

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

Исследование сообществ макробеспозвоночных животных в бухте Большие Коты озера Байкал с использованием ДНК метабаркодинга

Л.С. Кравцова¹✉, Т.Е. Перетолчина¹, Т.И. Трибой¹, И.А. Небесных¹, А.Е. Тупикин², М.Р. Кабилов²

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

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ lk@lin.irk.ru

Аннотация. Приводятся сведения о разнообразии макробеспозвоночных животных, структуре их сообществ в бухте Большие Коты оз. Байкал, полученные методом ДНК метабаркодинга на основе NGS-технологии (Illumina, MiSeq). Для ДНК метабаркодинга макробеспозвоночных был использован внутренний праймер *mCOLintF* в комбинации с *tgHCO2198* для амплификации фолмеровского фрагмента гена *COI*. Всего получено 118009 прочтений фрагмента гена *COI* (длиной не менее 313 п.н.). Показано, что количество прочтений может служить опосредованной характеристикой обилия вида (операционной таксономической единицы – ОТЕ). Корреляция количества прочтений с численностью макробеспозвоночных в пробах до экстракции ДНК по коэффициенту Спирмена составляет 0.6 ($p < 0.05$). Выявлено 115 ОТЕ, принадлежащих высшим таксонам макробеспозвоночных животных: Porifera – 1, Platyhelminthes – 3, Annelida – 38, Arthropoda – 55, Mollusca – 18. На видовом уровне (при гомологии с референсными последовательностями GenBank $\geq 95\%$ и покрытии не менее 90%) зарегистрировано 46 таксонов макробеспозвоночных, формирующих три сообщества: одно – с доминированием моллюсков *Choanomphalus* conf. *maacki* и два – с доминированием хирономид *Orthocladius gregarius* Linev., *Sergentia baicalensis* Tshern. Сообщества характеризуются невысоким видовым разнообразием по Шеннону (от 0.7 до 1.2 бит), высокой концентрацией доминирования по Симпсону (от 0.5 до 0.7) и низкой выравненностью по Пиелу (от 0.3 до 0.4). На долю доминантов и субдоминантов в сообществах приходится от 91 до 96% прочтений фрагмента гена *COI*. На пространственное распределение доминирующих видов сообществ влияют геоморфологические особенности дна в исследуемом районе и состав донных отложений. Предложенный подход для изучения структуры сообществ макробеспозвоночных на основе ДНК метабаркодинга может быть рекомендован для экспресс-оценки состояния водных экосистем при мониторинге.

Ключевые слова: сообщества макробеспозвоночных; разнообразие; ДНК метабаркодинг; *COI*; высокопроизводительное секвенирование; Байкал.

Для цитирования: 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;27(6):694-702. DOI 10.18699/VJGB-23-80

A study of macroinvertebrate communities in Bolshiye Koty Bay of Lake Baikal using DNA metabarcoding

L.S. Kravtsova¹✉, T.E. Peretolchina¹, T.I. Triboy¹, I.A. Nebesnykh¹, A.E. Tupikin², M.R. Kabilov²

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

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ lk@lin.irk.ru

Abstract. The diversity of macroinvertebrates, the structure of their communities in Bolshiye Koty Bay (Lake Baikal) was studied by a DNA metabarcoding approach using an Illumina MiSeq system. Internal primer *mCOLintF* in combination with *tgHCO2198* of the Folmer fragment of the *COI* gene were used for macroinvertebrate metabarcoding. A total of 118009 reads of the *COI* gene fragment (at least 313 bp in length) were obtained. The correlation of the Spearman coefficient ($S = 0.6$, $p < 0.05$) with the abundance of macroinvertebrates in the samples before DNA extraction showed that the number of reads can serve as an indirect characteristic of the abundance of a species (operational taxonomic unit, OTU). 115 OTUs belonging to the higher taxa of macroinvertebrates were identified: Porifera, 1; Platyhelminthes, 3; Annelida, 38; Arthropoda, 55; Mollusca, 18. At a high level of resolution (with homology with GenBank reference sequences $\geq 95\%$, coverage $\geq 90\%$), 46 taxa of macroinvertebrates comprising three communities were registered: one dominated by molluscs (*Choanomphalus* conf. *maacki*) and two dominated by chironomids (*Orthocladius gregarius* Linev., *Sergentia baicalensis* Tshern.). Communities are characterized by low species diversity according to Shannon (from 0.7 to 1.2 bits), high concentration of dominance according to Simpson (from 0.5 to 0.7) and low

evenness according to Pielou (from 0.3 to 0.4). Dominants and subdominants in the communities account for 91 to 96 % of *COI* gene fragment reads. The spatial distribution of the dominant species identified in the communities is influenced by the geomorphological features of the bottom and the composition of sediments in the area studied. The approach proposed for studying the structure of macroinvertebrate communities based on DNA metabarcoding and next generation sequencing can be recommended for express assessment of the state of aquatic ecosystems in the monitoring.

Key words: communities of macroinvertebrates; diversity; DNA metabarcoding; *COI*; high-throughput sequencing technologies; Lake Baikal.

For citation: Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Nebesnykh I.A., Tupikin A.E., Kabilov M.R. A study of macroinvertebrate communities in Bolshiye Koty Bay of Lake Baikal using DNA metabarcoding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):694-702. DOI 10.18699/VJGB-23-80

Введение

Структура сообществ водных организмов, в частности макробеспозвоночных, служит одним из показателей, характеризующих состояние водоемов. Исследования в этом направлении актуальны в связи с глобальным изменением климата и возрастающим антропогенным воздействием на водные экосистемы (O'Reilly et al., 2003; Bonada et al., 2007; Burgmer et al., 2007; Moss et al., 2011; Hampton et al., 2018).

Сообщества организмов представляют собой совокупность популяций разных видов, сосуществующих в пространстве и времени (Бигон и др., 1989). Структура их формируется под влиянием как абиотических факторов среды (Brauns et al., 2007; McGoff et al., 2013; Rezende et al., 2014; Worrall et al., 2014), так и биотических взаимодействий (van den Berg et al., 1997; Arbačiauskas et al., 2008; Nalera et al., 2009). Базовыми характеристиками структуры сообществ, как правило, являются видовое разнообразие и обилие организмов. Исследование разнообразия организмов на высоком уровне разрешения – видовом, обычно проводится с привлечением большого числа специалистов-морфологов и сопряжено с трудоемким процессом идентификации таксонов. В настоящее время альтернативой классическим методам изучения таксономического разнообразия водных экосистем служат молекулярно-генетические – ДНК метабаркодинг с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования. Этот метод широко применяется для оценки разнообразия как морской, так и пресноводной фауны (Porazinska et al., 2009; Hajibabaei et al., 2011; Aylagas et al., 2014; Elbrecht et al., 2017; Haenel et al., 2017; Kuntke et al., 2020).

