

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

ДНК-метабаркодинг бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариот оз. Байкал в условиях быстрых экологических изменений

Ю.С. Букин^{1, 2}✉, Л.С. Кравцова¹, Т.Е. Перетолчина¹, А.П. Федотов¹, А.Е. Тупикин³, М.Р. Кабилов³, Д.Ю. Щербаков^{1, 4}, Е.В. Минчева¹

¹ Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ bukinyura@mail.ru

Аннотация. Впервые приводится оценка разнообразия фитобентосных сообществ на основе ДНК-метабаркодинга с использованием ампликонов фрагмента гена 18S рРНК и технологии Illumina MiSeq. Исследование проведено в связи с цветением нитчатых водорослей (преимущественно рода *Spirogyra*) и цианобактерий в прибрежной зоне озера Байкал в условиях изменения климата и антропогенного воздействия. С помощью ДНК-метабаркодинга определен видовой состав водорослей, а также таксономическое разнообразие ассоциированных с ними эукариот в разных районах Байкала (у острова Большой Ушканий, в заливе Лиственничный) и в р. Кая (в черте г. Иркутска), находящейся в одном водосборном бассейне с оз. Байкал. С помощью NGS (next generation sequencing) получено более 15 тыс. прочтений 18S рРНК маркера. Выявлены виды водорослей, доминирующие по количеству прочтений, а также трудно идентифицируемые таксоны Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria, Amoebozoa и др., играющие важную роль в функционировании и формировании структуры водорослевых сообществ. Охарактеризовано разнообразие грибов и грибоподобных организмов в изучаемых сообществах. Индекс Шеннона рассмотренных сообществ колеблется от 1.56 до 2.72. Показаны преимущества и слабые стороны использования ДНК-метабаркодинга на основе фрагмента гена 18S рРНК для изучения структуры сообществ водорослей. Метод позволяет более полно учесть разнообразие таксонов эукариот, трудно идентифицируемых по морфологии, без привлечения большого числа специалистов, что характеризует его преимущество. Недостатком метода являются искажения, возникающие при проведении ПЦР. Предложены пути решения для устранения этого недостатка. Результаты исследования показывают, что для анализа минорной компоненты сообщества эукариот в образцах (организмы с малой биомассой), состоящих из смеси многоклеточных и одноклеточных организмов, требуется глубина прочтения не менее чем 100 000 последовательностей на пробу. В целом метод ДНК-метабаркодинга рекомендован для исследования структуры сообществ водорослей и ассоциированных с ними эукариот. Ключевые слова: водорослевые сообщества; метабаркодинг; 18S рРНК; Illumina MiSeq; озеро Байкал; зеленые водоросли; *Spirogyra*.

Для цитирования: Букин Ю.С., Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Федотов А.П., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Щербаков Д.Ю., Минчева Е.В. ДНК-метабаркодинг бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариот оз. Байкал в условиях быстрых экологических изменений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022; 26(1):86-95. DOI 10.18699/VJGB-22-12

DNA metabarcoding of benthic algae and associated eukaryotes from Lake Baikal in the face of rapid environmental changes

Yu.S. Bukin^{1, 2}✉, L.S. Kravtsova¹, T.E. Peretolchina¹, A.P. Fedotov¹, A.E. Tupikin³, M.R. Kabilov³, D.Yu. Sherbakov^{1, 4}, E.V. Mincheva¹

¹ Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ bukinyura@mail.ru

Abstract. Here we report new data describing the biodiversity of phytobenthic communities based on DNA-metabarcoding using the 18S rDNA marker and the Illumina MiSeq system. The study was initiated due to the blooming of filamentous algae (mainly of the genus *Spirogyra*) and cyanobacteria in the coastal zone of Lake Baikal under climate change and anthropogenic impact. The composition and taxonomic diversity of algae and other organisms associated with them on different sites of Lake Baikal (near Bolshoi Ushkaniy Island, in Listvennichny Bay) and in

the Kaya (within the city of Irkutsk, located in the same drainage basin as Lake Baikal) were determined using DNA-metabarcoding. About 15 thousand reads of the 18S rRNA marker were obtained by applying NGS (next-generation sequencing). The species of algae dominating in the number of reads, as well as the difficult-to-identify taxa (Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria, Amoebozoa, etc.), which play an important role in the functioning and formation of the structure of algal communities, were revealed. The Shannon index of the communities studied ranges from 1.56 to 2.72. The advantages and weaknesses of using DNA-metabarcoding based on the 18S rRNA gene fragment for studying the structure of algal communities are shown. The advantage of this method is the possibility to more fully determine the diversity of eukaryotes taxa, which are difficult to identify by morphology, without involving a large number of specialists, while the disadvantage of the method is the distortion that may occur during the PCR. Here, ways of solving this problem are proposed. The results of the study show that the analysis of the minor component of the eukaryotic community in samples (organisms with low biomass) consisting of a mixture of multicellular and unicellular organisms requires a read-depths of at least 100,000 sequences per sample. In general, the DNA-metabarcoding method is recommended for studying the structure of algal communities and eukaryotes associated with them.

Key words: algal communities; metabarcoding; 18S rDNA; Illumina MiSeq; Lake Baikal; green algae; *Spirogyra*.

For citation: Bukin Yu.S., Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Fedotov A.P., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Sherbakov D.Yu., Mincheva E.V. DNA metabarcoding of benthic algae and associated eukaryotes from Lake Baikal in the face of rapid environmental changes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1): 86-95. DOI 10.18699/VJGB-22-12

Введение

В последние годы для ряда районов прибрежной зоны озера Байкал широко известен ряд катастрофических, быстро развивающихся экологических явлений, в том числе взрывообразное распространение нитчатых водорослей и цианобактерий (Timoshkin et al., 2016). Впервые сообщения о подобных изменениях появились в 2011 г. (Кравцова и др., 2012; Kravtsova et al., 2014). До этого момента подобные явления для прибрежной зоны озера не были описаны, за исключением инвазии *Elodea canadensis* в 1970-х гг. (Ижболдина, 1990).

