

УДК 574.587:577.29

ДНК-МЕТАБАРКОДИНГ МАКРОБЕСПОЗВОНОЧНЫХ В СИСТЕМЕ БИОМОНИТОРИНГА ОЗЕРА БАЙКАЛ

© 2025 г. Л. С. Кравцова*, @, Т. Е. Перетолчина*, Т. И. Трибой*,
М. В. Коваленкова*, И. А. Небесных*, А. Е. Тупикин**, М. Р. Кабилов**

*Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033 Россия

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

пр. Академика Лаврентьевса, 8, Новосибирск, 630090 Россия

@e-mail: lk@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 21.02.2024 г.

После доработки 05.09.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

В 2019 г., спустя шесть лет с момента закрытия Байкальского целлюлозно-бумажного комбината, проведены исследования макрообентоса с использованием гидробиологических и молекулярно-генетических (ДНК-метабаркодинга) методов. По данным, полученным разными методами, количественное развитие макрообентоса в прибрежной зоне Байкала на глубинах до 5 м, а также видовой состав, структура его сообществ сопоставимы с таковыми в предыдущие годы исследований. Тенденция увеличения с 1968–1971 гг. доли *Oligochaeta*, находки палеарктических видов *Psychomyia flava* Hagen, 1861 (Trichoptera) и *Paratanytarsus grimmii* (Schneider, 1885) (Chironomidae), не встречавшихся ранее в Байкале, свидетельствуют о нарастании трофности в исследуемых районах. Опыт проведенных исследований может быть рекомендован для усовершенствования системы биомониторинга не только озера Байкал, но и других водоемов.

Ключевые слова: макрообентос, ДНК метабаркодинг, макробеспозвоночные, биомониторинг, озеро Байкал

DOI: 10.31857/S1026347025010087

Мониторинг представляет собой наблюдение, оценку изменений и прогнозирование состояния окружающей среды, в том числе водных экосистем (Израэль, 1974). Биомониторинг водоемов с каждым годом становится все более актуальным в связи с растущей деградацией сообществ организмов из-за антропогенного воздействия и глобальных климатических изменений (O'Reilly *et al.*, 2003; Kravtsova *et al.*, 2014, 2021; Hampton *et al.*, 2018; Timoshkin *et al.*, 2018; Valipour *et al.*, 2021). В последние десятилетия в биологическом мониторинге, наряду с экологическим направлением наблюдений на разных уровнях организации (клетка – организм – популяция – сообщество), большое внимание уделяется генетическому (Elbrecht, Steinke, 2019; Kuntke *et al.*, 2020; Mauffrey *et al.*, 2021). Если ранее биоразнообразие в экосистемах характеризовалось по составу таксонов (Одум, 1986), идентифицированных по морфологии, то в последнее время для его оценки применяют современные молекулярно-генетические методы на основе операционно-таксономических единиц (OTE), выявленных по ДНК (Hebert *et al.*,

2003; Yu *et al.*, 2012; Leray, Knowlton, 2015). Мониторинг с использованием ДНК-метабаркодинга гидробионтов, в частности макрообентоса (МЗБ), требует меньше временных и финансовых затрат по сравнению с традиционными эколого-гидробиологическими исследованиями. Связано это с тем, что сбор и сортировка макробеспозвоночных по видам обычными методами в системе мониторинга занимает много времени, требует привлечения опытных специалистов-морфологов для диагностики таксонов и в итоге становится дорогостоящим мероприятием. К тому же по морфологическим признакам довольно сложно провести видовую идентификацию молоди. Применение метода ДНК-метабаркодинга способствует решению этих проблем и позволяет в короткий срок получить экспертную оценку биоразнообразия в целом, не обращая внимания на стадии онтогенеза организмов.

Общие принципы построения системы мониторинга природной среды, как в глобальном, так и в региональном масштабе, были разработаны во второй половине прошлого века (Израэль,

1974). Например, основным подходом к организации биомониторинга одного из крупных (объем воды 23 000 км³) пресноводных водоемов планеты – озера Байкал – был экологический. Он подразумевал оценку структуры и функционирования в пространстве и времени популяций байкальских организмов и их сообществ (Израэль, Анохин, 1983; Кожова, 1983, Кожова, Павлов, 1985). Кроме того, О.М. Кожовой (1983) был предложен экотоксикологический подход для оценки влияния токсических веществ на биоту озера – от бактерий до млекопитающих. Позднее для мониторинга Байкала был рекомендован ландшафтный подход (Timoshkin *et al.*, 2005), базирующийся на тех же принципах организации наблюдений за биотической составляющей, что и ранее (Кожова, 1983).

Единая система генетического мониторинга байкальских гидробионтов, включающая ДНК-метабаркодинг, на сегодняшний день практически не разработана. Имеются публикации, характеризующие лишь один из его аспектов (мутационный): влияние загрязняющих веществ промышленных стоков Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК) на организмы (Павленко, Денисова, 1983; Новикова и др., 1998 и др.). В многочисленных опубликованных работах комплексный подход к организации системы генетического мониторинга за состоянием гидробионтов озера Байкал с использованием молекулярно-генетических методов не рассматривался. В них содержатся сведения, касающиеся, в основном, вопросов фундаментальной науки, а именно происхождения и эволюции байкальских беспозвоночных, особенностей генетической структуры популяций, митохондриальных геномов (Sherbakov, 1999; Martin *et al.*, 2000; Peretolchina *et al.*, 2020; Romanova *et al.*, 2021 и др.), хотя, безусловно, результаты этих исследований могут быть использованы в системе биомониторинга озера. Примером гидробиологического мониторинга за состоянием МЗБ озера Байкал служат наблюдения, организованные проф. М.М. Кожовым в 1963 г. и продолженные проф. О.М. Кожовой до 2000 г. в районе р. Утулик – р. Хара-Мурин восточного побережья Южного Байкала. Учитывая то, что на берегу озера долгие годы (с 1966 г.) функционировал БЦБК, промышленно очищенные сточные воды (ПОСВ) которого поступали в Байкал недалеко от устья р. Б. Осиновка, встает вопрос: изменился ли облик донного населения в этом районе после закрытия комбината в 2013 г.?

Цель работы – охарактеризовать современное состояние макрозообентоса, разнообразие и структуру сообществ макробес позвоночных в прибрежной зоне Байкала с использованием метода ДНК-метабаркодинга, а также разработать рекомендации по его применению в системе биомониторинга водоемов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевые исследования. Количественные пробы МЗБ (n = 15) были собраны классическими гидробиологическими методами в июле 2019 г. у восточного побережья Южного Байкала в пределах условных границ глубинных зон 0–1.5 м и 2–5 м, различающихся по степени волнового воздействия на дно. На контрольном участке (у р. Хара-Мурин – IV разрез (n = 5), далее “контроль”) и в районе бывшего сброса ПОСВ БЦБК (у р. Б. Осиновка (n = 10) – разрезы 1, 2, 4, далее “сброс”) отбор проб произведен водолазами на твердых (галька – г, валуны – в) и мягких (заиленный песок – зп) донных отложениях из учетной рамки площадью 0.1 м² (рис. 1).

Беспозвоночных животных с твердых донных отложений счищали щеткой в кювету с водой, а из мягких извлекали путем флотации в насыщенном растворе сахара с удельным весом 1.12 г/л. Все пробы промывали через сачок из мельничного сита № 23 и фиксировали 96%-ным этианолом.

Лабораторные исследования. Сортировку организмов по группам (на уровне высших таксонов) проводили под микроскопом МБС-10 (ЛЗОС, Россия) при ×20 увеличении, с определением их биомассы (мг) и численности (экз.) в каждой пробе.

Макробес позвоночных животных, выбранных из проб, собранных на участках “контроля” и “сброса”, использовали для выделения ДНК. Все организмы, найденные на гальке, валунах или на заиленном песке, объединяли в одну пробу, соответствующую типу донных отложений и району исследований. Поскольку размеры беспозвоночных животных в пробах варьировали от 2 мм до 20 мм и более, то для выделения ДНК от крупных организмов брали кусочки ткани (2–3 мм), а мелких (размерами ≤ 3 мм) использовали целиком. Предварительно кусочки ткани и мелкие организмы вымачивали в течение одного часа в дистиллированной воде, затем помещали их в фарфоровую чашку и растирали пестиком с добавлением 2%-ного раствора СТАВ. ДНК экстрагировали по модифицированной методике Дойла и Диксон (Doyle, Dickson, 1987), т.е. применяли хлороформ вместо фенол-хлороформ-изоамиловской смеси. Всего для высокопроизводительного секвенирования было подготовлено шесть проб геномной ДНК (не менее 20 нг в каждой) с разных типов донных отложений: три с “контроля” и три из района “сброса”.

