

УДК 574.589

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В ВОДЕ ЛАДОЖСКОГО ОЗЕРА

© 2024 г. А. В. Ильина^{1, 2, *}, С. А. Галкина¹, Д. А. Стариков³, Р. Г. Сахабеев², А. Г. Демин¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский государственный технологический университет, Санкт-Петербург, 190013 Россия

³Нижне-Свирский государственный природный заповедник, Лодейное поле, 187700 Россия

*e-mail: Arina-Ilina-23@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.04.2024 г.

После доработки 16.05.2024 г.

Принята к публикации 20.05.2024 г.

ДНК окружающей среды, или экологическая ДНК (эДНК), — это генетический материал, полученный непосредственно из образцов различных природных субстратов, а не напрямую из живого организма. Использование эДНК упрощает детекцию скрытных и малочисленных видов, которые сложно обнаружить при помощи классических методов экологического мониторинга. Для понимания возможностей и ограничений методов, основанных на применении эДНК, требуется информация о влиянии различных факторов на темпы деградации нуклеиновых кислот в окружающей среде. Нами изучена скорость деградации ДНК при температуре 14°C в воде из Свирской губы Ладожского озера с рН 7.3 в отсутствие освещения. Для этого были разработаны и протестированы высокоспецифичные праймеры и зонд TaqMan к фрагменту D-петли митохондриальной ДНК домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*). Выбор именно этого генетического материала в качестве экзогенной ДНК был обусловлен минимальным риском контаминации им природной воды в районе пробоотбора. На старте эксперимента в пробы воды вносили ДНК курицы (galДНК) до концентрации 50 мкг/л и детектировали методом ПЦР в реальном времени через 6 ч, 1, 2, 3, 8 и 14 сут. Используя разработанный протокол, мы выявляли целевые последовательности D-петли в образцах природной воды на протяжении первых трех суток эксперимента, при этом следовые количества galДНК обнаруживали вплоть до 8 сут.

Ключевые слова: экологическая ДНК, скорость деградации, пресноводный природный объект, экологический мониторинг, ДНК птиц, ПЦР в реальном времени

DOI: 10.56304/S0234275824030116

ДНК окружающей среды (environmental DNA), или экологическая, экосистемная, средовая ДНК (эДНК), — это собирательный термин для обозначения генетического материала, полученного непосредственно из образцов окружающей среды (например, воды, почвы, воздуха) без какого-либо контакта с изучаемым организмом [1]. Источниками эДНК могут быть отслоившиеся клетки, гаметы, продукты жизнедеятельности, трупы [2]. С тех пор, как в 2008 году эДНК впервые была использована для идентификации инвазивной лягушки-быка (*Rana catesbeiana*) в пресноводных водоемах Франции [3], ее стали рассматривать как один из перспективных инструментов, существенно до-

полняющих возможности традиционных методов экологического мониторинга. Методы, основанные на анализе эДНК, могут упростить детекцию видов, ареалы которых затрагивают труднодоступные места, животных, ведущих скрытный образ жизни, редких и инвазивных видов [4], а также индикаторных видов, мониторинг которых входит в систему производственного экологического контроля на объектах обустройства морских месторождений и транспорта. В отличие от классических методов визуального наблюдения, анализ эДНК позволяет частично обойти ограничения, налагаемые погодными условиями, длиной светового дня, лимитом времени и числа наблюдателей [5]. Сочетание методов эДНК и метабаркодинга (подхода, объединяющего технологии высокопроизводительного секвенирования и ДНК-штрихкодирования) позволяет определить видовое разнообразие целых сообществ [6, 7].

Список сокращений: мтДНК — митохондриальная ДНК; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени; эДНК — экологическая ДНК; galДНК — ДНК домашней курицы; D-galДНК — D-петля митохондриальной ДНК домашней курицы; HVR-2 (hypervariable region 2) — гипервариабельный участок-2; LOD (limit of detection) — предел обнаружения.

В водных экосистемах эДНК представляет собой молекулы либо растворенные, либо связанные с более крупными взвешенными частицами. От состояния эДНК в растворе зависит скорость ее деградации под влиянием физико-химических и биотических факторов. К таким факторам относятся: температура [8] и химический состав воды, рН и концентрация кислорода [9, 10]; интенсивность ультрафиолетового излучения [11]; внеклеточные нуклеазы [12]; микроорганизмы [13]; возможность сорбции ДНК [14]. Например, щелочная среда, постоянная температура, высокие соленость и концентрации ионов уменьшают скорость деградации ДНК [8, 15]. Повышенные температуры увеличивают скорость многих процессов, вовлеченных в деградацию ДНК, включая лизис клеток и органелл, гидролиз и окисление молекул ДНК, а также разрушение внеклеточными ферментами [16]. Следует также учитывать размер целевого фрагмента ДНК: чем он длиннее, тем быстрее деградирует. Короткие фрагменты эДНК размером 60–250 п.н. сохраняются на протяжении длительного времени и поэтому могут быть источником ложноположительных результатов [15, 17]. В экспериментах с использованием пресной и морской воды было установлено, что время деградации эДНК варьирует от нескольких часов до недель; при этом именно температура оказывает наиболее сильный эффект на время существования эДНК в водной среде [18–21]. Так, показано, что эДНК в морской воде может сохраняться в измеримых концентрациях более 2 недель при низких температурах ($\leq 10^\circ\text{C}$), но деградирует в течение недели при $\geq 20^\circ\text{C}$, и это не зависит от видовой принадлежности эДНК [21]. В пресной воде наиболее медленно эДНК деградировала при 5°C , при этом время 90%-ного снижения ее концентрации (T_{90}) составляло 6.6 сут, в то время как при более высоких температурах — около 1 сут [19]. Понимание динамики деградации эДНК в полевых условиях в различных средах обитания необходимо для разработки адекватной модели, предсказывающей время, в течение которого возможна детекция ДНК живых организмов, а также для введения поправки на деградацию эДНК во время транспортировки проб воды.

