) було розташоване у її гирлі при впадінні у морську затоку.

Місця відбору зразків відрізнялися за якістю води, оскільки станції вгорі були чистими, річка Донданг мала помірний рівень забруднення, а вода річки Джелутонг далі за течією була більш забрудненою, дещо солонуватою та мала неприємний запах (табл. 1).

Таблиця 1. **Середні значення (± SD) показників якості води станцій відбору проб у басейні р. Пінанг**

Показник	Станція відбору проб				
	Т1	Т2	Т3	Т4	Т5
pH	6,9 ± 0,2	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,2
Розчинений кисень мг/л	8,1 ± 0,4	7,8 ± 0,8	3,9 ± 1,7	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,8
Электропровідність, мкСм/см	28,3 ± 6,0	39,1 ± 11,9	227,1 ± 94,1	303,3 ± 60,2	543,1 ± 73,1
БПК, мг/л	1,0 ± 0,3	1,9 ± 0,6	32,1 ± 12,4	39,4 ± 7,0	43,5 ± 12,7
ХПК, мг/л	8,1 ± 1,9	11,2±1,8	91,1±52,1	93,0±25,3	96,2 ± 18,2
NH_3 -N, мг/л	0,2±0,1	0,7±0,4	6,6±5,3	6,8±3,4	8,2 ± 4,4
NO_3 -N, мг/л	0,5±0,5	1,8±0,6	4,7±2,2	6,6 ± 4,3	3,3 ± 1,5
NO_2 -N, мг/л	0,04 ± 0,04	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,05
PO_4 -P, мг/л	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,4	3,2 ± 1,6	2,6 ± 0,9	2,2 ± 0,9
Загальна кількість зважених твердих речовин, мг/л	7,8 ± 5,4	16,9±8,6	54,2±21,2	60,4±19,1	85,2 ± 16,3
Загальна кількість твердих речовин, мг/л	29,5 ± 4,9	60,0 ± 11,7	239,4 ± 32,5	214,1 ± 33,7	357,4 ± 44,8
Загальна кількість розчинених твердих речовин, мг/л	11,7 ± 4,4	27,2 ± 7,0	115,2 ± 18,3	123,5 ± 21,5	246,3 ± 37,8
Кислотність HCO_3^{-3}, мекв/л	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,5

Нижня ділянка р. Пінанг була найбільш забрудненою та солонуватою, під час припливу до русла потрапляла морська вода, солоність коливалася від 2 до 6 пунктів. Проби мулистого осаду відбирали у трьох повторностях у середині потоку за допомогою труби діаметром 5 см, яку занурювали в осад на глибину приблизно 5 см. Зразки на станції Т5 відбирали під час

відпливу, щоб забезпечити дотримання однорідної схеми відбору проб на станціях. Зразки поміщали у стерильні контейнери і до перенесення у лабораторію зберігали в ящику із льодом при 0 ºС.

Молекулярні дослідження

Виділення ДНК. Для забезпечення оптимального використання зразків застосовували комерційні набори для виділення ДНК. Серед існуючих наборів нами було обрано MOBIO Powersoil Isolation Kit, оскільки цей набір забезпечує кращу якість ДНК і посилення специфічними для ціанобактерій праймерами (Gaget та ін., 2017). Заморожені зразки (–20 ºС) розморожували при 4 ºС у холодильнику протягом 45 хв, щоб захистити клітини від температурного шоку.

ДНК екстрагували зі зразків за допомогою набору MOBIO Powersoil з незначними модифікаціями через наявність гумінової кислоти. Приблизно 0,25 г ґрунту вносили до туби із 5 мкл протеїнази-К й інкубували протягом 1 год при 37 °С для видалення надлишку гумінової кислоти перед додаванням першого лізисного буфера С1. ДНК елюювали в 50 мкл розчину С6 (10 мМ Трис, без ЕДТА, pH 8,0). Після екстракції проводили кількісне визначення геномної ДНК за допомогою спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Ампліфікація гена 16S. Зразки ДНК піддавали ПЛР із використанням 16S специфічних ціанобактеріальних праймерів, прямого праймера 5’- GGG GGA TTT TCC GCA ATG GG- 3 ’та зворотного праймера 5’- CGC TCT ACC AAC TGA GCT A- 3’ (Boyer et al., 2002). До ПЛР-суміші (iTaq plus), що містить 2 мкл буфера $MgCl_2$, 2 мкл суміші dNTP та 0,5 одиниці ДНК-полімерази Ex Taq, додавали 15 мкл ультрачистої води, по 1 мкл прямого та зворотного праймерів і 3 мкл геномної ДНК, отримавши кінцевий об’єм 20 мкл. Ампліфікацію 16S рДНК проводили за допомогою термоциклера Bio-Rad наступним чином: 94 °С протягом 1 хв (денатурація), 56 °С протягом 1 хв (віджиг), 35 циклів 72 °С протягом 4 хв (розширення) і остаточне продовження при тій же температурі ще протягом 10 хв. Гель-електрофорез проводили для скринінгу необхідної смуги на 1% агарозних гелях.

Секвенування ампліконів 16S. Геномна ДНК була відправлена для секвенування за допомогою платформи Illumina Miseq з цільовими регіонами V3 і V4 (Klindworth et al., 2013). Для секвенування ампліконів 16S використовували праймери, наведені у табл. 2.

Біоінформаційний аналіз

Попередня обробка Fastq. Qiime (Caporaso et al., 2010) був використаний для обробки прочитаних даних на багатьох рівнях. Спочатку здійснювали перевірку забруднення адаптера за допомогою PEAT v 1.2, а потім зчитування fastq було піддано BBMerge: спарене злиття кінцевих

зчитувань v 7.3. Для аналізу загальної якості зчитувань використовували інструменту Fastx_toolkit (fastq_quality_filter). Були відібрані зчитування, які мали 70 і більше відсотків показника якості Q20. Нарешті, зчитування були відфільтровані за мінімальною довжиною більше 100 bp.

Таблиця 2. **Приймери, використані для секвенування ампліконів 16S**

Прямий праймер
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
Зворотній праймер
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTG TATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Після проходження перевірки якості зчитування Fastq були переведені у формат Fastq. Виявлення химери проводили для пошуку передбачуваних химерних послідовностей у відфільтрованих даних; послідовності були піддані usearch uchime ref chimera і перевірені на RDP_GOLD v9 із параметрами за замовчуванням. Химерні послідовності видаляли перед наступним кроком у конвеєрі.

