



ДНК ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ: ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ, СОВРЕМЕННЫЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© Д.В. Пинахина¹, Е.М. Чекунова²

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Пинахина Д.В., Чекунова Е.М. ДНК окружающей среды: история изучения, современные и перспективные направления в фундаментальных и прикладных исследованиях // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 4. — С. 493–509. <https://doi.org/10.17816/ecogen25900>.

Поступила: 01.04.2020

Одобрена: 27.10.2020

Принята: 23.12.2020

✿ Статья посвящена сравнительно молодому и активно развивающемуся подходу в исследовании биоразнообразия — анализу ДНК окружающей среды (environmental DNA — eDNA). В ней изложены современные представления о природе eDNA, краткая история ее изучения, охарактеризованы основные методы анализа. Описаны основные направления современных исследований, использующих методы eDNA, и перспективы их использования для изучения биоразнообразия. Обсуждаются достоинства, недостатки и ключевые проблемы в развитии этого подхода.

✿ **Ключевые слова:** ДНК окружающей среды; метагеномика; биоразнообразие; биологический мониторинг; природоохранная биология; палеоэкология; палеогенетика.

ENVIRONMENTAL DNA: HISTORY OF STUDIES, CURRENT AND PERSPECTIVE APPLICATIONS IN FUNDAMENTAL AND APPLIED RESEARCH

© D.V. Pinakhina¹, E.M. Chekunova²

¹Russian ITMO University, Saint Petersburg, Russia;

²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Pinakhina DV, Chekunova EM. Environmental DNA: history of studies, current and perspective applications in fundamental and applied research. *Ecological genetics*. 2020;18(4):493-509. <https://doi.org/10.17816/ecogen25900>.

Received: 01.04.2020

Revised: 27.10.2020

Accepted: 23.12.2020

✿ This review article is dedicated to a relatively young, actively developing approach to biodiversity assessment — analysis of environmental DNA (or eDNA). Current views on the nature of eDNA, a brief overview of the history of this approach and methods of eDNA analysis are presented. Major research directions, utilizing eDNA techniques, and perspectives of their application to the study of biodiversity are described. Key issues in development of eDNA approach, its advantages and drawbacks are outlined.

✿ **Keywords:** environmental DNA; metagenomics; biodiversity; biological monitoring; conservation biology; paleoecology; paleogenetics.

ВВЕДЕНИЕ

Одно из активно развивающихся направлений, которое по прогнозам ряда авторов [1] может привести к революционным изменениям в изучении биоразнообразия, — исследование ДНК окружающей среды, или environmental DNA (eDNA).

eDNA — это генетический материал (ядерный, хлоропластный, митохондриальный), выделяемый из проб разнообразных природных субстратов (таких как почвы, осадки, морские и пресные воды) [2]. С середины 2000-х годов темп выхода публикаций, посвященных исследованиям

eDNA, увеличился более чем в 60 раз, и во многом это связано с развитием технологий секвенирования нового поколения, которые используют в подобных исследованиях [3].

ПРИРОДА ДНК ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Несмотря на активное развитие и интерес к eDNA, происхождение генетического материала, изучаемого с их помощью, остается недостаточно изученным [4]. К наиболее распространенным путям поступления eDNA в окружающую среду относят естественную десквамацию кожного эпителия, травматизацию тканей, выделение продуктов обмена и репродуктивных клеток, а также разложение умерших организмов [2]. После этого eDNA может транспортироваться и сохраняться в различных субстратах от нескольких недель в водоемах умеренного пояса [5] до сотен тысяч лет в вечной мерзлоте [6].

Концентрация eDNA в среде и ее сохранность в различных субстратах зависят от ряда как биотических, так и абиотических факторов [7]. Многие авторы отмечают, что объем выделяемого в среду генетического материала коррелирует с биомассой организмов [8, 9]. Он также зависит от их физиологических и экологических особенностей, возраста, стадии жизненного цикла [10]. Множество как полевых [10], так и лабораторных [11, 12] исследований продемонстрировали, что интенсивность выделения eDNA в среду варьирует у разных видов в сходных условиях, даже в пределах одного рода [13]. Воздействие стрессовых факторов также оказывает существенное влияние на темпы выделения eDNA живыми организмами, поскольку вызывает изменение интенсивности метаболизма и развитие иммунных ответов, приводящих к увеличению скорости деления эпителиальных клеток и повышению секреции слизи [7]. Изучение сезонных колебаний концентрации eDNA у ряда представителей рыб, амфибий и рептилий выявило их связь с сезонными изменениями их поведенческой активности [14]. Наиболее часто отмечается усиление сигналов eDNA во время сезона размножения, которое связывают, прежде всего, с выделением в окружающую среду репродуктивных клеток и тканей [15, 16]. По этой причине eDNA может использоваться для уточнения мест и времени размножения представителей различных таксонов.

Абиотические факторы, такие как температура, соленость, кислотность, концентрация кислорода и др., могут влиять на содержание eDNA в среде как косвенно, воздействуя на поведение, физиологию, особенности роста и развития организмов, так и непосредственно, определяя скорость деградации eDNA [7]. Например, M. Seymour с соавт. [17] показали, что количество eDNA в более щелочных условиях может превышать таковое в кислотных на 1–2 порядка, хотя остается неизвестным, обусловлено ли это изменением темпов деградации, либо выделения eDNA в среду. Авторы установили, что в реках eDNA может быстро транспортироваться: сигнал eDNA распространяется на десятки километров от источника, что необходимо учитывать при проведении исследований и интерпретации их результатов. В водной среде eDNA существует сравнительно непродолжительное время (обычно, исчисляемое днями), по сравнению с почвами и льдами, где она может сохраняться годами. По этой причине мониторинг текущего состояния экосистем с использованием eDNA обычно предполагает отбор проб воды, а не других субстратов. На скорость деградации eDNA в осадках и почвах влияют характер и доля глинистых минералов, органических веществ, таких как гуминовые кислоты, и заряженных частиц, которые способны адсорбировать фрагменты eDNA и защищать их от дальнейшего разрушения. Так, например, монтмориллонит может адсорбировать ДНК больше своей собственной массы и защищать ее от ДНКаз [18].

Таким образом, интенсивность eDNA сигнала зависит как от темпов выделения организмами генетического материала, так и от устойчивости eDNA в среде (продолжительности существования фрагментов ДНК после удаления их источника из системы) [5]. Этот показатель связан с плотностью популяции вида, размерами его особей, соотношением между выделяемой в среду и деградируемой ДНК для данного вида и зависит от абиотических факторов, влияющих как на деградацию, так и на транспортировку eDNA. Он варьирует от 15 до 30 дней для пресноводных рыб и амфибий [5, 10, 19, 20], от 0,9 до 7 дней для морских млекопитающих [21], а для рептилий он составляет около 14 дней [22]. В стоячих пресноводных водоемах eDNA сохраняется до 30 дней [20], а в морских

обстановках — в среднем около 7 дней [12, 21]. Размеры фрагментов eDNA также важный фактор, определяющий их устойчивость: фрагменты длиной 300–400 п. о. сохраняются в водной среде в течение недели [23, 24], в то время как более короткие фрагменты (около 100 п. о.) могут сохраняться годами [6, 25].

Вопросы, связанные с влиянием различных как биотических, так и абиотических факторов на устойчивость и процессы миграции eDNA в экосистемах стоят в настоящее время особенно остро. Ответы на них позволят расширить возможности eDNA-технологий не только для надежного диагностирования наличия или отсутствия интересующих таксонов на изучаемой территории, но и для оценки их обилия.