В начале 2000-х гг. митохондриальный ген *COI* был принят в качестве стандарта для ДНК баркодинга таксонов животных (Hebert et al., 2003) благодаря широкому применению универсальных праймеров (*LCOI490* и *HCO2198*) для амплификации фрагмента *M1–M6* (Folmer et al., 1994). Тем не менее в отдельных случаях для получения более четкого филогенетического сигнала используют другие переменные участки гена *COI*, например регион *I3–M11* у морских нематод (Derycke et al., 2010). Спустя некоторое время при учете разнообразия Metazoa в водных экосистемах стал популярен мини-баркод фолмеровского фрагмента *COI* с праймерами *mlCOIintF* и *jhHCO2198* (Meusnier et al., 2008; Leray et al., 2013), который оказался также приемлемым для изучения фауны

донных беспозвоночных в Лиственничном заливе озера Байкал (Кравцова и др., 2021).

В последнее десятилетие возрос интерес к использованию ДНК, выделенной из окружающей среды (eDNA), для экспресс-оценки разнообразия населения водной толщи и донных отложений (Yu et al., 2012; Lacoursière-Roussel et al., 2018). Преимущество этого метода заключается в быстром получении результата, так как не требуется предварительной изоляции каких-либо организмов из небольшого объема проб. Однако для исследования разнообразия Metazoa в водоемах он оказался менее эффективным. Показано, что метабаркодирование ДНК тканей беспозвоночных дает более точное представление о локальном разнообразии многоклеточных организмов (99 % прочтений), чем ДНК из окружающей среды (всего 12 %) (Gleason et al., 2021). В настоящей работе мы попытались выяснить возможность применения метода метабаркодинга ДНК из ткани организмов для оценки не только разнообразия макробеспозвоночных животных, но и количественного соотношения видов, формирующих сообщества.

Цель работы – охарактеризовать особенности структурной организации сообществ макробеспозвоночных животных, распространенных в прибрежной зоне открытого Байкала, с использованием ДНК метабаркодинга.

Материалы и методы

Количественные пробы зообентоса были собраны в июле 2019 г. в бухте Большие Коты оз. Байкал на участке протяженностью 1 км вдоль береговой линии (рис. 1).

На трех станциях (№ 1–3) сбор макробеспозвоночных проводили с разных типов донных отложений (см. рис. 1). К первому типу донных отложений относили крупную и мелкую гальку с отдельными валунами, расположенными в субаквальной части пляжа (глубины 0.3–0.4 м). Второй тип донных отложений был представлен валунами, неокатанными обломками пород с щебнем, а третий – заиленным песком. Два последних типа отложений встречались преимущественно на мелководной террасе на глубинах 2–5 м (см. рис. 1). На пляже пробы отбирали вручную, а на мелководной террасе – с помощью водолазов. Для каждого типа донных отложений было собрано по пять количественных проб зообентоса с использованием учетной рамки площадью 0.1 м². Беспозвоночных животных с поверхности камней счищали щеткой в кювету с водой, а из песка разной степени заиленности их извлекали путем флотации в насыщенном растворе сахара с удельным ве-

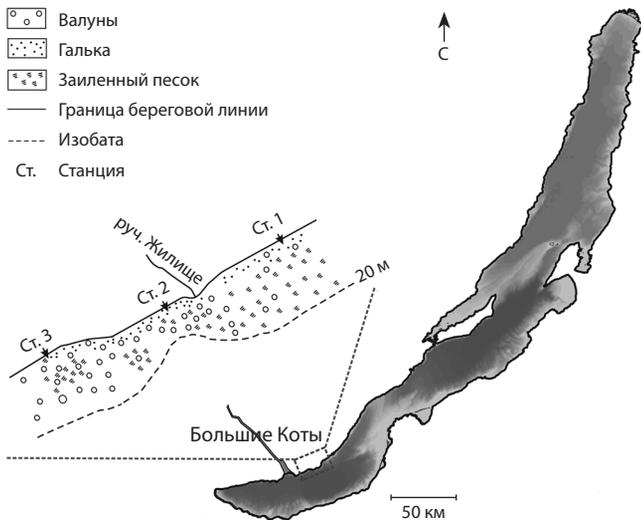


Рис. 1. Карта-схема отбора проб макрозообентоса в бухте Большие Коты оз. Байкал, июль 2019 г.

сом 1.12 г/л. Пробы промывали через сачок из мельничного сита № 23 и фиксировали 96 % этанолом. Всего собрано и разобрано в лабораторных условиях под микроскопом МБС-10 (при 20-кратном увеличении) 15 количественных проб зообентоса.

Согласно (Elbrecht et al., 2017), предварительная сортировка организмов по размерам существенно улучшает результат секвенирования всех таксонов независимо от биомассы организма. Поскольку зообентос в Байкале представлен разными размерными группами: мега-, макро-, мейоорганизмами, то в этой работе мы ограничились лишь одной размерной группой – макробеспозвоночными животными. Размеры их в пробах варьировали от 2 до 50 мм. Для выделения ДНК использовали всех макробеспозвоночных, найденных в пробе. Сначала их вымачивали в течение 1 ч в дистиллированной воде, мелкие организмы (2–3 мм) брали целиком, а от крупных особей (более 5 мм) отрезали кусочки ткани по 2–3 мм, чтобы нивелировать разброс биомассы по размеру. Затем кусочки ткани и небольшие организмы, собранные с одного и того же типа донных отложений, объединяли в одну пробу, помещали в фарфоровую чашку и растирали пестиком с добавлением 2 % раствора СТАВ. ДНК экстрагировали по модифицированной методике (Doyle, Dickson, 1987), используя хлороформ вместо фенол-хлороформ-изоамиловой смеси. Всего для метабаркодинга было подготовлено три пробы геномной ДНК (не менее 20 нг в каждой) беспозвоночных животных.