Для получения ампликонов гена *COI* использовали праймеры *mlCOIint F*: GGWACWGGWTGAAC-WGTWTAYCCYCC (Leray *et al.*, 2013) и *jgHCO2198*: TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA, где I – инозин (Geller *et al.*, 2013). Амплификацию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 0.2 мМ каждого dNTP, 0.5 мКМ каждого праймера, 2 мМ MgCl₂, 5 мКМ SYTO9, 10 нг ДНК, 25 ед./мл полимеразы

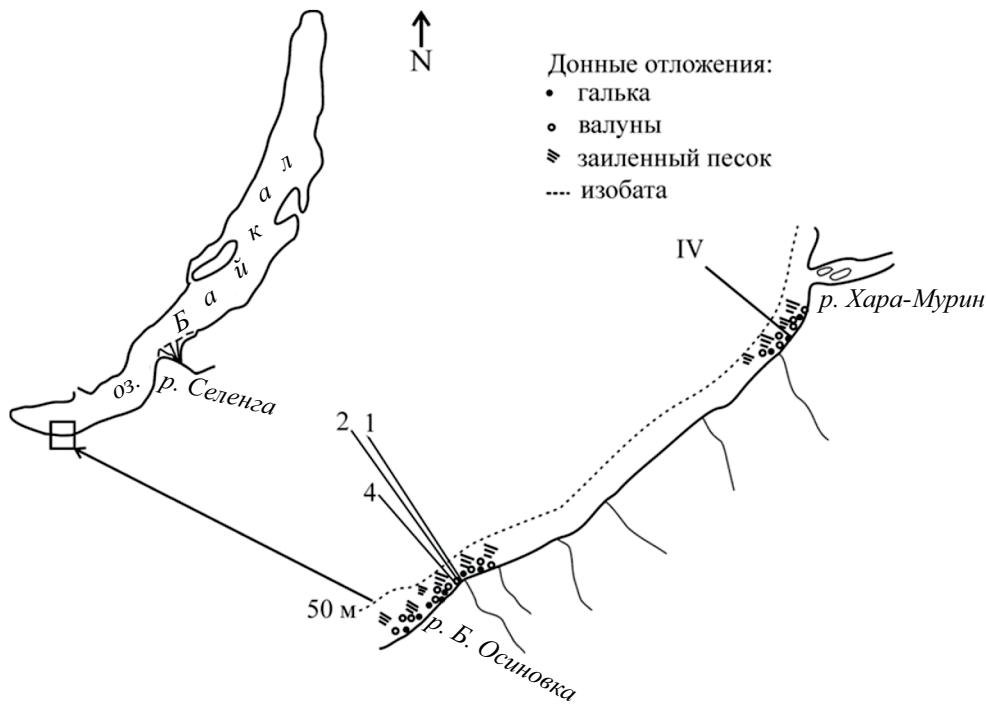


Рис. 1. Карта-схема отбора количественных проб макрообентоса в прибрежной зоне Южного Байкала (июль 2019 г.). Разрезы 1, 2, 4 расположены на участке в районе бывшего сброса ПОСВ БЦБК; IV – на контрольном участке в 5 км в северо-восточном направлении от сброса.

Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Литва). Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 Touch Real-Time PCR system (Bio-Rad, США) при следующих температурных условиях: 1 цикл – 95°C – 4 мин (предварительная денатурация ДНК); 32 цикла – 95°C – 30 с (денатурация ДНК), 48°C – 30 с (отжиг праймеров) и 72°C – 30 с (элонгация нуклеотидной цепи). Продукты ПЦР анализировали на системе MCE-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System с использованием набора DNA 12000 Reagent Kit (Shimadzu, Япония). Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с набором реактивов Qubit DNA High Sensitivity Assay Kits (Invitrogen, США). Для получения ДНК-библиотек из ампликонов были использованы наборы NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina и двусторонних баркодов NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) (NEB, Великобритания). Квантификацию полученных библиотек проводили при помощи набора Kapa SYBR Fast Universal qPCR Kit (KapaBiosystems, США). Для секвенирования библиотек использовали набор MiSeq Reagent Standard Kit v3 PE300 на MiSeq (Illumina, США) на базе ЦКП “Геномика” (ИХБФМ СО РАН).

Биоинформационическая и статистическая обработка данных. Полученные парные прочтения фрагмента гена *COI* анализировали с помощью UPARSE (Edgar,

2013), используя Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010). ОТЕ идентифицировали с помощью алгоритма кластеризации UPARSE, таксономическую принадлежность последовательностей определяли с помощью алгоритмов SINTAX (Edgar, 2016) и референсной базы Midori2 (GB257) (Machida *et al.*, 2017), а также BLAST. Анализ репрезентативности выборок ОТЕ проводили с помощью iNEXT 2.0.15 (Hsieh *et al.*, 2016). Нуклеотидные последовательности выявленных ОТЕ были протестираны на наличие стоп-кодонов с использованием программы SeqKit v0.16.1 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>).

Количество прочтений фрагмента гена *COI*, приходящиеся на ОТЕ, рассматривали как интегральный показатель относительного обилия макробес позвоночных, учитывающий численность и биомассу (ограниченную размерами кусочков ткани) организмов. Кроме того, рассчитывали показатели относительного обилия макробес позвоночных как произведение значений их средней численности (экз.) и биомассы (мг) в гидробиологических пробах до экстракции ДНК с целью исключить влияние на разброс данных крупных, но малочисленных и, наоборот, многочисленных, но мелких организмов. Для сравнения относительного обилия макробес позвоночных в 2019 г. (по гидробиологическим пробам) с таковым в исследованных районах в предыдущие годы (349

количественных проб) произведены его расчеты на основе архивных данных (Г.С. Каплиной – 1963–1977 гг., Л.С. Кравцовой – 1985–1995 гг.). Для визуализации ко всем показателям относительного обилия макробеспозвоночных, полученным разными методами (гидробиологическим и молекулярно-генетическим), применена функция “квадратный корень”. Кроме относительного обилия, для характеристики МЗБ в целом дополнительно приведены средняя и ошибка средней его биомассы и численности в пересчете на м^2 дна в исследованных районах.

Для оценки связи между показателями относительного обилия ОТЕ и макробеспозвоночных (на уровне высших таксонов) в гидробиологических пробах до экстракции ДНК использовали коэффициент корреляции Спирмена (S).

Сходство состава ОТЕ видового ранга на “контроле” и у “броса” оценивали по коэффициенту Серенсена (s) (Одум, 1986).

Сообщества макробеспозвоночных выделяли путем кластеризации ОТЕ видового ранга методом Варда с использованием Евклидова расстояния, не учитывая виды, на которые приходилось менее 10 прочтений. В качестве переменных X использовали прочтения, приходящиеся на ОТЕ (видов) в пробах, собранных на разных типах донных отложений в районах исследований. Предварительно для оценки закона распределения данных был использован информационный критерий Акаике. Так как распределение данных оказалось близко к логнормальному закону, все значения были трансформированы по функции $\lg(X+1)$. Для характеристики пространственного распределения относительного обилия видов, входящих в состав сообществ, использовали тепловую карту. Сообщества называли по видам, имеющим максимальные показатели относительного обилия. Субдоминантами считали виды, относительное обилие которых составляло $>5\%$ от общего числа прочтений, приходящихся на сообщество, а остальные ($<5\%$) – второстепенными. Структуру сообществ макробеспозвоночных характеризовали по индексам видового разнообразия Шеннона (H , бит), доминирования по Симпсону (C) и выравненности по Пиелу (e) (Одум, 1986). Статистические расчеты проводили с использованием пакета *vegan_2.0-7 R 3.0.0*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика количественного развития макрообентоса по гидробиологическим данным. В составе МЗБ в прибрежной зоне Байкала, исследованных районов “контроля” и “броса”, по многолетним наблюдениям зарегистрированы: *Platyhelminthes*, *Hirudinea*, *Polychaeta*, *Oligochaeta*, *Isopoda*, *Amphipoda*, *Plecoptera*, *Trichoptera*, *Chironomidae*, *Mollusca*.

В 2019 г. *Isopoda* в пробах не встречены. Основной вклад в формирование обилия МЗБ, как и ранее, вносят *Oligochaeta*, *Amphipoda*, *Chironomidae*, *Mollusca*, *Polychaeta* (рис. 2). Доля массовых групп в межгодовом аспекте колеблется на протяжении всего периода наблюдений.

В зоне глубин 0–1.5 м на гальке доминируют в МЗБ *Oligochaeta*, *Chironomidae*, а также *Amphipoda*. На “контроле” доля *Oligochaeta* и *Chironomidae* варьировала незначительно, с тенденцией к увеличению к 2019 г. относительно таковой до пуска БЦБК (1963–1965 гг.), тогда как *Amphipoda*, наоборот, снижалась. У “броса” наблюдается иная картина на фоне межгодовых колебаний. Доля *Chironomidae* и *Amphipoda* значительно снизилась, а *Oligochaeta* существенно возросла по сравнению с данными до пуска БЦБК (рис. 2).

