

ISSN 2658-3518

LIMNOLOGY & FRESHWATER BIOLOGY

2025, № 6

- > abiotic and biotic water components;
- > ecosystem-level studies;
- > systematics and aquatic ecology;
- > paleolimnology and environmental histories;
- > laboratory experiments and modeling

Thermohydrodynamic processes in Lake Ladoga: 3D model verification

Zverev I.S.^{1,2}, Karetnikov S.G.¹, Pozdnyakov Sh.R.³, Golosov S.D.^{1,2*}

¹Institute of Limnology RAS - St. Petersburg SPC RAS, 9 Sevastyanova Str., St. Petersburg, 196105, Russia

²Shirshov Institute of Oceanology RAS, 36 Nakhimovsky Prospekt, Moscow, 117997, Russia

³Saint-Petersburg Branch RAS, 5 University Embankment, Saint-Petersburg, 199034, Russia

ABSTRACT. The results of adapting a three-dimensional mathematical model of the hydrodynamics of an inland sea to the conditions of Lake Ladoga are presented, followed by its verification using field and remote measurements. During adaptation, a spherical B-type computational grid with a spatial resolution of 1 km × 1 km was constructed. The equation of state for seawater was replaced by an equation for weakly mineralized water with a maximum density at a temperature close to 4 °C. A procedure was implemented to calculate the inflow of heat and dissolved substances into the lake through liquid boundaries with the waters of tributaries. The flow of the Neva River was taken into account. Atmospheric forcing from NCEP/NCAR reanalysis with a spatial resolution of 2.5° × 2.5° has been replaced with the European equivalent ERA5 with a resolution of 0.25° × 0.25°. Verification of the new model version was performed for three areas of the lake: the southern shallow area (≤ 40 m), the central area (~50 m), and the northern deep area with depths up to 230 m. To assess the impact of climate change on thermohydrodynamic processes, calculations were performed from 1990 to 2020. Both contact measurements from the Institute of Limnology of the Russian Academy of Sciences and images from NOAA and MODIS Terra/Aqua satellites were used for verification. The verification results showed that the model adequately reproduces the main features of thermohydrodynamic processes in Lake Ladoga, namely: the vertical thermal structure of the lake's water mass, the beginning of the formation and spread of the vertical frontal zone - the thermobar. Accounting for inflow waters allows tracking their further distribution in the lake. Replacing atmospheric forcing has led to a significant improvement in calculations of ice conditions in the lake. The results of verification of the new version of the model should be considered satisfactory. Some shortcomings of the model have also been noted.

Keywords: Lake Ladoga, thermohydrodynamic processes, 3D mathematical modeling, temperature profile, ice cover, thermobar, satellite information

For citation: Zverev I.S., Karetnikov S.G., Pozdnyakov Sh.R., Golosov S.D. Thermohydrodynamic processes in Lake Ladoga: 3D model verification // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1249-1267. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1249

1. Introduction

One of the main problems in modern limnology is the adequate assessment of the mechanisms of variability of thermohydrodynamic (THD) processes in lakes, as well as the understanding of their future changes associated with global and regional climate change. Thermohydrodynamic processes largely determine the conditions for the functioning of aquatic ecosystems, thereby affecting water quality in water bodies. One effective method for studying THD processes is mathematical modeling.

Due to the large spatial extent of Lake Ladoga (~ 250 × 130 km) the presence of sharp depth differences (maximum depth ~ 230 meters), coupled with a highly indented coastline, THD processes in the lake have a pronounced spatial and temporal heterogeneity. Therefore, the one-dimensional approach widely used in limnology (see, for example, the FLake model, www.lakemodel.net), which assumes that vertical variability of processes prevails over horizontal variability, is insufficient for their modeling. To correctly reproduce THD processes in Ladoga, it is necessary to use a 3D (three-dimensional) approach, which was initially

*Corresponding author. E-mail address: sergey.golosov@mail.ru (S.D. Golosov)

Received: September 24, 2025;

Accepted after revised: November 07, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



widely used in meteorology and oceanography, and then in limnology. To date, there are a significant number of three-dimensional mathematical models developed specifically for lakes, or ocean models adapted to lake conditions. A detailed description of the history of the application of the three-dimensional approach in modeling different types of lakes is given in the monograph by Menshutkin V.V. (Menshutkin et al., 2013).