Метод *Open Reference Subsample OTU Picking* з використанням версії 1.8 Qiime. Вхідні зчитування були відфільтровані шляхом пошуку зчитувань за еталонним набором із низьким відсотком порогу ідентичності, щоб відкинути послідовності, які не були репрезентативними для цільового маркерного гена. Uclust v 1.2.22 кластеризував послідовності паралельно із робочим процесом відбору за закритим посиланням OTU, і послідовності були перевірені щодо Greengenes (DeSantis et al., 2006) (http://greengenes. Lbl. Gov) на рівні 97% ідентичності (Harris et al., 2013). Якщо зчитування відповідало вибраній контрольній послідовності на рівні більше 97% ідентичності, їх вважали еталонними OTU (operative taxonomy unit). Було обрано випадковим чином 0,1% неанотованих послідовностей та згруповано *de novo*, а новий збір еталонних послідовностей був здійснений з використанням кластерного центроїда для всіх отриманих OTU. Решта послідовностей, не включених до кластеризації *de novo*, пройшли додатковий раунд паралельного відбору з закритим посиланням OTU проти нових еталонних OTU, знову з ідентичністю > 97%. На завершальному етапі кластеризації ті послідовності, які не вдалося анотувати, під час цього останнього етапу збору OTU були згруповані *de novo* із закритими посиланнями і називалися „очищені OTU”. Нарешті, довідкові (reference) OTU, нові довідкові OTU та очищені OTU були об’єднані в єдину таблицю OTU. Оперативні таксономічні одиниці, кількість яких менше або дорівнює пороговому значенню 5 у цій та попередній відфільтрованій таблиці, були прийняті. Це означає, що кожна OTU спостерігалася принаймні 5 разів до того, як її було прийнято.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення PAST. Відносну чисельність ціанобактерій, індекс різноманітності Шеннона-Вейнера (H') та кластерний аналіз обчислювали за допомогою PAST (Hammer et al., 2001). Для перевірки будь-яких статистично значущих відмінностей між ціанобактеріальними угрупованнями досліджених станцій відбору проб було використано програмне забезпечення SPSS V20.0.

Результати та обговорення

Виділення ДНК за допомогою MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit. Ми використали модифікований протокол вилучення ДНК із донних відкладів для підвищення низьких концентрацій ДНК, отриманих за допомогою оригінального протоколу (дані не наведені). Модифікації передбачали внесення зразків мулу, додавання розчину протеїнази К у кожну тубу та інкубацію протягом 3 год при 65 ºС. Після проведення модифікації зі стадією гарячого лізису необхідні концентрації були успішно досягнуті (табл. 3, рис. 2).

Таблиця 3. **Концентрація, чистота (260 : 280 та 260 : 230) та вихід загальної ДНК мулу за допомогою MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit із модифікаціями**

Станція відбору зразків	Концентрація, нг/мкл	260 : 280	260 : 230
T1	50,0	1,78	0,93
T2	30,6	1,82	0,99
T3	13,8	1,96	1,73
T4	43,2	1,78	1,42
T5	41,2	1,78	1,65

ДНК завантажена в кількості 4 мкл.

Набір MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit діє за методом на основі SDS, який покращує вилучення мікробної ДНК зі складних зразків, таких як грунт (Soliman et al., 2017). У ґрунті зазвичай міститься багато забруднень, таких як гумінова кислота, які пригнічують ферментативні реакції, що беруть участь у відновленні ДНК, ПЛР та кількісному визначенні процесів ДНК. Тому були зроблені модифікації протоколу, що поєднують етапи гарячого хімічного та фізичного лізису для щоб досягти збільшення якісті та кількості ДНК (Roslan et al., 2017). Додана протеїна за К перетравлює органічні кислоти та білки, тоді як процес інкубації тепла сприяє гомогенізації та денатурації ферментів ДНК-ази, а SDS із високим

вмістом солі пом'якшує клітинну мембрану. Модифікований протокол збільшив концентрацію екстрагованої ДНК та її якість, щоб задовольнити мінімальні вимоги (чистота: A260/A280) для етапу підготовки бібліотеки на платформі послідовності наступного покоління Illumina Miseq (NGS).

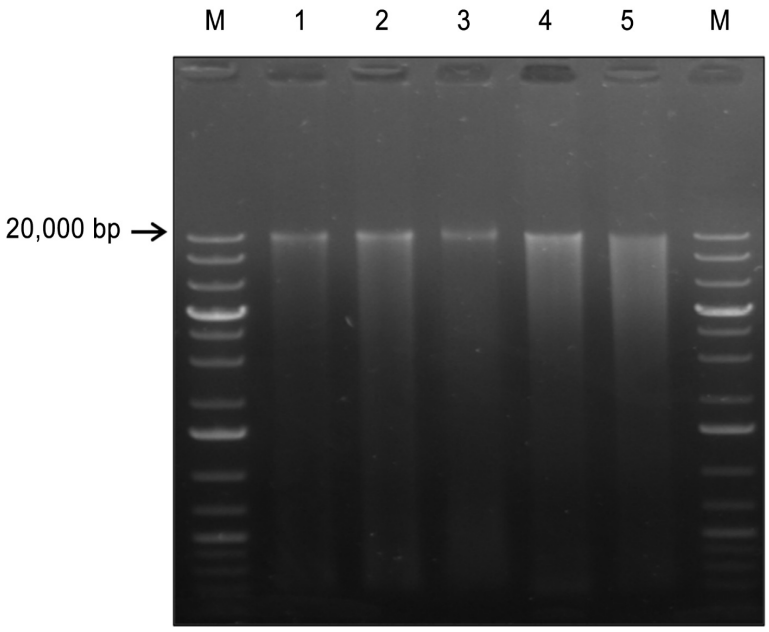

Рис. 2. Загальна ДНК донних відкладів (метагеномна ДНК), екстрагована з Lane M: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific); доріжка 1: загальна ДНК мулу зі станції T2 (р. Ейр-Ітам); доріжка 2: загальна ДНК мулу зі станції T1 (р. Ейр-Терджун); доріжка 3: загальна ДНК мулу зі станції T3 (р. Донданг); доріжка 4: загальна ДНК мулу зі станції T4 (р. Джелутонг); доріжка 5: загальна ДНК мулу зі станції T5 (р. Пінанг)

Чистоту ДНК досліджували за співвідношенням двох значень поглинання. Чиста ДНК має співвідношення значень поглинання при 260/280 нм між 1,7 і 1,8, тоді як нижчі значення вказують на значне забруднення білками (Clark, Christopher, 2000). Однак коефіцієнт поглинання 260/280 не завжди точно відображає чистоту ДНК, оскільки неточні співвідношення також можуть зустрічатися при дуже низьких концентраціях (< 10 нг/мкл) нуклеїнових кислот (O'Neill et al., 2011). Іноді деякі зразки дуже важко оцінити при 280 нм через джерела інтерференції, такі як вільні нуклеотиди, або деградація ДНК може призвести до того, що це співвідношення буде більше 2 (Wilfinger et al., 1997).

