



ТРАССИРОВАНИЕ ПОДЗЕМНЫХ ВОДОТОКОВ С ПОМОЩЬЮ ДНК-МЕТЧИКОВ

¹Гималов Ф.Р., ¹Гарафутдинов Р.Р., ¹Кулуев Б.Р., ²Привалов Л.Ю., ³Кириянова О.Ю.,
²Михайленко К.И., ²Урманчеев С.Ф., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, E-mail: chemeris@anrb.ru

²Институт механики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71

³Уфимский государственный нефтяной технический университет, Россия, 450062, Уфа, ул. Космонавтов, 1

Резюме

Подземные источники воды и перемещение воды в различных горных породах, включая карсты, представляет значительный интерес по многим причинам, среди которых немалое значение играет хозяйственная деятельность человека. Для трассирования водотоков применяют разнообразные метчики – стабильные и радиоактивные изотопы, микроорганизмы и бактериофаги, твердые частицы в виде спор лишайника, растворимые соли (хлориды, бромиды, прочие ионы), а также флуоресцентные красители. Относительно недавно для этой цели стали применять молекулы ДНК, которые можно с высокой чувствительностью детектировать с помощью полимеразной цепной реакции. Обычно используемое количество ДНК-метчиков составляет 10^{15} – 10^{16} молекул, что обеспечивает их уверенное обнаружение даже несмотря на значительное разбавление водными потоками. Помимо высокой чувствительности, другими преимуществами ДНК-метчиков для трассирования водотоков являются их экологичность и относительная дешевизна. Ввиду возможного разрушения ДНК в водной среде и сорбции на различных породах предложено использовать инкапсулированные молекулы, оболочками для которых служат полимолочная кислота, кремнезем, альгинаты и другие соединения. Спрогнозирован эксперимент по трассировке водотока ручья Тютюлена от понора у пещеры Кош до грифона Таравал, свидетельствующий о том, что в этом случае с учетом расхода воды будет достаточно всего около 10^{12} молекул ДНК.

Ключевые слова: гидрогеология, трассирование, ДНК-метчики, синтетическая ДНК, ПЦР, секвенирование, карст, трещиноватые породы

Цитирование: Гималов Ф.Р., Гарафутдинов Р.Р., Кулуев Б.Р., Привалов Л.Ю., Кириянова О.Ю., Михайленко К.И., Урманчеев С.Ф., Чемерис А.В. Трассирование в гидрогеологии подземных водотоков с помощью ДНК-метчиков // *Biomics*. 2021. Т.13(3). С.244-253. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-16

© Авторы

TRACING IN HYDROGEOLOGY OF UNDERGROUND WATERS USING DNA TRACERS

¹Gimalov F.R., ¹Garafutdinov R.R., ¹Kuluyev B.R., ²Privalov L.Yu., ³Kiryanova O.Yu.,
²Mikhailenko K.I., ²Urmancheev S.F., ¹Chemeris A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: chemeris@anrb.ru

²Institute of Mechanics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia

³Ufa State Petroleum Technological University, 1 Kosmonavtov str., Ufa, 450062, Russia

Resume

Underground water sources and their movement in various rocks, including karsts, are of considerable interest for many reasons, among which human economic activity plays a significant role. Various compounds are used to trace underground waters – stable and radioactive isotopes, microorganisms and bacteriophages, solid particles as lycopodium spores, chlorides and bromides, other ions, as well as fluorescent dyes. Relatively recently, DNA molecules have been used for this purpose, which can be detected with high sensitivity using a polymerase chain reaction. The commonly used number of DNA tracers is 10^{15} - 10^{16} molecules, which, despite significant dilution by water flows, ensures their subsequent detection. In addition to the high sensitivity of such analyses, other advantages of DNA molecules for tracing watercourses are their harmlessness for ecology, relative cheapness. In view of the possible destruction of DNA molecules in an aqueous medium and their sorption on various rocks, it is proposed to use encapsulated molecules, the shells of which are polylactic acid, silica, alginate and other compounds. An experiment on tracing the watercourse of the Tyutyulena stream from the ponor at the Kosh cave to the Traval griffin is predicted, indicating that in this case, taking into account the water flow, only about 10^{12} DNA molecules will be enough.

Keywords: hydrogeology, tracing, DNA taps, synthetic DNA, PCR, sequencing, karsts, fractured rocks

Citation: Gimalov F.R., Garafutdinov R.R., Kuluev B.R., Privalov L.Yu., Kiryanova O.Yu., Mikhailenko K.I., Urmanceev S.F., Chemeris A.V. Tracing in hydrogeology of underground watercourses using DNA tracers. *Biomics*. 2021. V.13(3). P.244-253. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-16

© Authors

Введение

Пресная вода в современном мире становится одним из самых ценных природных ресурсов. Считается, что вокруг нее в будущем могут разгореться региональные конфликты или даже глобальные войны. При этом вода – универсальный растворитель для множества неорганических и органических веществ, причем подавляющее большинство биологических молекул в живых организмах также растворены в воде, и важность воды на планете Земля трудно переоценить. Более 97% всей воды нашей Планеты принадлежит Мировому океану, и это соленая вода, непригодная для питья, сельскохозяйственных и большинства прочих нужд. Пресная вода сосредоточена в основном в ледниках и реках с озерами, и на их долю приходится около 1,82% (1,81 и 0,009% соответственно). Помимо атмосферных (0,001%) и поверхностных вод имеются еще и подземные воды, следить за которыми значительно труднее, но именно они в большинстве случаев представляют собой главные источники чистой питьевой воды. Считается, что объем подземных вод (0,63%) превышает таковой рек и озер приблизительно в 70 раз и распределены они весьма неравномерно. Республика Башкортостан расположена в Волго-Уральской карстовой провинции, и карстовые бассейны ее отдельных территорий обладают огромными ресурсами пресных подземных вод преимущественно в артинских и сакмарских карбонатных осадках [Абдрахманов и др. (Abdrakhmanov et al.), 2002]. Карстовые явления также непосредственно связаны с водой, в том числе

подземной, и их изучение, включая водотоки в них, представляется крайне актуальным по многим причинам, среди которых угрозы для промышленных объектов и жизни человека.