Among the three-dimensional lake models specially developed for Lake Ladoga, the model of the St. Petersburg Economic and Mathematical Institute of the Russian Academy of Sciences (Astrakhancev et al., 1986; 1987; 1992; 2003), which has been successfully used to solve THD and environmental problems for Lake Ladoga and Lake Onego. The biggest drawback of this model is that it does not take into account the direct impact of the atmosphere on the lake. The heat flux through the free surface of the lake is not calculated from the heat balance equation, but is estimated from direct estimates of changes in the heat content of the lake. The latter significantly limits the applicability of the model in solving problems related to the impact of regional climate variability on THD processes in lakes and their ecological status. In addition, the insufficient spatial resolution of the model did not allow the entire spectrum of hydrophysical processes in the lake to be reproduced. Currently, due to the reorganization of the scientific development team, this model is not available for use in further studies of Lake Ladoga.

In recent years, the mathematical model of internal sea hydrodynamics (MISH), developed at the Institute of Numerical Mathematics of the Russian Academy of Sciences (Ibraev, 2001; 2008), has become increasingly widespread (at least in the Russian Federation). The MISH was originally designed to reproduce THD processes in the Caspian Sea (Ibraev, 2008). Later, it was refined for studies of circulation in the World Ocean and its basins (Ushakov and Ibraev, 2018a; Ushakov and Ibraev, 2018b).

Compared to the ocean, inland seas have a number of characteristics that must be taken into account when modeling them (Ibraev, 2008). An important element of the THD of inland seas is the presence of intra- and interannual variability in water surface levels as a response of the water body to a non-zero water balance. In addition, water exchange through liquid lateral boundaries (river inflow and outflow) is important in inland seas, as it affects the formation of the thermal regime and chemical composition of the main water mass. Another important feature of inland seas is that global (basin) circulation is superimposed by movements of smaller spatial and temporal scales – synoptic and topographic, which requires the entire spectrum of movements to be described in the model. The latter requires the construction of higher spatial resolution grids for inland seas.

In this work, due to the similarity of Lake Ladoga to an inland sea in terms of the above characteristics (Filatov and Balagansky, 2021; Filatov and Romyantsev, 2021), an attempt has been made to adapt the first version of the MISH, which has been successfully tested in the Caspian Sea, to the conditions of the

freshwater Lake Ladoga, and the results of its verification based on field observations at Lake Ladoga and available satellite information are presented.

2. Materials and methods

In the MISH, the system of three-dimensional equations of thermohydrodynamics of the internal sea is approximated in the hydrostatic and Boussinesq approximations on a spherical grid of type *B* using the finite volume method in vertical *z*-coordinates (Marshall et al., 1997). The model has transitioned from a “rigid cover” condition to a description of a free sea surface, which allows for the description of the propagation of fast barotropic motions, as well as the variability of sea level depending on the variability of the water balance (Ibraev, 2008). The main characteristics of the model are given in Table 1.

Thus, Table 1 shows that the following changes were made to the model during the adaptation of the MISH to the conditions of Lake Ladoga:

- a high-resolution spherical calculation grid of type *B* ($\approx 1 \text{ km} \times 1 \text{ km}$) was constructed;
- the sea water state equation was replaced with a weakly mineralized water state equation that takes into account the maximum density at a temperature close to 4 °C;
- a procedure was implemented to calculate the inflow of heat and dissolved substances into the lake through liquid boundaries with tributary waters, as well as the outflow of the Neva River;
- atmospheric forcing from NCEP/NCAR reanalysis with a spatial resolution of $2.5^\circ \times 2.5^\circ$ has been replaced with the European equivalent ERA5 with a higher resolution of $0.25^\circ \times 0.25^\circ$.
- the sea ice formation model uses freshwater parameters (density, freezing temperature, latent heat of fusion of ice, heat capacity of ice). The salinity of sea ice has been replaced with the mineralization of freshwater.