Для получения ампликонов гена *COI* использовали праймеры *mICOIntF*: GGWACWGGWGTGAACWGTWTAУССYCC (Leray et al., 2013) и *tgHCO2198*: TAIAC YTCIGRTGICRAARAAYCA (Geller et al., 2013), где I – инозин. Амплификацию выполняли 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 Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Литва). ПЦР в режиме реального времени про-

водили на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR system (Bio-Rad, США) по программе: первоначальная денатурация 95 °C – 4 мин; 32 цикла при 95 °C – 30 с, 48 °C – 30 с и 72 °C – 30 с. Температура отжига праймеров подобрана с помощью ПЦР с градиентом. Продукты ПЦР анализировали на системе MCE-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System с использованием набора DNA 12000 Reagent Kit (Shimadzu, Япония). Выделенные ампликоны квантифицировали на флуориметре Qubit 2.0 с набором реактивов Qubit DNA High Sensitivity Assay Kits (Invitrogen, США). ДНК-библиотеки из ампликонов получали с использованием наборов 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 библиотек проводили при помощи набора Kapa SYBR Fast Universal qPCR Kit (KapaBiosystems, США). Секвенирование библиотек осуществляли с набором MiSeq Reagent Standard Kit v3 PE300 на MiSeq (Illumina, США) на базе ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН).

Парные прочтения анализировали с помощью UPARSE скриптов (Edgar, 2013), используя Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010). Биоинформатическая обработка включала перекрытие парных прочтений, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер, а также получение ОТЕ (операционной таксономической единицы). Таксономическую принадлежность последовательностей ОТЕ определяли с использованием алгоритмов SINTAX (Edgar, 2016) и референсной базы MIDORI_UNIQUE_20180221_COI_SINTAX (Machida et al., 2017), а также BLAST. Репрезентативность выборок ОТЕ анализировали в iNEXT 2.0.15 (Hsieh et al., 2016). Нуклеотидные последовательности выявленных ОТЕ были протестированы на наличие стоп-кодонов в программе SeqKit v0.16.1 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>).

Для оценки связи между исходной численностью организмов высших таксонов в пробах (до экстракции ДНК) и количеством прочтений фрагмента гена *COI* рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (S).

Сообщества макробеспозвоночных животных выделяли путем кластеризации ОТЕ видового ранга и принадлежащих на них прочтений фрагмента гена *COI* методом Варда, в качестве меры расстояния использовали евклидову метрику. Доминантов и субдоминантов в сообществах определяли путем ранжирования по убыванию модифицированного (встречаемость ОТЕ в пробах и их относительное обилие = прочтения, %) индекса плотности (Броцкая, Зенкевич, 1939; Константинов, 1986). Сообщества макробеспозвоночных называли по доминирующим видам, имеющим максимальный индекс плотности $\geq 10\%$. Виды с индексом плотности $\leq 10\%$ считали второстепенными. Для характеристики степени сложности структуры сообществ использовали индексы разнообразия Шеннона (H, бит), доминирования по Симпсону (D) и выравненности по Пиелу (e) (Одум, 1986).

Пространственное распределение доминантов и субдоминантов сообществ в бухте Большие Коты анализировали методом главных компонент, где в качестве пе-

ременных служили показатели относительного обилия ОТЕ, состав донных отложений. Данные для расчетов с использованием многомерной статистики предварительно были трансформированы по функции $\log(X+1)$. Расчеты проводили в статистической среде программирования R 3.0.0, пакет *vegan* 2.0-7.

Результаты

В результате высокопроизводительного секвенирования всего получено 118009 прочтений фрагмента гена *COI* (длиной не менее 313 п. н.). Биоинформатический анализ показал, что доля неклассифицированных последовательностей *COI* составила менее 1 % от общего числа (1157). 116852 прочтения приходятся на 115 ОТЕ, относящихся к высшим таксонам макробеспозвоночных животных: Porifera – 1, Platyhelminthes – 3, Annelida – 38, Arthropoda – 55, Mollusca – 18.

Коэффициент корреляции Спирмена (*S*) между численностью макробеспозвоночных высших таксонов (Platyhelminthes, Hirudinea, Polychaeta, Oligochaeta, Isopoda, Amphipoda, Trichoptera, Chironomidae, Bivalvia, Gastropoda), найденных в пробах до экстракции ДНК, и числом прочтений фрагмента гена *COI* составляет 0.6 ($p < 0.05$), что позволяет принять показатели последних за эквивалент относительного обилия организмов.

Идентифицировано 46 таксонов видового и родового ранга при гомологии с последовательностями из GenBank

$\geq 98\%$ и $\geq 95\%$ соответственно, с покрытием не менее 90 % (табл. 1). На них приходится 88 % прочтений фрагмента гена *COI*.

В районе исследования выявлено три сообщества макробеспозвоночных, из них одно – с доминированием моллюсков *Choanomphalus* conf. *maacki* (А), два – с доминированием хирономид *Orthocladius gregarius* Linev. (Б) и *Sergentia baicalensis* Tshern. (В) (рис. 2).

Сообщества характеризуются несложной структурой, в их составе отмечено 15–16 видов (табл. 2). Показатели индекса Шеннона невысоки, колеблются от 0.7 до 1.2 бит. При этом в сообществах наблюдается высокая концентрация доминирования одного вида (*D* варьирует от 0.5 до 0.7) и низкая выравненность (от 0.3 до 0.4).

В сообществе *C.* conf. *maacki* среди субдоминантов встречаются моллюски *Pseudancylastrum sibiricum* (Gerstf.), *Gerstfeldtancylus* conf. *roepstorfi*. В составе сообщества *O. gregarius* к субдоминантам относятся ручейники *Baicalina thamastoides* Mart., хирономиды *Orthocladius* sp. 2, *O. nitidoscutellatus* Lundstr., *Cricotopus fuscus* (Kieff.). В сообществе с доминированием *S. baicalensis* многочисленны полихеты *Manayunkia godlewskii* (Nusb.), моллюски *Choanomphalus* conf. *anomphalus*. На долю доминантов и субдоминантов в сообществах приходится от 91 до 96 % прочтений фрагмента гена *COI*.