Угруповання ціанобактерій, виявлені методом кластеризації OTU

На рис. 3 показано різноманіття ціанобактерій на рівні роду, зареєстроване за їхньою загальною кількістю. Серед виявлених родів найбільший показник рясності мали *Phormidium* (46426), *Nostoc* Vaucher ex Born. et Flah. (54305) і *Leptolyngbya* (297193). На станції T1 відмічено найвищу

відносну рясність *Phormidium* sp. (3,60%). Н-критерій Крускала-Уолліса показав, що існує суттєва різниця між відносною рясністю ціанобактерій на досліджених станціях ($p < 0,05$), і середнім рівнем цього показника 195,79 (Т1), 194,02 (Т2), 141,82 (Т3), 161,32 (Т4) та 179,23 (Т5).

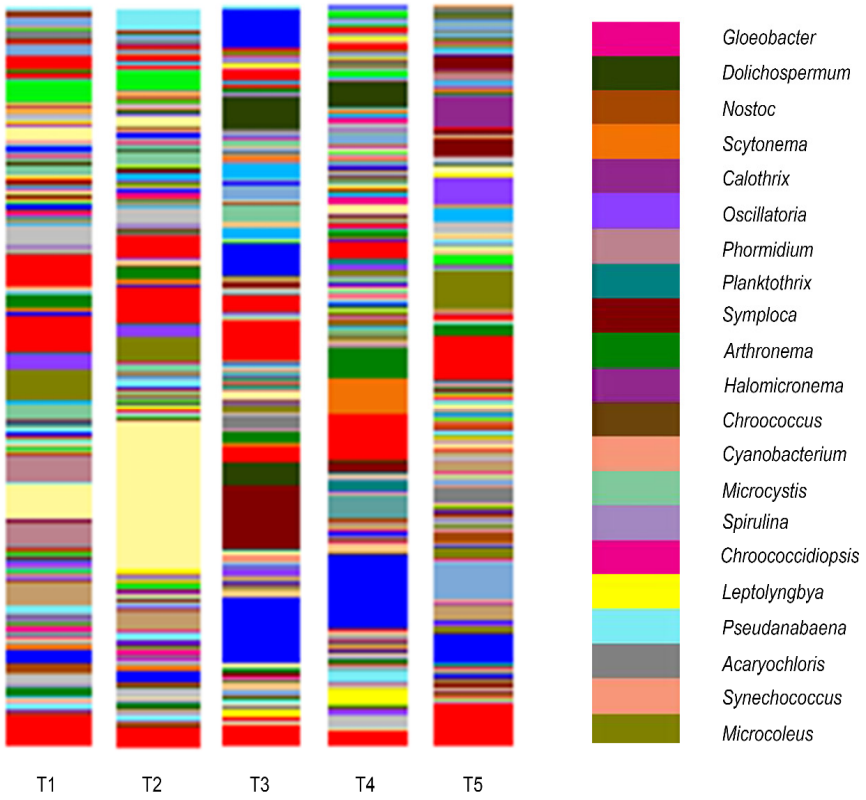

Рис. 3. Різноманіття та рясність ціанобактерій (на рівні роду) у зразках на станціях відбору проб Т1–Т5

На рис. 4 показано різноманіття ціанобактерій на видовому рівні. Загалом у верхній частині басейну р. Ейр-Терджун (Т1) зафіксовано 16 видів, у р. Ейр-Ітам (Т2) – 15 видів з 14 родів, у середній частині р. Донданг (Т3) виявлено лише 8 видів з 7 родів, у нижній частині р. Джелутонг (Т4) зафіксовано 12 видів з 11 родів, а в низів'ї р. Пінанг (Т5) ідентифіковані представники 13 видів з 12 родів (табл. 4). На всіх станціях траплялися представники порядків *Chroococcales*, *Oscillatoriales* та *Pseudanabaenales* з родів *Synechococcus*, *Phormidium*, *Arthronema* та *Leptolyngbya*.

Популяції ціанобактерій у місцях дослідження складалися з одноклітинних та нитчастих форм. Одноклітинні ціанобактерії були ідентифіковані як представники порядків *Chroococales*, *Synechococcales* та

Gloebacterales; нитчасті організми належали до порядків *Oscillatoriales*, *Pseudanabaenales* та *Nostocales*. Серед п'яти досліджених станцій річка Ейр-Терджун (T1) була найрізноманітнішою за складом ціанобактерій, за нею – річки Ейр-Ітам (T2), Пінанг (T5), Джелутонг (T4) та Донданг (T3).

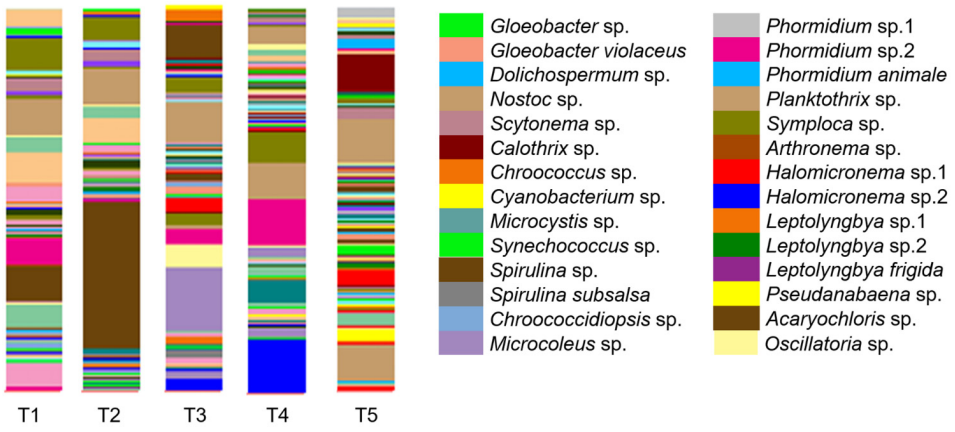

Рис. 4. Різноманіття та рясність ціанобактерій (на рівні виду) у зразках на станціях відбору проб T1–T5