Предложено немало способов слежения за подземными водотоками путем использования разнообразных трейсеров или метчиков, о которых далее отдельно пойдет речь, но прежде нужно коснуться относительно недавно внедрившихся в эту область молекулярно-биологических методов, и, в частности, полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР была разработана в середине 1980-х гг. [Saiki et al., 1985; Mullis, Faloona, 1987] и весьма быстро стала одним из наиболее важных и производительных методов в современной биологии, позволяя за весьма короткое время в геометрической прогрессии избирательно амплифицировать с помощью термостабильной ДНК полимеразы определенные участки ДНК или РНК, приводя к увеличению их количества до миллиарда и более раз. Спустя несколько лет это открытие было оценено по достоинству, что выразилось в присуждении К.Мюллису в 1993 г. Нобелевской премии по химии. В настоящее время ПЦР очень широко используется в диагностике, в том числе новой коронавирусной инфекции [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2020; Мавзютов и др., 2020; 2021], в научных исследованиях во многих областях биологии, в смежных и в прочих дисциплинах, среди которых можно отметить даже весьма далекие, такие как криминалистика [Чемерис и др. SChemeris et al.), 2018] и гидрогеология, чему и посвящена данная

статья. Но перед этим необходимо еще ненадолго остановиться на вопросе специфичности ПЦР, благодаря которой можно детектировать именно искомые участки ДНК, поскольку число комбинаций нуклеотидов в анализируемой последовательности подчиняется формуле 4^n , где 4 – четыре азотистых основания (аденин, гуанин, цитозин и тимин), а n – количество таких нуклеотидов во взятом в исследование фрагменте ДНК. Так, например, для цепи ДНК длиной 100 нуклеотидов возможно 4^{100} комбинаций, что приблизительно соответствует по короткой шкале обозначения больших чисел новемдециллиону (10^{60}). Таким образом, можно

подобрать множество подходящих последовательностей коротких фрагментов ДНК (около 100 нуклеотидов длиной), которые будут служить разными метчиками для слежения за перемещениями воды (при внесении в разных местах или с учетом разницы во времени) и их одновременной детекции в одной пробе. Но для того, чтобы выявить эти 100 нуклеотидов, необходимо провести ПЦР с использованием двух более коротких олигонуклеотидных праймеров (приблизительно по 20 нуклеотидов), фланкирующих искомый участок [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019], что схематично изображено на рисунке.

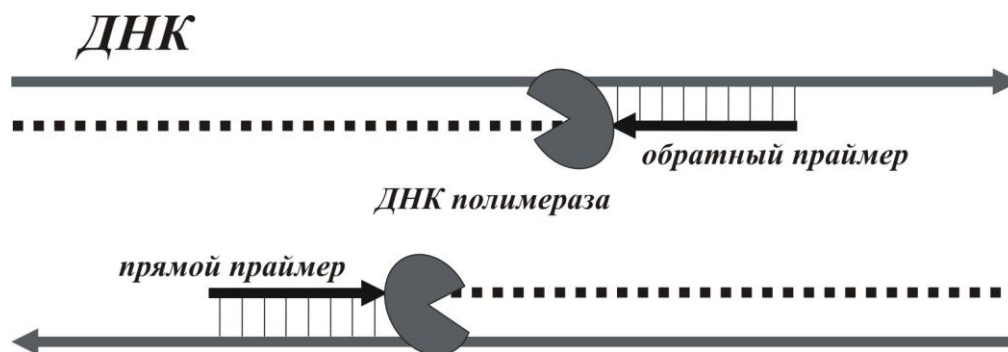


Рисунок. Схема расположения (отжига) праймеров при проведении ПЦР.

Удлинение праймеров ДНК полимеразой показано пунктирными линиями.

Figure. Scheme annealing of primers during PCR. The elongation of primers by DNA polymerase is shown by dotted lines.

Поскольку при одновременном использовании таких олигонуклеотидных праймеров вероятность их случайного отжига на ДНК суммируется, то 4 азотистых основания для двух праймеров по 20 звеньев нужно возводить в сороковую степень, и 4^{40} обеспечит свыше септиллиона комбинаций (10^{24}), что также исключает какую-либо ошибку.

Различные типы метчиков потоков воды в гидрогеологии

Пожалуй, стоит акцентировать внимание на том, что все рассматриваемые нами метчики представляют собой целенаправленно внесенные вещества или микроорганизмы и не распространяются на случайные загрязнения или природный изотопный состав тех или иных вод. Идеальным метчиком можно считать тот, который является нетоксичным, недорогим, легко детектируется в следовых количествах, стабилен в течение необходимого времени исследования, движется вместе с водотоком, не влияя на его характер, и не представлен в ощутимых количествах в самой исследуемой воде. При этом причин неудачных экспериментов даже при

использовании оптимальных метчиков довольно много, среди которых ошибочные представления о водотоках.