Calculations were made for the entire lake area for the period from 1990 to 2020, but verification was carried out for three areas: the northern area (with depths of more than 200 meters, station 105 area), central (50–60 meters, station 55 area) and shallow southern with depths up to 40 meters (station 25 area). Figure 1b shows the location of the stations selected for model verification. These stations were selected for verification because they have been included in the mandatory field research program of the Institute of Limnology of the Russian Academy of Sciences since the mid-1960s. Over the years, a significant amount of factual material has been accumulated at these stations.

Vertical thermal sounding data during the open water period was used to verify the model, as well as year-round satellite observations of ice conditions and the spatial distribution of surface water temperature in Lake Ladoga from 1990 to 2020.

To verify the MISH in terms of the quality of ice conditions and thermal bar reproduction, images obtained from NOAA satellites (<https://www.class.ngdc.noaa.gov>) and MODIS Terra/Aqua [<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>] were used. All of these satellites are equipped with high-resolution multispectral instruments (AVHRR) that can calculate water surface temperature. The satellites fly over Lake Ladoga several times a day. To verify the model, images obtained during daylight hours when there was no cloud cover over the lake were used. To reduce atmospheric correction, images with the object located nadirally in the image were selected. The atmospheric influence on the thermal radiation of the water surface was taken into account using the method developed by the Space Research Institute of the Russian Academy of Sciences, which utilizes the difference in the atmospheric influence on the passage of thermal radiation from the underlying surface in different parts of the thermal spectral range (Zakharov et al., 1993).

3. Results and discussion

3.1. Atmospheric forcing and ice conditions in the lake.

The initial meteorological information used in the MISH was based on NCEP/NCAR reanalysis data (a joint project of the National Centers for Environmental Prediction (NCEP) and Atmospheric Research (NCAR), USA), (www.cdc.noaa.gov). The data from this reanalysis is presented on a regular grid of 2.5 degrees latitude and longitude, which does not allow for the spatial heterogeneity of meteorological parameters over the lake area to be taken into account. As an alternative to the NCEP/NCAR reanalysis, the ERA5 reanalysis from the European Centre for Medium-Range Weather Forecasts (ECMWF) was used to model the atmospheric impact on the lake. ERA5 is the fifth generation of ECMWF reanalysis, representing a further modernization of the well-established ERA Interim reanalysis of global climate and weather over the past decades. The spatial resolution of the ERA5 reanalysis used in this study is 0.25° on a regular grid of latitudes and longitudes. Figure 1a shows the coverage of Lake Ladoga by the grids of both reanalyses.

The replacement of atmospheric effects on the lake was primarily due to the fact that model calculations showed unsatisfactory reproduction of ice conditions when using NCEP/NCAR reanalysis. This is mainly due to the underestimation of air temperature in the winter months compared to weather station data. As an example, Figure 2 shows a comparison of data from both reanalyses with meteorological observations in Petrokrepost Bay in different seasons of the year. The same figure also shows the results of ice thickness calculations based on reanalysis data in the same bay. There is clearly a significant underestimation of