Представники роду *Scytonema* характеризуються утворенням скупчень ниток, оповитих міцними піхвами, наявністю гетероцист і акінет, а також подвійним несправжнім галуженням (Cronberg et al., 2003). У цьому дослідженні *Scytonema* sp. була знайдена лише в донних відкладах річок Ейр-Терджун та Ейр-Ітам. Кілька видів *Scytonema* зареєстровані у верхніх частинах р. Тукун в Малайзії, колонізуючи різні типи субстратів (Azizan et al., 2020). За даними літератури (Paerl et al., 2000), види *Scytonema* поширені в усьому світі, включаючи донні відклади прісних вод у тропіках. *Scytonema* часто зустрічається у повітряних або субаеріальних зразках, відібраних з вологих скель або ґрунту (Merican et al., 2006; Komárek et al., 2013), де обмежена доступність поживних речовин. Види *Scytonema* містять гетероцисти (або гетероцити), що здійснюють азотфіксацію. Їхня поява може бути показником зниження рівня азоту в навколишньому середовищі (Azizan et al., 2020). Можна припустити, що представники *Scytonema* вимагають низького рівня концентрації поживних речовин і не можуть існувати в органічно забруднених водах. Цим можна пояснити появу *Scytonema* sp. на відносно чистих ділянках басейну – річках Ейр-Терджун та Ейр-Ітам.

Іншим зареєстрованим ниткоподібним видом був *Planktothrix* sp. Представники цього роду характеризуються як вільно плаваючі нерухомі трихоми, поширені в планктоні прісних водойм (Sønstebø, Rohrlack, 2011).

Таблиця 4. **Список ціанобактерій басейну р. Пінанг (Т1 – Ейр-Терджун, Т2 – Ейр-Ітам, Т3 –Донданг, Т4 –Джелутонг, Т5 – Пінанг)**

Таксон	Станція				
	Т1	Т2	Т3	Т4	Т5
Порядок *Chroococcales*					
Chroococcus sp.	+	+	–	–	–
Chroococcidiopsis sp.	–	+	–	+	+
Cyanobacterium sp.	–	–	+	+	+
Microcystis sp.	+	+	–	–	–
Spirulina sp.	–	–	–	–	+
Spirulina subsalsa	–	–	–	+	–
Пордок *Synechococcales*					
Acaryochloris sp.	+	+	–	+	–
Synechococcus sp.	+	+	+	+	+
Порядок *Gloebacterales*					
Gloebacter violaceus	+	–	–	–	–
Порядок *Oscillatoriales*					
Microcoleus sp.	+	+	–	–	+
Oscillatoria sp.	–	–	–	–	+
Phormidium sp.	+	+	+	+	+
Phormidium animale	+	+	+	+	–
Planktothrix sp.	+	–	+	+	–
Symploca sp.	+	–	–	–	+
Порядок *Pseudanabaenales*					
Arthronema sp.	+	+	+	+	+
Halomicronema sp. 1	–	–	–	–	+
Halomicronema sp. 2	–	–	–	–	+
Leptolyngbya sp. 1	+	+	–	–	–
Leptolyngbya sp. 2	+	+	+	+	+
Leptolyngbya frigida	–	+	–	–	–
Pseudanabaena sp.	+	+	+	+	–
Порядок *Nostocales*					
Scytonema sp.	+	+	–	–	–
Calothrix sp.	+	+	–	+	+

Наявність *Planktothrix* sp. в осаді чистих (Т1, р. Ейр Терджун) та забруднених (річки Донданг – Т3 та Джелутунг – Т4) станцій свідчить про те, що цей вид може рости у водоймах із різним рівнем органічного забруднення. Також повідомляється, що *Planktothrix* може траплятися як у планктоні, так і в бентосі (Komárek, Anagnostidis, 2005).

Види *Microcystis* Kützing у вигляді колоній дрібних клітин у слизовому матриксі зазвичай трапляються у прісних водах, а також в інших місцезростаннях (Misson et al., 2012; Pancrace et al., 2017). Відомо, що представники *Microcystis* та інших ціанобактеріальних родів, що є агентами «цвітіння» води, часто спричиняють спалахи цвітіння в евтрофних водоймах і рідко трапляються в оліготрофних водах (Graham et

al., 2009; Harke et al., 2016), тому, знахідки *Microcystis* sp. у зразках з річок Ейр Терджун (T1) та Ейр-Ітам (T2), вода в яких відносно чиста, є дещо інтригуючими. Для кращого розуміння факторів, що обумовлюють ріст та/або токсичність *Microcystis* у навколишньому середовищі, особливо у верхніх притоках Сунгай Пінанг, необхідно провести спеціальне дослідження для моніторингу вмісту макро- та мікроелементів, підвищення температури та концентрації вуглекислого газу (CO_2).

Представники роду *Chroococcus* зазвичай утворюють більш-менш кулясті драглисті колонії, що складаються з клітин, оточених власними слизовими оболонками; діаметр клітин 1,5–2,7 мкм. Представники цього роду переважно трапляються у метафітоні прісних водойм, можуть траплятися у планктоні (деякі види мають аеротопи), а також у наземних біотопах. Розмноження відбувається шляхом бінарного поділу. *Chroococcus* sp. також був зареєстрований лише у донних відкладеннях річок Ейр-Терджун (T1) та Ейр-Ітам (T2) у верхній частині басейну. Цей рід відомий своїм широким поширенням, особливо у тропічних прісних водах (Munir et al., 2016), рідше у солоних водоймах (Komárek et al., 2014).

У цьому дослідженні в епіпелі було зафіксовано двох представників роду *Spirulina* Turp., причому один з них виявлений лише в осаді р. Пінанг (T5). *Spirulina*, як правило, має циліндричні короткі до довгих трихоми шириною 0,3–7,5 мкм шир. та утворює тонкі слизисті плівки. Клітини без каліптри та інтенсивно рухливі. *Spirulina subsalsa* Oersted ex Gomont має інтенсивно рухливі та водночас ковзаючі трихоми. Скупчення трихомів у вигляді тонкої та м'якої ослизненої плівки. Деякі види *Spirulina* є космополітами (Nübel et al., 2000). Представників *Spirulina* часто можна зустріти у внутрішніх солоних і солонуватих стоячих водах або в прісних водах (Margheri et al., 2002). Знахідки *Spirulina* sp. та *S. subsalsa* в нижній частині басейну річок Джелутонг (T4) та Пінанг (5), де згадані річки характеризувалися широкими руслами, повільною течією та заходженням морської води під час припливу, відповідають літературним даним (Margheri et al., 2002).