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ СТАНОВЛЕНИЯ eDNA-ПОДХОДА К ИЗУЧЕНИЮ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

eDNA-подход берет свое начало из метагеномики, которая с середины 1980-х годов изучает разнообразие естественных микробных сообществ из проб воды, осадков или почв [26, 27]. Впервые понятие eDNA было использовано в микробиологических исследованиях морских осадков [26]. В 1990-х годах технологии eDNA применялись для мониторинга цветения фитопланктона [28], но только на рубеже XX–XXI вв. было показано, что методы метагеномики могут быть исключительно эффективны для исследования разнообразия многоклеточных организмов. Первая работа, в которой изучали судьбу ДНК макроорганизма в среде, вышла в 1998 г.; в ней было показано, что ДНК трансгенного табака сохраняется в почве до трех лет [29]. Настоящим толчком к дальнейшему развитию данного направления послужили исследования Е. Willerslev и соавт. [30], которые применили метод eDNA в палеоэкологии для реконструкции древних сообществ. Так, в 1999 г. в двух кернах льда из Северной Гренландии, датированных возрастом 2000 и 4000 лет, с использованием молекулярных методов ими было выделено 57 таксонов грибов, растений, водорослей и протистов.

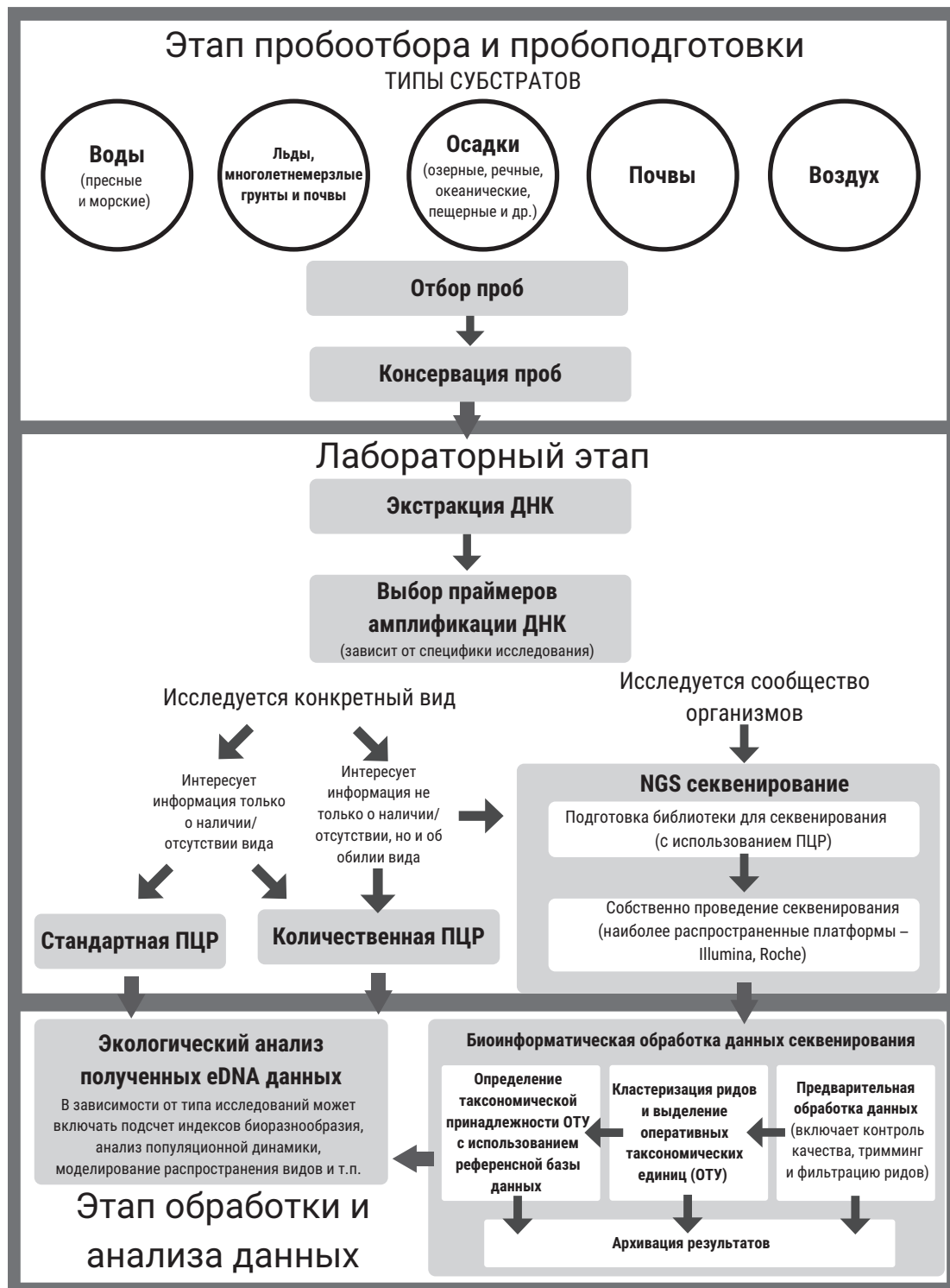
Впервые анализ eDNA многоклеточных организмов в пробах воды был опубликован в 2005 г. [31]. Его проводили для определения источника фекального загрязнения поверхностных

вод (стояла задача определить ДНК людей, коров, свиней и овец). Одной из первых работ, показавших перспективность eDNA-подхода в мониторинге биоразнообразия, стала статья, посвященная детекции инвазивного вида американской бычьей лягушки *Rana catesbeiana* Shaw 1802 в болотах Франции [19]. Она продемонстрировала крайне высокую чувствительность методов eDNA, благодаря которой возможно определять появление инвазивных видов гораздо быстрее, чем традиционными методами, что важно для своевременного сдерживания инвазий. Первым исследованием, в котором eDNA-подход использовали для обнаружения организмов, признанных исчезающими: двух представителей амфибий хвостатых (*Dicamptodon aterrimus*, Cope, 1867) и бесхвостых (*Ascaphus montanus* Nielson, Lohman and Sullivan, 2001), является работа С.С. Goldberg и соавт. [10]. В море eDNA-методы были впервые использованы в 2012 г. для мониторинга морских млекопитающих [21] и оценки разнообразия рыб [12]. К этому же времени относятся первые попытки оценки связи обилия организмов с концентрацией eDNA [5].

К настоящему моменту вышло множество обзорных статей, посвященных различным аспектам eDNA-исследований. Самые ранние подобные работы относятся к 2012 г. [32, 33]. С тех пор были опубликованы обзоры, освещающие подходы к использованию eDNA в природоохранной биологии [2, 19, 34–38], экологии eDNA [4, 7], изучению древней eDNA [39].

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ eDNA

Подход к исследованиям eDNA близок по своей идее к баркодированию ДНК, в котором у животных используют, как правило, последовательность митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*COI*) длиной около 650 п. о. как маркер таксономической принадлежности биологического материала. Фрагменты eDNA обычно короче (около 100 п. о.), и помимо *COI* для их анализа используют последовательности разнообразных генов (обычно это митохондриальные, хлоропластные или гены рибосомальных РНК) [19]. В том случае, когда таксоны неизвестны, целевые последовательности обычно группируются не по реальным таксонам, а по



Экологический анализ полученных eDNA данных

В зависимости от типа исследований может включать подсчет индексов биоразнообразия, анализ популяционной динамики, моделирование распространения видов и т.п.