С целью изучения потенциала эДНК как инструмента экологического мониторинга водоплавающих и околоводных птиц в северных широтах мы проанализировали скорость деградации ДНК в воде Свирской губы Ладожского озера — самого крупного пресного водоема Европы, который располагается на северо-западе России. Ежегодно в период весенней и осенней миграций на Ладоге собирается огромное число водоплавающих и околоводных птиц [22]. Этот регион — важное звено крупнейшего в Европе Беломоро-Балтийского пролетного пути [23]. Экологический мониторинг птиц в южной части Ладожского озера систематически ведут с 1968 года на Ладожской орнитологической

станции [24]. Вода озера пресная, гидрокарбонатно-кальциевая, со средней минерализацией 56 мг/л. Содержание растворенного кислорода зимой составляет 14–15 мг/л, летом в поверхностных слоях воды — 10–11 мг/л [25]. Термический режим различен в глубоководной центральной части и мелководных прибрежных районах озера, со средней температурой поверхности воды около 16°C в августе [26]. Свирская губа характеризуется небольшими глубинами, высокой концентрацией органических взвесей и обилием различных видов водоплавающих птиц [27, 28].

С целью определения времени, в течение которого эДНК сохраняется в детектируемых концентрациях в поверхностном слое воды Ладожского озера в весенне-летний период (при 14°C), мы проанализировали скорость деградации экзогенной ДНК на примере ДНК домашней курицы (galДНК), внесенной в образцы воды Свирской губы. В качестве видоспецифичного генетического маркера использовали небольшой фрагмент D-петли митохондриальной ДНК (mtДНК) домашней курицы (D-galДНК). Для его детекции были разработаны и протестированы высокоспецифичные праймеры и зонд TaqMan, пригодные для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Пробоподготовка

Природная вода была отобрана 5 июня 2023 г. в северо-восточной части Свирской губы Ладожского озера, входящей в состав Нижне-Свирского государственного природного заповедника. Отбор проводили в пластиковую емкость объемом 5 л, стерилизованную замачиванием в 6%-ной перекиси водорода (1 сут) и ультрафиолетовым излучением (20 мин). Тотальную ДНК выделяли из печени домашней курицы (*Gallus gallus domesticus* фенол-хлороформным методом [29]). Концентрацию ДНК измеряли с использованием флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора реагентов Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (Invitrogen, США).

В начале эксперимента 5 стерильных стеклянных емкостей объемом 1 л заполняли образцами воды по схеме, приведенной на рис. 1. В первые три емкости была добавлена природная вода и по 50 мкг тотальной ДНК домашней курицы. Положительным контролем служила емкость, содержащая воду Milli-Q и тотальную ДНК домашней курицы в такой же концентрации. Пятая емкость содержала отрицательный контроль — образец природной воды без внесения ДНК.

Все емкости инкубировали одновременно на качающейся платформе SK-L330-Pro (DLAB Scientific, Китай) при 100 об/мин в течение 14 сут при 14°C в соответствии с температурой воды, за-

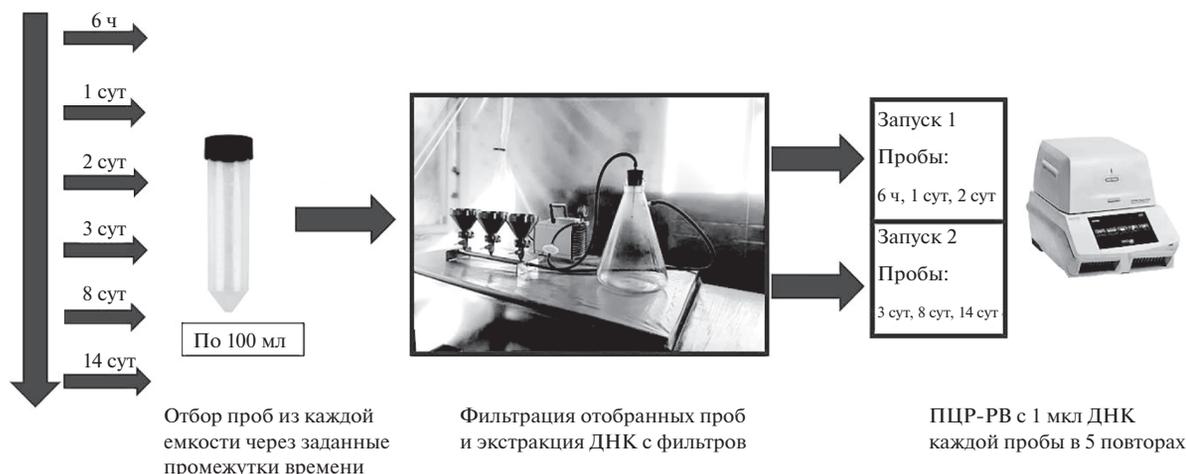
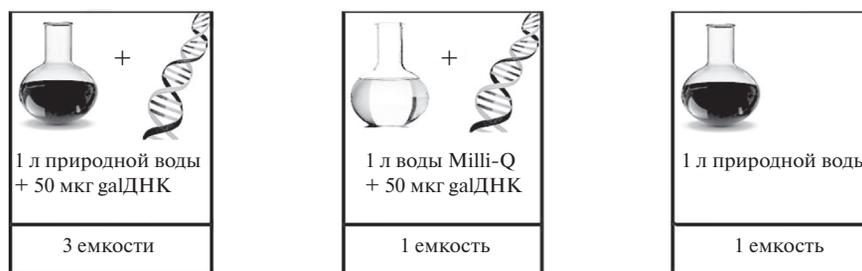