Oscillatoria Vaucher ex Gomont зафіксована лише в гирлі р. Пінанг (T5) при впадінні в морську затоку; річкова вода тут дуже забруднена. Раніше було встановлено (Wan Maznah, Mansor, 2000) що представники цього роду домінують в перифітонних альгоугрупованнях станцій відбору проб у басейні річки Пінанг. Відомо, що представники *Oscillatoria* поширені у водоймах із водою низької якості, рівнинних річках з високою концентрацією сульфідів, трапляються у безкисневому гіполімніоні стратифікованих озер (Camacho et al., 2000). Наявність нитчастих ціанобактерій також часто пов'язана з органічними забруднювачами, такими як джерела фекалій (Douterelo et al., 2004).

Види роду *Symploca* Kützing ex Gomont утворюють таломи, складені з висхідних паралельно розташованих або заплутаних ниток у слизових

піхвах. Зазвичай вони є аерофітними або субаерофітними формами, також відомі своїм потенціалом вторинного виробництва метаболітів. Здебільшого це морські види (Sharma et al., 2011), але деякі з них також знайдені у донних відкладах тропічних прісних вод (Kumar et al., 2018), що відповідає їхній появі в річках Ер-Терджун (T1) та Пінанг (T5).

Arthronema J.Komárek & J.Lukavský виявлена на всіх станціях відбору проб (T1–T5) з різним рівнем забруднення та інтенсивності світла (Chaneva et al., 2007). Вода на станціях, розташованих нижче за течією, була більш забрудненою і каламутною в порівнянні з іншими станціями, тому водорості отримували тут менше світла. Відомо, що види *Arthronema* широко розповсюджені у різних типах місцезростань, зокрема, в широкому діапазоні температур (15–50 °C) та інтенсивності світла (50–300 моль фотонів $m^{-2} \cdot s^{-1}$). Вони трапляються в ксеротермічних (пустельних) регіонах, входять до складу біологічних кірочок засолених ґрунтів та маршів (Covarrubias et al., 2016).

До роду *Halomicronema* Abed, Garcia-Pichel & Hernádez-Mariné належать помірно галофільні та галотолерантні нитчасті ціанобактерії з дуже тонкими трихомами (Abed et al., 2002a). Цей рід, як правило, зустрічається в бентосі морів і вважається теплолюбним (Li et al., 2014). Тому знахідки *Halomicronema* spp. лише у зразках епіпелю з гирла річки Пінанг (T5) відповідають екології цього роду. Наприклад, *Halomicronema excentricum* Abed, Garcia-Pichel & Hernádez-Mariné (Abed et al., 2002a) була описана як галотолерантна бентосна ціанобактерія, яка оптимально зростає при загальній солоності середовища 4,5 та 12% (мас. /об.). На станції відбору проб T5 річкова вода поповнюється солоною водою під час високих припливів, тому її солоність може підніматись до 15‰. Висловлювалось припущення, що добові припливи сприяють проникненню морських видів у континентальні водойми (Wan Maznah, Mansor, 2002).

Азотфіксуючу ціанобактерію *Calothrix* sp. було відмічено у зразках по всьому руслу, за виключенням р. Донданг (T3). Про її знахідки у річках Ейр Теджун та Ейр Ітам повідомлялося раніше (Wan Maznah, Mansor, 2002). *Calothrix* C.Agardh ex Bornet & Flahault – космополітний рід, поширений у всьому світі переважно у бентосі прісних водойм (Paerl et al., 2000). Види роду важко ідентифікувати через їхню морфологічну пластичність при зміні водних умов (Rinkel, Manoylov, 2014).

Synechococcus виявлено у зразках на всіх станціях відбору проб (T1–T5). Представники цього роду зустрічаються у вигляді поодиноких клітин розміром 0,9–1,9 мкм. Вони широко поширені у більшості морських, прісноводних та наземних екосистем, а також у субаеріальних місцезростаннях від полярних до тропічних екосистем. Їх можна знайти у вигляді епіфітів, вільно живучих або у симбіотичних стосунках з рослинами та тваринами (Dvořák et al., 2014).

Донні відклади річок Ейр Терджун (T1) та Ейр Ітам (T2) подібні за структурою – вони утворені крупнозернистим піском. Два морфовиди, виявлені на цих місцях, *Scytonema* sp. та *Calothrix* sp. належать до родів, які зазвичай трапляються у прісноводних місцезростаннях з низьким вмістом поживних речовин (Douterelo et al., 2004). *Calothrix* sp. також має морфологію, яка дозволяє ефективно прикріплюватися до субстрату (Smythe et al., 2016). *Microcoleus* sp. та інші представники роду здатні до ковзаючого руху, їхні нитки утворюють канатоподібні переплетіння, що дозволяє колонізувати геологічно нестійкі осадові субстрати (Garcia-Pichel, Wojciechowski, 2009), як наприклад, дно швидкоплинних водних середовищ T1 і T2.

Видове різноманіття

Індекс різноманітності Шеннона-Вайнера був найвищим (H’ = 1,867) на станції вище за течією (T1), тоді як у середній частині (T3) його значення було найнижчим (H’ = 0,399). За нашими даними, найвищий та найнижчий показники H’ зафіксовані на ділянках із чистою (T1) та помірно забрудненою (T3) водою відповідно, тоді як на станціях із відносно забрудненою водою (T4, T5) спостерігалися досить високі значення H’ (табл. 5). Це суперечить загальним припущенням, що кількість видів та різноманітність зменшуються відповідно до погіршення умов якості води (Offem et al., 2011; Wan Maznah, Makhlough, 2015). Використання видового різноманіття для оцінки якості води є складним (Podani, 1992; Wan Maznah, Mansor, 2002). Відносно вище значення індексу H’ та видове багатство зареєстровано у пробі із забрудненої станції T5 (розташованої у гирлі) порівняно з помірно забрудненою станцією T3, може бути зумовлене перемішуванням поживних речовин під час припливів та занесенням морських видів. На нашу думку, це може впливати на формування видового різноманіття ціанобактерій у гирлі Пенангу.

Таблиця 5. **Індекси видового різноманіття (H’), багатства (S) та рівності (J) ціанобактерій на станціях відбору проб у басейні р. Пінанг**

Станція	Коефіцієнт		
	S	H’	J
T1	16	1,866	0,727
T2	15	1,846	0,743
T3	8	0,399	0,192
T4	12	1,498	0,443
T5	13	1,510	0,557

Кластерний аналіз

Ми використали метод ієрархічної кластеризації та одержали дендрограму (рис. 5), засновану на коефіцієнті індексу флористичної подібності Жаккарда, з 1000 бутстрепів. Як видно з рисунку, станції

відбору проб згрупувалися відповідно до розміщення уздовж течії: станції верхньої частини русла (T1 і T2), середньої частини T3 і нижче за течією (T4) і гирлової ділянки T5.