Table 1. Main characteristics of the MISH

Model title	Model of Inland Sea Hydrodynamics (MISH)
Bottom topography	Data from the Institute of Limnology of the Russian Academy of Sciences
Horizontal grid	Spherical grid <i>B</i> (Marshall et al., 1997)
Horizontal resolution*	$\Delta\varphi = 0.54'$, $\Delta\lambda = 1.08'$ ($\approx 1 \text{ km} \times 1 \text{ km}$)
Vertical grid	<i>z</i> -coordinate
Vertical resolution*	$\Delta z = 2 \text{ m}$ at $0 \leq z < 5$ $\Delta z = 2.5 \text{ m}$ at $5 \leq z < 10$ $\Delta z = 5 \text{ m}$ at $10 \leq z < 40$ $\Delta z = 10 \text{ m}$ at $40 \leq z < 50$ $\Delta z = 25 \text{ m}$ at $50 \leq z < 225$
Parameterization of vertical turbulence	Munk-Anderson scheme (Munk and Anderson, 1948)
Parameterization of horizontal turbulence for momentum	Smagorinsky's scheme (Smagorinsky et al., 1965)
Horizontal turbulence scheme	$K_h = \text{const} = 5 \text{ m}^2/\text{s}$
Solution method	The solution is divided into two parts: the solution of 3D equations for baroclinic motions and the solution of 2D shallow water equations for barotropic motions (Ibrayev, 2001).
Convection	Convection "adjustment"
Equation of state *	(Chen and Millero, 1986)
Wind friction stress	According to Launiainen and Vihma (1990)
Heat fluxes on the lake surface:	ERA5 reanalysis
1) Shortwave radiation*	
2) Long-wave radiation:	
a) incoming*	ERA5 reanalysis
b) outgoing	Stefan-Boltzmann law
3) Explicit heat flux	According to Launiainen and Vihma (1990)
4) Latent heat flux	According to Launiainen and Vihma (1990)
Bottom friction	Parameterization of bottom friction (Ibrayev and Trukhchev, 1998)
Ice model*	The Hibler sea ice model (Hibler, 1980). No ice drift. Freshwater parameters (density, freezing point, latent heat of fusion, and heat capacity of ice) were used in ice formation calculations. Sea ice salinity was replaced by freshwater mineralization.
Tributaries *	Specified volumetric discharges, heat and matter fluxes from inflowing rivers
Time step	300 s
Calculation time for 1 model year on a laptop with an Intel Core I5 2.6GHz x 4 configuration with the specified calculation grid parameters	8 hours

Note: * - parameters and schemes changed at the adaptation of the MISH to the conditions of Lake Ladoga.

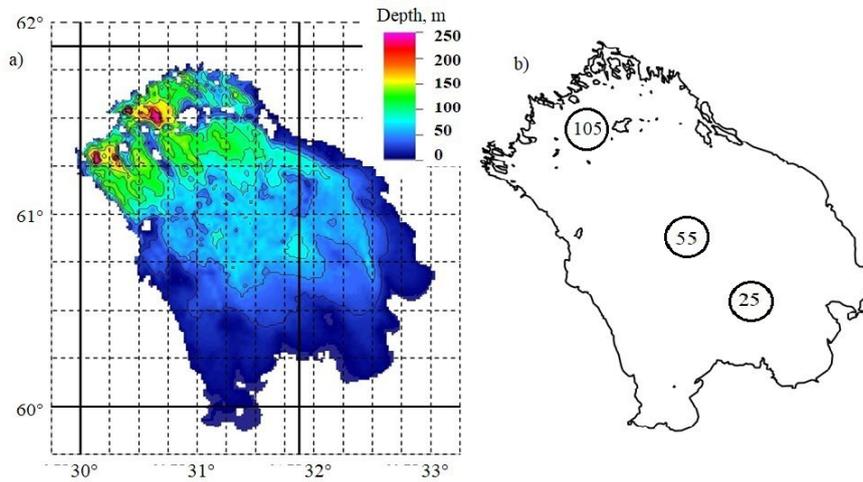


Fig.1. (a) – Topography of the Lake Ladoga bottom used in the calculations, and coverage of the Lake Ladoga water area by the NCEP/NCAR (solid lines) and ERA5 (dashed lines) reanalysis grids. (b) – Location of the observation station areas selected for model verification.

air temperature by the NCEP/NCAR reanalysis in the winter months, which is reflected in the calculation of ice thickness, which, according to observations, ranges from 0.5 to 0.7 m in the bay (Lake Ladoga. Atlas, 2002).