Этап обработки и анализа данных

Биоинформатическая обработка данных секвенирования

Определение таксономической принадлежности OTU с использованием референсной базы данных

Кластеризация ридов и выделение оперативных таксономических единиц (OTU)

Предварительная обработка данных (включает контроль качества, тримминг и фильтрацию ридов)

↓

Архивация результатов

Рис. 1. Основные общие этапы анализа ДНК окружающей среды

так называемым молекулярным операционным таксономическим единицам (Molecular Operational Taxonomic Units, MOTUs). Последовательность процедур, используемых в исследованиях eDNA, показана на рис. 1. Следует отметить, что перед проведением основного исследования рекоменду-

ется разработка пилотного проекта для определения вероятности детекции целевых таксонов с использованием конкретных протоколов отбора и анализа проб, поскольку множество факторов, в том числе химизм субстрата и температура, оказывают влияние на эту вероятность [40].

В связи с разнообразием субстратов, из которых возможно извлечение eDNA (льды и вечномёрзлые грунты, озерные отложения, почвы, пещерные осадки, воздух и воды из стоячих водоемов, рек, ручьев и океанов), методы отбора проб для исследований eDNA вариативны [39, 41]. Так, в случае отбора проб воды, могут быть использованы различные способы фильтрации, либо осаждение ДНК этанолом [42]. Способ отбора, объем и количество отбираемых проб зависят не только от типа субстрата, но и от специфики интересующих таксонов и гетерогенности среды [37, 41]. Например, в случае отбора проб почв или осадков требуются большие объемы и площадной охват для изучения более крупных организмов, а также отбор проб из большего количества локаций для компенсации их гетерогенности для более достоверного описания биоразнообразия территории [37]. Важным также считается создание негативных контрольных проб, поскольку одна из распространенных проблем eDNA-анализа — контаминация [40]. После отбора пробы консервируются путем заморозки при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, в 100 % этаноле или буфере клеточного лизиса [40, 41].

Этап лабораторных работ зависит в меньшей степени от типа проб и определяется целями исследования. Экстракцию ДНК чаще всего осуществляют с использованием специальных наборов, выбор которых зависит от характера исследования и интересующих таксонов, в ряде случаев наиболее эффективной оказывается классическая фенол-хлороформная экстракция [37, 41].

В настоящее время выделяют два основных типа исследований eDNA: таргетированные (видоспецифичные) и семи-таргетированные (направленные на изучение целых сообществ) [36] (рис. 1). Первый тип предполагает использование протоколов, разработанных для детекции конкретных видов по видоспецифичным фрагментам ДНК в пробах. Как правило, наличие или отсутствие вида определяют с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР), однако в последнее время активно развиваются подходы, в которых используют количественную или цифровую ПЦР, которые позволяют проводить оценку обилия видов. Второй тип исследований eDNA направлен на характеристику целых сообществ. Лабораторные методы в исследованиях такого плана более разнообразны и пред-

полагают использование широкого круга технологий секвенирования нового поколения (включая метабаркодирование и шотган-секвенирование). Их цель — определение видовой принадлежности всех фрагментов ДНК в пробе, успешность которого во многом зависит от качества существующих баз данных. Для макроорганизмов, как правило, они пока неполные, что ограничивает таксономическую разрешающую способность такого анализа. Исследования второго типа многими авторами считаются передовыми в области eDNA и наиболее перспективными для развития междисциплинарных исследований [36].

Одним из наиболее ответственных вопросов, которые необходимо учитывать в дизайне лабораторного этапа исследований eDNA обоих рассмотренных типов является выбор ПЦР-праймеров. В случае метабаркодирования eDNA, для оценки разнообразия сообщества, праймеры должны быть достаточно короткими, чтобы амплифицировать фрагменты деградированной ДНК. Стандартными в баркодировании диагностическими регионами считаются: для животных — митохондриальный ген субъединицы 1 цитохромоксидазы (*COI*), для растений — пластидные гены рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcL*) и матуразы К (*matK*), для грибов — внутренние транскрибируемые спейсеры ядерных генов рибосомальных РНК (ITS) [37]. Необходимо учитывать, что разные праймеры и регионы будут различаться по покрытию, разрешающей способности, сродству к разным таксонам.

В метабаркодировании eDNA наиболее распространенной платформой для секвенирования в последнее время является Illumina [3]. Также начинают применять технологии секвенирования третьего поколения. Ряд авторов показали, в частности, что применение платформы PacBio особенно эффективно, когда для точной таксономической идентификации необходимо использование баркодов более 500 п. о. и разнообразие организмов сравнительно невелико [43]. Другая группа авторов отмечает, что нанопоровое секвенирование может в будущем значительно упростить молекулярную детекцию инвазивных видов в водных экосистемах, и сделать ее более широко доступной [44].

Заключительным этапом исследования eDNA является биоинформатический анализ полученных данных. Для его проведения используются

стандартизированные «пайплайны», настраиваемые для конкретного исследования в зависимости от технологии секвенирования, используемого программного обеспечения и задач исследования. Основные этапы биоинформатического анализа при использовании платформы Illumina для метабаркодирования eDNA обсуждаются, например, в работе [45]. Во многих исследованиях создаются специальные базы данных для метабаркодирования, которые включают только интересующие таксоны и индикаторные последовательности из различных источников, дополненные собственными данными. Так, например, J. Axtner и соавт. [46] разработали базу данных для метабаркодирования тетрапод, включающую разнообразные маркеры — фрагменты генов *16S* рРНК и *12S* рРНК, цитохрома В и COI. Определение таксономического состава пробы проводят путем сравнения молекулярных таксономических единиц или непосредственно ридов после фильтрации качества с референсной базой данных. Предложено множество подходов для осуществления этой процедуры, включая использование программ для выравнивания последовательностей, марковских моделей (JM-MOTU), машинного обучения (TASOA), вероятностного определения таксономической принадлежности (PROTAX) и др. Выбор конкретного метода зависит от используемых маркеров и полноты референсных баз данных. Следует отметить, что если метагеномные исследования микроорганизмов имеют существенно более длительную историю, и уже создано множество программных пакетов и веб-сервисов, позволяющих специалистам даже без существенного опыта работы с компьютером достаточно просто проводить анализ метагеномных данных, то в области eDNA такие проекты только начинают появляться. В качестве примера можно привести SLIM — веб-приложение с открытым кодом, которое упрощает обработку данных метабаркодирования, имея интуитивно понятный графический интерфейс [47].

НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ МЕТОДЫ eDNA

Методы eDNA наиболее активно сейчас используют в областях, связанных с экологией и охраной природы. Можно выделить следующие основные направления их применения: в палеогенетических

исследованиях, для изучения древних сообществ; в биомониторинге, для детекции инвазивных и редких видов и выявления «скрытого биоразнообразия»; при контроле загрязнений окружающей среды и установлении новых экологических индикаторов ее состояния; для отслеживания распространения инфекционных заболеваний. Описаны случаи применения eDNA-подхода в медицине: например, для контроля качества воды и воздуха, для поиска патогенных организмов. В сельском хозяйстве методы eDNA применяют для обнаружения фитопатогенов. Магистральные направления, в которых активно используется анализ eDNA, показаны на рис. 2. Ниже будут рассмотрены примеры конкретных исследований в этих областях.