В зоне глубин 2–5 м на валунах исследованных районов в составе МЗБ наряду с *Amphipoda*, *Chironomidae*, *Oligochaeta* доминируют *Mollusca* и *Polychaeta*. Как на “контроле”, так и у “броса” на фоне межгодовых флюктуаций доля *Oligochaeta* и *Polychaeta* в 2019 г. выше таковой до пуска БЦБК, а *Chironomidae* и *Mollusca* ниже. Доля же *Amphipoda* в МЗБ на “контроле” остается низкой, а у “броса” возрастает до уровня таковой в 1963–1965 гг.

В этой же зоне глубин, но на заиленных песках состав доминантов менее разнообразен, чем на валунах, преобладают в МЗБ исследованных районов *Amphipoda* и *Oligochaeta* (рис. 2). Причем, в отличие от *Oligochaeta*, доля *Amphipoda* на “контроле” и у “броса” в 2019 г. стала выше, чем в 1963–1965 гг. до пуска БЦБК (рис. 2).

В целом, средние значения количественных показателей МЗБ в 2019 г. на контролльном участке были несколько ниже, чем в районе бывшего сброса ПОСВ БЦБК. На гальке в субаквальной части пляжа озера Байкал в зоне глубин 0–1.5 м на “контроле” количественные показатели МЗБ составляли $0.3 \text{ г}/\text{м}^2$ по биомассе и 2 тыс. экз/ м^2 по численности, а в районе “броса” – $9.9 \pm 2.8 \text{ г}/\text{м}^2$ и 62 ± 8 тыс. экз/ м^2 соответственно. В зоне глубин 2–5 м на валунах биомасса МЗБ на “контроле” достигала $20.0 \pm 6.0 \text{ г}/\text{м}^2$ (при численности 47 ± 20 тыс. экз/ м^2), а в районе “броса” – $26.2 \pm 10.4 \text{ г}/\text{м}^2$ (при численности 61 ± 24 тыс. экз/ м^2). На заиленном песке в этой же зоне глубин на “контроле” биомасса ($13.0 \pm 1.3 \text{ г}/\text{м}^2$) и численность (11 ± 3 тыс. экз/ м^2) МЗБ были несколько ниже, чем в районе “броса” (биомасса – $20.2 \pm 4.0 \text{ г}/\text{м}^2$, численность – 44 ± 14 тыс. экз/ м^2). Пониженные количественные показатели МЗБ на “контроле” по сравнению с таковыми у “броса”, возможно, обусловлены меньшим количеством собранных проб.

Характеристика относительного обилия макробеспозвоночных по молекулярно-генетическим данным. В результате высокопроизводительного секвенирования получено 283 025 прочтений фрагмента

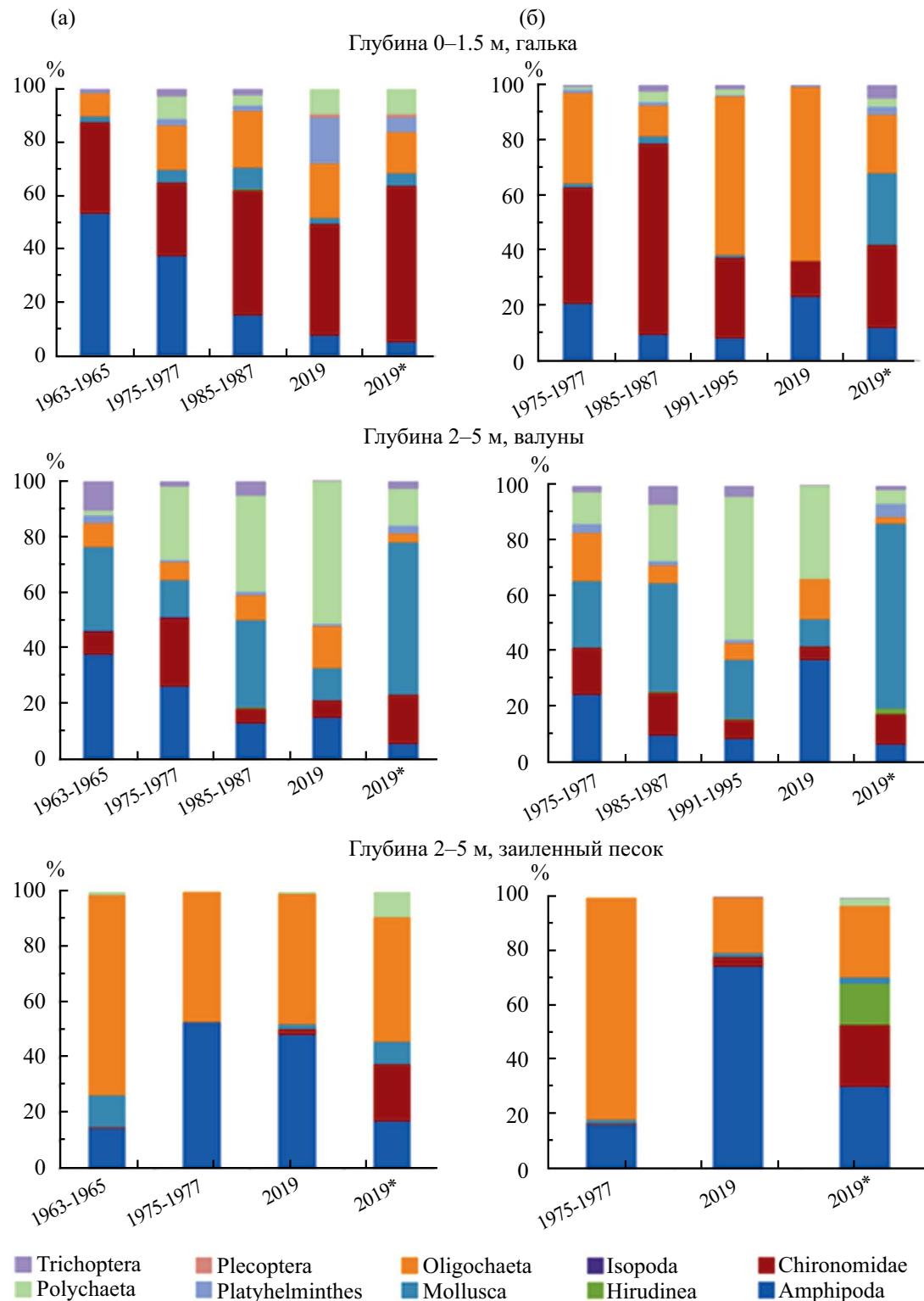


Рис. 2. Относительное обилие высших таксонов макробеспозвоночных на “контроле” (а) и у “сброса” (б) в прибрежной зоне Байкала по гидробиологическим и молекулярно-генетическим данным, трансформированным по функции “квадратный корень”. По оси абсцисс – периоды наблюдений: 1963–1965 гг. (до пуска БЦБК), 1975–1995 гг. (во время функционирования БЦБК), 2019 г. (спустя шесть лет после закрытия БЦБК), 2019* – относительное обилие ОТЕ; по оси ординат – доля относительного обилия ОТЕ и макробеспозвоночных.

гена *COI*, из них без учета наземных насекомых на “контроль” приходилось 48 % ($\text{г} = 53992$, $\text{в} = 39425$, $\text{зп} = 42240$), а на район “сброса” – 52 % ($\text{г} = 53332$, $\text{в} = 43342$, $\text{зп} = 50602$) прочтений.

Всего выявлено 114 ОТЕ высших таксонов: *Platyhelminthes* (6), *Annelida* (32), *Arthropoda* (59), *Mollusca* (17). Среди них ОТЕ со сходством более 78% с последовательностями из GenBank принадлежат типичным представителям беспозвоночных животных, встречающимся на исследованных участках “контроля” и “сброса” (рис. 2).

Коэффициент корреляции Спирмена (*S*) между показателями относительного обилия ОТЕ и высших таксонов макробес позвоночных в пробах до экстракции ДНК составляет 0.5 ($p \leq 0.05$). При этом доля прочтений, приходящихся на разные таксоны, непропорциональна их доле в гидробиологических пробах. Особенно она высока у *Mollusca* и низка у *Amphipoda*. Несмотря на неполное совпадение абсолютных значений (доли, %) относительного обилия высших таксонов, полученных разными методами, общая картина лидирования *Oligochaeta*, *Amphipoda*, *Chironomidae*, *Mollusca*, *Polychaeta* сохраняется (рис. 2).

На ОТЕ видового ранга (на уровне различий 3%) приходится 64% от общего числа прочтений. В списке видового состава содержится 35 ОТЕ, имеющих сходство с референсными последовательностями GenBank $\geq 95\%$, покрытие 91% и более (табл. 1).