Due to complex hydrometeorological conditions on Lake Ladoga during the ice season, no contact observations are conducted in the lake’s water area. The ice situation is assessed either by observations at coastal weather stations or by remote sensing data. Figure 3 shows examples of MISH verification using satellite data on the temporal dynamics of ice cover on Lake Ladoga in 2001. The model calculations were performed with two atmospheric forcing. As noted above, the NCEP reanalysis with a 2.5-degree grid, which is coarse for lake scales, reproduces ice processes in the lake extremely poorly. The data in Fig. 3 confirm this. As of March 13, according to satellite data and calculations using the ERA5 reanalysis, the northern part of the lake is still ice-free, while the calculation with the NCEP reanalysis shows that the lake is completely covered with ice. The same is true for ice melt calculations. As of April 25, satellite data and ERA5 calculations

show the lake surface to be ice-free. The NCEP reanalysis calculation, on the other hand, leaves a good half of the lake under ice. Accordingly, the timing of ice melt on the lake is shifting to June, which has never happened in the history of observations on Lake Ladoga.

At the same time, the ERA5 calculation at least qualitatively coincides with satellite information. Fig. 4 shows the results of assessing the degree of ice coverage of the lake surface based on satellite and model data in the form of long-term dynamics of the relative ice cover index of Lake Ladoga (RICI), proposed in the paper (Karetnikov and Naumenko, 2013). The index is the ratio of the total area under the curve of lake ice cover change for a specific winter season to the area bounded by the median values calculated from all available observations.

There is a noticeable, almost systematic discrepancy in the assessment of minimum RICI index values between satellite and model data, while the maximum values are similar in magnitude. Such differences in assessments may be related to differences between the minimum sensitivity threshold of the image interpre-

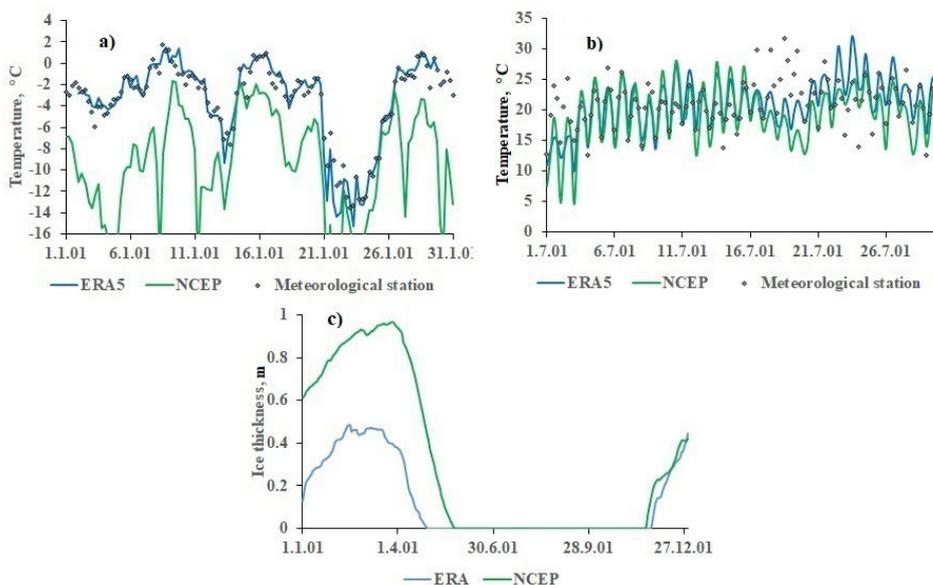


Fig.2. Air temperature in winter and summer 2001 in Petrokrepost Bay in accordance with meteorological reanalysis data (a) and (b), and seasonal variability of ice thickness according to modeling data (c).