Известно, что для водорослей Байкала характерны зональность в пространственном распределении и сезонная динамика, которая сохранялась в течение длительного времени (Мейер, 1930; Ижболдина, 1990, 2007; Ижболдина и др., 2017), однако с 2011 г. исследователи стали отмечать зарастание дна нитчатками водорослями (тиной) в заливе Лиственничный (Кравцова и др., 2012; Kravtsova et al., 2014). Зарастание дна нитчатками регистрируется также в других районах озера вблизи населенных пунктов пос. Култук, г. Байкальск, г. Северобайкальск (Timoshkin et al., 2018; Kravtsova et al., 2020). Среди нитчатых водорослей, разросшихся в литоральной зоне вблизи пос. Листвянка, доминируют представители рода *Spirogyra*. Впервые (почти за 100 лет наблюдений) бентосные нитчатые водоросли *Spirogyra* отмечены в составе планктонных сообществ прибрежной зоны (Бондаренко, Логачева, 2016). На байкальских пляжах в отдельных районах озера стали регистрировать большие скопления водорослей, выброшенные на берег (Сутурин и др., 2016; Timoshkin et al., 2016, 2018; Bukin et al., 2020). Формируя водорослевые маты вдоль береговой линии, нитчатые водоросли препятствуют проникновению света, концентрируют взвесь и таким образом негативно воздействуют на организмы-фильтраторы, в частности на байкальские губки (Khanaev et al., 2018). Надо сказать, что водоросли рода *Spirogyra* встречались в оз. Байкал и ранее. Исследователи эпизодически обнаруживали единичные нити спирогиры в составе донных фитоценозов в сорах и заливах озера. Среди них были зарегистрированы четыре вида рода *Spirogyra* и три формы: *S. calospora*, *S. decimina*

(*S. decimina* f. *jurgensis*, *S. decimina* f. *longata*), *S. weberi* (*S. weberi* f. *weberi*), *S. hassallii* (Ижболдина, 2007). Позднее был обнаружен вид *S. fluviatilis*, доминировавший в литоральной зоне Лиственничного залива в скоплениях нитчатых водорослей в 2012 г. (Тимошкин и др., 2014). Не исключено, что в Байкале могут обитать и эндемичные виды рода *Spirogyra*, приспособившиеся к специфическим условиям экосистемы озера. В настоящее время вопрос о том, какие еще виды встречаются в скоплениях нитчатых водорослей, остается открытым.

Изменение состава сообществ водорослей (и соотношения биомасс водорослей) влечет за собой и изменение в составе ассоциированных с ними эукариотических организмов (одноклеточных водорослей, простейших и грибоподобных организмов). Роль паразитических форм эукариот (грибоподобных организмов), негативно влияющих на развитие типичных для литоральной зоны водорослей, практически не изучена.

Водоросли литоральной зоны открытого Байкала – достаточно сложный объект для таксономической идентификации. Поэтому анализ видового разнообразия водорослей и их обилия в донных сообществах с помощью классических морфологических, а также гидробиологических методов является трудоемким и длительным процессом. Еще более сложная задача – изучение таксономического состава и количественного соотношения различных групп эукариотических организмов (в том числе микроэукариот), ассоциированных с водорослями. Идентификация таких таксонов может потребовать длительного культивирования на селективных средах и трудоемкого микроскопического анализа.

Упростить и ускорить подобные исследования может применение современных молекулярно-генетических методов метагеномного анализа, например таких, как ДНК-метабаркодинг, позволяющий определить принадлежность организма к определенному таксону. Метод заключается в амплификации каких-либо универсальных генетических маркеров в смеси ДНК организмов природной и/или лабораторной пробы с последующей расшифровкой ампликонов с помощью NGS (next generation sequencing) – секвенирования нового поколения. Метод

позволяет установить видовой состав и количественное соотношение таксонов в пробе.

Наибольшее распространение ДНК-метабаркодинг получил при изучении бактериальных сообществ с помощью универсального маркера 16S рибосомальной РНК (Petrosino et al., 2009). Подобные исследования проводились и для различных бактериальных сообществ оз. Байкал (Kurilkina et al., 2016). Но в литературе увеличивается количество работ, в которых этот метод с успехом применяется для эукариотических сообществ. При этом в качестве молекулярно-генетического маркера используется 18S рРНК (Taylor, Cunliffe, 2014; Hawkins et al., 2015; Smith et al., 2017) и фолмеровский фрагмент митохондриального гена CO1 (Leray et al., 2013). Эти же маркеры применялись для изучения сообществ из оз. Байкал, в частности, 18S рРНК – для ДНК-метабаркодинга сообществ микроэукариот (Yi et al., 2017), а CO1 – для сообществ беспозвоночных животных (Metazoa) (Кравцова и др., 2021). Сведения о ДНК-метабаркодинге бентосных водорослей Байкала крайне ограничены (Минчева и др., 2017), а данные об их сообществах и ассоциированных с водорослями эукариотах в настоящее время отсутствуют.

Для исследования водорослевых сообществ и ассоциированных с ними организмов больше всего подходит 18S рРНК. Для амплификации различных участков этого гена разработаны универсальные праймеры, охватывающие широкий спектр видов, принадлежащих разным далеким таксонам. Интерпретация результатов секвенирования облегчается наличием баз данных, содержащих шаблоны, которые позволяют провести выравнивание больших массивов последовательностей с учетом вторичной структуры.

Целью исследования была апробация метода ДНК-метабаркодинга с использованием 18S рРНК маркера для оценки разнообразия сообществ бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариотических организмов.

Материалы и методы

Отбор проб водорослей (мейо-, макрофитов размерами ≥ 2 мм) проведен в июле–августе 2015 г. на каменистой литорали у острова Бол. Ушканий в Северном Байкале (фоновый район, каменистая литораль), в заливе Лиственничный напротив пос. Лиственянка в Южном Байкале (район зарастания дна нитчатками водорослями, каменистая литораль). Для сравнения пробы были взяты в р. Кая, протекающей в черте г. Иркутска и находящейся в одном водосборном бассейне с оз. Байкал (табл. 1).

В Северном и Южном Байкале водоросли были собраны водолазами с трех глубин: 0–2, 2–5 и 6–10 м, а в р. Кая – с глубины 0.05–0.10 м. В каждом местообитании образцы водорослей с разных глубин были объединены в одну интегральную пробу. Идентификацию водорослей проводили по Л.А. Ижболдиной (2007).

Для молекулярно-генетического анализа собранные образцы водорослей фиксировали 80 % этиловым спиртом, затем через сутки перификсировали 70 % этанолом.

Тотальную ДНК выделяли по модифицированной методике Дойла и Диксона (Doyle, Dickson, 1987). В качестве молекулярно-генетического маркера использовали фрагмент гена 18S рРНК (Katana et al., 2001). Амплификацию прово-

дили с набором реактивов ПЦР с HS-Taq («Биолабмикс», г. Новосибирск, www.bioblabmix.ru) в 25 мкл реакционной смеси в термодиклере Bio-Rad-T100 (Bio-Rad, США). Генетический маркер (длиной около 400 пар нуклеотидов), кодирующий V1–V2 вариабельный регион 18S рРНК, амплифицировали с использованием универсальных праймеров 18SF: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' и 416-37R: 5'-ATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCC-3' (Katana et al., 2001). Условия амплификации: предденатурация при 95 °С – 5 мин, далее 25 циклов: денатурация при 95 °С – 1 мин, отжиг праймеров при 55 °С – 1 мин, элонгация при 72 °С – 2 мин (5 мин на последнем цикле).

Продукты реакции анализировали электрофоретически в 1 % агарозном геле. Полосу ожидаемого размера вырезали и очищали с помощью набора для элюции ДНК из агарозного геля («Биосилика», Новосибирск).