Рис. 1. Общая схема проведения эксперимента по определению скорости деградации экзогенной ДНК в образцах воды из Свирской губы Ладожского озера. Эксперимент включал три этапа: внесение тотальной galДНК, отбор проб и детекцию целевого фрагмента. На первом этапе в 3 емкости с 1 л воды из Свирской губы Ладожского озера и в емкость с водой Milli-Q добавляли 50 мкг тотальной galДНК. Емкость с отрицательным контролем содержала 1 л природной воды без экзогенной ДНК. На втором этапе через 6 ч, 1, 2, 3, 8 и 14 сут из каждой емкости отбирали по 100 мл воды и фильтровали через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм. На последнем этапе из каждого фильтра экстрагировали ДНК и проводили ПЦР-РВ с использованием соответствующих праймеров и зонда TaqMan для детекции фрагмента D-петли митохондриальной galДНК (D-galДНК).

Fig. 1. General scheme of an experiment to determine the rate of degradation of exogenous DNA in water samples from the Svir Bay of Lake Ladoga. The experiment included three stages, namely: addition of total galDNA, sampling, and detection of the target fragment. At the first stage, 50 µg of total galDNA were added to 3 containers with 1 L of water from the Svir Bay of Lake Ladoga, and to a container with Milli-Q water. The negative control container contained 1 L of water from the Bay without exogenous DNA. At the second stage, after 6 h, 1, 2, 3, 8 and 14 days, 100 mL of water were taken from each container and filtered through a nitrocellulose membrane with a pore diameter of 0.45 µm. At the last stage, DNA was extracted from each filter, and real time PCR was performed using appropriate primers and a TaqMan probe to detect the D-loop fragment of mitochondrial galDNA (D-galDNA).

регистрированной при пробоотборе. Для исключения воздействия на эДНК сторонних факторов пробы экспонировали без доступа света, емкости были закрыты крышками. Через 6 ч, 1, 2, 3, 8 и 14 сут после начала эксперимента из каждой емкости отбирали по 100 мл воды для выделения эДНК. Отбор воды через 8 и 14 сут выполняли для контроля остаточной концентрации целевой ДНК.

Фильтрация проб воды и выделение эДНК из фильтров

Отобранные образцы воды объемом 100 мл медленно фильтровали через нитроцеллюлозную

мембрану диаметром 47 мм с размером пор 0.45 мкм (Macherey-Nagel, Германия), для чего использовали вакуумную установку ПВФ-47/3 НБ (АО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия). Вплоть до выделения эДНК фильтры хранили при температуре -80°C . Выделение эДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК из широкого спектра биологических образцов diaGene («Диаэм», Россия), согласно протоколу фирмы-изготовителя, с предварительным измельчением фильтров стерилизованными ножницами. Для элюирования эДНК с фильтра использовали 100 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСI, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0).

Таблица 1. Последовательности праймеров и зонда TaqMan, использованные для детекции фрагмента D-петли митохондриальной galДНК (D-galDNA)**Table 1.** Primer and TaqMan probe sequences used for detection of mitochondrial galDNA D-loop fragment (D-galDNA)

Название	Последовательность
Праймер F_gal149	5'-GGTTGCCCTTCACAGTGC-3'
Праймер R_gal149	5'-CGATCCAAAGTGCATCAGTG-3'
Зонд TaqMan P_gal149	5'-FAM-CTACACCTGCGTTGCGTCSTATCCTA -GTQ1-3'

Разработка праймеров и зондов для ПЦР-РВ

Для детекции генетического материала домашней курицы в образцах воды методом ПЦР-РВ с зондом TaqMan в качестве маркерной последовательности была выбрана варибельная область D-петли мтДНК. Поиск видоспецифичных участков D-петли домашней курицы выполнен в пакете программ Geneious v9.1 (<https://www.geneious.com/>) с использованием общедоступной базы генетических данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Разработка праймеров и зонда TaqMan выполнена с использованием программы PrimerQuest Tool (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Зонд TaqMan нес флуоресцентную метку FAM и гаситель флуоресценции GTQ1. Все олигонуклеотиды синтезированы в ООО “Бигль” (Россия). Последовательности праймеров и зонда, использованные в данной работе, приведены в табл. 1.

Работоспособность системы праймеров проверяли методом ПЦР. Состав реакционной смеси: 5 мкл 5× qPCRmix-HS (ЗАО “Евроген”, Россия), по 0.5 мкл праймеров F_gal149 (10 мкМ) и R_gal149 (10 мкМ), 18 мкл воды, 1 мкл ДНК (20 нг/мкл). ПЦР проводили на градиентном амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: первичная денатурация при 95°C в течение 3 мин; 35 циклов [15 с при 95°C (денатурация), по 15 с при 58, 59, 60 и 61°C (отжиг праймеров), 15 с при 72°C (элонгация), 5 мин при 72°C (достройка цепи)]. В качестве оптимальной была принята температура отжига 59°C. ПЦР-продукт анализировали электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле, а затем секвенировали по Сэнгеру – без дополнительной очистки – с использованием капиллярного секвенатора ABI Prism 3500×1 (Applied Biosystems, США).