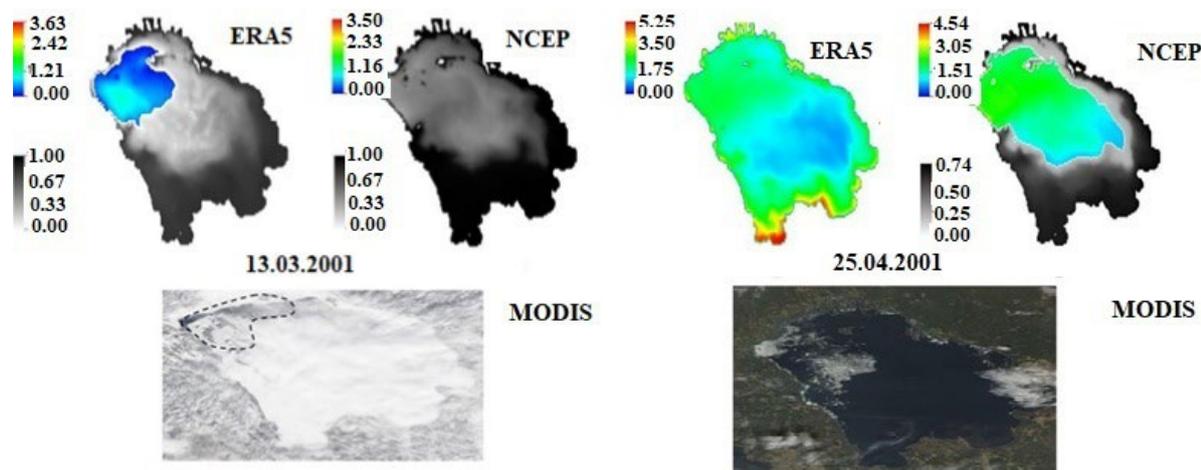


Fig.3. Water surface temperature ($^{\circ}\text{C}$) – color area and ice thickness (m) – black-and-white area on March 13 and April 25, 2001, calculated using NCEP/NCAR and ERA5 reanalysis data, as well as lake surface images obtained from the Modis satellite. The dotted line shows the position of the ice edge based on the satellite image.

tation method and the minimum ice thickness value specified in the model. In the model, the minimum ice thickness can be set to any small number, while the image interpretation method involves determining the presence/absence of ice based on the color range of the underlying surface in the image. If the underlying surface is a field of thin transparent ice, it is identified as water during interpretation. Therefore, in the model, the ice cover at the beginning of the ice season occupies a larger area compared to satellite data. The results of a numerical model experiment performed with an increased minimum ice thickness value (5 cm) are shown in Fig. 4 as a dotted line. The experimental data showed that the discrepancies in the RIC index values obtained from the model and from image interpretation were significantly reduced.

In addition, RIC variability can serve as an indirect indicator of climate change in the region during the winter period. It is difficult to identify any significant trends in the temporal dynamics of the index in Fig. 4. However, dividing the time interval under consideration into parts allows us to conclude that since approximately the early 2000s, there has been a downward trend in the temporal dynamics of RIC, i.e., the ice cover of Lake Ladoga is decreasing. The latter indicates a warming of the regional climate in the winter period. Figure 5 shows the results of the temporal dynamics of RIC for the periods 1990–2002 and 2002–2020, obtained from the model and from the interpretation of satellite images.

Thus, the correspondence between satellite and model data, at least in terms of the degree of ice coverage of the lake surface, appears to be satisfactory.

3.2. Vertical thermal structure of the lake

When comparing simulation results with field observation data, it should be borne in mind that the measured temperature profiles cannot be obtained at a point with the same strictly fixed geographical coordinates.

This is due to the specifics of taking measurements from a research vessel, which, for various reasons (error in determining the coordinates of the measurement point, drift of the vessel during operation, etc.), cannot be positioned with absolute accuracy in the same place on different dates. The spread in the coordinates of the measurement points is small, but can reach hundreds of meters, which is insignificant in terms of the scale of the entire lake. Nevertheless, given the complex relief of the lake bottom, even a small spread in station coordinates can lead to a spread in the depth of the measurement location. Therefore, when comparing simulation data with field data, it is appropriate to talk about the model reproducing the vertical temperature distribution not at a strictly defined observation station, but in its vicinity.