Палеоэкология. Применение методов eDNA для изучения макроорганизмов началось с палеогенетических исследований. В работе E. Willerslev и соавт. [6] было показано, что ДНК растений и животных может сохраняться продолжительное время как в вечномёрзлых грунтах, так и в осадках умеренно пояса, что позволяет изучать биоразнообразие древних сообществ даже в отсутствие в осадках макрофоссилий. В кернах вечномёрзлых осадков из Сибири возрастом от 400 000 до 10 000 лет авторами было обнаружено 19 различных таксонов растений и представителей мегафауны (мамонтов, бизонов, лошадей), а в пещерных отложениях Новой Зеландии — 29 таксонов растений и представители фауны, такие как моа; охарактеризована биота острова до заселения его человеком. В 2007 г. E. Willerslev и соавт. [25] была опубликована работа, в которой с использованием eDNA технологий был проведен анализ базальных частей кернов льда из глубинных скважин Гренландии, и показано, что на высоких широтах этого острова, погребенного сейчас под более чем 2 км льда, произрастали леса с разнообразными хвойными и насекомыми (они могут иметь возраст более 450 тыс. лет). Авторы предположили, что многие глубинные керны материкового льда могут содержать следы погребенных палеоэкосистем. Исследования древней eDNA дают возможность детально реконструировать развитие экосистем во времени. В работе M.W. Pedersen и соавт. [89], вышедшей в августе 2016 г., описаны результаты анализа eDNA кернов озерных отложений из самой узкой части коридора в Беренгии, освобо-



Рис. 2. Основные направления, в которых используется анализ ДНК окружающей среды, и ссылки на примеры исследований в этих направлениях

ждавшегося при отступлении ледника. Целью исследования было установить время, когда он был колонизирован флорой и фауной в той степени, чтобы через него стала возможна миграция людей. Результаты показали, что после ледника первыми сообществами, сформировавшимися на данной территории и оставившими следы в виде eDNA, были степи с мамонтами и бизонами. Они датируются около 12,6 тыс. лет. Около 11,5 тыс. лет назад (л. н.) они сменились разреженными мелколиственными лесами, которые населяли лоси, олени, белоголовые орланы, и около 10 тыс. л. н. там сформировался бореальный лес. Отсюда вывод, что первые американцы, населившие континент ранее 12,6 тыс. л. н., по всей видимости, не могли мигрировать в Северную Америку по этому пути.

Долговременная (в масштабе сотен и тысяч лет) экологическая динамика сообществ и экосистем имеет важное значение для объяснения экологических процессов, наблюдаемых в настоящее время. Временные данные (например, о состоянии экосистем до антропогенного вмешательства и их дальнейшей трансформации) необ-

ходимо учитывать при постановке природоохран- ных целей с учетом исторического контекста [38]. Ряд авторов отмечает высокую перспективность eDNA методов для решения подобных вопросов, подчеркивая, что eDNA позволяет получать дан- ные о динамике биоразнообразия на протяжении длительных промежутков времени для более ши- рокого круга таксонов и в большем разнообразии географических контекстов, чем другие источники временных данных в экологии (такие как долгов- ременный мониторинг, исторические документы, палеоэкология) [38]. Очевидно, что eDNA зани- мает особую нишу в этом отношении, восполняя пробел между палеонтологией и палеоэкологией, долговременными экспериментами и метаанали- зом современных исследований.

Мониторинг инвазивных видов. Инвазивные виды являются одним из основных факторов сокра- щения биоразнообразия, и eDNA-подход, благодаря своей чувствительности, уже зарекомендовал себя как один из самых эффективных методов контро- ля распространения этих таксонов [49]. Использо- вание стерильных и одноразовых инструментов

для отбора проб при исследованиях данного типа снижает риск переноса инвазивных видов и патогенов при полевых работах [50]. Одной из работ, продемонстрировавших эффективность eDNA для детекции инвазивных видов, стало исследование E.A. Brown и соавт. [51], которые ставили своей целью выявление видов зоопланктона неместного происхождения в 16 крупных портах Канады. Всего было идентифицировано 379 видов зоопланктона, из них 24 вида оказались чужеродными, причем 11 некоренных таксонов обнаружены в локациях, где ранее они не отмечались. В настоящее время активно ведутся разработки протоколов для анализа eDNA инвазивных видов разнообразных групп организмов. Помимо многочисленных работ по рыбам и амфибиям, предложены методы детекции инвазивных видов пресноводных моллюсков Европы [52], бирманского питона во Флориде, и даже водорослей *Codium fragile* Suringar, Hariot 1889 [53].

Программы мониторинга инвазивных видов с использованием eDNA уже реализуются на государственном уровне в ряде стран. Так, с 2013 г. Региональный комитет, отвечающий за контроль азиатского карпа в Канаде, Онтарио (Asian Carp Regional Coordinating Committee), совместно с Геологической службой США (Upper Midwest Environmental Sciences Center, USGS) и несколькими частными компаниями осуществляют программу мониторинга азиатских карпов — группы инвазивных видов, вытесняющих местные виды рыб в бассейнах Миссисипи, Огайо и других водоемах Северной Америки с помощью eDNA [54, 55]. Было показано, что eDNA может быть использована не только для детекции, но и для оценки обилия азиатских карпов [16].

Новые разработки в области eDNA-технологий позволяют осуществлять все этапы анализа в полевых условиях. Ряд авторов [56] уже провели тестирование системы отбора проб, фильтрации (Smith-Root eDNA Sampler), экстракции ДНК и мобильной qPCR-платформы (Biomeme) для проведения полного цикла анализа eDNA с целью быстрой и высокоэффективной детекции инвазивных гидробионтов в полевых условиях. Она требует дальнейшей оптимизации, в особенности в части процесса экстракции, чтобы избежать ингибирования ПЦР, но уже в текущем состоянии

представляется надежным средством детекции видов с помощью eDNA.

Мониторинг редких и исчезающих видов.

Не менее эффективным оказалось применение eDNA в мониторинге редких видов: программы мониторинга с использованием eDNA активно внедряются в практику природоохранных организаций. Так, в 2014 г. Nature England (негосударственная организация, спонсируемая Министерством окружающей среды и продовольствия Великобритании) одобрила протокол анализа eDNA [57] для обнаружения гребенчатого тритона *Triturus cristatus*, Laurenti, 1768, занесенного в международную Красную книгу. Испытание этого протокола показало его более высокую эффективность по сравнению с традиционными методами (в том числе визуальным поиском в дневное время, поиском икры, использованием бутылочных ловушек и т. п.): временные затраты сократились более чем в 10 раз, при этом финансовые расходы на проведение исследования оказались в 6–10 раз ниже. Присутствие гребенчатых тритонов в ходе данного пилотного проекта было выявлено в 99,3 % случаев [58].

Большинство протоколов для исследований eDNA редких видов разработаны именно для рыб и амфибий. Существуют некоторые трудности в приложении этого подхода к рептилиям и млекопитающим. Полагают, что организмы с твердыми, кератинизированными покровными тканями выделяют существенно меньшее количество ДНК в среду по сравнению с организмами, формирующими мукус [59]. Несмотря на это, eDNA часто оказывается надежным подходом к мониторингу и этих групп, что было продемонстрировано для крокодиловой ящерицы (*Shinisaurus crocodilurus* Ahl, 1930) [60]. Показано, что методы eDNA могут существенно повысить эффективность мониторинга редких представителей наземных позвоночных в зимний период. Их успешно применяли для детекции редких видов млекопитающих — канадской рыси (*Lynx canadensis* Kerr, 1792), пекана (*Pekania pennanti* Erxleben, 1777), росوماхи (*Gulo gulo*, Linnaeus, 1758) — по пробам снега, взятым из их следов и в локациях, где животные были сфотографированы [61].