Необходимо отметить, что в составе фауны прибрежной зоны озера в 2019 г. впервые зарегистрированы личинки амфибиотических насекомых (OTE со 100% сходством с последовательностями GenBank), относящиеся к видам *Psychomyia flava* (Trichoptera) и *Paratanytarsus grimmii* (Chironomidae). Первый найден на “контроле”, а второй у “сброса”, остальные виды (табл. 1) встречаются в Байкале, как в исследованных районах, так и за их пределами.

Сходство фауны сравниваемых районов “контроля” и “сброса” высоко ($s = 73\%$), поэтому структура сообществ макробес позвоночных исследована с использованием кластерного анализа на основе данных, объединенных в один массив. Показано, что донные отложения исследованных районов “контроля” и “сброса” группируются вместе, образуя два кластера. Один из них объединяет твердые (галька и валуны), а другой – мягкие (заиленный песок) донные отложения, различающиеся по составу и относительному обилию населения макробес позвоночных (рис. 3).

Выявленные методом ДНК-метабаркодинга виды (табл. 1) формируют три сообщества (кластеры (а), (б), (в)) (рис. 3), два из них с доминированием *Mollusca* и одно с доминированием *Chironomidae* (рис. 4). Сообщество (а) с доминированием *Choanomphalus amauronius* (*Mollusca*) включает виды с высоким обилием как на гальке, так и на валунах. Среди субдоминантов этого сообщества зарегистрированы

преимущественно личинки *Chironomidae*: *Neozavrelia* sp., *Cricotopus bicinctus*, *Orthocladius gregarius*, *Cricotopus intersectus*, *Cricotopus fuscus* (рис. 4). В сообществе (в) с доминированием *Pseudancylastrum aculiferum* (*Mollusca*) среди субдоминантов (рис. 4) отмечен обильный на валунах *Choanomphalus conf. taacki* (*Mollusca*), а также представители разных групп МЗБ: *Pagastia orientalis* (*Chironomidae*), *Apatania zonella* (Trichoptera), *Linevichella vortex* (Amphipoda), преобладающие на гальке (рис. 3).

Сообщество (б) с доминированием личинок *Segrentia baicalensis* (*Chironomidae*) объединяет виды, большинство из которых преобладает на заиленных песках (рис. 3). Среди субдоминантов отмечены Amphipoda: *Micruropus wahlii* и *Gmelinoides fasciatus*, а также личинки *Orthocladius* sp. (*Chironomidae*), *Manayunkia godlewskii* (Polychaeta) (рис. 4)

В целом, сообщества (а), (б), (в) характеризуются несложной структурой, в их составе зарегистрировано от 9 до 15 видов (рис. 4), индекс видового α -разнообразия по Шеннону не превышает 2 бит. Низкая концентрация доминирования по Симпсону и высокая выравненность по Пиелу у сообществ (а) и (б) (табл. 2) свидетельствуют о более или менее удовлетворительном их состоянии на глубинах 2–5 м, чем сообщество (в). Большая часть видов сообщества (в) встречается на глубинах 0–1.5 м в зоне интенсивной гидродинамики (волнового воздействия, прибойного потока). В нем возрастает концентрация доминирования одного вида, снижается выравненность, отмечено много второстепенных видов по сравнению с другими сообществами (табл. 2, рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Озеро Байкал – один из немногих пресноводных водоемов мира, где в начале прошлого века были организованы долговременные наблюдения за состоянием биоты, позволяющие регистрировать в настоящее время процессы, характеризующие отклик экосистемы озера на изменения климата и антропогенное воздействие (Kravtsova *et al.*, 2014, 2021; Timoshkin *et al.*, 2018; Brown *et al.*, 2021). Очевидно, что в прибрежной зоне Байкала на каменистых донных отложениях на глубинах до 5 м у “сброса” катастрофического снижения количественного развития МЗБ, вызванных ПОСВ БЦБК, не произошло. Здесь в 2019 г. биомасса МЗБ ($9.9 \text{ г}/\text{м}^2$ и $26.2 \text{ г}/\text{м}^2$) в зонах глубин 0–1.5 м и 2–5 м лишь незначительно отличалась от таковой в 1963–1965 гг. (до пуска БЦБК) – $6.5 \text{ г}/\text{м}^2$ и $37.7 \text{ г}/\text{м}^2$ соответственно. Однако на протяжении 50 лет наблюдений она не оставалась на одном уровне, а снижалась в 2–3 раза в разные годы. Низкие значения биомассы МЗБ у “сброса” были

Таблица 1. Состав ОТЕ, имеющих сходство с референсными последовательностями GenBank $\geq 95\%$

Таксон	Вид	№№ референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательностью из GenBank, %
Annelida/ Polychaeta	<i>Manayunkia godlewskii</i> (Nusbaum, 1901)	MK393737	100
Annelida/ Oligochaeta	<i>Lamprodrilus wagneri</i> Michaelsen, 1901	AJ577622	97.0
Arthropoda/ Amphipoda	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i> (Dybowsky, 1874)	MK887581	100
	<i>Eulimnogammarus verrucosus</i> (Gerstfeldt, 1858)	MK887450	100
	<i>Eulimnogammarus vittatus</i> (Dybowsky, 1874)	MK887738	99.3
	<i>Gmelinoides fasciatus</i> (Stebbing, 1899)	HF937342	100
	<i>Linevichella vortex</i> (Dybowsky, 1874)	MN148355	99.0
	<i>Micruropus wahli</i> (Dybowsky, 1874)	MN148354	100
	<i>Pallaseopsis kessleri</i> (Dybowsky, 1874)	MG936047	97.0
Arthropoda/ Chironomidae	<i>Microtendipes</i> sp.	LC329125	95.0
	<i>Neozavrelia</i> sp.	JF287391	97.0
	<i>Paratanytarsus grimmii</i> (Schneider, 1885)	KJ091751	100
	<i>Sergentia baicalensis</i> Tshernovskij, 1949	AF116586	99.0
	<i>Sergentia</i> conf. <i>affinis</i>	AF116588	97.0
	<i>Cricotopus fuscus</i> (Kieffer, 1909)	MN673037	99.0
	<i>Cricotopus intersectus</i> (Staeger, 1839)	MN683031	99.3
	<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabricius, 1794)	MZ625568	100
	<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen, 1818)	JN275346	100
	<i>Orthocladius gregarius</i> Linevitsh, 1970	KC879234	100
	<i>Orthocladius</i> sp.	JN275432	100
	<i>Orthocladius</i> sp. 2	KC894911	100
	<i>Pagastia orientalis</i> (Tshernovskij, 1949)	MW691956	99.0
	<i>Paratrichocladius rufiventris</i> (Meigen, 1830)	MZ657243	99.3
Arthropoda/ Trichoptera	<i>Apatania zonella</i> (Zetterstedt, 1840)	KT729264	99.3
	<i>Baicalina bellicosa</i> Martynov, 1914	KR153125	100
	<i>Psychomyia flava</i> Hagen, 1861	KX295998	100
Mollusca / Gastropoda	<i>Choanomphalus amauronius</i> Bourguignat, 1860	Y14721	98.0
	<i>Choanomphalus aorus</i> Bourguignat, 1861	Y14718	98.0
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>gerstfeldtianus</i>	Y14722	95.4
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>maacki</i>	LC429414	95.0
	<i>Maackia herderiana</i> (Lindholm, 1909)	KY697388	100
	<i>Megalovalvata piligera</i> (Lindholm, 1909)	LC377786	98.3
	<i>Parabaikalia oviformis</i> (W. Dybowski, 1875)	Z92999	99.0
	<i>Pseudancylastrum aculiferum</i> Starobogatov, 1989	KR822551	100
	<i>Pseudancylastrum sibiricum</i> (Gerstfeldt, 1859)	KR822557	98.0