Для тестирования праймеров и зонда TaqMan методом ПЦР-РВ полученный ампликон фрагмента D-петли очищали от праймеров с использованием набора для элюции ДНК из агарозного геля diaGene (“Диаэм”) согласно протоколу фирмы-изготовителя. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием набора готовых ПЦР-смесей 5× qPCRmix-HS (ЗАО “Евроген”). Состав реакционной смеси: 5 мкл 5× qPCRmix-HS, по 0.5 мкл праймеров F_gal149 (10 мкМ) и R_gal149 (10 мкМ), 18 мкл воды, 1 мкл ДНК (7 нг/мкл). Параметры ПЦР-

РВ: 5 мин при 95°C (первичная денатурация); 50 циклов [15 с при 94°C, 1 мин при 59°C (отжиг праймеров, гибридизация зонда и элонгация)]. Для тестирования праймеров и зонда готовили серию из пяти 10-кратных разведений очищенного ампликона с концентрацией от 10⁴ до 1 копии в 1 мкл. ПЦР-РВ всех образцов и контролей выполняли в 5 повторах.

Для построения графиков использовали программу Microsoft Excel 2402 (<https://www.microsoft.com/ru-ru/microsoft-365/excel?market=ru>). Построения проводили по медианным значениям порогового цикла (C_t). Коррекцию изображений выполняли в программе Adobe Photoshop 23.5.4 (<https://www.adobe.com/ru/products/photoshop.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа динамики деградации эДНК мы создали модель, представляющую собой пробу природной воды из Свирской губы Ладожского озера с добавлением тотальной ДНК домашней курицы. ДНК курицы была выбрана в качестве целевой, так как в районе проведения пробоотбора была минимальная вероятность контаминации воды этим генетическим материалом.

Валидация праймеров и зонда к фрагменту D-galДНК

Для разработки праймеров и видоспецифичного зонда к ДНК домашней курицы была выбрана последовательность гиперварибельного участка-2 (HVR-2) мтДНК протяженностью 149 п.н. (с 682 по 830 п.н. от начала D-петли) (табл. 1). Высокая варибельность этого фрагмента минимизирует вероятность неспецифической амплификации, что важно для адекватного анализа динамики деградации ДНК.

При тестировании праймеров нецелевых продуктов амплификации не зарегистрировано; специфичность последовательности ампликона подтверждена секвенированием.

С использованием ранее подготовленных разведений очищенного ампликона фрагмента D-петли выполнена ПЦР-РВ с зондом TaqMan и получен график, отображающий зависимость величины C_t от количества матрицы в реакционной смеси

(рис. 2). Линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации матрицы наблюдалось вплоть до 10 копий ДНК на реакцию, поэтому именно эта область графика была выбрана для калибровки.

Предел обнаружения (LOD) определяли как число копий матрицы в разведении, при котором хотя бы в одном из 5 повторов регистрировали положительный результат со значением $C_t < 39.01$ (минимальное число циклов для отрицательного контроля).

При разведении ДНК до приблизительно одной копии только один из 5 повторов был положительным, хотя в этом случае значение C_t составляло 38.38, то есть незначительно ниже принятого LOD. В случае 10 копий целевой ДНК в образце значение C_t одного из 5 положительных повторов было выше полученного в отрицательном контроле (рис. 2). В связи с этим мы определили LOD для разработанных нами праймеров и зонда TaqMan в границах между 1 и 10 копиями целевой последовательности D-петли на реакцию.

Предел количественного определения (LOQ) рассчитывали как минимальное число копий целевой последовательности D-петли, при котором в разведении все повторы ПЦР-РВ были положительными, то есть $C_t < LOD$ – минимального порогового значения C_t в отрицательном контроле. В 90%-ном доверительном интервале LOQ был определен на уровне >10 копий, но не выше 100 копий целевой матрицы в образце.

Анализ динамики деградации galДНК в воде из Ладожского озера

В ходе эксперимента исследовано 18 проб природной воды, содержащих galДНК, 6 проб положительного контроля и 6 проб отрицательного контроля. Все пробы фильтровали и в экстрагированных с фильтров образцах ДНК определяли фрагмент D-galДНК в ходе двух раундов ПЦР-РВ (по 75 образцов в каждом) (см. рис. 1). Для каждого запуска ПЦР-РВ определяли значение C_t , выше которого результаты считали недостоверными (рис. 3). Оно соответствовало минимальному значению C_t , полученному в повторах отрицательного контроля: 37.17 для первого запуска и 35.99 для второго. Получены диаграммы, отображающие зависимость величины C_t от времени нахождения galДНК в воде из Свирской губы (рис. 3).