По всей видимости, первым подобным экспериментом стало внесение около 2000 лет назад римским правителем Филиппом в озеро Ram на Голанских высотах шелухи для того, чтобы убедиться в том, что его воды являются основой источника Banias, расположенного на 600 м ниже данного озера в 6 км к западу на склонах горы Hermon и служащего в свою очередь основным источником реки Иордан. Считается, что эксперимент был успешным и подтвердил существовавшую тогда точку зрения, но проведенное во второй половине XX-го века новое исследование химического и изотопного состава этих вод [Mazog, 1976 – цит. по Davis et al., 1980] показало, что полученные в древности данные не соответствуют действительности. Хотя можно и допустить несовпадение их составов из-за человеческой деятельности и чтобы окончательно решить данный вопрос требуется трассирование этой водоносной системы с помощью современных подходящих метчиков.

В уже цитированном кратком обзоре [Davis et al., 1980] приведен целый ряд соединений и частиц, включая саму воду с отличающейся температурой, используемых для трассирования водотоков. Так, упоминается, что есть примеры отслеживания (в отсутствие интенсивного перемешивания) движения на расстояниях до 8 км разнотемпературных потоков воды благодаря ее высокой теплоемкости. В качестве неких твердых частиц отмечается использование окрашенных спор плауна ликоподия, имеющих диаметр около 30 мкм. Описываются примеры применения вирусов, бактерий, пекарских дрожжей. Но наиболее широко используются хлориды и бромиды, причем последние присутствуют в природной воде в концентрациях, приблизительно в 300 раз меньших, чем первые, которые требуется вносить в довольно больших количествах. Находят применение и йодиды, но они имеют тенденцию к большей сорбции на различных поверхностях. Помимо целого ряда стабильных изотопов в виде дейтерия, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{34}S , ^{88}Sr , в качестве метчиков также используются и радиоактивные элементы – тритий, ^{32}P , ^{60}Co , ^{131}I , ^{198}Au и др. При этом и те, и другие довольно дороги, а элементы второй группы еще и опасны в силу радиоактивности, к тому же необходимое оборудование должно быть высокоточным. Находят применение и растворенные в воде газы, в том числе инертные или с сильным запахом, например, меркаптаны.

Для исследования подземных водотоков широко используются красители, включая флуоресцентные, чувствительность детекции которых достаточно высока, и подобные исследования проводятся во многих странах, включая Россию. Так, некоторое время назад один из авторов данной статьи принял участие в выполнении работы по трассированию подземного водотока в Бурзянском районе Республики Башкортостан [Яйкаров и др. (Yaikarov et al.), 2016]. Поскольку в той статье упоминаются сразу несколько разных метчиков для слежения за подземными водами, позволим себе остановиться на ней подробнее. Исследовалось карстовое образование речушки Тютюлена, меженный сток которой полностью поглощается понором у пещеры Кош, и параллельно изучался карстовый источник Таравал, находящийся по прямой на расстоянии 3,4 км от этой пещеры. Стояла задача подтвердить водную связь данного понора и источника. По свидетельствам местных жителей, на рубеже 1920-30-х годов один из жителей соседней деревни вылил в Тютюлену бочку дегтя, и спустя 6 часов в карстовом источнике Таравал появились маслянистые пятна. Фактически, деготь оказался метчиком водотоков, но ущерб ручью, по-видимому, он оказал значительный. Позднее другой местный

житель высыпал в тот же понор гранулированный пенополистирол, и через некоторое время он также всплыл в грифоне Таравал. При проведении цитируемого научного исследования был использован краситель флуоресцеин в количестве 0,5 кг, что обеспечило с учетом скорости водотока концентрацию при внесении 152 г/м³. Визуально при выходе красителя из источника он не наблюдался, поскольку его концентрация для этого должна быть выше 1,5 мг/мл. Для улавливания флуоресцеина применяли заменяемые через определенные промежутки времени марлевые ловушки с активированным углем, из которого потом в лабораторных условиях велась экстракция красителя, и его количество оценивалось с помощью флуоресцентного спектрофотометра модели LS-55 фирмы Perkin Elmer (США). Первый раз флуоресцеин был обнаружен в третьей по очередности ловушке, находившейся в воде в промежутке времени от 4 до 6,5 часов после внесения в понор данного красителя. Последний раз флуоресцеин фиксировался в ловушке, снятой через 14,5 часов от начала эксперимента. В той статье [Яйкаров и др. (Yaikarov et al.), 2016] упоминаются и схожие исследования карстовых образований на Урале, где вместо красителя использовалось 100 кг поваренной соли, после чего в намеченных местах периодически отбирались пробы на содержание хлорид-ионов.

ДНК-метчики в виде «голой»¹ ДНК

Несмотря на то, что высокочувствительная детекция с помощью ПЦР специфичных нуклеотидных последовательностей ДНК была предложена в середине 1980-х гг., понадобилось больше десятилетия, прежде чем этот метод нашел применения в гидрогеологии. И сделали это норвежские авторы, исследуя различные гидрогеологические объекты [Sabir et al., 1999; 2000; 2001]. Ими была выполнена серия экспериментов, в которой использовалась синтетическая ДНК длиной 72 нуклеотида и праймеры к ней, несущие экстрапоследовательности бактериофага M13, используемые для секвенирования образующихся ампликонов для подтверждения правильности амплификации искомым молекулам ДНК. Количество молекул ДНК в их экспериментах составляло 10¹⁶. Параллельно для сопоставления результатов анализировалось движение хлорид-ионов. Два эксперимента были проведены в пористой среде. Цель первого эксперимента с метчиками состояла в том, чтобы проверить подвижность и миграцию молекул

¹ Здесь под «голой» ДНК понимается обычная ДНК, не заключенная в какую-либо оболочку и доступная для действия разрушающих ее ферментов.