Парноконцевую расшифровку продуктов амплификации проводили с помощью технологии Illumina MiSeq в ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

Все этапы анализа данных Illumina MiSeq прочтений – выборочное расшифрованное последовательностей ДНК – осуществлялись с использованием программы MOTHUR (Schloss et al., 2009) и базы данных последовательностей 18S рРНК SILVA (Quast et al., 2012) по схеме MiSeq standard operating procedure (MiSeq SOP) (Kozich et al., 2013). Анализ состоял из следующих процедур: 1) сшивка парноконцевых MiSeq прочтений продуктов амплификации в консенсусные последовательности; 2) тримминг консенсусных последовательностей по качеству прочтения (удаление последовательностей со средним качеством прочтения ниже 20 баллов); 3) удаление химерных последовательностей из набора данных; 4) удаление последовательностей, не соответствующих амплифицированному фрагменту 18S рРНК в базе данных SILVA; 5) выравнивание последовательностей по шаблону базы данных SILVA; 6) расчет матрицы генетических дистанций (в качестве метрики дистанций использовалась доля несовпадающих нуклеотидов при попарном сравнении последовательностей); 7) кластеризация последовательностей на основе генетических дистанций; 8) выделение ОТЕ (операционных таксономических единиц) на уровне кластерного расстояния (0.01), соответствующего межвидовым различиям (1 %); 9) составление таблицы с указанием количества последовательностей, приходящихся на ОТЕ в пробе; 10) выделение репрезентативных последовательностей для каждого ОТЕ; 11) таксономическая идентификация репрезентативных последовательностей с помощью онлайн-приложения BLAST.

Статистическую сходимость результатов оценки таксономического разнообразия характеризовали с помощью кривых насыщения и индекса Chao1 (Chao, 1987). Индекс Chao1 дает оценку ожидаемого α разнообразия в изучаемом сообществе исходя из наблюдаемого количества таксонов при текущем количестве прочтений в пробе. Другими словами, расчеты Chao1 позволяют исследователю понять, сколько еще таксонов (видов) может быть потенциально обнаружено в пробе при увеличении количества прочтений от имеющегося значения до бесконечности. Значительное превышение ожидаемого α разнообразия,

Таблица 1. Общая характеристика исследуемых проб

Район сбора	Геогр. координаты	Виды-доминанты, идентифицированные по морфологии	Количество прочтений	Видовое богатство	Chao1	Индекс Шеннона
Остров Бол. Ушканий, южный берег (проба UI) (каменистая литораль)	N 53.848626° E 108.616931°	<i>Draparnaldioides baicalensis</i>	6610	19	22	2.72
Залив Лиственничный (проба LB) (каменистая литораль)	N 51.867102° E 104.832101°	<i>Spirogyra</i> sp.	5054	15	16	2.45
Река Кая (проба KR)	N 52.265051° E 104.235322°	<i>Cladophora glomerata</i> , <i>Draparnaldia plumosa</i>	3400	7	10	1.56

рассчитанного с помощью индекса Chao1, над наблюдаемым свидетельствует о недостаточном количестве прочтений в пробе и потере таксонов.

Данные о таксономическом составе сообществ (представленности ОТЕ видового ранга) сравнивали с помощью кластерного анализа методом UPGMA, где в качестве меры расстояния использовали коэффициент сходства Брея–Кертиса. Перед проведением кластеризации данные о количестве последовательностей, приходящихся на каждое представленное ОТЕ в пробах, были нормированы на среднее количество прочтений на пробу. Структуру выявленных сообществ визуализировали на тепловой карте.

Разнообразие сообществ оценивали по индексу Шеннона, а также по кривым обилия, с учетом того, что чем медленней кривая обилия выходит в нулевое значение, тем более разнообразным является сообщество.

Статистические расчеты (индекс разнообразия, кластеризация, визуализация данных) проводились в пакете ‘vegan’ (Dixon, 2003) для языка программирования R.

Результаты

Массив данных после фильтрации исходных прочтений включал 6610 последовательностей из района у о. Бол. Ушканий, 5054 – из Лиственничного залива и 3400 – из р. Кая (см. табл. 1).

Операционные таксономические единицы, выделенные на уровне генетических дистанций 0.01, представлены разным числом прочтений: 88 ОТЕ содержали более чем одну последовательность (две – 4000 последовательностей) и 378 ОТЕ – по одной последовательности. На долю единично представленных ОТЕ (из одного прочтения) приходилось 2.57 % от всего набора прочтений, что ниже допустимого 5 % порога (Kozich et al., 2013) и свидетельствует об отсутствии погрешностей на стадии амплификации, секвенирования и фильтрации данных по качеству. Для дальнейшего анализа, согласно рекомендациям (Kozich et al., 2013), брали только ОТЕ, содержащие 4 прочтения и более (табл. 2).

Видовое обилие в образцах из разных местообитаний далеко от насыщения, судя по кривым сходимости (рис. 1, а). Эту же информацию дают значения индекса Chao1 (см. табл. 1), согласно которому количество видов в сообществах было также недооценено. Причем наиболее недооценен видовой состав минорной составляющей, представленной одноклеточными эукариотическими организмами.

Выделенные 27 ОТЕ характеризуют разные таксоны водорослей и ассоциированные с ними организмы (рис. 2 и 3, см. табл. 2). Большинство таксонов, идентифицированных с помощью BLAST, принадлежало водорослям

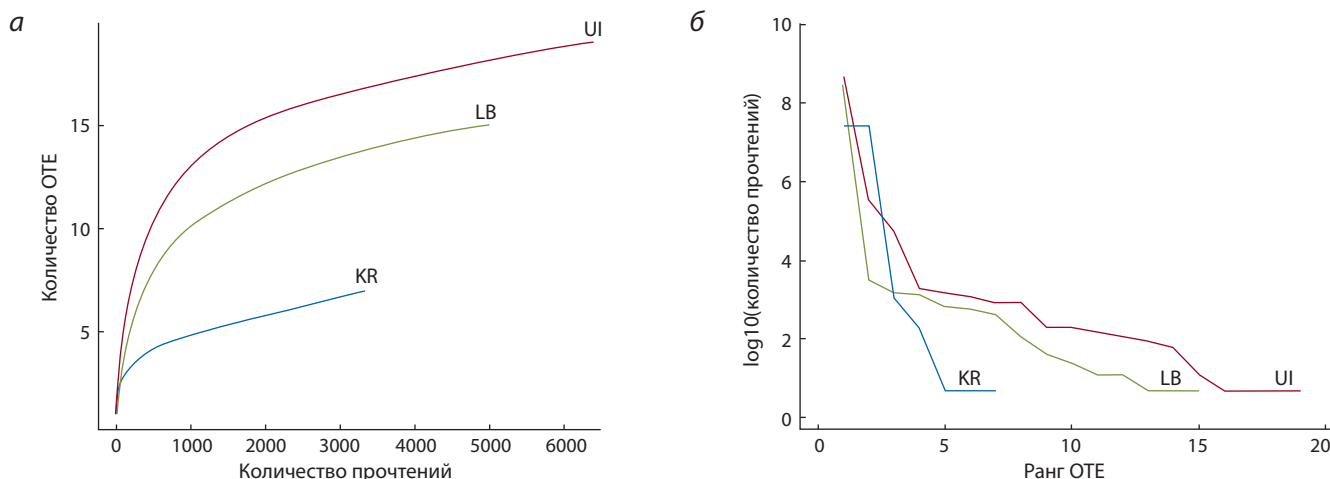


Рис. 1. Кривые насыщения количества таксонов видового ранга в пробах при различных размерах выборок прочтений (а) и кривые видовой обилия (б).