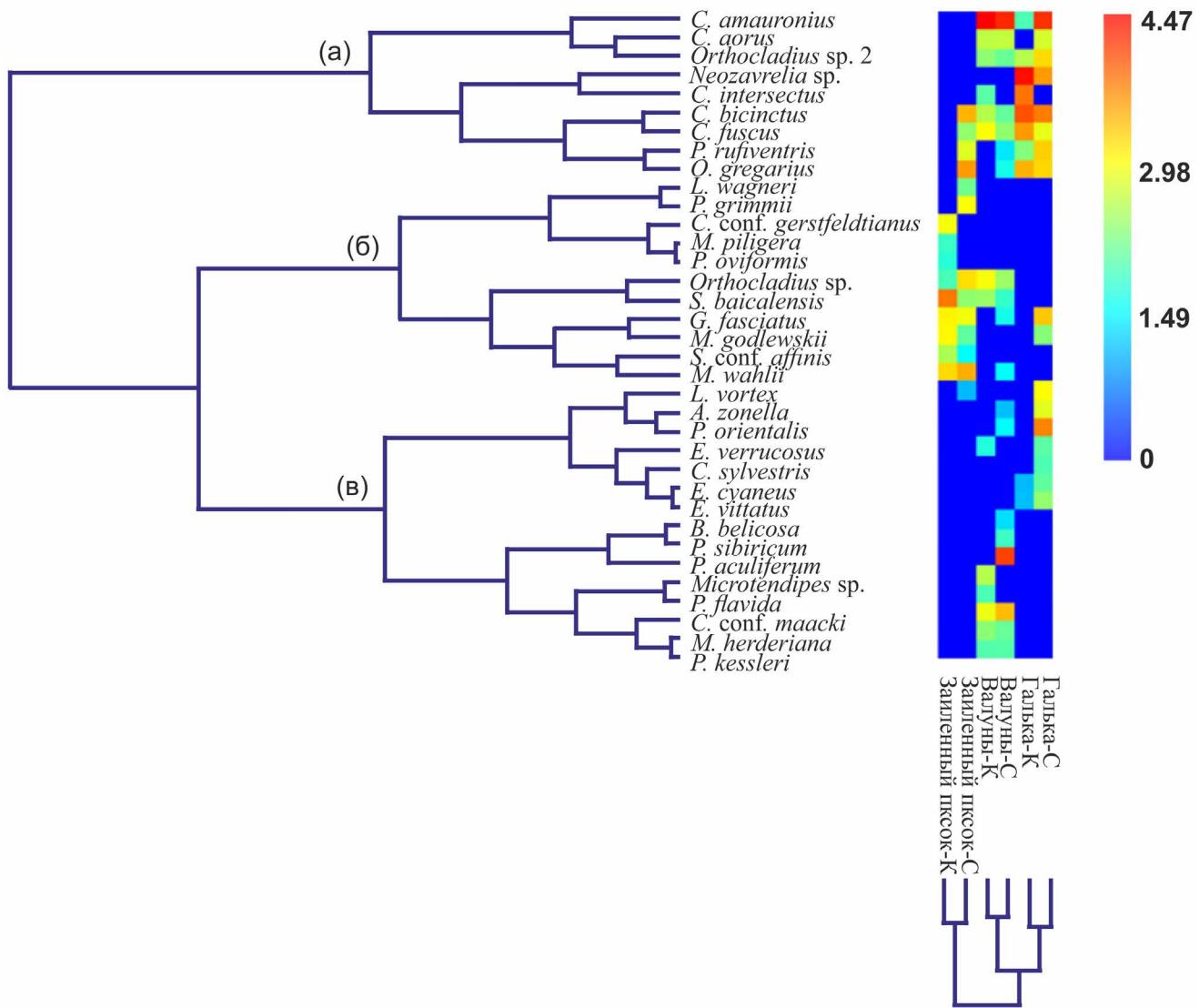


Рис. 3. Сообщества макробеспозвоночных, распространенные на исследованных участках прибрежной зоны Байкала (июль 2019 г.). Кластеры ОТЕ видового ранга: (а) – сообщество с доминированием *C. amauronius* (Mollusca), (б) – с доминированием *S. baicalensis* (Chironomidae), (в) – с доминированием *P. aculiferum* (Mollusca). Термальная карта характеризует распределение видов на разных типах донных отложений на “контроле” (К) и у “сброса” (С). Цветовой градиент шкалы соответствует логарифмированным показателям относительного обилия ОТЕ, входящих в состав сообществ.

зарегистрированы с 1975 г. по 1992 г. ($1.7\text{--}3.0 \text{ г}/\text{м}^2$ и $5.2\text{--}18.1 \text{ г}/\text{м}^2$), но уже в 1993 г. достигли показателей $5.3 \text{ г}/\text{м}^2$ и $33.3 \text{ г}/\text{м}^2$, сравнимых с биомассой МЗБ в 1963–1965 гг. (Кожова, Кравцова, 1995). Некоторые изменения можно отметить в надводной структуре МЗБ, т.е. в процентном соотношении высших таксонов макробеспозвоночных. В исследованных районах на каменистых донных отложениях в межгодовой динамике МЗБ наблюдается тенденция увеличения доли Oligochaeta и Polychaeta на глубинах до 5 м (рис. 2). Вызвано

ли это заилиением донных осадков из-за сильного наводнения в 1971 г. или влиянием ПОСВ БЦБК, поступающим в поверхностные воды с 1978 г., однозначно ответить невозможно. Основываясь на многолетних наблюдениях, можно заключить, что изменчивость показателей биомассы или численности макробеспозвоночных связана не только с антропогенным воздействием, но и с естественными флюктуациями, обусловленными как биологическими особенностями видов, так и воздействием абиотических факторов среды (Каплина, 1974;

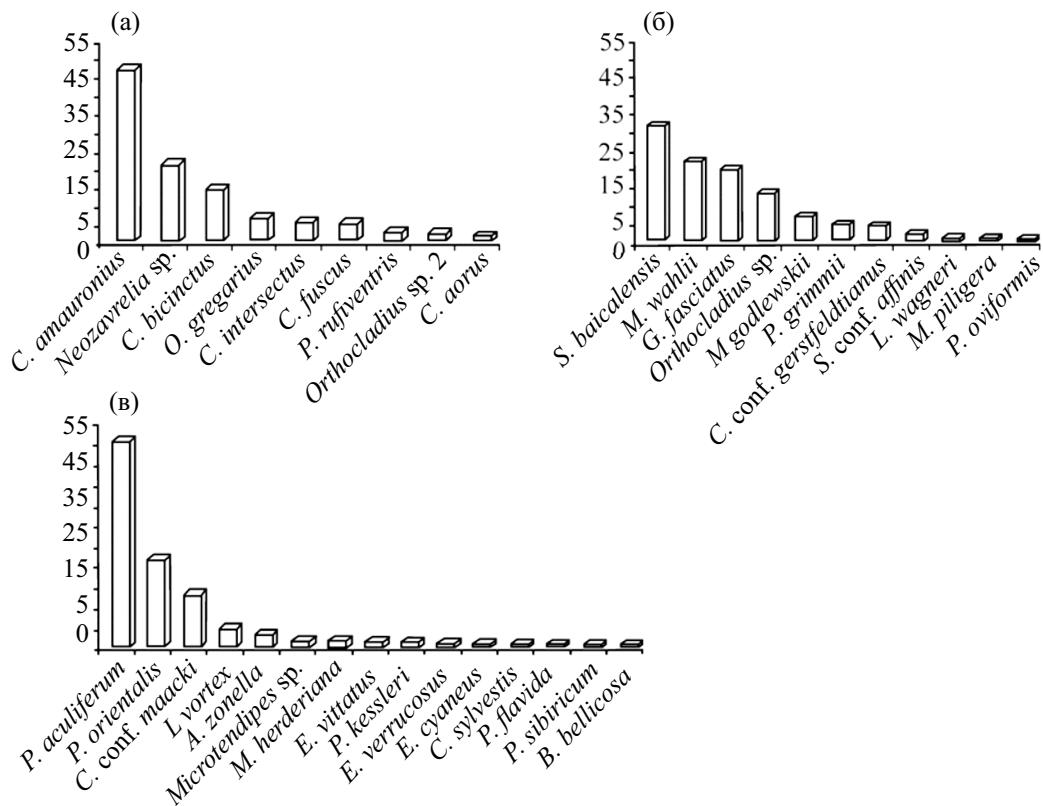


Рис. 4. Доля доминантов, субдоминантов и второстепенных ОТЕ видового ранга в сообществах (а), (б), (в), выявленных в прибрежной зоне Байкала (июль 2019 г.). По оси ординат – относительное обилие ОТЕ (% от общего числа прочтений, приходящихся на сообщество); по оси абсцисс – ОТЕ видового ранга, ранжированные в порядке убыли относительного обилия.

Кравцова и др., 2006). По-видимому, влияние ПОСВ БЦБК на МЗБ у “броса” прослеживается лишь на мягких (ил, заиленный песок) донных отложениях с антропогенным осадком в зонах глубин 5–20 м, 20–50 м, 50–100 м (Кожова, 1974). Рассмотрим ниже, насколько сопоставимы результаты гидробиологических исследований с таковыми, полученными молекулярно-генетическими методами.

В настоящее время большое внимание уделяется применению молекулярно-генетических методов для биомониторинга природных экосистем (Baird, Hajibabaei, 2012; Elbrecht, Steinke, 2019; Watts *et al.*, 2019; Reinholt *et al.*, 2021). Хотя для

оценки биоразнообразия многие исследователи считают наиболее перспективным использование ДНК окружающей среды (eDNA) (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2018; Reinholt *et al.*, 2021), мы выбрали ДНК-метабаркодинг макробес позвоночных и технологию высокопроизводительного секвенирования. Этот метод точнее характеризует представленность многоклеточных организмов (99% прочтений), чем eDNA (всего 12%) (Gleason *et al.*, 2021).