To assess the quality of the MISH reproduction of the vertical thermal structure in Lake Ladoga in different seasons of the year, the years with the highest reliability of field observations were selected from the database of the Institute of Limnology. It should be noted that all observations refer to periods of open

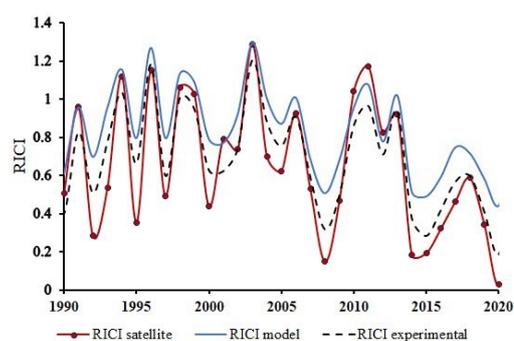


Fig.4. Long-term variability of the ice coverage index of Lake Ladoga. The red line with markers represents satellite imagery data, the solid blue line represents modeling results, and the dotted line represents experimental calculation results.

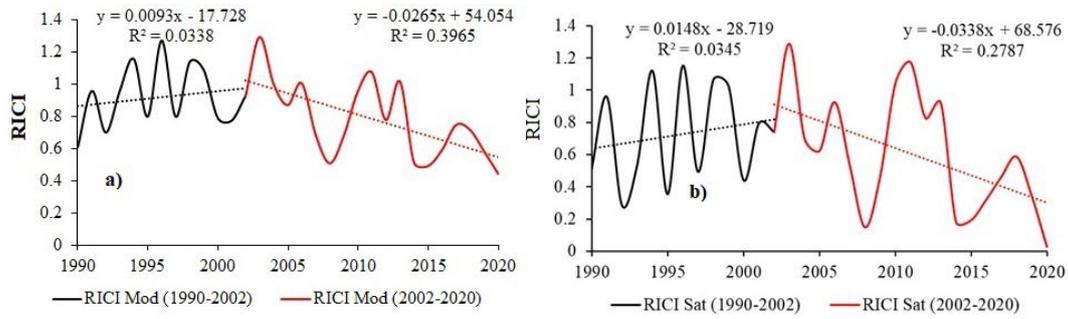


Fig.5. Variability of the ice cover index of Lake Ladoga RICi in different periods: a) – modeling results, b) – satellite image data.

water. Winter observations were not carried out due to the complex ice conditions on the lake. Fig. 6 shows the results of calculations of the vertical distribution of water temperature in the lake for the three selected stations during the summer warming of the lake (June–August) and developed autumn convection (October) at the beginning and end of the entire calculation period.

Despite the generally satisfactory agreement between the calculated and measured profiles, it should be noted that the model best reproduces the temperature profile at all stations when there is a pronounced upper mixed layer (UML) of wind or convective origin in the lake. In cases where the water mass in the upper layers is stably stratified, the model gives underestimated temperature values. This may be due to the fact that the model does not calculate the temperature directly at the water surface. Due to the peculiarities of the calculation grid, the first calculated temperature value is at a depth of 1 m. With stable stratification of the surface layer, the temperature difference between

the surface and a depth of 1 m can reach several degrees. Conversely, with a pronounced upper mixed layer, this circumstance does not play a role – the temperature in the UML is practically uniform vertically. This can be seen at all “October” stations in both 1991 and 2018. Another drawback of the model is the lack of a complete equation for density convection. Instead, a so-called “convective adjustment” is used, which is triggered when the density of water in the upper cell becomes greater than that in the lower cell. The model then automatically equates the temperature to the average value for both calculation cells. This procedure is justified for small vertical cell sizes. With large dimensions, a situation may arise where, under natural conditions, convective mixing has not reached a depth corresponding to the dimensions of the lower cell, but the temperature in it is already considered average for the two cells. An example of such a situation is shown in Fig. 7.