Пространственное распределение доминирующих видов сообществ макробеспозвоночных в зависимости от

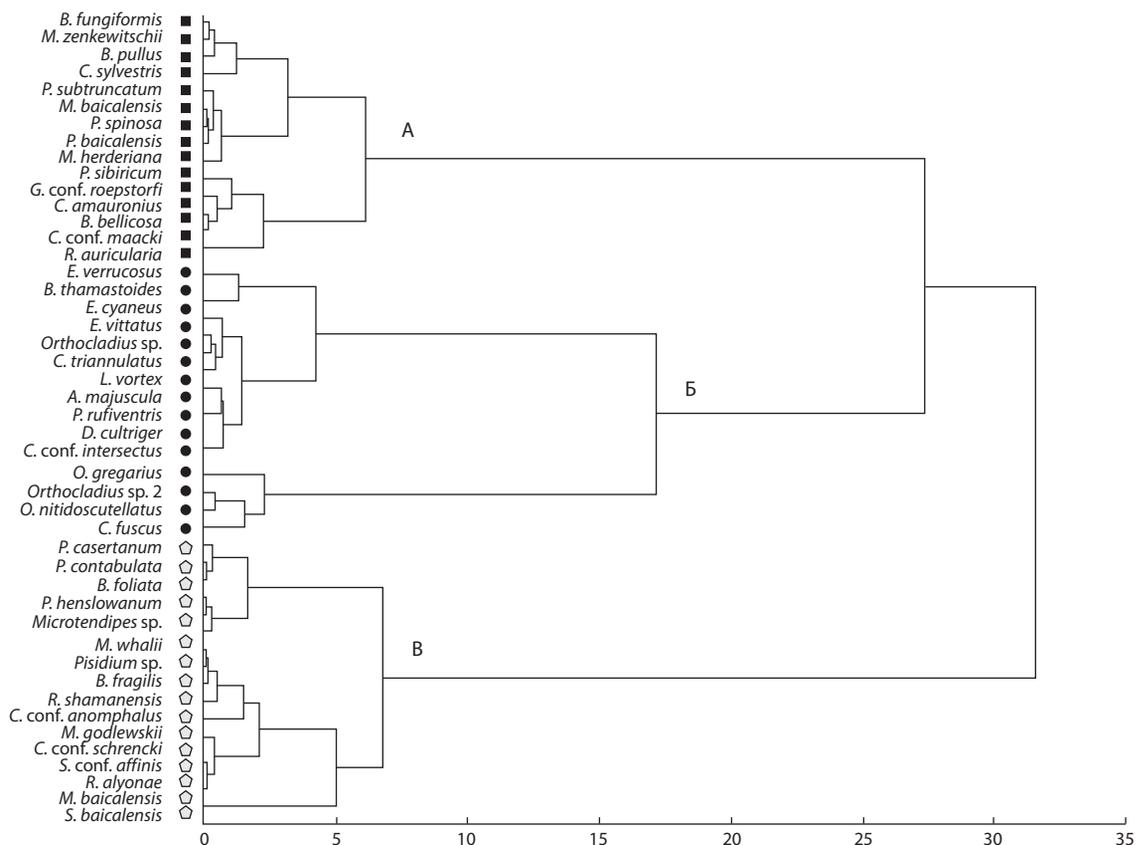


Рис. 2. Дендрограмма ОТЕ макробеспозвоночных животных, построенная методом кластеризации Варда с использованием евклидовой метрики в качестве меры расстояния.

Кластеры А, Б, В – сообщества макробеспозвоночных, выделенные на основе прочтений фрагмента гена *COI*.

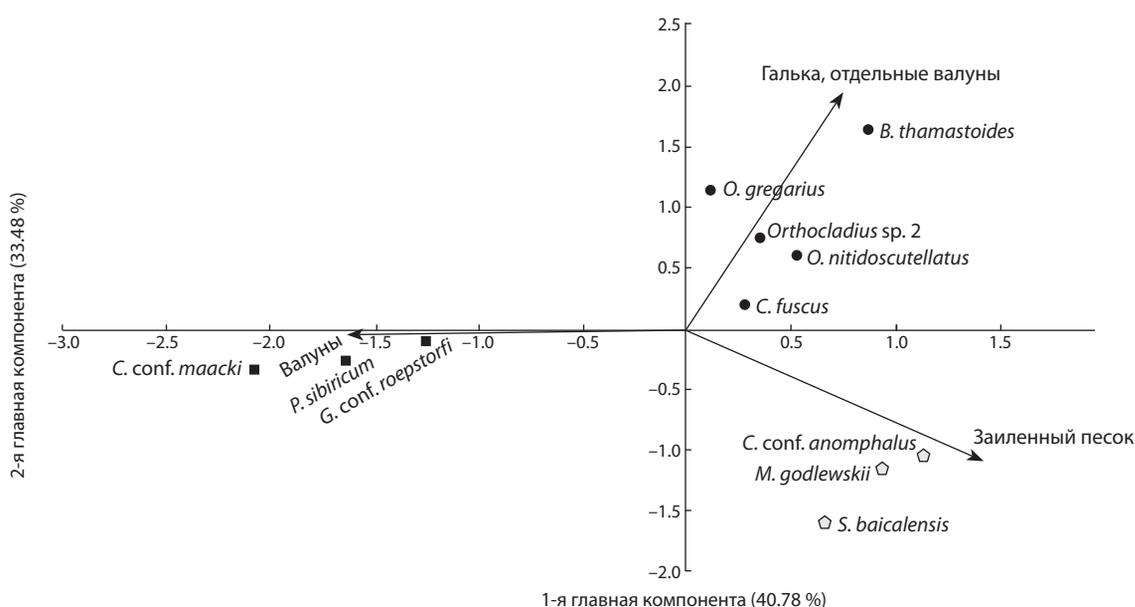
Таблица 1. Состав ОТЕ, имеющих сходство с референсными последовательностями GenBank $\geq 95\%$