Набор молекулярных маркеров для ДНК-метабаркодинга организмов включает фрагменты разных генов ядерной или митохондриальной ДНК,

Таблица 2. Структурные параметры сообществ макробес позвоночных, распространенных на глубинах до 5 м у восточного побережья оз. Байкал (июль 2019 г.)

Сообщество	Видовое разнообразие по Шеннону, Н, бит.	Индекс доминирования по Симпсону, С	Индекс выравненности по Пиелу, е	Количество прочтений на сообщество
<i>C. amauronius</i>	1.6	0.28	0.72	135265
<i>S. baicalensis</i>	1.8	0.19	0.76	21062
<i>P. aculiferum</i>	1.5	0.34	0.55	23660

например: *16S*, *18S*, *COI* (Leray *et al.*, 2013; Geller *et al.*, 2013; Wangensteen *et al.*, 2018; Ficetola *et al.*, 2021). В данном исследовании предпочтение было отдано последнему гену, так как нуклеотидные последовательности *COI* макробес позвоночных животных лучше представлены в базах данных GenBank, BOLD, Midori2. Причем ранее было показано, что праймеры *mlCOIintF* в комбинации с *jgHCO2198* фолмеровского фрагмента *COI*, длиной 313 п.н., вполне эффективны для оценки разнообразия донной фауны не только в других водоемах, но и в Байкале (Leray *et al.*, 2013; Geller *et al.*, 2013; Кравцова и др., 2021, 2023).

Относительное обилие ОТЕ согласуется с общей картиной количественного развития МЗБ по гидробиологическим данным. На уровне высших таксонов в 2019 г. по этому показателю выявлены практически все группы МЗБ, встречающиеся в этом районе, а также лидирующая роль в бентосе Oligochaeta, Amphipoda, Chironomidae, Mollusca, Polychaeta, сохраняющаяся на протяжении многих лет по гидробиологическим данным (рис. 2). При этом следует отметить, что пропорция относительного обилия ОТЕ высших таксонов несколько отличается от таковой в гидробиологических пробах (рис. 2), несмотря на то, что при выделении ДНК мы стремились исключить большой разброс биомассы, ограничив размеры крупных организмов до 2–3 мм. На данном этапе исследования выяснить причины таких различий сложно, так как, с одной стороны, это может быть следствием учета кусочков ткани организмов (например, Mollusca) по длине, а не по объему (толщине). С другой стороны, на результат количества прочтений разных групп организмов может влиять сам процесс амплификации из-за несоответствия между универсальными праймерами и праймерной областью у разных таксонов (Piñol *et al.*, 2015). Несмотря на это, коэффициент корреляции Спирмена между показателями относительного обилия ОТЕ и высших таксонов в гидробиологических пробах дает положительный сигнал, как и в пробах из других районов оз. Байкал: Лиственничного залива ($S = 0.5$, $p < 0.05$), бухты Большие Коты ($S = 0.6$, $p < 0.05$) (Кравцова и др., 2021, 2023). Положительную линейную корреляцию между биомассой образца и количеством последовательностей также отмечают другие исследователи (Elbrecht, Leese, 2015). Хотя нам удалось обнаружить лишь умеренно значимую корреляцию между относительным обилием ОТЕ и макробес позвоночных на уровне высших таксонов в гидробиологических пробах, мы попытались провести анализ их видового разнообразия в исследуемых районах, особенностей структуры сообществ.

Фауна донного населения в районе р. Утулик – р. Хара-Мурин, простирающемся на 25 км вдоль восточного побережья Байкала, включающем участки “контроля” и “броса” до глубины 300 м, довольно богата в видовом отношении. Здесь

отмечено 224 вида макробес позвоночных животных, из них 169 эндемиков (Ербаева, 1988). В 2019 г., по сравнению с предыдущими годами, был обследован гораздо меньший по протяженности район, что отразилось в какой-то мере на оценке разнообразия молекулярно-генетическим методом. Точки отбора проб располагались в зоне глубин до 5 м непосредственно у “броса” вблизи р. Б. Осиновка и на удаленном участке “контроля” у р. Хара-Мурин (рис. 1). Хотя количество ОТЕ (114) было близко к списку видов (142), найденных на каменистых донных отложениях в 1975–1983 гг. (Ербаева, 1988), но уровень сходства (< 95%) большинства из них (например, Oligochaeta) не позволил идентифицировать их до вида по референсным последовательностям GenBank. В частности, *Propappus volki* Michaelsen, 1916, *Lamprodrilus achaetus* Isossimov, 1962, *Stylodrilus opistoannulatus* (Isossimov, 1962), *Rhyacodrilus stephensonii* Černosvitov, 1942, *Rhyacodrilus coccinaeus* (Vejdovský, 1875), *Tubifex tubifex* (Müller, 1773), а также представители родов *Nais*, *Rhynchelmis*, *Limnodrilus*, часто встречающиеся в исследованных районах, были идентифицированы со сходством 86–92%. Также среди ОТЕ с низким сходством были зарегистрированы Piscicolidae (Hirudinea), Tricladida (Platyhelminthes), редко встречающиеся Plecoptera. Возможно, одной из причин этого служит отсутствие в GenBank и других базах данных последовательностей *COI* байкальских организмов. В составе фауны Байкала насчитывается 2565 видов и подвидов (Timoshkin, 1997), третью часть из них составляют макробес позвоночные. Наиболее полно представлены в GenBank последовательности фрагмента гена *COI* байкальских Polychaeta, Isopoda, Trichoptera, эндемичных Chironomidae, характеризующихся невысоким таксономическим разнообразием (от 4 до 16 видов). В отличие от них, байкальские Platyhelminthes, Oligochaeta, Amphipoda, Mollusca, имеющие в своем составе от 150 до 300 и более видов, представлены GenBank не в полном объеме. Большинство нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *COI* этих групп макробес позвоночных принадлежит массовым видам. Для выяснения технической точности используемого метода для какой-то одной конкретной группы МЗБ требуется проведение дополнительных исследований.

Сомнений не вызывает идентификация видов (табл. 1) с высоким уровнем сходства $\geq 95\%$, на долю которых приходится больше половины прочтений фрагмента гена *COI*. Они формируют сообщества, отмеченные в этом районе в предыдущие годы (Кравцова и др., 2006). Относительное обилие доминантов *C. amauronius*, *S. baicalensis*, *P. aculiferum* и субдоминантов сообществ (рис. 3, 4) отражает общие закономерности пространственного распределения видов в прибрежной зоне Байкала. *Choanomphalus* (Mollusca) селятся

преимущественно на валунах, а *S. baicalensis* (Chironomidae) – на заиленном песке на мелководных террасах, изредка встречаются на подводных склонах (Каплина, 1974; Линевич, 1981; Кравцова и др., 2006). Личинки Chironomidae *Neozavrelia* sp., а также родов *Cricotopus* (*C. bicinctus*, *C. intersectus*, *C. fuscus*) и *Orthocladius* (*O. gregarius*) являются типичными обитателями каменистых донных отложений субаквальной части пляжей (глубины до 1.5 м). Ранее в списках видов личинок хирономид, представителей родов *Cricotopus* и *Orthocladius*, часто обозначали как species под номерами (sp. №1, №2, №3) (Линевич, 1981). Благодаря методу ДНК-метабаркодинга многие из них удалось идентифицировать до вида.

На фоне глобального изменения климата происходит постепенное повышение трофности (с олиго-на β -мезосапрную) открытых участков прибрежной зоны Байкала, усиливающейся под воздействием антропогенных факторов. Эти изменения отмечены по фито-, зоопланктону в фотическом слое эпилимниона (0–15 м), а также в донном населении (Kravtsova et al., 2021). Тенденция увеличения доли Oligochaeta в макрозообентосе, отмеченная еще в 1968–1971 гг. (Кожева, 1974), сохраняется в настоящее время на каменистых донных отложениях как в районах исследования, так и у западного побережья озера (Kravtsova et al., 2021). Освоение палеарктиками открытых побережий Байкала зарегистрировано в разных группах донного населения: Lymnaeidae (Mollusca), *Hydra oligactis* Pallas, 1766 (Hydrozoa), высшей водной растительности *Elodea canadensis* Michaux (1803) (Plantae) (Кравцова и др., 2010; Peretolchina et al., 2020; Schniebs et al., 2022). Расширение ареалов палеарктических видов происходит и среди амфибиотических насекомых, что подтверждают находки видов *P. flava* (Trichoptera) и *P. grimmii* (Chironomidae), идентифицированных по ДНК-метабаркодингу в районах исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНК-метабаркодинг на основе высокопроизводительного секвенирования позволил охарактеризовать современное состояние МЗБ в районе бывшего сброса ПОСВ БЦБК в оз. Байкал. Несмотря на то что вопрос о точности количественных показателей, полученных данным методом, все еще остается дискуссионным и требует дополнительных исследований, общая картина пространственного распределения относительного обилия МЗБ не противоречит гидробиологическим данным. В целом, относительное обилие ОТЕ и МЗБ по гидробиологическим пробам на участках “контроля” и “сброса”, а также список видов, идентифицированных по ДНК-метабаркодингу, свидетельствуют о сходстве результатов. К тому же в последнем случае без привлечения большого числа специалистов-морфологов

были получены более точные характеристики видового разнообразия, в частности личинок Chironomidae рода *Cricotopus*, а также находки видов *P. flava*, *P. grimmii*, встречающихся впервые в Байкале.