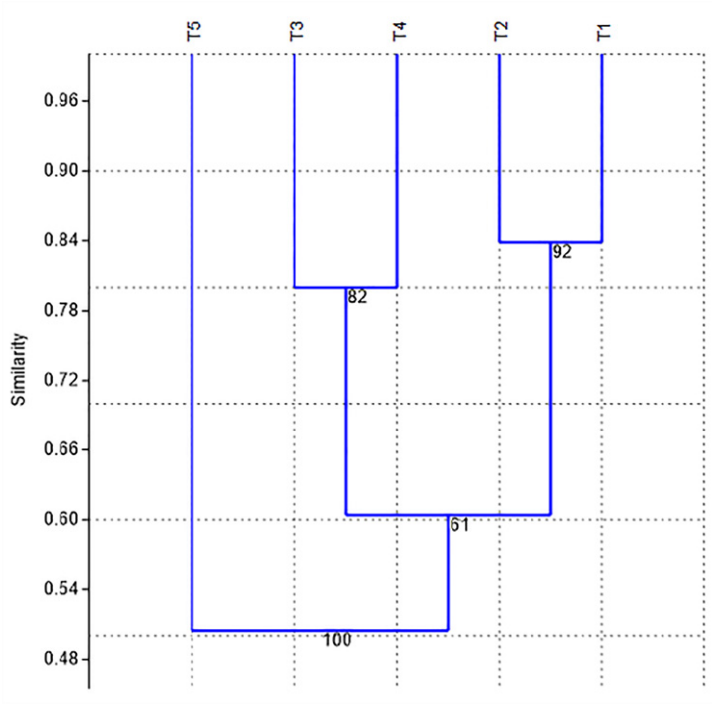

Рис. 5. Дендрограма на основі індексу схожості Жаккарда за п'ятьма місцями відбору проб (T1–T5)

На рис. 5 показано, що станції вище за течією (T1, T2) були згруповані, як і станції нижче за течією (T3, T4). Розділення верхніх та нижчих ділянок течії може бути обумовлено мінливістю фізичних та якісних характеристик водних потоків (табл. 1). Річки верхньої частини басейну характеризувалися чистою водою, швидкою течією та неглибокими руслами, тоді як для нижніх потоків були характерні забруднена вода з повільнішою течією, більша ширина та глибина русла. Станція T5 знаходиться окремо від інших чотирьох пунктів спостереження, ймовірно, через вплив морської води на донні угруповання цієї ділянки. Характерними видами для T5 були *Spirulina* sp., *Oscillatoria* sp. та *Halomicronema* sp. Відмінності у фізичних та хімічних властивостях різних приток басейну річки можуть відігравати селективну роль при формуванні угруповань синьозелених водоростей (Azizan et al., 2020).

Це перше дослідження угруповань ціанобактерій у басейні р. Пінанг з використанням 16S рДНК-амплікону для визначення їхнього видового

складу. Такий метод має багато переваг порівняно із класичними підходами до морфологічної ідентифікації, ізоляції та культивування. Показано, що методи, які не залежать від культивування, поповнили наші знання про різноманітність прокаріотів (Lambrechts et al., 2019), особливо у виявленні більшого різноманіття мікроорганізмів. За використання 16S рРНК та секвенування метагеномів природних угруповань виявлено велику кількість прокаріотів, які не піддаються культивуванню і раніше не враховувалися. Метагеномні підходи забезпечують подальший прогрес у розумінні на геномному рівні, а також застосування у вивченні мікробного різноманіття в складних середовищах (Ortiz-Estrada et al., 2019). Хоча за допомогою цього методу можна виявити невідомі раніше ціанобактерії, необхідно зазначити, що все ще існують обмеження в його застосуванні. Наприклад, наявність доступних праймерів чи режим відбору проб, якого можна було досягти з урахуванням можливості їхнього подальшого вивчення молекулярними методами.

Дані щодо різноманітності, отримані з використанням молекулярного підходу, можуть мати певні похибки, зокрема, деякі ОТУ неможливо виявити, хоча вони присутні у вихідному середовищі (Taton et al., 2006). Повідомлялося (Carini et al., 2016), що у зразках можуть бути присутніми мертві інтактні клітини та позаклітинна геномна ДНК, які збільшать показники, приховавши реальну картину таксономічного різноманіття. Існують слабкі сторони та застереження при використанні морфологічних та молекулярних підходів, тому їх слід поєднувати, щоб отримати повну картину різноманітності у природі (Taton et al., 2006). Секвенування наступного покоління (NGS) є додатковим інструментом для точної ідентифікації, що може посприяти інтенсифікації дослідження різноманітних природних угруповань мікроорганізмів на основі послідовностей (Eiler et al., 2013). У ході нашого обстеження району досліджень ми спостерігали розростання мікроорганізмів на різних субстратах. Ціанобактеріальне різноманіття могло бути значно більшим за рахунок відбору більшої кількості зразків. Однак, з огляду на фінансові обмеження при аналізі метагеномів та забезпечення однорідності дизайну вибірки, ми обмежилися відбором лише зразків м’яких донних відкладів.

Висновки

Уперше із використанням метагеномного підходу вивчено різноманіття ціанобактерій у басейні р. Пінанг. Дослідження показало, що 25% морфовидів розвивалися лише на певних станціях водотоків басейну р. Пінанг, що свідчить про наявність угруповань ціанобактерій цих річок, які досить чіткі та мають специфічні екологічні вимоги. Деякі види, що можуть переносити різноманітні умови навколишнього середовища, розвивалися на всіх станціях спостереження. За нашим дослідженням

вперше показано ціанобактеріальне різноманіття у басейні р. Пінанг. Використання метагеномного методу на основі 16S рДНК-амплікону для визначення складу ціанобактерій потенційно може бути потужним інструментом моніторингу навколишнього середовища.

Список літератури

Abed R.M.M., Garcia-Pichel F., Hernández-Mariné. 2002a. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol*. 177: 361–370.

Abed R.M.M., Safi N.M.D., Koster J., de Beer D., El-Nahhal Y., Rullkotter J., Garcia-Pichel F. 2002b. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol*. 68(4): 1674–1683.

Azizan A.A., Radzi R., Wan Maznah W.O., Convey P., Merican F.M.S. 2020. First Records of morphological diversity and ecology of periphytic Cyanobacteria from Tukun River, Penang forest reserve, Malaysia. *Tropic. Life Sci. Res*. 31(1): 85–105.