Здесь и на рис. 2 и 3: UI – оз. Байкал, каменистая литораль о. Бол. Ушканий; LB – оз. Байкал, каменистая литораль, залив Лиственничный; KR – Иркутск, р. Кая.

Таблица 2. Результаты идентификации таксономической принадлежности ОТЕ на основе гомологии с последовательностями из базы данных NCBI

Таксон видового ранга	Таксон высокого ранга	Степень сходства с референсными последовательностями из NCBI	Доля от общего количества прочтений, %		
			Байкал, о. Бол. Ушканий (каменистая литораль)	Байкал, залив Лиственничный (каменистая литораль)	Река Кая (в черте г. Иркутска)
<i>Draparnaldioides baicalensis</i>	Plantae	100	91.88	0.04	–
<i>Spirogyra</i> sp. 1		100	0.078	97.157	–
<i>Cladophora glomerata</i>		100	–	0.02	49.836
<i>Draparnaldia plumosa</i>		99	–	–	49.21
<i>Navicula radiosa</i>	Stramenopiles	100	3.928	–	–
Eukaryote sp.	Неклассифицированные эукариоты	99	1.761	–	–
<i>Vorticella</i> sp.	Alveolata	100	0.358	0.26	0.03
<i>Gomphonema</i> cf. <i>angustum</i>	Stramenopiles	99	–	0.641	0.03
<i>Didymosphenia geminata</i>		99	0.405	0.02	–
<i>Spumella</i> sp.		100	0.016	0.45	–
<i>Procryptobia sorokini</i>	Euglenozoa	100	–	0.44	–
<i>Nitzschia aequorea</i>	Stramenopiles	99	0.3	–	–
<i>Pythium myophilum</i>		100	0.15	0.03	0.596
<i>Adriamonas</i> sp.		93	0.25	–	–
<i>Pseudovorticella coscinodisci</i>	Alveolata	98	0.281	–	–
<i>Oikomonas</i> sp.	Stramenopiles	99	0.016	0.3	–
Неидентифицированные Stramenopiles		100	–	0.3	–
<i>Ulnaria ulna</i>	Chromista	100	0.140	0.02	–
<i>Aspidisca</i> sp.	Alveolata	93	0.140	–	–
<i>Cladophora</i> sp.	Plantae	93	–	–	0.268
<i>Ichthyobodo</i> sp.	Euglenozoa	90	0.125	–	–
<i>Bodomorpha</i> sp.	Rhizaria	99	–	0.14	–
<i>Chaetophora</i> sp.	Plantae	97	0.109	–	–
<i>Hartmannellidae</i> sp.	Amoebozoa	93	0.094	–	–
<i>Achnanthydium</i> sp.	Stramenopiles	98	0.031	0.06	–
<i>Amphileptus</i> sp.	Alveolata	99	0.016	0.08	–
<i>Cocconeis</i> sp.	Stramenopiles	99	0.016	0.04	0.03

Charophyta и Chlorophyta: *Spirogyra*, *Draparnaldioides*, *Cladophora* и *Draparnaldia* (см. табл. 2). Доминирующие таксоны, идентифицированные с помощью ДНК-метабаркодирования, полностью соответствовали таксонам, выявленным в результате морфологического анализа образцов (см. табл. 1). Кроме того, значительная часть последовательностей принадлежала таксонам высокого уровня: Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria и Amoebozoa (см. рис. 2). Все исследованные пробы отличались по спектру доминирующих видов водорослей

(см. рис. 3, табл. 2). Эндемик *Draparnaldioides baicalensis* доминировал в фоновом районе Северного Байкала у о. Бол. Ушканий, *Spirogyra* sp. – в сообществе Лиственничного залива. Сообщества у о. Бол. Ушканий и залива Лиственничный образуют один кластер на дендрограмме (см. рис. 3) и имеют в своем составе 10 общих таксонов. В сообществе р. Кая преобладали *Cladophora glomerata* и *Draparnaldia plumosa*; оно существенно отличалось от двух других сообществ по таксономическому составу (см. рис. 3) и содержало два общих таксона с сообществом ли-

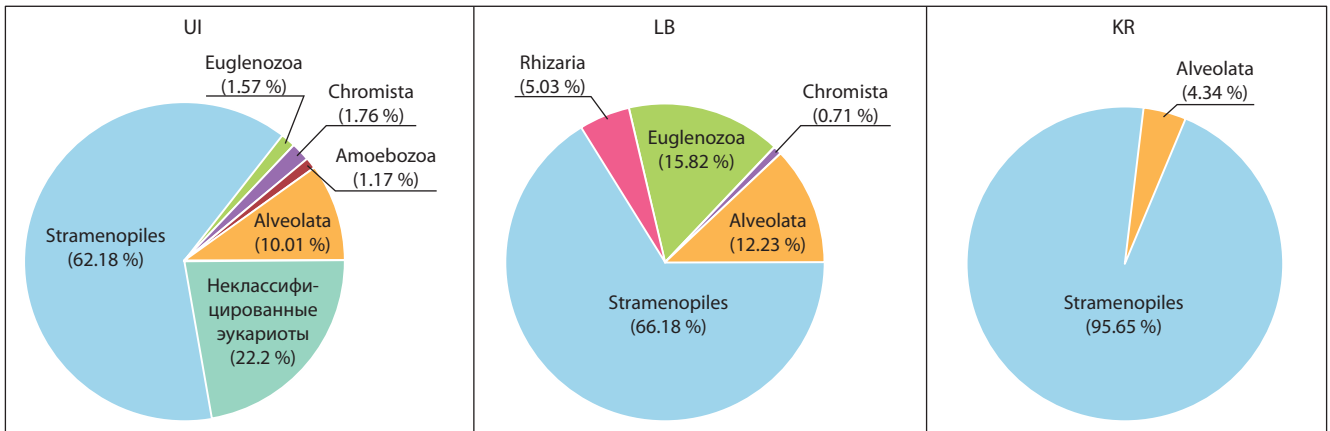


Рис. 2. Распределение таксонов высокого ранга, ассоциированных с водорослями (процентное соотношение от их количества прочтений).