Использованный метод может быть рекомендован для совершенствования системы мониторинга за состоянием МЗБ не только оз. Байкал, но и других водоемов и водотоков, а также для оценки качества вод по индикаторным видам. Особенно он перспективен для организаций, осуществляющих контроль и наблюдения за состоянием водоемов, как в краткосрочной, так и долгосрочной перспективе. При организации мониторинга водоемов с использованием ДНК-метабаркодинга и высоко-производительного секвенирования необходимо учесть следующие рекомендации: 1) провести предварительную экспертизу состава морфологически описанных видов, обитающих в водоеме, представленности их нуклеотидных последовательностей различных генов в базах данных GenBank, BOLD, Midori2, с целью выбора наиболее перспективных для ДНК-метабаркодинга; 2) в зависимости от состава МЗБ подобрать универсальные праймеры для получения ампликонов широкого спектра организмов, входящих в состав сообществ; 3) отбор образцов должен осуществляться на основе базовых эколого-гидробиологических подходов, учитывающих не только геоморфологию дна, состав донных отложений, но и особенности биологического развития, распространения, функционирования видов в исследуемом водоеме; 4) поскольку представители МЗБ характеризуются неравномерным распределением биомассы из-за размеров тела, в отличие от микроорганизмов, зоопланктона, фитопланктона, микроводорослей, то для получения более или менее адекватного количества прочтений, приходящихся на таксон, требуется разработка специализированного инструментария для отбора ткани организмов для выделения ДНК; 5) для кратко- и долгосрочных наблюдений за состоянием МЗБ в системе генетического мониторинга необходимо разработать единые протоколы выделения ДНК, используемых праймеров, режима ПЦР, воспроизводимые заинтересованными исследователями.

Мы солидарны с мнением многих специалистов о том, что востребованность ДНК-метабаркодинга для биомониторинга водных экосистем со временем будет только возрастать и, вероятнее всего, он заменит рутинные, трудоемкие методы благодаря высокому уровню таксономического разрешения, быстроте получения результата и экономической эффективности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по проекту Российского фонда фундаментальных исследований № 19-05-00398-а;

сбор и обработка проб проводились частично в рамках ГЗ № 121032300196-8; биоинформационный анализ частично выполнен в рамках ГЗ № 121031300042-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ербаева Э.А.* Макрозообентос в районе Байкальского ЦБК / Долгосрочное прогнозирование состояния экосистем. Новосибирск: Наука, 1988. С. 150–166.
- Израэль Ю.А.* Глобальная система наблюдения. Прогноз и оценка изменений состояния окружающей среды. Основы мониторинга // Метеорол. и гидрол. 1974. № 7. С. 3–8.
- Израэль Ю.А., Анохин Ю.А.* Мониторинг природной среды в регионе оз. Байкал / Проблемы регионального мониторинга состояния озера Байкал. Л.: Гидрометеоиздат, 1983. С. 4–11.
- Каплина Г.С.* Макрозообентос каменистых грунтов лitorали оз. Байкал и его сезонная динамика (данные 1963–1968 гг., район Больших Котов) / Продуктивность Байкала и антропогенные изменения его природы. Иркутск, 1974. С. 126–137.
- Кожкова О.М.* Межгодовые изменения в биоценозах района Утулик-Мурина Южного Байкала / Продуктивность Байкала и антропогенные изменения его природы. Иркутск, 1974. С. 160–172.
- Кожкова О.М.* Биологический мониторинг оз. Байкал и предложения по его усовершенствованию / Проблемы регионального мониторинга состояния озера Байкал. Л.: Гидрометеоиздат, 1983. С. 12–24.
- Кожкова О.М., Павлов Б.К.* Экологический мониторинг. Принципы и методы / Совершенствование регионального мониторинга состояния озера Байкал. Л.: Гидрометеоиздат, 1985. С. 22–37.
- Кожкова О.М., Кравцова Л.С.* Мониторинг бентоса в районе Байкальского целлюлозно-бумажного комбината / Природные ресурсы, экология и социальная среда Прибайкалья Т. 2. Иркутск: Изд-во Иркутского университета, 1995. С. 63–69.
- Кравцова Л.С., Потемкина Т.Г., Механикова И.В., Ижболдина Л.А., Акинишина Т.В., Варыханова К.В.* Пространственное распределение бентосных сообществ беспозвоночных животных в южной котловине озера Байкал // Зоология беспозвоночных. 2006. Т. 3. № 1. С. 65–76.
- Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Механикова И.В., Помазкина Г.В., Белых О.И.* Натурализация *Elodea canadensis* Mich. в озере Байкал // РЖБИ. 2010. № 2. С. 2–17.
<https://doi.org/10.1134/S2075111710030045>
- Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Трибой Т.И., Небесных И.А., Купчинский А.Б., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р.* Исследование разнообразия гидробионтов Лиственничного залива озера Байкал с использованием ДНК-метабаркодинга // Генетика. 2021. Т. 57. № 4. С. 445–453.
<https://doi.org/10.31857/S0016675821040056>
- Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Трибой Т.И., Небесных И.А., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р.* Исследование сообществ макробеспозвоночных животных в бухте Большие Коты озера Байкал с использованием ДНК-метабаркодинга // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 27. № 6. С. 694–702.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-23-80>
- Линевич А.А.* Хирономиды Байкала и Прибайкалья. Новосибирск: Наука, 1981. 152 с.
- Новикова Л.Н., Островская Р.М., Яковлева Ю.Н., Кожкова О.М.* Мутагенная активность лигнинодержащих соединений / Проблемы сохранения биоразнообразия. Новосибирск: Наука, 1998. С. 74–79.
- Одум Ю.* Экология. М.: Мир, 1986. 376 с.
- Павленко В.В., Денисова Т.П.* Сравнительное изучение токсикогенетических эффектов промстоков БЦБК и супермутагенов на дафниях // Проблемы регионального мониторинга состояния озера Байкал. Л.: Гидрометеоиздат, 1983. С. 150–154.
- Baird D.J., Hajibabaei M.* Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing // Mol. Ecol. 2012. № 8. P. 2039–2044.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05519.x>
- Brown K.R., Gerber A., Bedulina D., Timofeev M.A.* Human impact and ecosystemic helth at Lake Baikal // Water. 2021. № 4. P. e1528.
<https://doi.org/10.1002/wat2.1528>
- Doyle J.J., Dickson E.E.* Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis // Taxon. 1987. V. 36. № 4. P. 715–722.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–2461.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar R.C.* UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nat. Methods. 2013. V. 10. № 10. P. 996–998.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar R.C.* UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing // bioRxiv. 2016. P. 081257.
<https://doi.org/10.1101/081257>