Boyer S.L., Johansen J.R., Flechtner V.R., Howard G.L. 2002. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (*Cyanophyceae*) species based on sequence analysis of 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *J. Phycol*. 38(6): 1222–1235.

Camacho A., Vicente E., Miracle M.R. 2000. Ecology of deep-living *Oscillatoria* (= *Planktothrix*) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Arch. Hydrobiol*. 148(3): 333–355.

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 7(5): 335–336.

Carini P., Marsden P.J., Leff J.W., Morgan E.E., Strickland M.S., Fierer N. 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat. Microbiol*. 2(3): 16242.

Cavicchioli R., Erdmann S. 2015. The discovery of Antarctic RNA viruses: a new game changer, *Mol. Ecol*. 24(19): 4809–4811.

Chaneva G., Furnadzhieva S., Minkova K., Lukavsky J. 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum* – a prospective phycobiliprotein-producing strain. *J. Appl. Phycol*. 19(5): 537–544.

Clark W., Christopher K. 2000. An introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation and the 'Frankengel' experiment. *Tested Stud. Lab. Teaching*. 22: 81–99.

Covarrubias Rubio Y., Cantoral Uriza E.A., Casas Flores J.S., García Meza J.V. 2016. Thermophile mats of microalgae growing on the woody structure of a cooling tower of a thermoelectric power plant in Central Mexico. *Rev. Mexic. Biodivers*. 87(2): 277–287.

Creer S., Deiner K., Frey S., Porazinska D., Taberlet P., Thomas W.K., Potter C., Bik H.M. 2016. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods Ecol. Evol*. 7(9): 1008–1018.

Crispim C.A., Gaylarde C.C. 2005. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microbial Ecol*. 49(1): 1–9.

Cronberg G., Carpenter E.J., Carmichael W.W. 2003. Taxonomy of harmful cyanobacteria. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris: UNESCO Publ. Pp. 523–562.

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Andersen G.L. 2006. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucl. Acids Res*. 34(2): 394–399.

Douterelo I., Perona E., Mateo P. 2004. Use of cyanobacteria to assess water quality in running waters. *Environ. Pollut*. 127(3): 377–384.

Dvořák P., Hindák F., Hašler P., Hindakova A., Poulíčková A. 2014. Morphological and molecular studies of *Neosynechococcus sphagnicola*, gen. et sp. nov. (*Cyanobacteria*, *Synechococcales*). *Phytotaxa*. 170(1): 24–34.

Eiler A., Drakare S., Bertilsson S., Pernthaler J., Peura S., Rofner C., Simek K., Yang Y., Znachor P., Lindström E.S. 2013. Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. PLoS ONE. 8(1): 1–10.

Gaget V., Lau M., Sendall B., Froscio S., Humpage A.R. 2017. Cyanotoxin: which detection techniques for an optimum risk assessment ? *Water Res.* 118: 227–238.

Garcia-Pichel F., Wojciechowski M.F. 2009. The evolution of a capacity to build supra-cellular ropes enabled filamentous cyanobacteria to colonize highly erodible substrates. *PLoS One*. 4(11): e7801.

Graham J.L., Loftin K.A., Kamman N. 2009. Monitoring recreational freshwaters. *Lakelines*. 29: 18–24.

Hammer Ø., Harper D.A., Ryan P.D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1): 1–9.

Harke M.J., Steffen M.M., Gobler C.J., Otten T.G., Wilhelm S.W., Wood S.A., Paerl H.W. 2016. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp., *Harmful Algae*. 54: 4–20.

Harris J.K., Caporaso J.G., Walker J.J., Spear J.R., Gold N.J., Robertson C.E., Hugenholtz P., Goodrich J., McDonald D., Knights D., Marshall P. 2013. Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *ISME J.* 7(1): 50–60.

Ho L., Kayal N., Trolio R., Newcombe G. 2010. Determining the fate of *Microcystis aeruginosa* cells and microcystin toxins following chlorination. *Water Sci. Technol.* 62(2): 442–450.

Kaštovská K., Elster J., Stibal M., Šantrůčková H. 2005. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microb. Ecol.* 50(3): 396–407.

Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucl. Acids Res.* 41(1): 1–11.

Komárek J., Anagnostidis K. 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil: *Oscillatoriales*. In: *Süßwasserflora vonMitteleuropa*. Bd 19/2. Munchen: Elsevier GmbH. Pp. 17–59.

Komárek J., Sanť Anna C.L., Bohunická M., Mareš J., Hentschke S., Rigonato J., Fiore M.F. 2013. Phenotype diversity and phylogeny of selected *Scytonema* – species (Cyanoprokaryota) from SE Brazil. *Fottea Olomouc*. 13(2): 173–200.

Komárek J., Kastovsky J., Mares J., Johansen J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia.* 86: 295–335.

Krupke A., Lavik G., Halm H., Fuchs B.M., Amann R.I., Kuypers M.M. 2014. Distribution of a consortium between unicellular algae and the N_2 fixing cyanobacterium UCYN-A in the North Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol*. 16(10): 3153–3167.

Kumar M., Sundaram S., Gnansounou E., Larroche C., Thakur I.S. 2018. Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Biores. Technol*. 247: 1059–1068.

Lambrechts S., Willems A., Tahon G. 2019. Uncovering the uncultivated majority in Antarctic soils: toward a synergistic approach. *Front. Microbiol*. 10: 1–242.

Li Y., Lin Y., Loughlin P.C., Chen M. 2014. Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll *f*. *Front. Plant Sci*. 5: 1–67.

Lutz S., Anesio A.M., Field K., Benning L.G. 2015. Integrated 'omics', targeted metabolite and single-cell analyses of Arctic snow algae functionality and adaptability. *Front. Microbiol*. 6: 13–23.

Margheri M.C., Bosco M., Giovannetti L., Ventura S. 2002. Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 9–16.

Merican F., Wan Asmadi W.A., Wan Maznah W.O., Mashhor Mansor. 2006. A note on the freshwater algae of Gunung Strong, Kelantan, Malaysia. *Trop. Life Sci. Res*. 17: 65–76.

Misson B., Sabart M., Amblard C., Latour D. 2012. Benthic survival of *Microcystis*: Long-term viability and ability to transcribe microcystin genes. *Harm. Algae*. 13: 20–25.

Munir M., Qureshi R., Ilyas M., Munazir M., Leghari M.K. 2016. Systematics of *Chroococcus* from Pakistan. *Pak. J. Bot.* 48(1): 255–262.

Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. 2000. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* spp. Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 50: 1265–1277.