ДНК в качестве индикаторов в песчаном водоносном горизонте. Эксперимент был проведен на объекте, расположенном недалеко от взлетно-посадочной полосы аэропорта Осло. Данный водоносный горизонт образован одной из крупнейших ледниковых дельт в Норвегии и полностью подпитывается за счет пополнения осадками; сухопутного стока не происходит, и предполагаемое среднее время пребывания воды в водоносном горизонте составляет почти 30 лет. Для исследования были пробурены несколько скважин. Эксперимент с введением хлорид-ионов и ДНК-метчиков был начат 16 октября 1996 года и продолжался 20 дней. При этом ДНК-метчики были обнаружены на больших глубинах и быстрее, чем хлорид-ионы. В другом их опыте была проведена оценка различных гипотез относительно источника загрязнения эксплуатационной скважины, снабжающей питьевой водой около 2000 жителей. Объединив результаты анализа ДНК и NaCl, было определено, что источником загрязнения в водоносном горизонте была утечка из канализационной системы примерно в 300 метрах от добывающей скважины. Другой эксперимент с ДНК-метчиками водотоков был проведен в трещиноватых твердых породах, потребовавшийся при строительстве железнодорожного туннеля в Норвегии, поскольку значительный дренаж поверхностных вод и водно-болотных угодий через трещины в скальных породах в туннель препятствовал строительным работам и влиял на уровень воды в болотах и озерах на высоте 160 - 200 м выше туннеля. Это исследование помогло лучше понять нарушение водного баланса из-за строительства туннеля. В целом авторы пришли к выводу, что использование ДНК-метчиков, во-первых, экологично, относительно недорого, обеспечивает необходимую чувствительность и подходит для разных геологических пород. Поскольку в тех их экспериментах велась только качественная оценка результатов, авторы справедливо заметили, что использование ПЦР в реальном времени, например, с системой TaqMan, может обеспечить получение количественных показателей выявляемых молекул ДНК и сопоставлять их с объемом водотоков.

Но потребовалось еще больше десятилетия, прежде чем подобные работы стали проводиться в других странах. Так, летом 2010 года группой голландских и французских ученых были успешно исследованы водотоки двух ручьев, для чего ими были синтезированы шесть различных ДНК-метчиков длиной 80 нуклеотидов, используемых в количествах 10^{15} молекул [Forpen et al., 2011]. В своей следующей работе эти авторы сравнили ДНК-метчики с классическим NaCl и подтвердили пригодность молекул ДНК для трассирования водотоков [Forpen et al., 2013]. Тогда же на использование ДНК-метчиков

для отслеживания водотоков в трещиноватых скальных породах обратили внимание итальянские ученые, и, сопоставив их с метчиком в виде KCl, пришли к выводу о приемлемости молекул ДНК для этих целей [Aquilanti et al., 2013]. Спустя несколько лет ими было проведено масштабное исследование водотоков в карстах с помощью ДНК (10^{16} молекул) в сравнении с флуоресцеином (200 г) и отмечено, что ДНК-метчики оказались весьма удобными для таких горных пород [Aquilanti et al., 2016].

Отслеживание сбросов сточных вод в ненарушенной каменной почве и аллювиальном гравийном водоносном горизонте проводилось с использованием 10 синтетических двухцепочечных ДНК-метчиков длиной 302 пары нуклеотидов каждый [Pang et al., 2017]. При этом 52 пары нуклеотидов приходились на фланкирующие участки, служащие местами для отжига праймеров, дизайн центральных 198 пар нуклеотидов осуществлялся с помощью случайного генератора последовательностей. Было показано, что ДНК-метчики, легко обнаруживаемые в загрязненной сточными водами почве и подземных водах, с помощью количественной ПЦР могут стать новым эффективным инструментом для отслеживания сброса сточных вод в почву и грунтовые воды, обеспечивая пространственную оценку наличия или отсутствия источников и путей загрязнения. При этом отмечается, что необходимы дальнейшие исследования для изучения взаимодействия ДНК и сточных вод с учетом влияния подповерхностных условий окружающей среды на поведение и разрушение молекул ДНК.

Недавно китайскими авторами [Zhang et al., 2021] проведены модельные эксперименты по изучению влияния длины молекул ДНК на их адсорбцию при трассировании ДНК-метчиков с помощью хорошо контролируемых лабораторных условий. Для этого были синтезированы девять уникальных синтетических двухцепочечных ДНК-метчиков различной длины (90 - 200 пар нуклеотидов) и сопоставлены с эталонными метчиками (бромид-ионы и ионы лития) при их пропускании через колонки со стеклянными бусинками или песком. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как длина ДНК, так и свойства пористой поверхности оказывают заметное влияние на перемещение ДНК-метчиков и, следовательно, их необходимо учитывать при разработке будущих тестов с точки зрения выбора места исследования, а также дизайна последовательностей ДНК и интерпретации данных.

Инкапсулированные ДНК-метчики

Поскольку как одноцепочечная, так и двуцепочечная ДНК в «голом» виде представляет собой биополимер, способный расщепляться под

действием различных нуклеаз, которые могут присутствовать в окружающей среде за счет секреции их бактериями или в результате разрушения клеток живых организмов, то для увеличения сохранности ДНК ее можно инкапсулировать в некую оболочку, изолировав тем самым от внешних факторов. Не удивительно, что в гидрогеологии было предложено пользоваться в том числе и подобными ДНК-метчиками.

Так, с помощью полимолочной кислоты и парамагнитных частиц оксида железа были созданы микросферы, содержащие фрагменты ДНК длиной 100 нуклеотидов [Sharma et al., 2012]. При этом авторы привели подсчеты стоимости изготовления таких частиц и всего анализа потоков воды с помощью ПЦР, согласно которым 1 г микросфер, содержащий около 10^{12} индивидуальных частиц, обошелся всего в один доллар. Кроме лабораторных исследований, детекция внесенных ДНК-метчиков проводилась и в натурных экспериментах – в ручье.