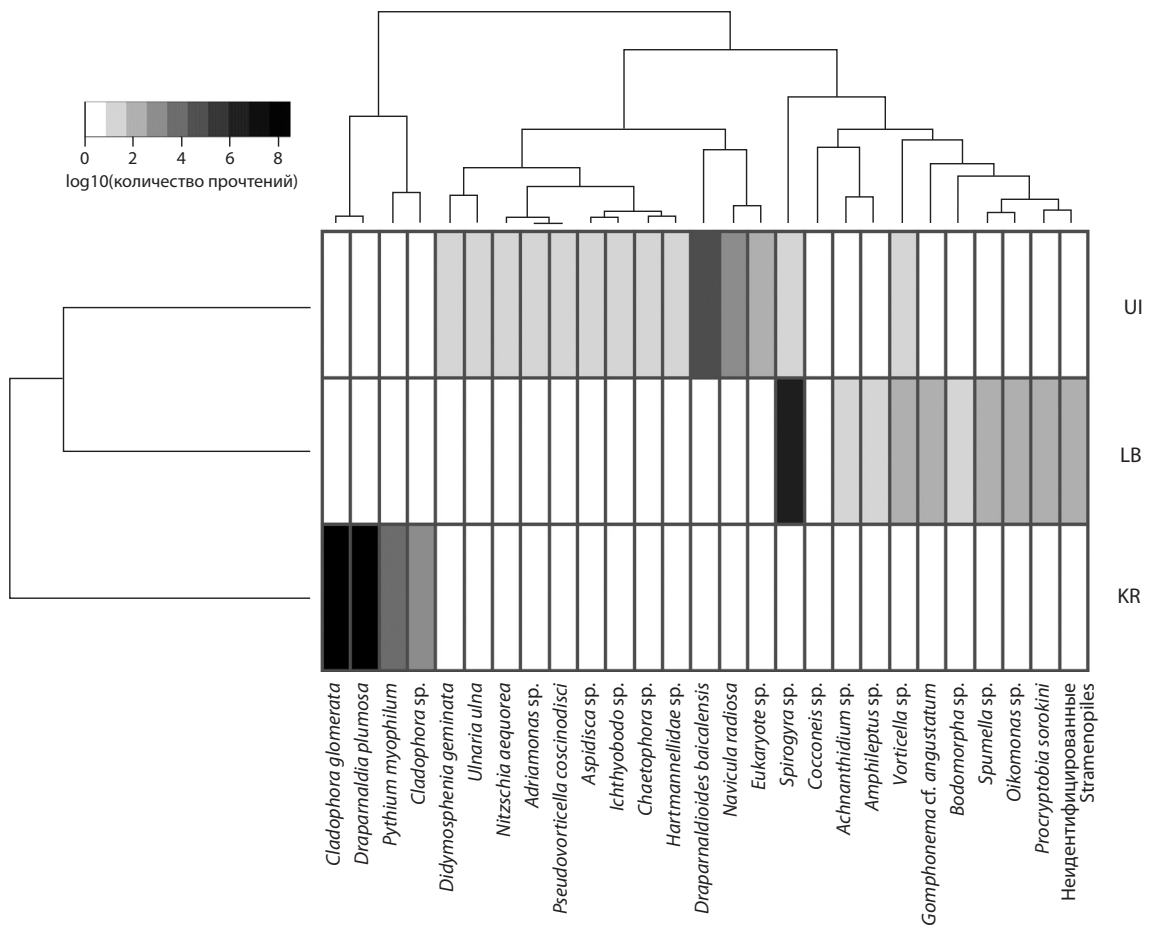


Рис. 3. Тепловая карта структуры сообществ бентосных водорослей с ассоциированными с ними эукариотами и их кластеризация по степени сходства на основе дистанций Брея–Кертиса.

Градиент серого цвета показывает нормализованное количество прочтений (в логарифмическом масштабе), приходящихся на таксон.

торали у о. Бол. Ушканий, а также четыре общих таксона с сообществом из залива Лиственничный.

В целом сообщество у о. Бол. Ушканий и залива Лиственничный, судя по показателям Шеннона, были более разнообразны, чем таковое в р. Кая (см. табл. 1). Кривые обилия также подтверждают этот результат (см. рис. 1, б).

Обсуждение

В прибрежной зоне о. Бол. Ушканий, расположенного в центральной природоохранной зоне Байкала, где практически отсутствует антропогенное воздействие, типичными представителями водорослевой флоры каменистой литорали озера являются эндемичные виды *Draparnaldio-*

des baicalensis, *D. arnoldii*, *D. arenaria* и *Cladophora floccosa* f. *floccosa* (Ижболдина, 1990). Согласно результатам проведенного исследования, структурных изменений в сообществе вблизи острова не наблюдалось (см. табл. 2, рис. 3), хотя в его составе в следовых количествах присутствовала *Spirogyra* sp. 1. Находки ее в этом районе обусловлены циркуляционными течениями, существующими в оз. Байкал (Kravtsova et al., 2020).

В заливе Лиственничный до 2000 г. на глубине более 1.5 м в летний период преобладали виды *Dermatochrysis reticulata*, *Didymosphenia geminata* и *Nitella flexilis*. Однако в настоящее время они утратили ведущую роль в фитоценозах из-за разрастания нитчатых водорослей *Spirogyra*, нетипичных для открытой литорали оз. Байкал (Kravtsova et al., 2014, 2020), что подтверждают наши результаты (см. табл. 2, рис. 3). Расшифрованный фрагмент нитчатых водорослей из Лиственничного залива был на 100 % идентичен ранее опубликованной последовательности *Spirogyra* sp. 1, найденной в литоральной зоне залива в 2013 г. (Романова и др., 2013). Можно предположить, что в период с 2011 по 2015 г. в Лиственничном заливе развивался один и тот же вид *Spirogyra* sp. 1. Распространение нитчаток создает стрессовые условия для типичных водорослевых сообществ оз. Байкал. Известно, что вследствие экспансии видов в экосистемах происходит уменьшение разнообразия по Шеннону (Ling, 2008; Powell et al., 2013). Подобные закономерности наблюдаются и в заливе Лиственничный, где типичные для этого периода водоросли подавлены; к тому же показатель Шеннона здесь ниже, чем в сообществе у о. Бол. Ушканий (см. табл. 1). Еще меньшее разнообразие по Шеннону наблюдалось в р. Кая (см. табл. 1). Но какие-либо выводы о нахождении этого сообщества в стрессовых условиях сделать сложно. В литературных данных мы не нашли информации о значении индекса разнообразия Шеннона, характерном для сообществ донных водорослей и ассоциированных с ними эукариотических организмов речных экосистем. Возможно, полученное значение индекса для р. Кая в принципе характерно для экосистем такого рода.