Offem B.O., Ayotunde E.O., Ikpi G.U., Ada F.B., Ochang S.N. 2011. Plankton-based assessment of the trophic state of three tropical lakes. *J. Environ. Protect*. 2: 304–315.

O'Neill M., McPartlin J., Arthure K., Riedel S., McMillan N.D. 2011. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *J. Phys.*: Conf. Ser. IOP Publ. 012047.

Ortiz-Estrada Á.M., Gollas-Galván T., Martínez-Cordova L.R., Martínez Porchas M. 2019. Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Rev. Aquacult*. 11(1): 234–245.

Paerl H.W., Pinckney J.L., Steppe T.F. 2000. Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ. Microbiol*. 2(1): 11–26.

Pancrace C., Barny M.A., Ueoka R., Calteau A., Scalvenzi T., Pédron J., Gugger M. 2017. Insights into the *Planktothrix* genus: Genomic and metabolic comparison of benthic and planktic strains. *Sci. Rep*. 7: 41181.

Podani J. 1992. Monitoring system. In: *Biological Indicators in Environmental Protection*. New York: Ellis Horwood. Pp. 12–16.

Rinkel B.E., Manoylov K.M. 2014. *Calothrix* – an evaluation of freshwater species in United States rivers and streams, their distribution and preliminary ecological findings. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*. 163: 43–59.

Roslan MA.M., Mohamad M.A.N., Omar S.M. 2017. High quality DNA from peat soil for metagenomic studies: a mini review on DNA extraction. *Science*. 1(2): 1–6.

Schluter D., Pennell M.W. 2017. Speciation gradients and the distribution of biodiversity. *Nature*. 546(7656): 48–55.

Sharma R., Sharma V., Sharma M.S. Kumar V.B., Rachana M., Singh G.K. 2011. Studies on limnological characteristic, planktonic diversity and fishes (species) in Lake Pichhola, Udaipur, Rajasthan (India). *Univ. J. Environ. Res. Technol*. 1: 274–285.

Sigler W.V., Bachofen R., Zeyer J. 2003. Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environ. Microbiol*. 5(7): 618–627.

Singh R.S., Thakur S.R., Bansal P. 2015. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Rev. Microbiol.* 41(1): 77–88.

Smythe W.F., McAllister S.M., Hager K.W., Hager K.R., Tebo B.M., Moyer C.L. 2016. Silica Biomineralization of *Calothrix*-Dominated Biofacies from Queen's Laundry Hot-Spring, Yellowstone National Park, USA. *Front. Environ. Sci*. 4: 1–40.

Soliman T., Yang S., Yamazaki T. 2017. Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: the influence of DNA kit selection and technician technical expertise. *PeerJ.* 5(e4178): 1–16.

Sønstebø J.H., Rohrlack T. 2011. Possible implications of chytrid parasitism for population subdivision in freshwater cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4): 1344–1351.

Taton A., Grubisic S., Balthasart P., Hodgson D.A., Laybourn-Parry J., Wilmotte A. 2006. Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57(2): 272–289.

Wan Maznah W.O., Mansor M. 2000. Periphytic algal composition in Pinang River Basin, a case study on one of the most polluted rivers in Malaysia. *J. Biosci.* 11(1): 53–67.

Wan Maznah W.O., Mansor M. 2002. Aquatic pollution assessment based on attached diatom communities in the Pinang River Basin, Malaysia. *Hydrobiologia*. 487(1): 229–241.

Wan Maznah W.O., Makhlough A. 2015. Water quality of a tropical reservoir based on spatio-temporal variation of phytoplankton composition and physico-chemical analysis. *Int. J. Environ. Sci. Technol*. 12(7): 2221–2232.

Wan Ruslan Ismail. 2000. The hydrology and sediment yield of the Sungai Air Terjun catchment, Penang Hill, Malaysia. *Hydrol. Sci. J.* 45(6): 897–910.

Wierzchos J., de los Ríos A., Ascaso C. 2013. Microorganisms in desert rocks: the edge of life on Earth. *Int. Microbiol*. 15: 171–181.

Wilfinger W.W., Mackey K., Chomcyznski P. 1997. Nanodrop technologies 260/280 and 260/230 ratios nanodrop @ ND-1000 and ND-8000 8-sample spectrophotometers. *BioTechniques*. 22: 474–481.

Підписав до друку С.С. Шалигін

Nur Fadzliana A.R.[1], Wan Maznah W.O.[1,2,3], Nor S.A.M.[1], Choon Pin Foong[1], Luo Wei[4] . 2021. **Epipelic cyanobacterial diversity in Pinang River basin, Malaysia, revealed by 16S-based metagenomic approach**. *Algologia*. 31(1): 93–113.

[1]School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia
[2]Centre for Marine and Coastal Studies, Universiti Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia
[3]River Engineering and Urban Drainage Research Centre, Engineering Campus,
Universiti Sains Malaysia, 14300 Nibong Tebal, Penang, Malaysia
[4]SOA Key Laboratory for Polar Science, Polar Research Institute of China,
Shanghai 200136, China

Cyanobacteria are the most widespread group of photosynthetic prokaryotes. They are primary producers in a wide variety of habitats and are able to thrive in harsh environments, including polluted waters; therefore, this study was conducted to explore the cyanobacterial populations inhabiting river tributaries with different levels of pollution. Sediment samples (epipelon) were collected from selected tributaries of the Pinang River basin. Air Terjun (T1) and Air Itam rivers (T2) represent the upper streams of Pinang River basin, while Dondang (T3) and Jelutong rivers (T4) are located at in the middle of the river basin. The Pinang River (T5) is located near the estuary and is subjected to saline water intrusion during high tides. Cyanobacterial community was determined by identifying the taxa via 16S rRNA gene amplicon sequence data. 16S rRNA gene amplicons generated from collected samples were sequenced using illumina Miseq, with the targeted V3 and V4 regions yielding approximately 1 mln reads per sample. *Synechococcus*, *Phormidium*, *Arthronema* and *Leptolyngbya* were found in all samples. Shannon-Weiner diversity index was highest (H' = 1.867) at the clean upstream station (T1), while the moderately polluted stream (T3) recorded the lowest diversity (H' = 0.399), and relatively polluted stations (T4 and T5) recorded fairly high values of H'. This study provides insights into the cyanobacterial community structure in Pinang River basin via cultivation-independent techniques using 16S rRNA gene amplicon sequence. Occurrence of some morphospecies at specific locations showed that the cyanobacterial communities are quite distinct and have specific ecological demands. Some species which were ubiquitous might be able to tolerate varied environmental conditions.

K e y w o r d s : Cyanobacteria, species composition, Pinang River basin, 16S rRNA