Таксон	Вид	Номер референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательностью из GenBank, %
Porifera	<i>Baikalospongia fungiformis</i> Mak.	MH985288	99.7
Polychaeta/Fabriciidae	<i>Manayunkia baicalensis</i> (Nusb.)	MK393734	97.6
	<i>Manayunkia godlewskii</i> (Nusb.)	MK393737	99.3
	<i>Manayunkia zenkewitschii</i> Sit., Shcherb. et Kharch.	KF289863	99.2
Oligochaeta	<i>Rhynchelmis alyonae</i> Mart., Ferrag. et Kayg.	GU328670	98.3
	<i>Rhynchelmis</i> sp.	AJ577632	95.0
Amphipoda	<i>Baikalogammarus pullus</i> (Dyb.)	FJ756303	99.7
	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i> (Dyb.)	MK887720	99.7
	<i>Eulimnogammarus verrucosus</i> (Gerstf.)	MK887569	100.0
	<i>Eulimnogammarus vittatus</i> (Dyb.)	MK887750	99.7
	<i>Linevichella vortex</i> (Dyb.)	MN148355	99.7
	<i>Micruropus whalii</i> (Dyb.)	MN148354	99.7
Diptera/Chironomidae	<i>Microtendipes</i> sp.	LC329125	95.0
	<i>Paratanytarsus baicalensis</i> (Tshern.)	MT020734	99.3
	<i>Sergentia baicalensis</i> Tshern.	AF116586	99.0
	<i>Sergentia</i> conf. <i>affinis</i>	AF116588	96.5
	<i>Cricotopus fuscus</i> (Kieff.)	MN673037	98.6
	<i>Cricotopus</i> conf. <i>intersectus</i>	MN683031	96.9
	<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabr.)	KC250789	100.0
	<i>Cricotopus triannulatus</i> (Macq.)	KJ439943	99.6
	<i>Diplocladius cultriger</i> Kieff.	HQ941599	98.6
	<i>Orthocladius gregarius</i> Linev.	KC879234	100.0
	<i>Orthocladius nitidoscutellatus</i> Lundstr.	MT048130	98.6
	<i>Orthocladius</i> sp.	KT248920	100.0
	<i>Orthocladius</i> sp. 2	KT248920	100.0
	<i>Paratrichocladius rufiventris</i> (Meig.)	HQ941597	99.3
Trichoptera	<i>Apatania majuscula</i> MacLach.	KX103052	99.3
	<i>Baicalina bellicosa</i> Mart.	KR153132	99.7
	<i>Baicalina thamastoides</i> Mart.	KR153144	99.6
	<i>Baicalinella foliata</i> (Mart.)	KR153101	99.7
	<i>Protobaicalina spinosa</i> (Mart.)	KR153124	98.9
Mollusca/Bivalvia	<i>Pisidium casertanum</i> (Poli)	KF483386	99.6
	<i>Pisidium henslowanum</i> (Shepp.)	KF483398	98.9
	<i>Pisidium</i> sp.	KF000182	99.3
	<i>Pisidium</i> sp. 1	KF483372	95.0
Mollusca/Gastropoda	<i>Benedictia fragilis</i> W. Dyb.	KX241839	99.3
	<i>Choanomphalus amauronius</i> Bourg.	Y14721	98.0
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>anomphalus</i>	Y14714	95.4
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>maacki</i>	LC429414	95.3
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>schrencki</i>	Y14713	96.1
	<i>Gerstfeldtiancylus</i> conf. <i>roepstorfi</i>	KR822550	96.2
	<i>Maackia herderiana</i> (Lindh.)	KY697388	99.7
	<i>Megalovalvata baicalensis</i> (Gerstf.)	LC377798	99.7
	<i>Pseudancylastrum sibiricum</i> (Gerstf.)	KR822557	100.0
	<i>Pseudobaikalia contabulata</i> (W. Dyb.)	Z92987	99.7
	<i>Radix auricularia</i> (Linn.)	MH190039	100.0

Таблица 2. Структурные параметры сообществ макробеспозвоночных животных, выявленных в бухте Большие Коты оз. Байкал, июль 2019 г.

Сообщество	Число видов	Доля прочтений доминантов, %	H, бит	D	e	Количество прочтений на сообщество
<i>Orthocladius gregarius</i>	15	96	1.20	0.45	0.44	39941
<i>Choanomphalus conf. maacki</i>	15	93	0.74	0.70	0.28	32573
<i>Sergentia baicalensis</i>	16	91	0.70	0.74	0.25	30118

Примечание. H – видовое разнообразие по Шеннону; D – индекс доминирования по Симпсону; e – индекс выравненности по Пиелу.

**Рис. 3.** Распределение доминирующих видов (ОТЕ) сообществ макробеспозвоночных (А–В) в пространстве двух первых главных компонент, учитывающих 74 % вариабельности массива данных относительного обилия.

факторов среды показано на рис. 3. Первая главная компонента характеризует распространение сообществ в зависимости от состава донных отложений. Доминирующие виды сообществ макробеспозвоночных, встречающиеся на мелкообломочном материале (гальке, зайленном песке), имеют положительные нагрузки на первую главную компоненту, а на грубообломочном (валунах, обломках пород) – отрицательные. Вторая главная компонента характеризует распределение доминантов исследованных сообществ макробеспозвоночных в зависимости от геоморфологии дна. Виды, встречающиеся в зоне пляжа, имеют положительные нагрузки, а на мелководной террасе – отрицательные.

Обсуждение

Исследования Р. Бэйли с коллегами (Bailey et al., 2001) указывают на эффективность мониторинговых наблюдений за состоянием водоемов при использовании таксономии на уровне рода или вида. Метабаркодинг как современный генетический инструмент широко применяется для экспресс-оценки биоразнообразия в экосистемах (Elbrecht, Leese, 2015). Авторы работы рекомендуют использовать метрику «присутствие/отсутствие» для харак-

теристики разнообразия, так как высокая разрешающая способность праймеров позволяет учесть массовые и минорные виды. Однако этот подход не дает возможности измерить абсолютные значения численности или биомассы организмов в пробах, тогда как для изучения структуры сообществ необходимы показатели, характеризующие не только состав таксонов, но и их количественное соотношение. Количество прочтений, по всей видимости, можно отнести к опосредованной характеристике обилия вида (ОТЕ). Это подтверждает наличие положительной корреляции между численностью макробеспозвоночных до экстракции ДНК и представленностью ОТЕ не только в пробах, собранных в оз. Байкал в бухте Большие Коты ($S = 0.6, p < 0.05$), но и в Лиственничном заливе ($S = 0.5$) (Кравцова и др., 2021). Кроме того, отмечена положительная корреляция количества прочтений с биомассой организмов, собранных в прудах Германии (Elbrecht, Leese, 2015). Поэтому при анализе структуры сообществ макробеспозвоночных акцент был сделан на количестве прочтений, приходящихся на ОТЕ, а также на встречаемости ОТЕ в пробах. Чтобы понять, насколько молекулярно-генетический метод и NGS-технология эффективны в исследованиях сообществ макробеспозвоночных, для

сравнения был использован тот же подход, что и при изучении экологии водоемов на основе классических гидробиологических методов (Броцкая, Зенкевич, 1939; Константинов, 1986; Бигон и др., 1989).