Динамика деградации целевой D-galДНК в первых трех емкостях, содержащих природную воду, в целом оказалась сходной (рис. 3, табл. 2): значение C_t повышалось с увеличением времени экспонирования. При проведении ПЦР-РВ с образцами ДНК из емкости № 1 к 3 суткам, а из № 2 к 8 суткам пороговые циклы были выше значения LOD в большинстве повторов. В случае с емко-

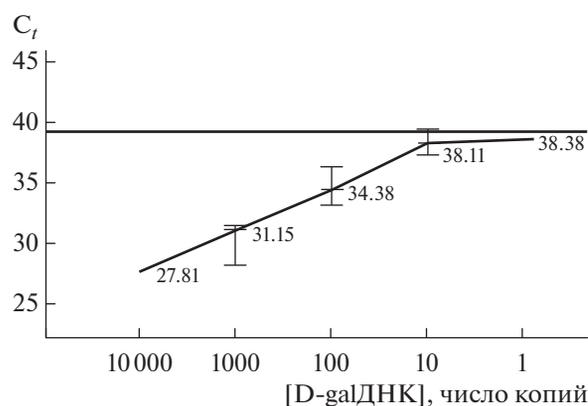


Рис. 2. Калибровочный график зависимости порогового цикла (C_t) от количества целевой матрицы. Результаты представлены как медианные значения C_t . Горизонтальной линией показано минимальное значение $C_t = 39.01$, полученное в отрицательном контроле.

Fig. 2. Calibration plot of threshold cycle (C_t) versus the amount of target template (D-galDNA). Results are presented as median C_t values. The horizontal line shows the minimum value of $C_t = 39.01$ for the negative control.

стью № 3 к 8 суткам результаты только одного из 5 повторов были выше LOD; при этом на 14 сутки ни один из полученных результатов не удовлетворял критерию достоверности. Стоит подчеркнуть, что на конечный результат могут влиять такие технические моменты, как способ фильтрации воды и метод выделения ДНК из фильтров – в первую очередь этап измельчения вручную. Вероятно, с этими обстоятельствами связаны аномально высокие значения C_t , полученные при анализе проб ДНК из емкости № 3 через 2 сут (рис. 3, табл. 2).

В положительном контроле значимого изменения концентрации D-galДНК на протяжении всего эксперимента не наблюдали (рис. 3, табл. 2). Эти результаты согласуются с выводами Saito & Doi [30], которые сообщали о стабильности ДНК в дистиллированной воде в течение длительного времени. И это подтверждает гипотезу Barnes & Turner [31], согласно которой ведущую роль в деградации ДНК в воде играют микроорганизмы и внеклеточные ферменты.

Количественное определение скорости деградации galДНК

По калибровочному графику (рис. 2) рассчитывали число копий целевой последовательности D-galДНК в 1 мкл элюата, полученном из 100 мл пробы положительного контроля (емкость № 4). При медианном значении $C_t = 26.00$ (ряд значений в интервале 6 ч–14 сут, см. табл. 2) число копий целевого фрагмента в 1 мкл элюата составило 36 200. Учитывая отсутствие значимых изменений кон-

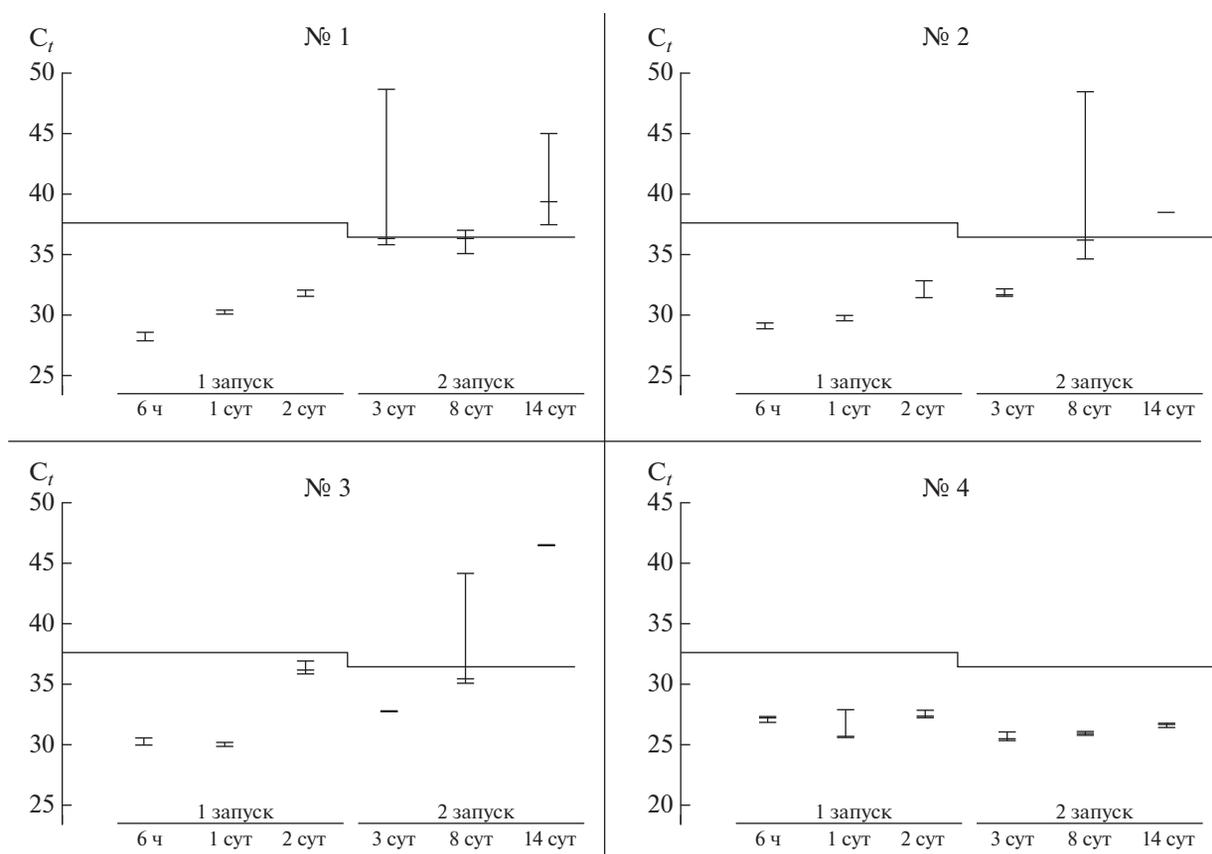


Рис. 3. Анализ динамики деградации galДНК в образцах природной воды при 14°C. Емкости №№ 1–3 содержали по 1 л природной воды, контрольная емкость № 4 – 1 л воды Milli-Q. Во все емкости вносили по 50 мкг galДНК. Горизонтальной линией показано минимальное значение C_t , полученное в отрицательном контроле (запуск I – 37.17, запуск II – 35.99).