Одним из достоинств методов eDNA для мониторинга биоразнообразия является возможность

вовлечения в исследования любителей-волонтеров и приобщения таким образом широкого круга людей к экологическим проблемам. В ходе упомянутого выше тестового мониторинга гребенчатого тритона именно волонтерами были отобраны пробы из 239 прудов в Англии, Уэльсе, Шотландии. Широкомасштабная программа мониторинга биоразнообразия с помощью eDNA, в основу которой легла волонтерская работа, была учреждена Университетом Калифорнии в 2017 г. [62]. В ходе этой программы волонтеры отбирают пробы почвы и осадков, исследователи анализируют eDNA и делятся полученными результатами на специально разработанном сайте, который благодаря дружественному интерфейсу удобен как для исследователей, так и для широкой публики, содержит образовательные и аналитические модули [62, 63]. В рамках этих работ уже исследовано более 1679 локаций [63].

Важную роль играют исследования eDNA и в контроле успешности реинтродукции различных видов, как это было показано на примере подкаменщика (*Cottus rhenanus* Freyhof, Kottelat and Nolte, 2005) в Западной Германии [64]. Благодаря чувствительности eDNA-методов, их можно эффективно использовать для определения так называемого скрытого биоразнообразия в случаях, когда искомые виды не обнаруживаются традиционными методами в районах своего обитания. В этом отношении показательна работа G. Boussarie и соавт. [65], в которой авторами методами eDNA обнаружены в Новой Каледонии на 44 % больше видов акул, чем с использованием традиционных методов, а на некоторых участках, подверженных антропогенной нагрузке, некоторые виды были выявлены впервые. Исследователи пришли к выводу о крайней необходимости крупномасштабных программ мониторинга с применением eDNA-методов для выявления редких видов и для разработки программ по их охране.

Контроль распространения паразитических организмов. Другим направлением использования eDNA является контроль распространения инфекционных заболеваний и паразитических организмов. Так, разработана система для детекции и мониторинга возбудителя шистосомоза (*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907) с использованием eDNA из проб воды [66]. Детекция eDNA этих паразитов

была успешна уже при численности 10 церкарий на литр воды в лабораторных условиях, а при полевых испытаниях в Кении данный подход позволил выявить шистосому в двух локациях, где это не удалось сделать традиционными методами. Авторы исследования делают вывод, что анализ eDNA может стать важным элементом контроля шистосомоза, необходимым для его полной элиминации. Исследования eDNA также могут облегчить мониторинг возбудителей заболеваний диких животных, и важное преимущество рассматриваемого подхода — это его неинвазивность. Показано, что методы eDNA могут использоваться для детекции патогенов, вызывающих массовую гибель амфибий — ранавирусов [67] и хитридиомицетов (*Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore Pessier & D.K. Nichols, 1999) [68] — прежде, чем они приводят к летальным последствиям. Методы eDNA активно внедряются и в практику мониторинга патогенов и в аквакультурах. Заболевания приводят к потерям продуктивности аквакультур примерно на 40 %, и часто это связано со сложностями раннего обнаружения патогенов. Анализ eDNA позволяет оперативно произвести подобную оценку и предотвратить распространение инфекций. Было показано, что eDNA позволяет эффективно обнаруживать простейших *Chilodonella* в аквакультурах баррамунди *Lates calcarifer*, Bloch, 1790 [69]. Также eDNA может стать новым надежным недорогим инструментом для отслеживания патогенных организмов в аквакультуре лососевых. L. Peters и соавт. [70] продемонстрировали возможность идентификации таких паразитов, как *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) и *Paramoeba perurans* (Young et al. 2007) до вида, а также микроводорослей (*Prymnesium parvum*, *Pseudonitzschia seriata* и *P. delicatissima*) до рода (они основывались на секвенировании ампликонов региона 18S SSU рДНК v9). Причем использование более дешевой платформы для секвенирования Ion Torrent, оказалось даже более чувствительным по сравнению с методом Illumina.

Детекция патогенов растений. Метод eDNA используется не только для детекции патогенов животных, но и в сельском хозяйстве, для выявления возбудителей заболеваний растений. Так, кампания Precision Biomonitoring [71] предлагает услугу по обнаружению широкого спектра

микроорганизмов (бактерий и грибов), представляющих угрозу как для людей, так и для самих растений, в пробах *Cannabis*. Весь процесс занимает около 80 мин и основан на qPCR-системе. Он может полностью осуществляться в месте отбора пробы, в полевых условиях, что позволяет существенно сэкономить время по сравнению с традиционным подходом, основанным на культивировании микроорганизмов.

Здравоохранение. Анализ eDNA является перспективным в здравоохранении для мониторинга грибов, споры и фрагменты мицелия которых, находясь в воздухе, могут вызывать аллергические реакции и становиться источниками инфекций. С использованием метабаркодинга таксономический охват грибов, присутствующих в воздухе может увеличиваться десятикратно по сравнению с традиционно используемой микроскопией [72]. X. Tong и соавт. [73] продемонстрировали, что подобный анализ разнообразия грибов в пробах воздуха в госпиталях может быть важным элементом для предотвращения инфекций, и для выбора оптимального подхода к дезинфекции.

Теоретическая биология. Анализ eDNA активно применяют для проверки экологических гипотез, например, в исследованиях экологии опыления, которые особенно актуальны в связи с глобальным снижением численности популяций опылителей и распространением синдрома разрушения пчелиных колоний. С целью определения предпочтений пчел к опылению определенных видов растений, eDNA-подход используют для анализа проб меда и пыльцы. A. Valentini и соавт. [74] проводили анализ eDNA меда для определения его географического происхождения, а N. de Vere и соавт. [75], проанализировав пробы меда из Национального ботанического сада Уэльса, обнаружили, что пчелы предпочитают местные растения, встречающиеся в ненарушенных лесных сообществах и зеленых изгородях. Они делают вывод, что поддержание таких сообществ, защита их от инвазивных видов, необходимы для благополучия пчел. Другая группа авторов [76] показала, что использование ДНК метабаркодинга пыльцы с опылителей позволило выявить в 2,5 раза больше взаимодействий растений с опылителями по сравнению с традиционным подходом. A. Lucas и соавт. [77] в 2018 г. этим методом обнаружили индивидуаль-

ную сезонную специализацию в выборе растений журчалками, а другой коллектив авторов [78] показал возможность трансконтинентального опыления, обнаружив у бабочек на европейском средиземноморском побережье пыльцу африканских таксонов. Таким образом, анализ eDNA может быть использован и для выявления географии миграций опылителей.

Индикация состояния водоемов. Методы eDNA могут стать эффективным инструментом для контроля загрязнений водных экосистем и установления новых экологических индикаторов. В работе F. Li и соавт. [79] метабаркодирование использовали для комплексной оценки изменения структуры речных сообществ дельты реки Янцзы (включая как прокариоты, так и эукариоты) в ответ на стрессовые факторы, связанные с антропогенной активностью. Их задачами было выявить факторы, которые оказывают негативное влияние на структуру сообществ и оценить возможности eDNA-подхода для определения статуса загрязненности рек. Результаты показали, что таким фактором оказался избыток элементов питания (включая DO, NO₃⁻, NH₄⁺, TN и TP). При этом авторами были выявлены молекулярные таксономические единицы, которые могут служить индикаторами статуса загрязненности речной воды этими компонентами. Другое исследование показало, что анализ временных профилей бактериальных сообществ в реках на основе данных секвенирования *16s* рРНК можно использовать для прогнозирования даты цветения цианобактерий более точно, чем при анализе параметров среды (с вероятностью 78–92 %) [80].