Состав эукариот, ассоциированных с водорослями, довольно разнообразен: Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria и Amoebozoa, особый интерес представляют оомицеты рода *Pythium* (см. рис. 3, табл. 2) в пробах литоральной зоны Байкала. Надо отметить, что в настоящее время микобиота Байкала практически не изучена, хотя ДНК грибов рода *Pythium* была обнаружена при исследовании микроразнообразия поверхностного слоя глубоководных донных осадков озера (Yi et al., 2017). Однако известно, что большинство пресноводных грибоподобных организмов рода *Pythium* являются паразитами зеленых водорослей (Raghukumar, 1987; Li et al., 2010; Carney, Lane, 2014). Увеличение концентрации *Pythium* в фитоценозах происходит в конце вегетационного периода, он способствует более быстрой деструкции первичного органического вещества растительного происхождения. Возможно, водоросли в сообществе у о. Бол. Ушканий заканчивали вегетацию, поэтому в большей мере были поражены паразитическими грибами, о чем свидетельствует большее количество ДНК *P. myophilum* в пробах из этого района по сравнению с пробами из Лиственничного за-

лива. С одной стороны, в сообществе литоральной зоны Лиственничного залива *P. myophilum*, по-видимому, еще не успел распространиться, так как во время исследования *Spirogyra* sp. 1 была в хорошем фенологическом состоянии. С другой стороны, *Spirogyra* sp. 1 потенциально может быть устойчива к поражению *P. myophilum*, в отличие от других традиционных видов (например, *Ulothrix*), распространенных в литорали Байкала. В таком случае *Spirogyra* sp. 1 получает конкурентное преимущество над другими видами и становится сообществообразующим таксоном. Вероятно, распространение *P. myophilum* вносит определенный вклад в изменение структуры донных сообществ водорослей литорали оз. Байкал.

Несмотря на оригинальность полученных результатов, мы бы хотели обратить внимание на особенности использования метода ДНК-метабаркодинга при исследовании водорослевых сообществ и ассоциированных с ними эукариот. При анализе данных ДНК-метабаркодинга по 18S рРНК перед нами встала проблема определения порога генетического расстояния между видами внутри рода. Для 16S рибосомальной РНК (маркер бактериальных сообществ) таким расстоянием выбрано 3 % (0.03) несовпадающих нуклеотидов между сравниваемыми последовательностями (Petrosino et al., 2009; Kurilkina et al., 2016). Некоторые исследователи при анализе эукариотических сообществ на основе 18S рРНК тоже используют меру в 3 % (0.03) замен для разделения ОТЕ видового уровня (Yi et al., 2017). Если для микроразнообразия это в какой-то степени оправданно (в силу высокой скорости эволюции из-за быстрой смены поколений), то для многоклеточных организмов такая мера не может быть применена для разделения видов, поскольку для них 18S рРНК считается одним из медленно эволюционирующих маркеров (Anne, 2006). Проведенный нами анализ литературных данных показал, что для многоклеточных водорослей порог дистанций, соответствующий 3 % несовпадающих нуклеотидов, разделяет не только виды, но и различные роды, а также семейства (Chen et al., 2012; Романова и др., 2013; Sherwood et al., 2014; Taylor, Cunliffe, 2014). Если бы для выделения ОТЕ был использован порог в 3 %, то все выделенные виды образовали бы один кластер, соответствующий таксонам высокого ранга, и изучение видового разнообразия в этой группе организмов стало бы невозможным. Более детальный анализ опубликованной информации (Chen et al., 2012; Романова и др., 2013; Sherwood et al., 2014; Taylor, Cunliffe, 2014) позволил нам выбрать порог в 1 % (0.01) замен для разделения разных видов внутри одного рода и использовать его в нашем исследовании.

В ходе исследования установлено, что при наличии от 3400 до 6610 прочтений фрагмента 18S рРНК на каждую пробу явно недооценено видовое разнообразие эукариотических организмов, ассоциированных с бентосными водорослями. В смеси ДНК, состоящей из макро- и микроорганизмов, многоклеточные виды (водоросли) составили основную пул прочтений. В каждой пробе на многоклеточные водоросли приходится от 91 до 99 % всех прочтений 18S рРНК. В этом случае мы адекватно оцениваем видовое разнообразие макроорганизмов – водорослей – и теряем большую часть разнообразия ассоциированных

с ними эукариотических организмов. В методических работах по изучению сообществ бактерий на основе ДНК-метабаркодинга по 16S рРНК маркеру (Bukin et al., 2019) приводится цифра в 10000 конечных, фильтрованных по качеству, прочтений на пробу для адекватной оценки видового разнообразия микроорганизмов. Учитывая это, для оценки видового разнообразия минорной компоненты сообщества эукариотических организмов, ассоциированных с водорослями, необходимо увеличить количество прочтений на пробу в 50 раз и более. Тогда на минорную компоненту будет приходиться приблизительно 10000 расшифрованных последовательностей ДНК. В совокупности потребуется несколько сотен тысяч прочтений на пробу. При современном уровне развития NGS секвенирования это вполне посильная задача. Другой способ, позволяющий получить 10000 прочтений на минорную составляющую сообщества, – это предварительное механическое разделение пробы на две части – водорослевую компоненту и компоненту ассоциированных с водорослями организмов. В таком случае ДНК выделенных компонент должна расшифровываться по отдельности в разных запусках секвенирования.

Следует также обратить внимание на то, что при ДНК-метабаркодинге могут возникать искажения из-за разной специфичности используемых универсальных праймеров к разным таксонам, входящим в состав природных образцов. В результате при ПЦР будут возникать искажения, меняющие изначальное соотношение концентраций ДНК таксонов в пробе по сравнению с ее конечным продуктом. Снизить этот эффект можно путем проведения меньшего количества циклов ПЦР при подготовке образца для секвенирования, а также использованием в исследовании одних и тех же наборов реактивов и стандартизацией методики пробоотбора. Другое важное замечание относится к методологии статистического анализа, которая обязательно должна содержать стадию нормировки данных. Для этого можно перевести количество прочтений на таксон в пробе в долю прочтений, приходящихся на него в пробе, либо нормировать весь массив данных (как сделано в нашей работе) к среднему количеству прочтений на пробу. Такая нормировка, несмотря на искажения, связанные с ПЦР, позволит при использовании методов многомерной статистики (кластеризации и т. п.) определить тренд изменений в концентрации ДНК какого-либо таксона в разных сравниваемых природных образцах.

Заключение

Для исследования таксономической структуры водорослевых сообществ и ассоциированных с водорослями эукариотических организмов был применен метод ДНК-метабаркодинга на основе фрагмента гена 18S рРНК, позволивший получить статистически репрезентативные результаты. Метабаркодинг показал, что в литорали залива Лиственничный в сообществе водорослей стал доминировать один из видов рода *Spirogyra*, что согласуется с результатами морфологической идентификации. ДНК этого вида обнаружена также в пробах фоновой участка оз. Байкал у острова Бол. Ушканый. Метод оказался эффективным для точной таксономической идентификации морфологически сложной группы организмов и позволил

определить представленность в выборках трудно изучаемых таксонов, ассоциированных с водорослями, которые играют важную роль в формировании разнообразия и функционировании сообществ. Для репрезентативной оценки минорной составляющей сообщества – эукариотических организмов, ассоциированных с водорослями, необходимо значительное увеличение размеров выборки расшифрованных последовательностей ДНК.