Fig. 3. Analysis of the dynamics of galDNA degradation in natural water samples at 14°C. Bottles No. 1–3 contained 1 L of water from the Svir Bay, control bottle No. 4 contained 1 L of Milli-Q water. Fifty micrograms of galDNA were added to each bottle. The horizontal line shows the minimum C_t value obtained in the negative controls (run I – 37.17, run II – 35.99).

центрации целевого фрагмента D-galДНК в положительном контроле с течением времени, данное значение было принято как исходное для емкостей с пробами природной воды. С использованием каллибровочного графика были рассчитаны усредненные концентрации целевой ДНК (число копий в 1 мкл элюата) через 6 ч, 1, 2, 3 и 8 сут после начала эксперимента и построен график скорости деградации galДНК в воде из Свирской губы (рис. 4). Экспериментальные значения C_t , превышающие LOD, не использовали в расчетах. Как видно из представленных на рис. 4 данных, деградация galДНК увеличивалась со временем, причем скорость различалась на трех временных интервалах.

В интервале 0–6 ч (I) происходило резкое снижение концентрации целевой ДНК – на 89%: с 36200 до 3900 копий/мкл элюата. Скорость деградации матрицы в интервале I составляла 14.8%/ч. Это может быть связано с тем, что молекулы еще находятся в свободном состоянии и не защищены от физико-химических и биотических факторов

среды высокомолекулярными органическими субстратами.

В интервале 6–48 ч (II) деградировало 85% оставшейся целевой ДНК (2 440 и 592 копии/мкл элюата через 1 и 2 сут соответственно), при этом скорость расщепления снизилась в среднем до 2%/ч. Вероятно, на этом этапе значительная часть оставшихся молекул связывается с органическими субстратами и становится менее доступной для расщепления.

В интервале 48–192 ч (III) концентрация целевого фрагмента снизилась еще на 91% (492 и 51 копии/мкл через 3 и 8 сут соответственно), а скорость составила 0.6%/ч. Можно предположить, что на данном этапе происходит медленная деградация преципитированной с другими органическими соединениями ДНК, при этом свободная ДНК полностью отсутствует. Учитывая выявленную кинетику гидролиза galДНК в исследованных образцах воды из Свирской губы и практически следовое количество уже через 8 ч инкубации при 14°C, мы

Таблица 2. Анализ методом ПЦР-РВ динамики деградации экзогенной ДНК (galДНК) в образцах природной воды при 14°C

Table 2. Real-time PCR analysis of the dynamics of degradation of exogenous DNA (galDNA) in natural water samples at 14°C

Емкость	C _t , число циклов*					
	6 ч	1 сут	2 сут	3 сут	8 сут	14 сут
1	28.35	30.16	31.84	36.55	36.52	39.51
2	28.99	29.78	31.97	31.64	36.29	38.41
3	30.25	29.85	36.10	32.65	35.35	46.59
K ⁺	26.96	25.48	27.35	25.18	25.71	26.29
K ⁻	46.39	38.65	42.74	—	—	44.06
	Минимальное значение C _t — 37.17			Минимальное значение C _t — 35.99		

*Примечание: Приведены медианные значения C_t; серым фоном выделены значения, превышающие LOD в каждом запуске ПЦР-РВ.

*Note: Median C_t values are shown; values exceeding the LOD in each real time PCR run are highlighted in gray.

посчитали нецелесообразным продлевать эксперимент еще на 6 сут.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными другими авторами на образцах воды из разных водоемов. Так, R. Lance с соавт. [32] сообщали о возможности обнаружения ДНК карпа в воде рыбохозяйственного бассейна с температурой 12°C на протяжении 8.4 сут. Saito & Doi [30] регистрировали ДНК рыб в морской воде на 7 сутки, а в пресной воде из пруда — через 5 сут. Авторы сообщали об экспоненциальном снижении количества ДНК рыб в воде и практически полном ее исчезновении через 8 сут.

Стоит отметить, что в естественных условиях образцы эДНК попадают в водоем чаще всего в виде связанных с другими молекулами и кинетика их де-

градации, скорее всего, отличается от модельных систем, во всяком случае, на начальном этапе.