Лучшей защитой для молекул ДНК служит их инкапсулирование в кремнеземных наночастицах, которое позволило проследить судьбу добавленной ДНК в ходе биологической очистки сточных вод с использованием активного ила и показать, что более 97% таких частиц были удалены из сточных вод путем включения в биомассу осадка [Grass et al., 2014]. При этом процесс создания кремнеземных ДНК-наночастиц довольно длителен и заключается в том, что фиксированные на модифицированном диоксиде кремния молекулы ДНК покрываются кремнеземом с помощью тетраэтоксисилана [Paunescu et al., 2013; Mikutis et al., 2018]. В другой работе тех же авторов подобным ДНК-наночастицам, получившим название SiDNAMag, были приданы еще и парамагнитные свойства, что позволило высказать предположение о перспективности использования SiDNAMag для различных гидрологических исследований водотоков подземной воды.

В одной из работ [Dahlke et al., 2015] описывается применение девяти ДНК-метчиков, шесть из которых были инкапсулированы с помощью полимолочной кислоты и поливинилацетата в присутствии окиси железа, что придало таким высушенным микрочастицам парамагнитные свойства, позволяющие с большей легкостью извлекать их из потоков воды. При этом дизайн последовательностей ДНК протяженностью от 82 до 102 нуклеотидов производился с помощью генератора случайных последовательностей GeneDesign Random DNA generator (<http://54.235.254.95/gd/Guide/randna.html>), после чего по базе данных GenBank с использованием инструмента BLAST убеждались в отсутствии гомологии с природными последовательностями. Все

эти метчики вместе с одним флуоресцентным красителем были введены в небольшой (3,2 км) ледник на севере Швеции. Полученные данные позволили построить теоретическую модель путей потока, по которым вода проходит через ледник. С учетом холодной температуры инкапсулированная ДНК показала лишь ненамного лучшие результаты по сравнению с «голой».

Другой тип инкапсулирования ДНК-метчиков заключается в образовании микрочастиц на основе плазмидных ДНК, несущих вставки с нуклеотидными последовательностями, сгенерированными случайным генератором ДНК, и хитозана, покрытые еще слоем альгината [Pang et al., 2020]. Также плазмидная ДНК была использована для формирования микрочастиц с парамагнитной окисью железа, покрытых полимолочной кислотой, нашедших применение в гидрологии [Liao et al., 2020].

Заключение

В одной из статей [Dahlke et al., 2015] по базе данных Google Scholar за период с 1990 г. по 10 декабря 2014 г. проведен анализ публикаций, в которых описывались способы трассирования водотоков. Так, дейтерий использовался приблизительно в 7000 работах, тогда как ДНК-метчики – всего в 22. За прошедшее с того момента время подобных работ добавилось не так много, что до некоторой степени удивительно, учитывая многочисленные преимущества применения молекул ДНК в качестве метчиков для слежения за водотоками. В относительно недавней обзорной статье приведена таблица, в которой сопоставлены традиционные и ДНК-метчики [Liao et al., 2018]. Так, практически по всем параметрам, среди которых экологичность, относительная дешевизна синтетических ДНК, включая их инкапсулированные формы, высокая чувствительность и использование не самого дорогого оборудования, молекулы ДНК имеют ряд преимуществ или, по крайней мере, не уступают традиционным метчикам. Одной из причин их меньшего использования может выступать слабое взаимодействие гидрогеологов с молекулярными биологами.

Правильным подходом к использованию ДНК-метчиков для трассирования водотоков является применение синтетической ДНК, причем такой, которая не может встречаться в Природе, и генерация которой возможна, в частности, с помощью разработанного нами специального генератора таких последовательностей GATCGGenerator [Кирьянова и др. (Kiryanova et al.), 2021]. Этим полностью исключается получение ложноположительных результатов, поскольку известно, что ДНК из экскрементов или отмерших организмов может

присутствовать как в почве [Levy-Boothe et al., 2007], так и в воде, и уже появилась аббревиатура eDNA (environmental DNA) [Senapati et al., 2019], на основе изучения которой, например, при исследовании водоемов с помощью амплификации и секвенирования ДНК, выявляют видовой состав местной фауны, в частности, рыб.

Возвращаясь к трассированию ручья Тютюлена и источника Таравал и принимая расход воды в поноре равным (осенью) около 10 л/с, легко подсчитать, что за сутки объем протекающей воды составляет (округленно) 1 м³, или 10⁹ мл. Если допустить, что необходимое количество копий ДНК для их детекции с помощью ПЦР в реакционной смеси равно 10³ (и это большая величина), то для подобного трассирования этой карстовой системы будет достаточно всего 10¹² копий ДНК, что совсем немного. Однако, с учетом деградации и сорбции ДНК количество этих молекул в отбираемых пробах уменьшится, возможно, на один-два порядка и составит от 10 до 100 копий мишени в мл, что вполне достаточно для их уверенной детекции. К тому же если применять инкапсулированные молекулы ДНК, то их разрушение и сорбция будут снижены. Если они будут находиться в инкапсулированной форме с парамагнитными частицами, то их можно будет собирать с помощью магнитов. А если применять ДНК, меченную биотином, то такие молекулы даже «голой» ДНК можно концентрировать с помощью магнитных частиц с биотин-стрептавидиновой системой и, следовательно, анализируемый объем воды может быть заметно больше. При этом на экологической ситуации исследование данного водотока с помощью молекул ДНК никак не скажется, поскольку тот же биотин является природным веществом (витамин В₇, или Н), да и количества используемых веществ просто мизерные.