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ eDNA В БУДУЩЕМ

Одним из зарождающихся направлений в анализе eDNA является использование его в популяционно-генетических исследованиях для изучения генетической структуры популяций, что позволяет реконструировать их историю, оценить текущее состояние, прогнозировать будущие перспективы, что необходимо для планирования природоохранительных мероприятий. Традиционные исследования подобного рода предполагают отбор проб крови или тканей организмов, что приводит к их стрессу или даже летальным последствиям. С другой стороны, этот процесс может быть дорогостоящим,

опасным (например, при работе с ядовитыми организмами), трудо- и времязатратным для исследователей. Несмотря на то что данное направление только зарождается, уже существует ряд примеров использования eDNA для получения внутривидовых популяционно-генетических данных. Так, eDNA морской воды использовали для изучения разнообразия гаплотипов мтДНК у китовых акул *Rhincodon typus*, для определения их популяционной структуры и трофических взаимоотношений. Было показано, что недавно установленная катарская популяция этих акул ближе к индо-тихоокеанским, чем к атлантическим представителям вида. Также в течение двух лет была прослежена положительная корреляция между количеством копий eDNA китовых акул и малого восточного тунца (*Euthynnus affinis* Cantor, 1849), вероятно, обусловленная их трофическими связями (тунцы входят в рацион этих акул) [81]. Показана возможность не только определять уже установленные гаплотипы с помощью eDNA, но и выделять новые. Ранее неизвестные гаплотипы по контрольному региону мтДНК были выявлены у обыкновенной морской свиньи (*Phocoena phocoena* Linnaeus, 1758) в ходе анализа eDNA из проб морской воды [80]. Более того, метабаркодинг eDNA позволяет изучать гаплотипы не только для одного, но и для множества видов одновременно, как это было продемонстрировано для арthropод из пресноводных водоемов [83]. Более подробно с данным направлением исследований можно ознакомиться в обзорной статье С.И. Adams и соавт. [59].

Для систематизации биомониторинга сообществ с помощью eDNA предложено создание биобанков eDNA на государственном или международном уровне [3]. Это сделает возможным документировать изменения экосистем во времени, получая временные серии eDNA. Также это даст возможность анализа eDNA-материала из ранее опубликованных работ новыми методами. В настоящее время одной из проблем метабаркодинга eDNA является отсутствие стандартов, которые позволили бы сравнивать данные eDNA, полученные в разных исследованиях с применением различных технологий, и создание биобанков eDNA призвано решить эту проблему.

Ведутся исследования, направленные на применение методов eDNA не только для детекции ви-

дов, но и для определения их обилия. Множество статей рассматривают связь концентрации eDNA с численностью либо биомассой определенных видов гидробионтов (для этого используется количественная ПЦР, qPCR или dd PCR). Обычно результаты показывают среднюю степень корреляции между ними. Погрешности в оценке обилия могут определяться как многочисленными факторами, влияющими на концентрацию и перенос eDNA в воде, так и особенностями аналитических протоколов, в том числе подбором праймеров. В настоящее время начинают выходить работы, в которых оцениваются возможности eDNA-метабаркодинга для определения относительного обилия множества таксонов по количеству ридов, относящихся к различным молекулярным таксономическим единицам. Первой работой, продемонстрировавшей возможности метабаркодинга eDNA для количественной оценки крупномасштабных вариаций структуры сообществ рыб в крупной реке, стала статья D. Pont и соавт. [84], в которой анализировались пробы воды, отобранные на протяжении 500 км реки Рон. Они выявили значительную корреляцию (средней степени) между относительным обилием видов рыб и количествами стандартизированных ридов и пришли к выводу, что метабаркодинг позволяет получить важную информацию об относительном обилии видов (хотя и не позволяет точно оценить их обилие или биомассу). Пробы были отобраны в ходе одной 12-дневной экспедиции, а данные, полученные в результате такого мониторинга, оказались сопоставимы с таковыми, полученными в ходе 10-летних наблюдений с традиционно используемым электрофишингом (около 300 дней полевых работ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С начала активного применения методов eDNA к эукариотам в 2000-х годах сформировалось множество направлений исследований, в которых их успешно используют. В качестве основных можно выделить: палеогенетические исследования (направленные на изучение биоразнообразия древних сообществ и реконструкцию эволюции экосистем во времени); мониторинг инвазивных и редких видов, а также выявление «скрытого биоразнообразия»; контроль распространения инфекционных заболеваний и паразитов (что находит применение

в здравоохранении, аквакультуре, сельском хозяйстве и охране природы); проверку экологических гипотез, изучение биотических взаимоотношений; отслеживание загрязнений окружающей среды и установление новых экологических индикаторов. В перспективе совершенствование eDNA-технологий позволит применять их не только для детекции видов, но и для изучения внутривидового генетического разнообразия (в популяционно-генетических исследованиях), а также для количественной характеристики структуры целых сообществ (а не только оценки обилия отдельных видов).

Магистральным направлением в практическом применении методов eDNA в настоящее время является мониторинг инвазивных и редких видов в водных экосистемах. Технологии eDNA могут стать существенным дополнением к традиционным методам мониторинга, поскольку имеют ряд преимуществ: более высокая чувствительность (что особенно важно в случае с малочисленными видами); меньшее стрессовое воздействие на организмы благодаря неинвазивности; во многих случаях более низкая стоимость исследований (в особенности в широкомасштабных программах); сокращение времени и трудозатрат на исследования, а также снижение риска для специалистов при отборе проб; возможность вовлечения в программы мониторинга любителей-волонтеров и приобщения широкого круга людей к проблемам биоразнообразия (в связи с простотой полевого этапа подобных работ); возможность автоматизации мониторинга (портативные станции для проведения eDNA-анализа в полевых условиях уже существуют и активно совершенствуются). Многие достоинства методов eDNA обуславливают их перспективность для проведения широкомасштабных исследований биоразнообразия в труднодоступных регионах: как в арктических [85], так и в антарктических водах [86] для отслеживания последствий изменения климата (таких как развитие инвазий) и ряда антропогенных влияний. Запущен проект по разработке системы идентификации видов дисфотической зоны океана с помощью eDNA (Woods Hole Oceanographic Institution ocean twilight zone project) [87].

Несмотря на ряд достоинств, существует множество нерешенных проблем, связанных с применением eDNA-технологий. Текущие ограничения методов eDNA обсуждаются во множестве обзор-

ных статей (например, [1, 2, 37]). В качестве основных проблем их авторы отмечают высокий риск загрязнения и, соответственно, ложноположительных результатов (для борьбы с этим обязательным является использование проб сравнения на всех этапах работы и другие меры предосторожности [2]); погрешности, связанные с ингибированием полимераз гуминовыми кислотами и другими веществами, присутствующими в пробах на этапе ПЦР, которое может приводить, напротив, к ложноотрицательным результатам; ошибки на этапе ПЦР или секвенирования, включая формирование химерных молекул; неполнота референсных баз данных, их таксономического и географического покрытия; сложности в интерпретации результатов, связанные с невозможностью различать eDNA-сигнал от живых и умерших организмов, и разных стадий жизненного цикла, а также гибридных видов (в случае использования митохондриального маркерного участка). Особенно следует отметить трудности в оценке временного и пространственного охвата eDNA-сигнала. Известно, что в поверхностных водах ДНК деградирует от нескольких часов до нескольких дней [5], поэтому их eDNA отражает современное состояние сообщества, однако в почвах и осадках она может сохраняться намного дольше. Более того, в определенных типах экосистем (например, в реках) eDNA может быстро транспортироваться, что затрудняет определение ее географического происхождения. Например, J. Papsu и соавт. [88] выявили ДНК сообществ наземных растений и скота в пробах озерных отложений. Водоемы аккумулируют ДНК со всего водосборного бассейна. Таким образом, усиленного изучения требует влияние различных факторов (биологических, физических, химических) на транспортировку eDNA в ландшафте и темпы ее деградации [1].