Фауна макробеспозвоночных животных на мелководной террасе и в подводной части пляжа в бухте Большие Коты (без учета населения подводного склона и каньона) довольно разнообразна. В 1988 г. в ее составе было отмечено не менее 177 видов (Кравцова и др., 2003). Большинство видов, найденных с помощью ДНК метабаркодирования в 2019 г., встречались здесь ранее, но в целом разнообразие донной фауны (см. табл. 1), выявленное с помощью молекулярно-генетических методов, ниже. Это можно объяснить, с одной стороны, меньшим объемом собранных количественных проб макрозообентоса, а с другой – отсутствием в GenBank последовательностей *COI* богатых видами байкальских групп, например олигохет. В Байкале отмечено 202 вида олигохет, среди них 165 – эндемики (Семерной, 2004). Возможно, представленность в GenBank последовательностей *COI* этой группы беспозвоночных невелика в связи со слабой изученностью фауны из-за высокого ее эндемизма. Всего на Annelida приходится около 30 % от общего количества ОТЕ, идентифицированных с помощью ДНК метабаркодирования как из бухты Большие Коты, так и из Лиственничного залива оз. Байкал (Кравцова и др., 2021).

Небогатые видами многощетинковые черви Polychaeta также входят в состав Annelida, но ранее они не были указаны в списке таксонов из бухты Большие Коты (Кравцова и др., 2003), так как определение их по морфологии не проводилось. Тем не менее с помощью ДНК метабаркодирования в 2019 г. в составе фауны здесь были найдены с высокой гомологией (98–99 %) с последовательностями из GenBank (см. табл. 1) все три вида полихет, встречающиеся в Байкале (Пудовкина и др., 2014): *Manayunkia baicalensis* (Nusb.), *M. godlewskii*, *M. zenkewitschii* Sit., Shcherb. et Kharch.

Хирономиды (Diptera) относятся к объектам, у которых идентифицировать виды по морфологическим признакам личинок крайне сложно, часто их определяют до группы видов (gr.) или species (sp.). Не исключено, что *O. gregarius* – доминант одного из трех выявленных в 2019 г. сообществ, ранее значился в списке таксонов из бухты Большие Коты как *O. gr. thienemanni*, а субдоминант *O. nitidoscutellatus* был в составе *O. gr. olivaceus* (Кравцова и др., 2003). Хотя эти виды и встречались в бухте Большие Коты в 1988 г., они не играли сообществообразующую роль среди других макробеспозвоночных (Kravtsova et al., 2004). Виды *O. gregarius* и *O. nitidoscutellatus*, как показали дальнейшие молекулярно-генетические исследования (Kravtsova et al., 2014), имеют длительную эволюционную историю, и их существование в Байкале не вызывает сомнения (Макаренко Е.А., Макаренко М.А., 2008).

Невысокое разнообразие ОТЕ видового ранга свидетельствует о том, что сообщества макробеспозвоночных с доминированием *C. conf. maacki*, *O. gregarius* и *S. baicalensis* в бухте Большие Коты характеризуются несложной структурой (см. табл. 2) в связи с указанными выше причинами.

Известно, что абиотические факторы среды играют важную роль в распространении и формировании разнообразия сообществ макробеспозвоночных (Rezende et al., 2014). Пространственное распределение доминантов и субдоминантов сообществ макробеспозвоночных из бухты Большие Коты согласуется с особенностями распространения этих видов в прибрежной зоне Байкала. Так, сообщество с доминированием *C. conf. maacki* приурочено, как и ранее, к каменистым донным отложениям мелководной террасы. Сообщество *O. gregarius* распространено на гальке с отдельными валунами в зоне пляжа, а с доминированием *S. baicalensis* – на заиленных песках мелководной террасы, характерном биотопе для этого вида. В Байкале представители рода *Orthocladius* предпочитают селиться в гидродинамически активной зоне волнового перемешивания и водного потока, а *Sergentia* – в условиях, где седиментационные процессы преобладают над размывом и переносом терригенного материала, органического вещества.

Исследование структуры сообществ макробеспозвоночных в водных экосистемах с использованием ДНК метабаркодирования имеет свои особенности, в отличие от экспресс-оценки разнообразия фауны (на основе метрики «присутствие/отсутствие»). В первую очередь необходимо обратить внимание на степень изученности разнообразия донной фауны водоема, размерные группы ее представителей. Немаловажное значение для оценки разнообразия имеет наличие последовательностей изучаемого фрагмента гена в базе данных GenBank и др. Для получения адекватной характеристики относительного обилия (прочтений фрагмента гена *COI*) организмов в сообществе отбор количественных проб макрозообентоса должен производиться с определенной площади с учетом биотопической неоднородности дна. Во избежание влияния размеров тела организмов на количество прочтений, входящих на ОТЕ, при подготовке проб для выделения ДНК необходимо отбирать одинаковые по величине кусочки ткани от всех особей, найденных в количественных пробах. Это дает возможность получить интегральную характеристику относительного обилия организма (количество прочтений), учитывающую его нивелированную по разбросу (из-за размеров тела) биомассу, а также численность. Поскольку макробеспозвоночные животные составляют третью часть от представителей уникальной фауны Байкала (2565 видов и подвидов (Timoshkin, 1997)), то для объективной оценки α -разнообразия требуется создание более полной базы данных референсных последовательностей *COI*.

Закключение

ДНК метабаркодирование с комбинацией праймеров *mICOIntF* и *jgHCO2198* для амплификации фрагмента гена *COI* показал свою эффективность в исследованиях разнообразия и структуры сообществ байкальских макробеспозвоночных. В составе фауны бухты Большие Коты найдены типичные представители большинства групп макробеспозвоночных, населяющие прибрежную зону озера Байкал. Показано, что количество прочтений как характеристика относительного обилия таксонов может быть рекомендо-

вано для анализа особенностей структурной организации сообществ макробеспозвоночных. В целом предложенный подход приемлем для оценки стабильности сообществ макробеспозвоночных во временном аспекте при мониторинге водных экосистем.