Литература

1. Абдрахманов Р.Ф., Мартин В.И., Попов В.Г., Рождественский А.П., Смирнов А.И., Травкин А.И. Карст Башкортостана // Информреклама. Уфа. 2002. 383 с.
2. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. Биомика. 2019. Т.11(1). С. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
3. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // Biomcs. 2020. Т.12(1). С. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7
4. Кирьянова О.Ю., Кирьянов И.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Губайдуллин И.М. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ GATCGGenerator №2021667097 от 25 октября 2021 г.
5. Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Газизов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Загадки нового коронавируса SARS-CoV-2 // Биомика. 2021. Т.13(1). С. 75-99. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-7
6. Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Юлдашев Р.А., Хусаинова Р.И., Чубукова О.В., Гималов Ф.Р., Матниязов Р.Т., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Вершинина З.Р., Мифтахов И.Ю., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Проблемные аспекты диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 с помощью обратнотранскрипционной ПЦР // Biomcs. 2020. Т.12(4). С. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50
7. Чемерис Д.А., Сагитов А.М., Аминев Ф.Г., Луценко В.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Васильев Р.Г., Алексеев Я.И., Сломинский П.А., Хуснутдинова Э.К., Чемерис А.В. Эволюция подходов к ДНК-идентификации личности Биомика. 2018. Т.10(1). С.85-140. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-16
8. Яйкаров С.А., Кузьмина Л.Ю., Червяцова О.Я., Гарафутдинов Р.Р. Трассирование подземного водотока «ручей Тютюлена — пещера Кош — грифон Таравал» (Южный Урал) // Пещеры. Сборник научных трудов. Пермь, 2016. С. 6-14.
9. Aquilanti L., Clementi F., Landolfo S., Nanni T., Palpacelli S., Tazioli A. A DNA tracer used in column tests for hydrogeology applications // Environmental earth sciences. 2013. V. 70. P. 3143–3154. doi: 10.1007/s12665-013-2379-y
10. Aquilanti L., Clementi F., Nanni T. et al. DNA and fluorescein tracer tests to study the recharge, groundwater flow path and hydraulic contact of aquifers in the Umbria-Marche limestone ridge (central Apennines, Italy) // Environ Earth Sci. 2016. V. 75. P. 626. doi: 10.1007/s12665-016-5436-5
11. Dahlke H.E., Williamson A.G., Georgakakos C., Leung S., Sharma A.N., Lyon S.W., Walter M.T. Using concurrent DNA tracer injections to infer glacial flow pathways / Special Issue: Tracer advances in catchment hydrology. 2015. V. 29(25). P. 5257-5274. doi: 10.1002/hyp.10679

12. Davis S.N., Thompson G.M., Bentley H.W., Stiles G. Ground-Water Tracers — A Short Review // *Groundwater*. 1980. V. 18(1). P. 14-23. doi: 10.1111/j.1745-6584.1980.tb03366.x.
13. Foppen J.W., Orup C., Adell R., Poulalion V., Uhlenbrook S. Using multiple artificial DNA tracers in hydrology // *Hydrological Process*. 2011. V.25(19). P.3101-3106. doi: 10.1002/hyp.8159
14. Foppen J.W., Seopa J., Bakobie N., Bogaard T. Development of a methodology for the application of synthetic DNA in stream tracer injection experiments // *Water resources research*. 2013. V.49. P. 5369–5380. doi: 10.1002/wrcr.20438.
15. Foppen W., Bogaard T., van Osnabrugge B., Puddu M., Grass R. The potential of silica encapsulated DNA magnetite microparticles (SiDNAMag) for multi-tracer studies in subsurface hydrology EGU General Assembly Conference Abstracts. 2015.
16. Grass R.N., Schälchli J., Paunescu D., Soellner J.O.B., Kaegi R., Stark W.J. Tracking trace amounts of submicrometer silica particles in wastewaters and activated sludge using silica-encapsulated DNA barcodes // *Environmental Science & Technology Letters*. 2014. V. 1(12). P. 484-489. doi: 10.1021/ez5003506
17. Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Hart M.M., Powell J.R., Klironomos J.N., Pauls K.P., Swanton C.J., Trevors J.T., Dunfield K.E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment // *Soil Biology and Biochemistry*. 2007. V. 39(12). P. 2977-2991. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.06.020
18. Liao R., Yang P., Wu W., Luo D., Yang D. A DNA tracer system for hydrological environment investigations // *Environ Sci Technol*. 2018. V. 52(4). P. 1695-1703. doi: 10.1021/acs.est.7b02928
19. Liao R., Zhang J., Li T., Luo D., Yang D. Biopolymer/plasmid DNA microspheres as tracers for multiplexed hydrological investigation // *Chemical Engineering Journal*. 2020. V. 12. P. 401. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126035>
20. Mikutis G., Deuber C.A., Schmid L., Kittilä A., Lobsiger N., Puddu M., Asgeirsson D.O., Grass R.N., Saar M.O., Stark W.J. Silica - encapsulated DNA-based tracers for aquifer characterization // *Environ Sci Technol*. 2018 V. 52(21). P. 12142-12152. doi: 10.1021/acs.est.8b03285
21. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods Enzymol*. 1987. V.155. P.335-350. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
22. Pang L., Abeysekera G., Hanning K., Premaratne A., Robson B., Abraham P., Sutton R., Hanson C., Hadfield J., Heiligenthal L., Stone D., McBeth K., Billington C. Water tracking in surface water, groundwater and soils using free and alginate-chitosan encapsulated synthetic DNA tracers // *Water Res*. 2020. V. 184. P. 116-192. doi: 10.1016/j.watres.2020.116192.
23. Pang L., Robson B., Farkas K., McGill E., Varsani A., Gillot L., Li J., Abraham P. Tracking effluent discharges in undisturbed stony soil and alluvial gravel aquifer using synthetic DNA tracers // *Sci Total Environ*. 2017. V. 592. P. 144-152. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.072
24. Paunescu D., Puddu M., Soellner J.O., Stoessel P.R., Grass R.N. Reversible DNA encapsulation in silica to produce ROS-resistant and heat-resistant synthetic DNA 'fossils' // *Nat. Protoc*. 2013. V.8(12). P.2440-2448. doi: 10.1038/nprot.2013.154
25. Sabir I.H., Alestrom P., Haldorsen S. Use of synthetic DNA as new tracers for tracing ground water flow and multiple contaminants // *Journal of Applied Sciences*. 2001. V. 1. P. 233-238.
26. Sabir I.H., Haldorsen S., Torgersen J., Aleström P., Gaut S., Colleuille H., Pedersen, T.S., Kitterød N.O. Synthetic DNA tracers: Examples of their application in water related studies / Tracers and modelling in hydrogeology. Proceedings of TraM'2000, the International Conference on Tracers and Modeling in Hydrogeology held at Liège, Belgium, May 2000. P.159-165 ref.11.
27. Sabir, I., Torgersen J., Haldorsen S., Aleström P. DNA tracers with information capacity and high detection sensitivity tested in groundwater studies // *Hydrogeology Journal*. 1999. V. 7. P. 264-7272. doi: 10.1007/s100400050200.
28. Sabir, Iftikhar & Haldorsen, Sylt & Torgersen, Jacob & Alestrom, Peter & Colleuille, Hervé & Pedersen, Tor & Nils-Otto,. (2000).. IAHS-AISH Publication.
29. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*. 1985. V.230(4732). P.1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
30. Senapati D., Bhattacharya M., Kar A., Chini D.S., Das B.K., Patra B.C. Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection // *Proceedings of the Zoological Society*. 2018. V. 72 (3). P. 211-228.
31. Sharma A.N., Luo D., Walter M.T. Hydrological tracers using nanobiotechnology: Proof of concept // *Environmental science & technology*. 2012. V. 46. P. 8928-8936. doi: 10.1021/es301561q
32. Zhang Y., Hartung M., Hawkins A., Dekas A., Li K., Horne R. DNA tracer transport through porous media – the effect of DNA length and adsorption // *Water Resources Research*. 2021. V. 57(2). <https://doi.org/10.1029/2020WR028382>