- Elbrecht V., Leese F.* Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass-sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol // *PloS one*. 2015. № 7. P. e0130324.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324>
- Elbrecht V., Steinke D.* Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring // *Freshw. Biol.* 2019. V. 64. № 2. P. 380–387.
<https://doi.org/10.1111/fwb.13220>
- Ficetola G.F., Boyer F., Valentini A., Bonin A., Meyer A., Dejean T., Gaboriaud C., Usseglio-Polatera P., Taberlet P.* Comparison of markers for the monitoring of freshwater benthic biodiversity through DNA metabarcoding // *Mol. Ecol.* 2021. V. 30. № 13. P. 3189–3202.
<https://doi.org/10.1111/mec.15632>
- Geller J.B., Meyer C.P., Parker M., Hawk H.* Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxon biotic surveys // *Mol. Ecol. Resour.* 2013. V. 13. № 5. P. 851–861.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12138>
- Gleason J.E., Elbrecht V., Braukmann T.W.A., Hanner R.H., Cottenie K.* Assessment of stream macroinvertebrate communities with eDNA is not congruent with tissue-based metabarcoding // *Mol. Ecol.* 2021. V. 30. № 13. P. 3239–3251.
<https://doi.org/10.1111/mec.15597>
- Hampton S.E., McGowan S., Ozersky T., Virdis S.G., Vu T.T., Spanbauer T.L., Kraemer B.M., Swann G., Mackay A.W., Powers S.M. et al.* Recent ecological change in ancient lakes // *Limnol. Oceanogr.* 2018. № 5. P. 2277–2304.
<https://doi.org/10.1002/limo.10938>
- Hebert P.D.N., Cywinski A., Ball S.L., De Waard J.R.* Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Royal Soc. B.* 2003. V. 270. P. 313–321.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hsieh T.C., Ma K.H., Chao A.* iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers) // *Methods Ecol. Evol.* 2016. № 12. P. 1451–1456.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Kravtsova L.S., Izboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Rodionova E.V., Domysheva V.M., Sakirko M.V., Tomberg I.V., Kostornova T.Ya., Kravchenko O.S., Kupchinsky A.B.* Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal // *J. Great Lakes Res.* 2014. № 2. P. 441–448.
<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.02.019>
- Kravtsova L., Vorobyeva S., Naumova E., Izboldina L., Mincheva E., Potemkina T., Pomazkina G., Rodionova E., Onishchuk N., Sakirko M., Nebesnykh I., Khanaev I.* Response of aquatic organisms communities to global climate changes and anthropogenic impact: evidence from Listvenichny bay of Lake Baikal // *Biology*. 2021. V. 10. № 9. P. 904.
<https://doi.org/10.3390/biology10090904>
- Kuntke F., de Jonge N., Hesselsoe M., Nielsen J.L.* Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates // *Ecol. Indic.* 2020. P. 111:105982.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105982>
- Lacoursière-Roussel A., Howland K., Normandeau E., Grey E.K., Archambault P., Deiner K., Lodge D.M., Hernandez C., Leduc N., Bernatchez L.* eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity // *Ecol. Evol.* 2018. V. 8. № 16. P. 7763–7777.
<https://doi.org/10.1002/ece3.4213>
- Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P., Mills S.C., Aquedelo N., Ranwez V., Boehm J.T., Machida R.* A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents // *Front. Zool.* 2013. V. 10. № 1. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34>
- Leray M., Knowlton N.* DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity // *PNAS*. 2015. 112. № 7. P. 2076–2081.
<https://doi.org/10.1073/pnas.142499711>
- Machida R.J., Leray M., Ho S.-L., Knowlton N.* Metazoan mitochondrial gene sequence reference datasets for taxonomic assignment of environmental samples // *Sci. data.* 2017. V. 4. № 1. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2017.27>
- Martin P., Kaygorodova I., Sherbakov D. Yu., Verheyen E.* Rapidly evolving lineages impede the resolution of phylogenetic relationships among Clitellata (Annelida) // *Mol. Phylogen. Evol.* 2000. V. 15. № 3. P. 355–368.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0764>
- Mauffrey F., Cordier T., Apothéloz-Perret-Gentil L., Cerma kova K., Merzi T., Delefosse M., Blanc P., Pawłowski J.* Benthic monitoring of oil and gas offshore platforms in the North Sea using environmental DNA metabarcoding // *Mol. Ecol.* 2021. V. 30. № 13. P. 3007–3022.
<https://doi.org/10.1111/mec.15698>
- O'Reilly C.M., Alin S.R., Plisnier P.D., Cohen A.S., McKee B.A.* Climate change decreases aquatic ecosystem productivity of Lake Tanganyika, Africa // *Nature*. 2003. № 424. P. 766–768.
<https://doi.org/10.1038/nature01833>
- Peretolchina T.E., Khanaev I.V., Enushchenko I.V., Sherbakov D. Y., Kravtsova L.S.* The diversity of the Baikal lineage of *Hydra oligactis* Pallas, 1766: molecular and morphological evidence // *Zookeys*. 2020. № 912. P. 1–12.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.912.46898>
- Peretolchina T.E., Sitnikova T.Y., Sherbakov D. Y.* The complete mitochondrial genomes of four Baikal molluscs from the endemic family Baicaliidae (Caenogastropoda: Truncatelloidea) // *J. Molluscan Stud.* 2020. V. 86. № 3. P. 201–209.
<https://doi.org/10.1093/mollus/eyaa004>
- Piñol J., Mir G., Gomez-Polo P., Agustí N.* Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative

- metabarcoding of arthropods // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. № 4. P. 819–830.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355>
- Reinholdt J.M., Egelyng S.E., Agersnap S., Jessen R.J., Baattrup-Pedersen A., Wiberg-Larsen P., Francis T.P.* Seasonal turnover in community composition of stream-associated macroinvertebrates inferred from freshwater environmental DNA metabarcoding // Environ. DNA. 2021. V. 3. № 4. P. 861–876.
<https://doi.org/10.1002/edn3.193>
- Romanova E.V., Bukan Y.S., Mikhailov K.V., Logacheva M.D., Aleoshin V.V., Sherbakov D.Y.* The mitochondrial genome of a freshwater pelagic amphipod *Macrohectopus branickii* is among the longest in Metazoa // Genes. 2021. V. 12. № 12. P. 1–25.
<https://doi.org/10.3390/genes12122030>
- Schniebs K., Sitnikova T.Y., Vinar斯基 M.V., Müller A., Khanaev I.V., Hundsdoerfer A.K.* Morphological and Genetic Variability in *Radix auricularia* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) of Lake Baikal, Siberia: The Story of An Unfinished Invasion into the Ancient Deepest Lake // Diversity. 2022. V.14. № 7. P. 527.
<https://doi.org/10.3390/d14070527>
- Shcherbakov D.Y.* Molecular phylogenetic studies on the origin of biodiversity in Lake Baikal // Trends Ecol. Evol. 1999. № 14. P. 92–95.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01543-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01543-2)
- Timoshkin O.A.* Biodiversity of Baikal fauna: state-of-the-art (Preliminary analysis) // New Scope Boreal Ecosyst. East Sib. 1997. P. 35–76.
- Timoshkin O.A., Goulter G., Wada E., Sutuirin A.N., Yuma M., Bondarenko N.A., Melnik N.G., Kravtsova L.S., Obolkina L.A., Karabanov E.B.* Is the concept of a universal monitoring system realistic? Landscape-ecological investigations on Lake Baikal (East Siberia) as a possible model // Verh. Internat. Verein. Limnol. 2005. V. 29. P. 315–320.
<https://doi.org/10.1080/03680770.2005.11902021>
- Timoshkin O.A., Moore M.V., Kulikova N.N., Tomberg I.V., Malnik V.V., Shimaraev M.N., Troitskaya E.S., Shirokaya A.A., Sinyukovich V.N., Zaitseva E.P., Domysheva V.M., Yamamoto M., Poberezhnaya A.E., Timoshkina E.M.* Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia) // J. Great Lakes Res. 2018. V. 44. № 2. P. 230–244.
<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.01.008>
- Valipour M., Bateni S.V., Jun C.* Global Surface Temperature: A New Insight // Climate. 2021. № 9. P. 81.
<https://doi.org/10.3390/clim9050081>
- Wangensteen O.S., Palacín C., Guardiola M., Turon X.* DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers // Peer J. 2018. P. e4705.
<https://doi.org/10.7717/peerj.4705>
- Watts C., Doppleide A., Holdaway R., Davis C., Wood J., Thorneburrow D., Dickie I.A.* DNA metabarcoding as a tool for invertebrate community monitoring: a case study comparison with conventional techniques // Austral Entomol. 2019. V. 58. № 3. P. 675–686.
<https://doi.org/10.1111/aen.12384>
- Yu D.W., Ji Y., Emerson B.C., Wang X., Ye C., Yang C., Ding Z.* Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring // Methods Ecol. Evol. 2012. № 3. P. 613–623.
<https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x>

DNA-metabarcoding of macroinvertebrates in the biomonitoring system of Lake Baikal

**L. S. Kravtsova^{1, #}, T. E. Peretolchina¹, T. I. Triboy¹, M. V. Kovalenkova¹,
I. A. Nebesnykh¹, A. E. Tupikin², M. R. Kabilov²**

¹*Limnological Institute SB RAS, Ulaanbaatarskaya, 3, Irkutsk, 664033 Russia*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
Akademika Lavrentyeva ave., 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

[#]*E-mail: lk@lin.irk.ru*

In 2019, 6 years after the closure of the Baikal Pulp and Paper Mill, macrozoobenthos was studied using hydrobiological and molecular-genetic (DNA metabarcoding) methods. According to the data obtained by different methods, the quantitative development of macrozoobenthos in the coastal zone of Lake Baikal at depths of up to 5 m, as well as the species composition and structure of its communities are comparable with those in previous years of research. The tendency of increasing the proportion of Oligochaeta since 1968–1971, findings of the Palearctic species *Psychomyia flava* Hagen, 1861 (Trichoptera) and *Paratanytarsus grimmii* (Schneider, 1885) (Chironomidae), not previously encountered in Lake Baikal, indicate an increase in trophicity in the areas studied. The experience of our research can be recommended for improving the biomonitoring system of Lake Baikal, as well as other water bodies.

Keywords: macrozoobenthos, DNA metabarcoding, macroinvertebrates, biomonitoring, Lake Baikal