Список литературы / References

- Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. М.: Мир, 1989.
[Begon M., Harper J., Townsend K. Ecology: From Individuals to Ecosystems. Malden, MA: Blackwell Publishing, 1986. (Russ. ed.: Begon M., Harper J., Taunsend K. Ekologiya. Moscow: Mir Publ., 1989)]
- Броцкая В.А., Зенкевич Л.А. Количественный учет донной фауны Баренцева моря. *Труды Всерос. науч.-исслед. ин-та рыб. хоз-ва и океанографии*. 1939;4:5-98.
[Brotskaya V.A., Zenkevich L.A. Quantitative accounting of the benthic fauna of the Barents Sea. *Proceedings of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography*. 1939;4:5-98. (in Russian)]
- Константинов А.С. Общая гидробиология. М., 1986.
[Konstantinov A.S. General Hydrobiology. Moscow, 1986. (in Russian)]
- Кравцова Л.С., Карабанов Е.Б., Камалтынов Р.М., Механикова И.В., Ситникова Т.Я., Рожкова Н.А., Слугина З.В., Ижболдина Л.А., Вейнберг И.В., Акиншина Т.В., Кривоновов С.К., Щербаков Д.Ю. Макрозообентос субаквальных ландшафтов мелководной зоны Южного Байкала. I. Локальное разнообразие донного населения и особенности его пространственного распределения. *Зоол. журн.* 2003;82(3):307-317.
[Kravtsova L.S., Karabanov E.B., Kamaltynov R.M., Mekhanikova I.V., Sitnikova T.Ya., Rozhkova N.A., Slugina Z.V., Izhboldina L.A., Weinberg I.V., Akinshina T.V., Krivonogov S.K., Shcherbakov D.Yu. Macrozoobenthos of subaqueous landscapes in the shoal of southern Lake Baikal: 1. Local diversity of bottom populations and features of their spatial distribution. *Zoologicheskii Zhurnal = Zoological Journal*. 2003;82(3):307-317. (in Russian)]
- Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Трибой Т.И., Небесных И.А., Купчинский А.Б., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р. Исследование разнообразия гидробионтов>Listvenничного 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/S1022795421040050.]
- Макарченко Е.А., Макарченко М.А. Новые находки хирономид (Diptera, Chironomidae, Orthocladiinae) на Дальнем Востоке и сопредельных территориях. III. *Orthocladius van der Wulp*. *Евразийский энтомолог. журн.* 2008;7(3):243-262.
[Makarchenko E.A., Makarchenko M.A. New findings of chironomids (Diptera, Chironomidae, Orthocladiinae) in Far East and bordering territories. III. *Orthocladius van der Wulp*. *Evroziatskii Entomologicheskii Zhurnal = Euroasian Entomological Journal*. 2008; 7(2):243-262. (in Russian)]
- Одум Ю. Экология. М., 1986.
[Odum Yu. Basic Ecology. Philadelphia–New York–Chicago–San Francisco–Montreal–Toronto–London–Sydney–Tokyo–Mexico City–Rio de Janeiro–Madrid: Saunders College Publ., 1983. (Russ. ed.: Odum Yu. Ekologiya. Moscow, 1986)]
- Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Матвеев А.Н., Щербаков Д.Ю. Родственные связи байкальских полихет рода *Manayunkia* [Polychaeta: Sedentaria: Sabellidae] по данным анализа CO1 с анализом истории расселения. *Экол. генетика*. 2014;12(3):32-42.
[Pudovkina T.A., Sitnikova T.Y., Matveyev A.N., Shcherbakov D.Y. Kindred relations of Baikal polychaete of the *Manayunkia* genus [Polychaeta: Sedentaria: Sabellidae] according to CO1 and settlement history analysis. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(2):129-137. DOI 10.1134/S207905971602009X.]
- Семерной В.П. Олигохеты озера Байкал. Новосибирск: Наука, 2004.
[Semernoy V.P. Oligochaeta of Lake Baikal. Novosibirsk: Nauka Publ., 2004. (in Russian)]
- Arbačiauskas K., Semenchenko V., Grabovski M., Leuven R., Pounović M., Son M., Csanyi B., Gumuliauskaitė S., Konopacka A., Nehring S., van der Velde G., Vezhnovetz V., Panov V. Assessment of biocontamination of benthic macroinvertebrate communities in European inland waterways. *Aquat. Invasions*. 2008;3(2):211-230. DOI 10.3391/ai.2008.3.2.12.
- Aylagas E., Borja A., Rodríguez-Ezpeleta N. Environmental status assessment using DNA metabarcoding: towards a genetics based marine biotic index (gAMBI). *PLoS One*. 2014;9(3):e90529. DOI 10.1371/journal.pone.0090529.
- Bailey R.C., Norris R.H., Reynoldson T.B. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *J. North Am. Benthol. Soc.* 2001;20(2):280-286. DOI 10.2307/1468322.
- Bonada N., Dolédec S., Statzner B. Taxonomic and biological trait differences of stream macroinvertebrate communities between mediterranean and temperate regions: implications for future climatic scenarios. *Glob. Chang. Biol.* 2007;13(8):1658-1671. DOI 10.1111/j.1365-2486.2007.01375.x.
- Brauns M., Garcia X.-F., Pusch M.T., Walz N. Eulittoral macroinvertebrate communities of lowland lakes: discrimination among trophic states. *Freshw. Biol.* 2007;52(6):1022-1032. DOI 10.1111/j.1365-2427.2007.01.
- Burgmer T., Hillebrand H., Pfenninger M. Effects of climate-driven temperature changes on the diversity of freshwater macroinvertebrates. *Oecologia*. 2007;151(1):93-103. DOI 10.1007/s00442-006-0542-9.
- Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A., Backeljau T., Moens T. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS One*. 2010;5(10):e13716. DOI 10.1371/journal.pone.0013716.
- 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.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2460-2461. DOI 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*. 2013;10(10):996-998. DOI 10.1038/nmeth.2604.
- Edgar R.C. SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv*. 2016. DOI 10.1101/074161.
- 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;10(7):e0130324. DOI 10.1371/journal.pone.0130324.
- Elbrecht V., Vamos E.E., Meissner K., Aroviita J., Leese F. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods Ecol. Evol.* 2017;8(10):1265-1275. DOI 10.1111/2041-210X.12789.
- Folmer O., Hoeh W.R., Black M.B., Vrijenhoek R.C. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994;3(5):294-299.
- Geller J., Meyer C., Parker M., Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 2013;13(5):851-861. DOI 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;30(13):3239-3251. DOI 10.1111/mec.15597.
- Haanel Q., Holovachov O., Jondelius U., Sundberg P., Bourlat S.J. NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal

- eukaryotes in shell sand from Hällö island, Smögen, and soft mud from Gullmar Fjord, Sweden. *Biodivers. Data J.* 2017;5:e12731. DOI 10.3897/BDJ.5.e12731.
- Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X., Singer G.A.C., Baird D.J. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One.* 2011; 6(4):e17497. DOI 10.1371/journal.pone.0017497.
- Hampton S.E., McGowan S., Ozersky T., Virdis S.G.P., Vu T.T., Spanbauer T.L., Kraemer B.M., Swann G., Mackay A.W., Powers S.M., Meyer M.F., Labou S.G., O'Reilly C.M., DiCarlo M., Galloway A.W.E., Fritz S.C. Recent ecological change in ancient lakes. *Limnol. Oceanogr.* 2018;63(5):2277-2304. DOI 10.1002/lno.10938.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 2003;270(1512): 313-321. DOI 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;7(12):1451-1456. DOI 10.1111/2041-210X.12613.
- Kravtsova L.S., Kamal'tynov R.M., Karabanov E.B., Mekhanikova I.V., Sitnikova T.Ya., Rozhkova N.F., Slugina Z.V., Izhboldina L.A., Weinberg I.V., Akinshina T.V., Sherbakov D.Yu. Macrozoobenthic communities of underwater landscapes in the shallow-water zone of southern Lake Baikal. *Hydrobiol.* 2004;522:193-205. DOI 10.1023/B:HYDR.0000029979.68265.3e.
- Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Sherbakov D.Y. The evolutionary history of two species of Orthocladinae (Diptera: Chironomidae) from Lake Baikal (Eastern Siberia). *Aquat. Insects.* 2014;36(3-4):171-185. DOI 10.1080/01650424.2015.1062111.
- Kuntke F., de Jonge N., Hesseløe M., Nielsen J.L. Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates. *Ecol. Indic.* 2020; 111:105982. DOI 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;8(16):7763-7777. DOI 10.1002/ece3.4213.
- Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P., Mills S.C., Agudelo N., Ranwez V., Boehm J.T., 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):34. DOI 10.1186/1742-9994-10-34.
- 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;4(1):170027. DOI 10.1038/sdata.2017.27.
- McGoff E., Aroviita J., Pilotto F., Miler O., Solimini A.G., Porst G., Jurca T., Donohue L., Sandin L. Assessing the relationship between the Lake Habitat Survey and littoral macroinvertebrate communities in European lakes. *Ecol. Indic.* 2013;25:205-214. DOI 10.1016/j.ecolind.2012.09.018.
- Meusnier I., Singer G.A.C., Landry J.-F., Hickey D.A., Hebert P.D.N., Hajibabaei M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics.* 2008;9(1):214. DOI 10.1186/1471-2164-9-214.
- Moss B., Kosten S., Meerhoff M., Battarbee R.W., Jeppesen E., Mazzeo N., Havens K., Lacerot G., Liu Z., de Meester L., Paerl H., Scheffer M. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters.* 2011;1(2):101-105. DOI 10.5268/IW-1.2.359.
- Nalepa T.F., Fanslow D.L., Lang G.A. Transformation of the offshore benthic community in Lake Michigan: recent shift from the native amphipod *Diporeia* spp. to the invasive mussel *Dreissena rostriformis bugensis*. *Freshw. Biol.* 2009;54(3):466-479. DOI 10.1111/j.1365-2427.2008.02123.x.
- 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(6950):766-768. DOI 10.1038/nature01833.
- Porazinska D.L., Giblin-Davis R.M., Faller L., Farmerie W., Kanzaki N., Morris K., Powers T.O., Tucker A.E., Sung W.A.Y., Thomas W.K. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Mol. Ecol. Resour.* 2009;9(6):1439-1450. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02611.x.
- Rezende R.S., Santos A.M., Henke-Oliveira C., Gonçalves J.F., Jr. Effects of spatial and environmental factors on benthic macroinvertebrate community. *Zoologia.* 2014;31(5):426-434. DOI 10.1590/S1984-46702014005000001.
- Timoshkin O.A. Biodiversity of Baikal fauna: state-of-the-art (Preliminary analysis). In: New Scope on Boreal Ecosystems in East Siberia. Proc. of the Intern. Workshop, Kyoto, Japan, 23-25 Nov. 1994. Novosibirsk: Russ. Acad. Sci. Publ. Siberian Branch, 1997; 35-76.
- van den Berg M.S., Coops H., Noordhuis R., van Schie J., Simons J. Macroinvertebrate communities in relation to submerged vegetation in two Chara-dominated lakes. *Hydrobiologia.* 1997;342:143-150. DOI 10.1023/A:1017094013491.
- Worrall T.P., Dunbar M.J., Extence C.A., Laize C.L.R., Monk W.A., Wood P.J. The identification of hydrological indices for the characterization of macroinvertebrate community response to flow regime variability. *Hydrol. Sci. J.* 2014;59(3-4):645-658. DOI 10.1080/02626667.2013.825722.
- 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(4):613-623. DOI 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x.

ORCID ID

L.S. Kravtsova orcid.org/0000-0003-0862-4726
T.E. Peretolchina orcid.org/0000-0002-2950-9762
T.I. Triboy orcid.org/0000-0002-4830-0155
I.A. Nebesnykh orcid.org/0000-0001-5961-0514
A.E. Tupikin orcid.org/0000-0002-8194-0322
M.R. Kabilov orcid.org/0000-0003-2777-0833

Благодарности. Работа выполнена по проекту Российского фонда фундаментальных исследований № 19-05-00398. а. Сбор и разбор проб частично проведены в рамках ГЗ № 121032300196-8, биоинформатический анализ частично выполнен в рамках ГЗ № 121031300042-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.02.2023. После доработки 16.05.2023. Принята к публикации 16.05.2023.