References

1. Abdrakhmanov R.F., Martin V.I., Popov V.G., Rozhdestvensky A.P., Smirnov A.I., Travkin A.I. Karst of Bashkortostan // Informreklama. Ufa. 2002. 383 p. (In Russian)
2. Aquilanti L., Clementi F., Landolfo S., Nanni T., Palpacelli S., Tazioli A. A DNA tracer used in column tests for hydrogeology applications // Environmental earth sciences. 2013. V. 70. P. 3143–3154. doi: 10.1007/s12665-013-2379-y
3. Aquilanti L., Clementi F., Nanni T. et al. DNA and fluorescein tracer tests to study the recharge, groundwater flow path and hydraulic contact of aquifers in the Umbria-Marche limestone ridge (central Apennines, Italy) // Environ Earth Sci. 2016. V. 75. P. 626. doi: 10.1007/s12665-016-5436-5
4. Chemeris D.A., Sagitov A.M., Aminev F.G., Lutsenko V.I., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Vasilov R.G., Alexeyev Ya.I., Slominsky P.A., Khusnutdinova E.K., Chemeris A.V. The evolution of approaches to DNA identification of personality. *Biomics*. 2018. V.10(1). P.85-140. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-16 (In Russian)
5. Dahlke H.E., Williamson A.G., Georgakakos C., Leung S., Sharma A.N., Lyon S.W., Walter M.T. Using concurrent DNA tracer injections to infer glacial flow pathways / Special Issue: Tracer advances in catchment hydrology. 2015. V. 29(25). P. 5257-5274. doi: 10.1002/hyp.10679
6. Davis S.N., Thompson G.M., Bentley H.W., Stiles G. Ground-Water Tracers — A Short Review // Groundwater. 1980. V. 18(1). P. 14-23. doi: 10.1111/j.1745-6584.1980.tb03366.x.
7. Foppen J.W., Orup C., Adell R., Poulalion V., Uhlenbrook S. Using multiple artificial DNA tracers in hydrology // Hydrological Process. 2011. V.25(19). P.3101-3106. doi: 10.1002/hyp.8159
8. Foppen J.W., Seopa J., Bakobie N., Bogaard T. Development of a methodology for the application of synthetic DNA in stream tracer injection experiments // Water resources research. 2013. V.49. P. 5369–5380. doi: 10.1002/wrcr.20438.
9. Foppen W., Bogaard T., van Osnabrugge B., Puddu M., Grass R. The potential of silica encapsulated DNA magnetite microparticles (SiDNAMag) for multi-tracer studies in subsurface hydrology EGU General Assembly Conference Abstracts. 2015.
10. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., Alexeyev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova J.Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R.T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019. V.11(1). P. 23–70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
11. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Human betacoronaviruses and their highly sensitive detection by PCR and other amplification methods. *Biomics*. 2020. V.12(1). P. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7 (In Russian)
12. Grass R.N., Schälchli J., Paunescu D., Soellner J.O.B., Kaegi R., Stark W.J. Tracking trace amounts of submicrometer silica particles in wastewaters and activated sludge using silica-encapsulated DNA barcodes // Environmental Science & Technology Letters. 2014. V. 1(12). P. 484-489. doi: 10.1021/ez5003506
13. Kiryanova O.Yu., Kiryanov I.I., Sharafutdinov R.R., Chemeris A.V., Gubaidullin I.M. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registratsii programmy dlja JeVM GATCGGenerator No. 2021667097 ot 25 oktjabrja 2021. [Certificate of the state registration computer program GATCGGenerator No. 2021667097 dated October 25, 2021] (In Russian)
14. Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Hart M.M., Powell J.R., Klironomos J.N., Pauls K.P., Swanton C.J., Trevors J.T., Dunfield K.E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment // Soil Biology and Biochemistry. 2007. V. 39(12). P. 2977-2991. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.06.020
15. Liao R., Yang P., Wu W., Luo D., Yang D. A DNA tracer system for hydrological environment investigations // Environ Sci Technol. 2018. V. 52(4). P. 1695-1703. doi: 10.1021/acs.est.7b02928
16. Liao R., Zhang J., Li T., Luo D., Yang D. Biopolymer/plasmid DNA microspheres as tracers for multiplexed hydrological investigation // Chemical Engineering Journal. 2020. V. 12. P. 401. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126035>
17. Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E.Yu., Gazizov R.R., Baymiev An.Kh., Nikonorov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. The enigmas of the new coronavirus SARS-CoV-2. *Biomics*. 2021. V.13(1). P. 75-99. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-7 (In Russian)
18. Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E.Yu., Yuldashev R.A., Khusainova R.I., Chubukova O.V., Gimalov F.R., Matniyazov R.T., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Vershinina Z.R., Miftakhov I.Yu., Nikonorov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Problematic aspects of diagnostics of SARS-CoV-2 coronavirus infection using reverse-transcriptional PCR. *Biomics*. 2020. V.12(4). P. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50 (In Russian)
19. Mikutis G., Deuber C.A., Schmid L., Kittilä A., Lobsiger N., Puddu M., Asgeirsson D.O., Grass R.N., Saar M.O., Stark W.J. Silica - encapsulated DNA-based