Список литературы / References

- Бондаренко Н.А., Логачева Н.Ф. Структурные изменения в фитопланктоне прибрежной зоны озера Байкал. *Гидробиол. журн.* 2016;52(6):17-26.
- [Bondarenko N.A., Logacheva N.F. Structural changes in phytoplankton of the littoral zone of Lake Baikal. *Gidrobiologicheskii Zhurnal = Hydrobiological Journal.* 2017;53(2):16-24. DOI 10.1615/Hydrobiol.v53.i2.20.]
- Ижболдина Л.А. Мейо- и макрофитобентос озера Байкал (водоросли). Под ред. А.А. Батраева. Иркутск: Изд-во Иркут гос. ун-та, 1990.
- [Izhboldina L.A. Meio- and Macrophytobenthos of Lake Baikal (algae). Irkutsk: Irkutsk State Univ. Publ. House, 1990. (in Russian)]
- Ижболдина Л.А. Атлас и определитель водорослей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо- и макрофиты) с краткими очерками по их экологии. Новосибирск: Наука-Центр, 2007.
- [Izhboldina L.A. Atlas and Keys to Algae of Benthos and Periphyton of Lake Baikal (meio and macrophytes) with Brief Essays on Their Ecology. Novosibirsk: Nauka-Tsentr Publ., 2007. (in Russian)]
- Ижболдина Л.А., Чепинога В.В., Минчева Е.В. Распределение мейо- и макрофитобентоса в литоральной зоне открытых прибрежных оз. Байкал по данным профилирования 1963–1988 гг. Часть 2. Восточный берег. *Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. «Биология. Экология».* 2017;19:36-57.
- [Izhboldina L.A., Chepinoga V.V., Mincheva E.V. Meio- and macrophytobenthos distribution in the littoral zone along the open coasts of Lake Baikal according to profiling data from 1963–1988. Part 2. Eastern coast. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Ser. Biologiya, Ekologiya = Irkutsk State University Bulletin. Ser. "Biology. Ecology"*. 2017;19:36-57. (in Russian)]
- Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В., Помазкина Г.В., Домышева В.М., Кравченко О.С., Грачев М.А. Нарушение вертикальной зональности зеленых водорослей в прибрежной части залива Лиственничный озера Байкал. *Докл. АН (Общ. биология).* 2012;447(2):227-229.
- [Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Domyшева V.M., Kravchenko O.S., Grachev M.A. Disturbances of the vertical zoning of green algae in the coastal part of the Listvennichnyi gulf of Lake Baikal. *Doklady Biological Sciences.* 2012;447(1):350-352. DOI 10.1134/S0012496612060026.]
- 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; 57(4):445-453. DOI 10.31857/S0016675821040056.
- [Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Nebesnykh I.A., Kupchinskiy A.B., Tupikin A.E., Kabilov M.R. The study of the diversity of hydrobionts from Listvennichny Bay of Lake Baikal by DNA metabarcoding. *Russ. J. Genet.* 2021;57(4):460-467. DOI 10.1134/S1022795421040056.]
- Мейер К.И. Введение во флору водорослей озера Байкал. *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 1930;38:179-396.
- [Meyer K.I. Introduction to the algal flora of Lake Baikal. *Bulleten MOIP. Otdelenie Biol. = Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series.* 1930;38:179-396. (in Russian)]

- Минчева Е.В., Букин Ю.С., Кравцова Л.С., Коваль В.В., Кабилов М.Р., Тупикин А.Е., Щербakov Д.Ю. Исследование водорослево-грибных сообществ в районе Лиственничного залива и острова Большой Ушканий озера Байкал. В: Бычков И.В., Казаков А.Л. (ред.) Актуальные проблемы науки Прибайкалья. Вып. 2. Иркутск, 2017;138-143.
[Mincheva E.V., Bukin Yu.S., Kravtsova L.S., Koval V.V., Kabilov M.R., Tupikin A.E., Shcherbakov D.Yu. Study of algal-fungal communities in Listvennichny Bay and Bol'shoi Ushkaniy island of Lake Baikal. In: Bychkov I.V., Kazakov A.L. (Eds.) Topical Problems in Baikal Region Studies. Iss. 2. Irkutsk, 2017;138-143. (in Russian)]
- Романова Е.В., Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В., Щербakov Д.Ю. Идентификация зеленых нитчатых водорослей из района локального биогеоценного загрязнения озера Байкал (залив Лиственничный) с помощью молекулярного маркера 18S рДНК. *Экол. генетика*. 2013;11(4):23-33. DOI 10.17816/ecogen11423-33.
[Romanova E.V., Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Shcherbakov D.Yu. Identification of filamentous green algae from an area of local biogenic pollution of Lake Baikal (Listvennichny bay) using SSU 18S rDNA molecular marker. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2013;11(4):23-33. DOI 10.17816/ecogen11423-33. (in Russian)]
- Сутурин А.Н., Чебыкин Е.П., Мальник В.В., Ханаев И.В., Минаев А.В., Минаев В.В. Роль антропогенных факторов в развитии экологического стресса в литорали оз. Байкал (акватория пос. Листвянка). *География и природ. ресурсы*. 2016;6:43-54. DOI 10.21782/GIPR0206-1619-2016-6(43-54).
[Suturin A.N., Chebykin E.P., Malnik V.V., Khanaev I.V., Minaev A.V., Minaev V.V. The role of anthropogenic factors in the development of ecological stress in Lake Baikal littoral (the Listvyanka settlement lakescape). *Geografiya i Prirodnye Resursy = Geography and Natural Resources*. 2016;6:43-54. DOI 10.21782/GIPR0206-1619-2016-6(43-54). (in Russian)]
- Тимошкин О.А., Бондаренко Н.А., Волкова Е.А., Томберг И.В., Вишняков В.С., Мальник В.В. Массовое развитие зеленых нитчатых водорослей родов *Spirogyra* Link и *Stigeoclonium* Kutz. (Chlorophyta) в прибрежной зоне Южного Байкала. *Гидробиол. журн*. 2014;50(5):15-26.
[Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Volkova E.A., Tomberg I.V., Vishnyakov V.S., Malnik V.V. Mass development of green filamentous algae of the genera *Spirogyra* and *Stigeoclonium* (Chlorophyta) in the littoral zone of the southern part of Lake Baikal. *Gidrobiologicheskij Zhurnal = Hydrobiological Journal*. 2015;51(1):13-23. DOI 10.1615/HydroBJ.v51.i1.20. (in Russian)]
- Anne C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*. 2006;127(1-3):101-120. DOI 10.1007/s10709-006-9118-1.
- Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., Bukin S.V., Zakharenko A.S., Zemskaya T.I. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci. Data*. 2019;6(1):1-14. DOI 10.1038/sdata.2019.7.
- Bukin Yu.S., Bondarenko N.A., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Bukin S.V., Pogodaeva T.V., Chernitsyna S.M., Shubenkova O.V., Ivanov V.G., Zakharenko A.S., Zemskaya T.I. Interconnection of bacterial and phytoplanktonic communities with hydrochemical parameters from ice and under-ice water in coastal zone of Lake Baikal. *Sci. Rep*. 2020;10(11087):1-12. DOI 10.1038/s41598-020-66519-3.
- Carney L.T., Lane T.W. Parasites in algae mass culture. *Front. Microbiol*. 2014;5:278. DOI 10.3389/fmicb.2014.00278.
- Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*. 1987;43:783-791. DOI 10.2307/2531532.
- Chen C., Barfuss M.H., Pröschold T., Schagerl M. Hidden genetic diversity in the green alga *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *BMC Evol. Biol*. 2012;12:77. DOI 10.1186/1471-2148-12-77.
- Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci*. 2003;14(6):927-930. DOI 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.
- Doyle J.J., Dickson E.E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 1987;36(4):715-722. DOI 10.2307/1221122.
- Hawkins J., de Vere N., Griffith A., Ford C., Allainguillaume J., Hegarty M., Baillie L., Adams-Groom B. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: a new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134735. DOI 10.1371/journal.pone.0134735.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *J. Phycology*. 2001;37(3):443-451. DOI 10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x.
- Khanaev I.V., Kravtsova L.S., Maikova O.O., Bukshuk N.A., Sakirko M.V., Kulakova N.V., Butina T.V., Nebesnukh I.A., Belikov S.I. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: sponge disease and the problem of conservation of diversity. *J. Great Lakes Res*. 2018;44(1):77-85. DOI 10.1016/j.jglr.2017.10.004.
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol*. 2013;79(17):5112-5120. DOI 10.1128/AEM.01043-13.
- Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Rodionova E.V., Domyshva 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;40(2):441-448. DOI 10.1016/j.jglr.2014.02.019.
- Kravtsova L.S., Mizandrontsev I.B., Vorobyova S.S., Izhboldina L.A., Mincheva E.V., Potyomkina T.G., Golobokova L.P., Sakirko M.V., Triboy T.I., Khanaev I.V., Sherbakov D.Yu., Fedotov A.P. Influence of water motion on the spatial distribution of *Spirogyra* in Lake Baikal. *J. Great Lakes Res*. 2020;46(1):29-40. DOI 10.1016/j.jglr.2019.09.004.
- Kurilkina M.I., Zakharova Yu.R., Galachyants Yu.P., Petrova D.P., Bukin Yu.S., Domyshva V.M., Blinov V.V., Likhoshvay Ye.V. Bacterial community composition in the water column of the deepest freshwater Lake Baikal as determined by next-generation sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol*. 2016;92(7):1-19. DOI 10.1093/femsec/fiw094.
- Leray M., Yang J.Y., Mejean C.P., Mills S.C., Agudelo N., Ranwez V., Machida R.J. 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;10(1):1-14. DOI 10.1186/1742-9994-10-34.
- Li W., Zhang T., Tang X., Wang B. Oomycetes and fungi: important parasites on marine algae. *Acta Oceanologica Sinica*. 2010;29(5):74-81. DOI 10.1007/s13131-010-0065-4.
- Ling S.D. Range expansion of a habitat-modifying species leads to loss of taxonomic diversity: a new and impoverished reef state. *Oecologia*. 2008;156(4):883-894. DOI 10.1007/s00442-008-1043-9.
- Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem*. 2009;55(5):856-866. DOI 10.1373/clinchem.2008.107565.
- Powell K.I., Chase J.M., Knight T.M. Invasive plants have scale-dependent effects on diversity by altering species-area relationships. *Science*. 2013;339(6117):316-318. DOI 10.1126/science.1226817.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2012;41(D1):D590-D596. DOI 10.1093/nar/gks1219.
- Raghukumar C. Fungal parasites of the green alga *Chaetomorpha media*. *Infection*. 1987;15:100. DOI 10.1093/infdis/15.1.100.

- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Sahl J.W. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(23):7537-7541. DOI 10.1128/AEM.01541-09.
- Sherwood A.R., Carlile A.L., Neumann J.M., Kocielek J.P., Johansen J.R., Lowe R.L., Presting G.G. The Hawaiian freshwater algae biodiversity survey (2009–2014): systematic and biogeographic trends with an emphasis on the macroalgae. *BMC Ecol.* 2014;14(1): 28. DOI 10.1186/s12898-014-0028-2.
- Smith K.F., Kohli G.S., Murray S.A., Rhodes L.L. Assessment of the metabarcoding approach for community analysis of benthic-epiphytic dinoflagellates using mock communities. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 2017;51(1):555-576. DOI 10.1186/s12898-014-0028-2.
- Taylor J.D., Cunliffe M. High-throughput sequencing reveals neustonic and planktonic microbial eukaryote diversity in coastal waters. *J. Phycol.* 2014;50(5):960-965. DOI 10.1111/jpy.12228.
- 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., Yamamuro M., Pobrezhnaya 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;44(2):230-244. DOI 10.1016/j.jglr.2018.01.008.
- Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M., Moore M.V., Belykh O.I., Malnik V.V., Sakirko M.V., Shirokaya A.A., Bondarenko N.A., Domysheva V.M., Fedorova G.A., Kochetkov A.I., Kuzmin A.V., Lukhnev A.G., Medvezhonkova O.V., Nepokrytykh A.V., Pasyukova E.M., Pobrezhnaya A.E., Potapskaya N.V., Rozhkova N.A., Sheveleva N.G., Tikhonova I.V., Timoshkina E.M., Tomberg I.V., Volkova E.A., Zaitseva E.P., Zvereva Yu.M., Kupchinsky A.B., Bukshuk N.A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *J. Great Lakes Res.* 2016;42(3): 487-497. DOI 10.1016/j.jglr.2016.02.011.
- Yi Z., Berney C., Hartikainen H., Mahamdallie S., Gardner M., Boenigk J., Bass D. High-throughput sequencing of microbial eukaryotes in Lake Baikal reveals ecologically differentiated communities and novel evolutionary radiations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017; 93(8):fix073. DOI 10.1093/femsec/fix073.

ORCID ID

Yu.S. Bukin orcid.org/0000-0002-4534-3846
L.S. Kravtsova orcid.org/0000-0003-0862-4726
T.E. Peretolchina orcid.org/0000-0002-2950-9762
A.P. Fedotov orcid.org/0000-0003-3020-9895

A.E. Tupikin orcid.org/0000-0002-8194-0322
M.R. Kabilov orcid.org/0000-0003-2777-0833
D.Yu. Sherbakov orcid.org/0000-0002-1410-392X
E.V. Mincheva orcid.org/0000-0003-4447-6345

Благодарности. Работа выполнена при поддержке темы бюджетного финансирования ЛИИ СО РАН № 121032300196-8, гранта РФФИ – Иркутская область № 17-44-388071_р, частичной поддержке гранта РФФИ 19-05-00398_а. Авторы выражают благодарность Иркутскому суперкомпьютерному центру СО РАН за предоставление доступа к высокопроизводительному кластеру «Академик В.М. Матросов». Мы благодарим администратора Иркутского суперкомпьютерного центра СО РАН Ивана Сидорова за помощь в проведении вычислений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.07.2021. После доработки 05.10.2021. Принята к публикации 21.10.2021.