Большая часть статей, в которых используется подход eDNA, в настоящее время направлена на изучение разнообразия именно эукариотических организмов, и их число неуклонно растет в последние годы [90]. Несмотря на перечисленные трудности, использование eDNA является многообещающей технологией, которая уже приводит к революционным изменениям в охране природы и открывает новые горизонты в изучении биоразнообразия нашей планеты и его исторического развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cristescu ME, Hebert PD. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2018;49(1): 209-230. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306>.
2. Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*. 2015;183:4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.
3. Jarman SN, Berry O, Bunce M. The value of environmental DNA biobanking for long-term biomonitoring. *Nat Ecol Evol*. 2018;2(8): 1192-1193. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0614-3>.
4. Barnes MA, Turner CR. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv Genet*. 2016;17(1):1-17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>.
5. Dejean T, Valentini A, Duparc A, et al. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLOS ONE*. 2011;6(8): e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>.
6. Willerslev E, Hansen A, Binladen J, et al. Diverse plant and animal DNA from Holocene and Pleistocene sedimentary records. *Science*. 2003;300(5620):791-795. <https://doi.org/10.1126/science.1084114>.
7. Stewart KA. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodivers Conserv*. 2019;28(5):983-1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>.
8. Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol Ecol Resour*. 2014;14(1):109-116. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>.
9. Piggott MP. Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecol Evol*. 2016;6(9):2739-2750. <https://doi.org/10.1002/ece3.2083>.
10. Goldberg CS, Pilliod DS, Arkle RS, Waits LP. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One*. 2011;6(7): e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>.
11. Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol*. 2012;21(11):2565-2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>.
12. Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*. 2012;7(8): e41732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>.
13. Mächler E, Deiner K, Steinmann P, Altermatt F. Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshwater Science*. 2014;33(4):1174-1183. <https://doi.org/10.1086/678128>.
14. de Souza LS, Godwin JC, Renshaw MA, Larson E. Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. *PLoS One*. 2016;11(10): e0165273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165273>.
15. Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*. 2015;183:29-37. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.025>.
16. Erickson RA, Rees CB, Coulter AA, et al. Detecting the movement and spawning activity of bigheaded carps with environmental DNA. *Mol Ecol Resour*. 2016;16(4):957-965. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12533>.
17. Seymour M, Durance I, Cosby BJ, et al. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Commun Biol*. 2018;1:4. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0005-3>.
18. Khanna M, Stotzky G. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(6): 1930-1939. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.6.1930-1939.1992>.
19. Díaz-Ferguson EE, Moyer GR. History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments.

- Rev Biol Trop.* 2014;62(4):1273-1284. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.13231>.
20. Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters.* 2008;4(4): 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
 21. Foote AD, Thomsen PF, Sveegaard S, et al. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS One.* 2012;7(8):e41781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041781>.
 22. Piaggio AJ, Engeman RM, Hopken MW, et al. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Mol Ecol Resour.* 2014;14(2):374-380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180>.
 23. Alvarez AJ, Yumet GM, Santiago CL, Toranzos GA. Stability of manipulated plasmid DNA in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Water Quality.* 1996;11(2): 129-135. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1996\)11:2<129::AID-TOX8>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1996)11:2<129::AID-TOX8>3.0.CO;2-B).
 24. Zhu B. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Research.* 2006;40(17):3231-3238. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.040>.
 25. Willerslev E, Cappellini E, Boomsma W, et al. Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern greenland. *Science.* 2007;317(5834):111-114. <https://doi.org/10.1126/science.1141758>.
 26. Ogram A, Saylor GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods.* 1987;7(2-3): 57-66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X).
 27. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(4):669-685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>.
 28. Bailiff MD, Karl DM. Dissolved and particulate DNA dynamics during a spring bloom in the Antarctic Peninsula region, 1986-1987. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers.* 1991;38(8-9):1077-1095. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(91\)90097-Y](https://doi.org/10.1016/0198-0149(91)90097-Y).
 29. Paget E, Lebrun M, Freyssinet G, Simonet P. The fate of recombinant plant DNA in soil. *Eur J Soil Biol.* 1998;34(2):81-88. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(99\)90005-5](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(99)90005-5).
 30. Willerslev E, Hansen A, Christensen B, et al. Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(14): 8017-8021. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8017>.
 31. Martellini A, Payment P, Villemur R. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res.* 2005;39(4):541-548. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012>.
 32. Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Riesberg LH. Environmental DNA. *Mol Ecol.* 2012;21(8):1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>.
 33. Yoccoz NG. The future of environmental DNA in ecology. *Mol Ecol.* 2012;21(8):2031-2038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05505.x>.
 34. Lodge DM, Turner CR, Jerde CL, et al. Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Mol Ecol.* 2012;21(11):2555-2558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x>.
 35. Bohmann K, Evans A, Gilbert MT, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol Evol.* 2014;29(6): 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>.
 36. Seymour M. Rapid progression and future of environmental DNA research. *Commun Biol.* 2019;2:80. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0330-9>.
 37. Ruppert K, Kline R, Rahman M. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation.* 2019;17: e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>.
 38. Bálint M, Pfenninger M, Grossart HP, et al. Environmental DNA time series in ecology. *Trends Ecol Evol.* 2018;33(12):945-957. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.09.003>.
 39. Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, et al. Ancient and modern environmental

- DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1660):20130383. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0383>.
40. Goldberg CS, Turner CR, Deiner K, et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution.* 2016;7(11):1299-1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>.
41. Creer S, Deiner K, Frey S, et al. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution.* 2016;7(9):1008-1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>.
42. Hinlo R, Gleeson D, Lintermans M, Furlan E. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>.
43. Tedersoo L, Tooming-Klunderud A, Anslan S. PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytol.* 2018;217(3):1370-1385. <https://doi.org/10.1111/nph.14776>.
44. Egeter B, Veríssimo J, Lopes-Lima M, et al. Speeding up the detection of invasive aquatic species using environmental DNA and nanopore sequencing. *bioRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.142521>.
45. Deiner K, Bik HM, Mächler E, et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol.* 2017;26(21):5872-5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>.
46. Axtner J, Crampton-Platt A, Hörig LA, et al. An efficient and robust laboratory workflow and tetrapod database for larger scale environmental DNA studies. *Gigascience.* 2019;8(4): giz029. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz029>.
47. Dufresne Y, Lejzerowicz F, Perret-Gentil LA, et al. SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(1):88. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2663-2>.
48. Ficetola GF, Taberlet P, Coissac E. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Mol Ecol Resour.* 2016;16(3):604-607. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12508>.
49. Furlan EM, Gleeson D, Wisniewski C, et al. eDNA surveys to detect species at very low densities: A case study of European carp eradication in Tasmania, Australia. *J Appl Ecol.* 2019;56(11):2505-2517. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13485>.
50. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016;25(4):929-942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>.
51. Brown EA, Chain FJ, Zhan A, et al. Early detection of aquatic invaders using metabarcoding reveals a high number of non-indigenous species in Canadian ports. *Diversity Distributions.* 2016;22(10):1045-1059. <https://doi.org/10.1111/ddi.12465>.
52. Clusa L, Miralles L, Basanta A, et al. eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula. *PLoS One.* 2017;12(11): e0188126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188126>.
53. Muha TP, Skukan R, Borrell YJ, et al. Contrasting seasonal and spatial distribution of native and invasive *Codium* seaweed revealed by targeting species-specific eDNA. *Ecol Evol.* 2019;9(15): 8567-8579. <https://doi.org/10.1002/ece3.5379>.
54. Great lakes restoration initiative. Asian carp early detection. Available from: https://www.usgs.gov/centers/glri/science/asian-carp-early-detection?qt-science_center_objects=0#qt-science_center_objects.
55. Asian Carp. Environmental DNA. Available from: <https://www.asiancarp.us/eDNA.html>.
56. Thomas AC, Tank S, Nguyen PL, et al. A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. 2020;2(3):261-270. *Environmental DNA.* <https://doi.org/10.1002/edn3.25>.
57. Rees HC, Bishop K, Middleditch DJ, et al. The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. *Ecol Evol.* 2014;4(21):4023-4032. <https://doi.org/10.1002/ece3.1272>.
58. Biggs J, Ewald N, Valentini A, et al. Analytical and methodological development for improved surveillance of the Great Crested Newt. Defra Project WC1067. Oxford: Freshwater Habitats Trust; 2014. 142 p.