- tracers for aquifer characterization // *Environ Sci Technol.* 2018. V. 52(21). P. 12142-12152. doi: 10.1021/acs.est.8b03285
20. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods Enzymol.* 1987. V.155. P.335-350. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
21. Pang L., Abeysekera G., Hanning K., Premaratne A., Robson B., Abraham P., Sutton R., Hanson C., Hadfield J., Heiligenthal L., Stone D., McBeth K., Billington C. Water tracking in surface water, groundwater and soils using free and alginate-chitosan encapsulated synthetic DNA tracers // *Water Res.* 2020. V. 184. P. 116-192. doi: 10.1016/j.watres.2020.116192.
22. Pang L., Robson B., Farkas K., McGill E., Varsani A., Gillot L., Li J., Abraham P. Tracking effluent discharges in undisturbed stony soil and alluvial gravel aquifer using synthetic DNA tracers // *Sci Total Environ.* 2017. V. 592. P. 144-152. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.072
23. Paunescu D., Puddu M., Soellner J.O., Stoessel P.R., Grass R.N. Reversible DNA encapsulation in silica to produce ROS-resistant and heat-resistant synthetic DNA 'fossils' // *Nat. Protoc.* 2013. V.8(12). P.2440-2448. doi: 10.1038/nprot.2013.154
24. Sabir I.H., Alestrom P., Haldorsen S. Use of synthetic DNA as new tracers for tracing ground water flow and multiple contaminants // *Journal of Applied Sciences.* 2001. V. 1. P. 233-238.
25. Sabir I.H., Haldorsen S., Torgersen J., Aleström P., Gaut S., Colleuille H., Pedersen, T.S., Kitterød N.O. Synthetic DNA tracers: Examples of their application in water related studies / *Tracers and modelling in hydrogeology. Proceedings of TraM'2000, the International Conference on Tracers and Modeling in Hydrogeology held at Liège, Belgium, May 2000.* P.159-165 ref.11.
26. Sabir, I., Torgersen J., Haldorsen S., Aleström P. DNA tracers with information capacity and high detection sensitivity tested in groundwater studies // *Hydrogeology Journal.* 1999. V. 7. P. 264-7272. doi: 10.1007/s100400050200.
27. Sabir, Iftikhar & Haldorsen, Sylt & Torgersen, Jacob & Alestrom, Peter & Colleuille, Hervé & Pedersen, Tor & Nils-Otto,. (2000).. *IAHS-AISH Publication.*
28. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science.* 1985. V.230(4732). P.1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
29. Senapati D., Bhattacharya M., Kar A., Chini D.S., Das B.K., Patra B.C. Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection // *Proceedings of the Zoological Society.* 2018. V. 72 (3). P. 211-228.
30. Sharma A.N., Luo D., Walter M.T. Hydrological tracers using nanobiotechnology: Proof of concept // *Environmental science & technology.* 2012. V. 46. P. 8928-8936. doi: 10.1021/es301561q
31. Yaikarov S. A., Kuzmina L. Yu., Cherviatsova O. Ya., Garafutdinov R. R. Tracing of Underground water in karst system «River Tjtlini — cave Kosh — Taraval spring» (South Ural) //
32. Zhang Y., Hartung M., Hawkins A., Dekas A., Li K., Horne R. DNA tracer transport through porous media – the effect of DNA length and adsorption // *Water Resources Research.* 2021. V. 57(2). <https://doi.org/10.1029/2020WR028382>