На основании полученных результатов логично предположить, что мониторинг целевых последовательностей ДНК в образцах воды, сходных по составу и температуре с водой из Свирской губы Ладожского озера в летний период, можно проводить в течение, как минимум, трех суток после ее попадания в водоем. Это открывает широкие возможности для внедрения в практику экомониторинга методов анализа эДНК для выявления скрытого биоразнообразия мелководных северных водоемов. Стоит отметить, что для любых задач, предполагающих количественную оценку эДНК, важно учитывать и время, прошедшее с момента отбора пробы воды до ее анализа, так как скорость деградации

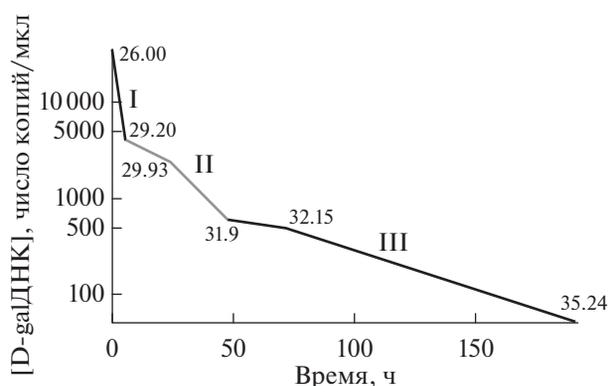


Рис. 4. Количественный анализ изменений концентрации galДНК в воде Свирской губы в течение 8 сут при 14°C. Цифрами указаны средние значения C_t, полученные методом ПЦР-РВ для целевого фрагмента D-galДНК в образцах воды, отобранных через 6 ч, 1 (24 ч), 2 (48 ч), 3 (72 ч) и 8 сут (192 ч) после начала эксперимента. Римскими цифрами отмечены основные временные интервалы с различной скоростью деградации ДНК.

Fig. 4. Quantitative analysis of changes in galDNA concentration in the water of the Svir Bay for 8 days at 14°C. The numbers indicate the average C_t values obtained by real time PCR for the target D-galDNA fragment in water samples taken after 6 h, 1 (24 h), 2 (48 h), 3 (72 h) and 8 (192 h) days after the start of the experiment. Roman numerals mark the main time intervals with different rates of DNA degradation.

генетического материала максимальна в первые часы его поступления в природный водоем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Основные этапы работы проводили на базе ресурсных центров Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета (г. Санкт-Петербург): ЦКП “Хромас” (разработка праймеров, ПЦР с электрофоретической детекцией), “Развитие молекулярных и клеточных технологий” (секвенирование по Сэнгеру и ПЦР в режиме реального времени).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 22-74-10043).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart K.A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodivers. Conserv.*, 2019, 28, 983–1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>
2. Bohmann K., Evans A., Gilbert M.T.P., Carvalho G.R., Creer S., Knapp M., Yu D.W., de Bruyn M. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.*, 2014, 29(6), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
3. Ficetola F., Miaud C., Pompanon F., Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, 2008, 4, 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
4. Carraro L., Mächler E., Wüthrich R. Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nat. Commun.*, 2020, 11, 3585. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17337-8>
5. Barlow J., Ferguson C.M., Perrin W.F., Balance L., Gerrodette T., Joyce G., MacLeod C.D., Mullin K., Palka D.L., Waring G. Abundance and densities of beaked and bottlenose whales (family Ziphiidae). *J. Cetacean Res. Manage.*, 2006, 7(3), 263–270. <https://doi.org/10.47536/jerm.v7i3.736>
6. Ji Y., Ashton L., Pedley S.M., Edwards D.P., Tang Y., Nakamura A., Kitching R., Dolman P.M., Woodcock P., Edwards F.A., Larsen T.H., Hsu W.W., Benedict S., Hamer K.C., Wilcove D.S., Bruce C., Wang X., Levi T., Lott M., Emerson B.C., Yu D.W. Reliable verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol. Lett.*, 2013, 16, 1245–1257. <https://doi.org/10.1111/ele.12162>
7. Zuhdi M.F., Madduppa H., Zamani N.P. Variasi temporal kelompok ikan terumbu karang di pulau tidung kecil menggunakan eDNA metabarkoding dan sensus visual. *Jurnal Kelautan Tropis*, 2021, 24(3), 283–290. <https://doi.org/10.14710/jkt.v24i3.11810>
8. Collins R.A., Wangensteen O.S., O’Gorman E.J., Mariani S., Sims D.W., Genner M.J. Persistence of environmental DNA in marine systems. *Commun. Biol.*, 2018, 1, 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>
9. Weltz K., Lyle J.M., Ovenden J., Morgan J.A.T., Moreno D.A., Semmens J.M. Application of environmental DNA to detect an endangered marine skate species in the wild. *PLoS One*, 2017, 12, e0178124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178124>
10. Zulkefli N.S., Kim K.-H., Hwang S.-J. Effects of microbial activity and environmental parameters on the degradation of extracellular environmental DNA from a eutrophic lake. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, 16(18), 3339. <https://doi.org/10.3390/ijerph16183339>
11. Mächler E., Osathanunkul M., Altermatt F. Shedding light on eDNA: neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms. *PLoS One*, 2018, 13(4), e0195529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195529>
12. van Bochove K., Bakker F.T., Beentjes K.K., Hemerik L., Vos R.A., Gravendeel B. Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecol. Evol.*, 2020, 10, 3647–3654. <https://doi.org/10.1002/ece3.6123>
13. Pedersen M.W., Overballe-Petersen S., Ermini L., Sarkissian C.D., Haile J., Hellstrom M., Spens J., Thomsen P.F., Bohmann K., Cappellini E., Schnell I.B., Wales N.A., Carøe C., Campos P.F., Schmidt A.M., Gilbert M.T., Hansen A.J., Orlando L., Willerslev E. Ancient and modern environmental DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2015, 370(1660), 20130383. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0383>
14. Lorenz M.G., Aardema B.W., Krumbain W.E. Interaction of marine sediment with DNA and DNA availability to nucleases. *Mar. Biol.*, 1981, 63, 225–230. <https://doi.org/10.1007/BF00397113>
15. Колмакова О.В. Экосистемная ДНК (эДНК) в исследованиях биоразнообразия рыб. *Журнал Сибирского Федерального университета. Серия: Биология*, 2023, 16(1), 5–23. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0398>
16. Grzyb J., Frączek K. Activity of phosphohydrolytic enzymes in waters. *Ecol. Chem. Eng.*, 2012, 19(6), 583–589. [https://doi.org/10.2428/ecea.2012.19\(06\)059](https://doi.org/10.2428/ecea.2012.19(06)059)
17. Jo T., Murakami H., Masuda R., Sakata M.K., Yamamoto S., Minamoto T. Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.*, 2017, 17, e25–e33. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12685>
18. Strickler K.M., Fremier A.K., Goldberg C.S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol. Conserv.*, 2015, 183, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
19. Eichmiller J.J., Best S.E., Sorensen P.W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environ. Sci. Technol.*, 2016, 50(4), 1859–1867. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05672>