59. Adams CI, Knapp M, Gemmill NJ, et al. Beyond biodiversity: can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool? *Genes (Basel)*. 2019;10(3):192. <https://doi.org/10.3390/genes10030192>.
60. Reinhardt T, van Schingen M, Windisch HS, et al. Monitoring a loss: Detection of the semi-aquatic crocodile lizard (*Shinisaurus crocodilurus*) in inaccessible habitats via environmental DNA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 2019;29(3):353-360. <https://doi.org/10.1002/aqc.3038>.
61. Franklin TW, McKelvey KS, Golding JD, et al. Using environmental DNA methods to improve winter surveys for rare carnivores: DNA from snow and improved noninvasive techniques. *Biological Conservation*. 2019;229:50-58. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.006>.
62. Meyer RS, Curd EE, Schweizer T, et al. The California environmental DNA “CALeDNA” program. Posted Content published. 2019:503383. <https://doi.org/10.1101/503383>.
63. CALeDNA. California Environmental DNA Together, we can help protect California’s biodiversity. Available from: <http://ucedna.com>.
64. Hempel CA, Peinert B, Beermann AJ, et al. Using environmental DNA to monitor the reintroduction success of the Rhine sculpin (*Cottus rhenanus*) in a restored stream. *Peer J Preprints*. 2019;7: e27574v2. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27574v2>.
65. Boussarie G, Bakker J, Wangensteen O, et al. Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Sci Adv*. 2018;4(5): eaap9661. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aap9661>.
66. Sengupta ME, Hellström M, Kariuki HC, et al. Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(18):8931-8940. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815046116>.
67. Hall EM, Crespi EJ, Goldberg CS, Brunner JL. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Mol Ecol Resour*. 2016;16(2):423-433. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12461>.
68. Kamoroff C, Goldberg CS. Using environmental DNA for early detection of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prior to a ranid die-off. *Dis Aquat Org*. 2017;127(1):75-79. <https://doi.org/10.3354/dao03183>.
69. Gomes BG, Hutson KS, Domingos JA, et al. Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms. *Aquaculture*. 2017;479:467-473. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.021>.
70. Peters L, Spatharis S, Dario MA, et al. Environmental DNA: a new low-cost monitoring tool for pathogens in salmonid aquaculture. *Front Microbiol*. 2018;9:3009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03009>.
71. Environmental DNA Solutions. Cannabis pathogen detection. Available from: <https://precision-biomonitoring.com/environmental-dna-solutions/>.
72. Banchi E, Ametrano CG, Stanković D, et al. DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy. *PLoS One*. 2018;13(3): e0194489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194489>.
73. Tong X, Xu H, Zou L, et al. High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. *Sci Rep*. 2017;7:39606. <https://doi.org/10.1038/srep39606>.
74. Valentini A, Miquel C, Taberlet P. DNA barcoding for honey biodiversity. *Diversity*. 2010;2(4): 610-617. <https://doi.org/10.3390/d2040610>.
75. De Vere N, Jones LE, Gilmore T, et al. Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability. *Sci Rep*. 2017;7:42838. <https://doi.org/10.1038/srep42838>.
76. Pornon A, Escaravage N, Burrus M, et al. Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Sci Rep*. 2016;6:27282. <https://doi.org/10.1038/srep27282>.
77. Lucas A, Bodger O, Brosi BJ, et al. Generalisation and specialisation in hoverfly (Syrphidae) grassland pollen transport networks revealed by DNA metabarcoding. *J Anim Ecol*. 2018;87(4):1008-1021. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12828>.
78. Suchan T, Talavera G, Sáez L, et al. Pollen metabarcoding as a tool for tracking long-distance insect migrations. *Mol Ecol Resour*. 2019;19(1): 149-162. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12948>.

79. Li F, Peng Y, Fang W, et al. Application of environmental dna metabarcoding for predicting anthropogenic pollution in rivers. *Environ Sci Technol*. 2018;52(20):11708-11719. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03869>.
80. Tromas N, Fortin N, Bedrani L, et al. Characterising and predicting cyanobacterial blooms in an 8-year amplicon sequencing time course. *ISME J*. 2017;11(8):1746-1763. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.58>.
81. Sigsgaard EE, Carl H, Møller PR, Thomsen PF. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*. 2015;183:46-52. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.023>.
82. Parsons KM, Everett M, Dahlheim M, Park L. Water, water everywhere: environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *R Soc Open Sci*. 2018;5(8):180537. <https://doi.org/10.1098/rsos.180537>.
83. Elbrecht V, Vamos EE, Steinke D, Leese F. Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data. *Peer J*. 2018;6:e4644. <https://doi.org/10.7717/peerj.4644>.
84. Pont D, Rocle M, Valentini A, et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci Rep*. 2018;8(1):10361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>.
85. Lacoursière-Roussel A, Howland K, Normandeau E, et al. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecol Evol*. 2018;8(16):7763-7777. <https://doi.org/10.1002/ece3.4213>.
86. Cowart DA, Murphy KR, Cheng C-HC. Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. *Mar Genomics*. 2018;37:148-160. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.11.003>.
87. Woods Hole Oceanographic Institution. New eyes in the twilight zone. Using E-DNA to discover what lives in the deep. Available from: <https://www.whoi.edu/multimedia/new-eyes-twilight-zone/>.
88. Pansu J, Giguet-Covex C, Ficetola GF, et al. Reconstructing long-term human impacts on plant communities: an ecological approach based on lake sediment DNA. *Mol Ecol*. 2015;24(7):1485-1498. <https://doi.org/10.1111/mec.13136>.
89. Pedersen MW, Ruter A, Schweger C, et al. Post-glacial viability and colonization in North America's ice-free corridor. *Nature*. 2016;537(7618):45-49. <https://doi.org/10.1038/nature19085>.
90. Garlapati D, Charankumar B, Ramu K, et al. A review of the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2019;18(3):389-411. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09501-4>.

✿ Информация об авторах

Дарья Владимировна Пинахина — канд. геол.-мин. наук (по специальности палеонтология и стратиграфия), студент магистратуры факультета информационных технологий и программирования. Университет ИТМО, Санкт-Петербург. SPIN: 3163-7275. E-mail: acanthodasha@gmail.com.

Елена Михайловна Чекунова — д-р биол. наук, старший научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. SPIN: 2788-6386. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.

✿ Authors and affiliations

Daria V. Pinakhina — PhD, master's degree program student, Faculty of Information Technologies and Programming. ITMO University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 3163-7275. E-mail: acanthodasha@gmail.com.

Elena M. Chekunova — Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 2788-6386. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.