

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (ЭКОДНК) В АКВАКУЛЬТУРЕ

^{1,2}Головинов И.В., ^{1,2}Воробьева А.В., ^{1,3}Алимова А.Ш., ^{1,2}Гайдамаченко В.Н.,
¹Небесихина Н.А.

¹Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» «АзНИИРХ», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

²Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича
Ивановского, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

³Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. Раннее выявление болезней рыб и борьба с ними имеют решающее значение для аквакультуры. Традиционные методы мониторинга требуют много времени и часто малоэффективны. Экологическая ДНК (экоДНК) может применяться для мониторинга переносимых водой инфекций рыб. В настоящем исследовании рассмотрено применение ДНК окружающей среды для мониторинга инфекционных заболеваний рыб в аквакультуре. Приводятся литературные данные об использовании экоДНК в диагностике патогенов с использованием различных методов молекулярной биологии.

Ключевые слова. Экологическая ДНК, экоДНК, аквакультура, инфекционные заболевания

APPLICATIONS ENVIRONMENTAL DNA (eDNA) IN AQUACULTURE

^{1,2}Golovinov I.V., ^{1,2}Vorobeveva A.V., ^{1,3}Alimova A.Sh., ^{1,2}Gaidamachenko V.N., ¹Nebesikhina N.A.

¹Azov-Black Sea Branch of "VNIRO" ("AzNIIRKH"), Rostov-on-Don, Russian Federation

²Southern Federal University, The Academy of Biology and Biotechnology named after D. I. Ivanovsky,
Rostov-on-Don, Russian Federation

³Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Early detection and control of fish diseases is critical for aquaculture. Traditional monitoring methods are time consuming and often ineffective. Environmental DNA (eDNA) can be used to monitor waterborne infections in fish. The present study examined the application of environmental DNA to the monitoring of infectious diseases in fish in aquaculture. Literature data on the use of eDNA in the diagnosis of pathogens using various methods of molecular biology are presented.

Keywords. Environmental DNA, eDNA, aquaculture, infection disease.

В настоящее время общий объем производства продукции аквакультуры в мире составляет 74,81 млн тонн [1]. В Российской Федерации в 2021 году объем производства продукции товарной аквакультуры составил 356,6 тысяч тонн [2]. Однако, сегодня болезни приводят к потерям примерно 40% производственного потенциала (~102 миллиарда долларов США) из-за прямых (смертность) и косвенных (добавление химикатов, отходы корма) факторов [3]. Следовательно, раннее выявление болезней и борьба с ними имеют решающее значение для будущего аквакультуры.

Традиционные методы мониторинга водной среды, такие как гистопатология и морфологическая идентификация, требуют много времени и часто не обладают должной чувствительностью к обнаружению.

Но существует новый метод – экоДНК (экологическая ДНК), при котором генетический материал (ДНК и РНК) как макро-, так и микроорганизмов извлекается из проб окружающей среды и обнаруживается с помощью методов молекулярной биологии. В последние годы данный метод стал популярным. Во многом это произошло благодаря развитию технологий анализа генетических последовательностей ДНК и мощных вычислительных систем, упрощающих анализ больших объемов, полученных данных.

Экологическая ДНК (экоДНК) может применяться для мониторинга переносимых водой инфекций рыб. Для рыб следы экоДНК могут происходить из клеток крови, слизи, стула, чешуи и т. п. Инфекции и паразиты также оставляют следы экоДНК в воде.

Важным потенциалом анализа экоДНК в аквакультуре является то, что отбор проб не влияет на окружающую среду и не требует гибели рыбы. Сегодня большое количество рыбы убивают, чтобы исключить заболевание или обнаружить его. С помощью концепции экоДНК можно анализировать

пробы воды, чтобы выявить инфекцию на ранней стадии или указать на отсутствие болезни. Анализ экоДНК также может быть удобным инструментом для более точного картирования распространения инфекции во времени и пространстве и, таким образом, инструментом раннего предупреждения, позволяющим принимать профилактические меры. Раннее предупреждение о возникающих вспышках болезней может позволить заблаговременно принять меры по контролю и смягчению последствий.

Стандартный протокол экоДНК включает в себя следующие этапы:

1. Отбор проб воды
2. Фильтрация или центрифугирование
3. Выделение ДНК
4. ПЦР-РВ или NGS

Применение экоДНК в аквакультуре показало свою эффективность на различных объектах: паразитических беспозвоночных *Tetracapsuloides bryosalmonae*, вызывающих заболевания почек лососёвых рыб [4,5]; иридовирусе красного морского леща [6]; грибок *Aphanomyces astaci*, вызывающим чуму раков рода *Astacus* [7]; лососёвой вши (*Lepeophtheirus salmonis*), амёбах *Paramoeba perurans*, водорослях *Prymnesium parvum*, *Pseudo-nitzschia seriata* и *P. Delicatissima* [8]; бактериях *Piscirickettsia salmonis* и вирусе некроза эритроцитов [9]; инфузориях *Chilodonella hexasticha* [10]; хитридном грибе *Batrachochytrium salamandrivorans*, поражающем саламандр [11].