20. Tsuji S., Ushio M., Sakurai S., Minamoto T., Yamanaka H. Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS One*, 2017, 12(4), e0176608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608>
21. McCartin L.J., Vohsen S.A., Ambrose S.W., Layden M., McFadden C.S., Cordes E.E., McDermott J.M., Herrera S. Temperature controls eDNA persistence across physicochemical conditions in seawater. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2022, 56(12), 8629–8639. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01672>
22. Бубличенко Ю.Н. Птицы ООПТ Финского залива. СПб.: Изд-во “Наука-школе”, 2017, 175–194. https://old.spbrc.ru/ru/councils/ecology/school_science/ptici_finskogo.
23. Резвый С.П., Носков Г.А., Гагинская А.Р. Атлас миграций птиц Ленинградской области по данным кольцевания. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей, 1995, 232 с.
24. Noskov G.A., Rymkevich T.A., Iovchenko N.P. Intraspecific variation of moult: adaptive significance and ways of realization. In: *Proc. 22 Int. Ornithol. Congr., Durban*. Eds N.J. Adams & R.H. Slotow, Johannesburg: BirdLife South Africa, 1999, 544–563.
25. Богословский Б.Б., Кириллова В.А. Водные массы озер с различным водообменом (на примере озер Ладожского, Онежского и Ильменя). В кн.: *Вопросы современной лимнологии*. Ленинград: Наука, 1973, 102–113.
26. Румянцев В.А., Кудерский Л.А. Ладожское озеро: общая характеристика, экологическое состояние. *Общество. Среда. Развитие (Terra Humana)*, 2010, 1, 171–182.
27. Носков Г.А., Антипин М.А., Бабушкина О.В. Летние и осенние миграции птиц в Свирской губе Ладожского озера. В кн. *Изучение динамики популяций мигрирующих птиц и тенденций их изменений на Северо-Западе России*. СПб.: Изд-во “Тускарора”, 2006, 5, 53–82.
28. Румянцев В.А., Кондратьев С.А. Ладога. СПб.: Изд-во “Нестор-История”, 2013, 468 с.
29. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Изд-во “Мир”, 1984, 480 с.
30. Saito T., Doi H. Degradation modeling of water environmental DNA: experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environ. DNA*, 2021, 3, 850–860. <https://doi.org/10.1002/edn3.192>
31. Barnes M.A., Turner C.R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv. Genet.*, 2016, 17, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-432>
32. Lance R.F., Klymus K.E., Richter C.A., Guan X., Farrington H.L., Carr M.R., Thompson N., Chapman D.C., Baerwaldt K.L. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Manag. Biol. Invasions*, 2017, 8(3), 343–359. <https://doi.org/10.3391/mbi.2017.8.3.08>

Study on Exogenous DNA Degradation in Ladoga Lake Water

A. V. Ilina^{a, b, #}, S. A. Galkina^a, D. A. Starikov^c, R. G. Sakhabeev^b, and A. G. Dyomin^a

^aSaint-Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^bSaint-Petersburg State Institute of Technology, Saint Petersburg, 190013 Russia

^cNizhnesvirsky Nature Reserve, Lodeynoye Pole, 187700 Russia

[#]e-mail: Arina-Ilina-23@yandex.ru

Abstract—Environmental DNA (eDNA) is genetic material obtained directly from samples of various natural substrates, rather than from a living organism. The use of eDNA simplifies monitoring of secretive and low-abundance species that are difficult to detect using classical environmental survey methods. Understanding the capabilities and limitations of eDNA-based methods requires information about the influence of various factors on the rate of degradation of nucleic acids in the environment. We studied the rate of DNA degradation at a temperature of 14°C in water from the Svir Bay of Lake Ladoga with pH 7.3 in the absence of light. For this purpose, highly specific primers and a TaqMan probe were developed and tested for the D-loop fragment of mitochondrial DNA of the domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). The choice of this particular genetic material as exogenous DNA was due to the minimal risk of contamination of natural water in the sampling area. At the start of the experiment, chicken DNA (galDNA) was added to the water samples to a concentration of 50 µg/L and detected by real-time PCR after 6 h, 1, 2, 3, 8 and 14 days. Using the developed protocol, we identified target D-loop sequences in natural water samples during the first three days of the experiment, with trace amounts of galDNA detected up to 8 days.

Keywords: environmental DNA, degradation rate, freshwater system, environmental monitoring, bird DNA, real-time PCR