Обобщенные данные об исследованиях экоДНК в аквакультуре представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Обзор литературы о применении экоДНК в аквакультуре с описанием использованных методов

Страна	Вид	Объем собранной воды и метод выделения ДНК	Метод анализа и целевая область	Метод количественного определения экоДНК	Источник
Япония	Red sea bream iridovirus	0,5 л через поликарбонатный 0,8 мкм фильтр с выделением ДНК с использованием набора Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit	ПЦР-РВ гена MCP RSIV	Стандартные кривые, основанные на серийных разведениях ДНК	6
Швейцария	<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	5 л через стекловолоконный 1 мкм фильтр с выделением ДНК с использованием Qiagen DNeasy PowerWater Kit	ПЦР-РВ гена COI	Стандартные кривые, основанные на серийных разведениях ДНК	4
Швейцария	<i>Aphanomyces astaci</i>	5 л через стекловолоконный 1 мкм фильтр с выделением ДНК с использованием Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit	ПЦР-РВ участка ITS1	Стандартные кривые, основанные на серийных разведениях ДНК	7
Великобритания	<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , <i>Paramoeba perurans</i> , <i>Prymnesium parvum</i> , <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> , <i>P. delicatissima</i>	0,5 л через ПЭС 0,22 мкм фильтр с выделением ДНК с использованием Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit	Метабарк одинг гена 18S SSU рДНК на платформах Illumina MiSeq и Ion Torrent	Количество чтений последовательностей экоДНК используется в качестве показателя относительной численности вида	8
Канада	39 патогенов лососёвых (вирусные, бактериальные,	15 л через ПЭС 0,22 мкм фильтр с выделением ДНК с использованием СТАВ метода	ПЦР-РВ	Стандартные кривые, основанные на серийных разведениях ДНК	9

	эукариотиче ские)				
Австралия	<i>Chilodonella hexasticha</i>	0,015 л центрифугируют с выделением ДНК с использованием СТАВ метода	ПЦР-РВ гена SSU-рДНК	Стандартные кривые, основанные на серийных разведениях ДНК	10
Нидерланды	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	2 л через 0,45 мкм целлюлозно-нитратный фильтр с выделением ДНК с использованием Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit	ПЦР-РВ фрагмента ДНК длиной 54 п.н.	Стандартные кривые, основанные на серийных разведениях ДНК	11

Характеристика состояния экосистемы посредством измерения биоиндикаторов — еще одно применение технологии экодНК [12]. Биоиндикаторы выбирают по их чувствительности к условиям окружающей среды. Если количество выбранного биоиндикатора уменьшается или увеличивается, соответствующее изменение можно рассматривать как признак того, что нужно искать пагубные влияния: загрязнение воды, сдвиги в структуре сообщества и изменение климата.

Методы обнаружения патогенов, основанные на ДНК окружающей среды, теоретически могут обеспечить одновременные исследования множества возникающих водных патогенов в разных таксонах хозяев. Однако для того, чтобы метабаркодинг экодНК превратился в полезный инструмент биомониторинга, необходимо подтвердить, что наборы данных о последовательностях, полученные в результате амплификации маркеров метабаркодинга, отражают истинную видовую идентичность, проверить чувствительность при различных уровнях численности и загрязненности окружающей среды и внедрить недорогой метод секвенирования, позволяющий выполнять массовую обработку полевых образцов.

Список использованных источников

1. Никифоров-Никишин А. Л., Шатохин М. В. Развитие мирового рынка аквакультуры // Дельта науки. – 2019. – №. 1. – С. 4-6.
2. Объем производства аквакультуры в России вырос на 8,5% — до 357 тыс. тонн – ФАО // Федеральное агентство по рыболовству. Объединенная пресс-служба. Новости. – 2022. – 09.02. – URL: <https://fish.gov.ru/news/2022/02/09/obem-proizvodstva-akvakultury-v-rossii-vyros-na-85-do-357-tys-tonn/> (дата обращения: 29.08.2022).
3. FAO F. et al. The state of world fisheries and aquaculture // Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations. – 2012.
4. Kawato Y. et al. Application of environmental DNA for monitoring Red Sea bream Iridovirus at a fish farm // Microbiology spectrum. – 2021. – Т. 9. – №. 2. – С. e00796-21.
5. Sieber N., Hartikainen H., Vorburger C. Validation of an eDNA-based method for the detection of wildlife pathogens in water // Diseases of Aquatic Organisms. – 2020. – Т. 141. – С.171-184.
6. Sieber N. et al. Parasite DNA detection in water samples enhances crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) monitoring in asymptomatic carrier populations // Detection of aquatic wildlife pathogens from eDNA in water samples. – 2020. – С. 77.
7. Peters L. et al. Environmental DNA: A new low-cost monitoring tool for pathogens in salmonid aquaculture // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 3009.
8. Shea D. et al. Environmental DNA from multiple pathogens is elevated near active Atlantic salmon farms // Proceedings of the Royal Society B. – 2020. – Т. 287. – №. 1937. – С. 20202010.
9. Gomes G. B. et al. Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms // Aquaculture. – 2017. – Т. 479. – С 467-473.
10. Spitzen-van der Sluijs A. et al. Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water // Environmental DNA. – 2020. – Т. 2. – №. 4. – С. 565-571.
11. Duval E. et al. An eDNA-based method for monitoring a salmonid infectious disease: Development and application // ARPHA Conference Abstracts. – Pensoft Publishers, 2021. – Т. 4. – С. e64797.
12. Barnes M. A., Turner C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics // Conservation genetics. – 2016. – Т. 17. – №. 1. – С. 1-17.