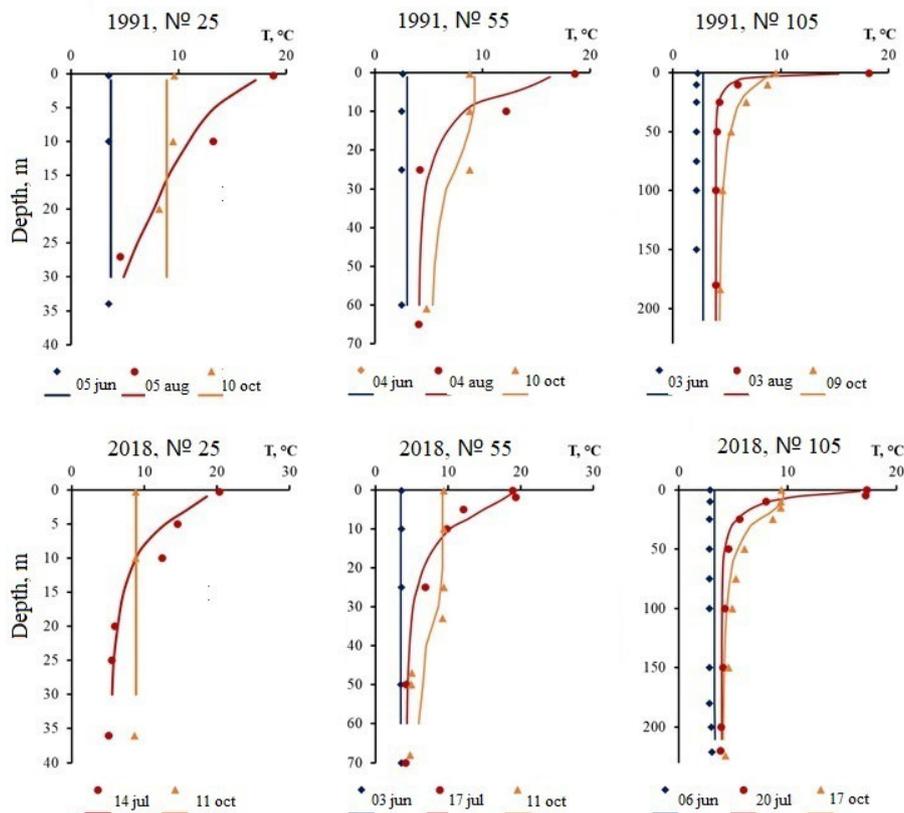


Fig.6. Calculated (lines) and measured (symbols) vertical temperature profiles in Lake Ladoga for different stations.

3.3. Thermal bar (thermobar)

One of the “hallmarks” of freshwater bodies is the thermobar, a vertically oriented frontal zone that occurs when the water mass is heated/cooled to temperatures close to the maximum density temperature $T_{\max} = 3.98$ °C. The nature of the thermobar is as follows. In spring, when the water begins to warm up, the shallow coastal zone of the reservoir warms up faster than the deep-water zone away from the shore. The temperature field becomes horizontally heterogeneous. Due to the peculiarity of the equation of state of fresh water – the presence of a maximum density temperature – the density stratification on both sides of the maximum density isotherm behaves differently: stable density stratification is observed in the shallow zone and unstable stratification in the deep zone, where at a water temperature $T < T_{\max}$, density convection develops with a strong downward current in a narrow strip between the zones. The corresponding frontal boundary of the division is called a thermal bar. As the water body warms up, the thermal bar shifts toward the deep water zone. This process continues until the temperature of the cold deep water zone reaches T_{\max} . A similar phenomenon can be observed in autumn: the shallow coastal zone cools faster than the deep water zone. Its temperature drops below the maximum density temperature earlier. Further cooling of the lake, while maintaining the thermal convective regime in the deep water zone, leads to the formation of hydrostatically stable stratification in shallow water.

As a frontal zone, the thermobar slows down the exchange processes between coastal and deep-water masses, thereby exerting a significant influence on THD processes and the ecological state of the water body. It is precisely because of the thermobar that biogenic elements accumulate in coastal areas, ensuring high biological productivity. On the other hand, the thermobar

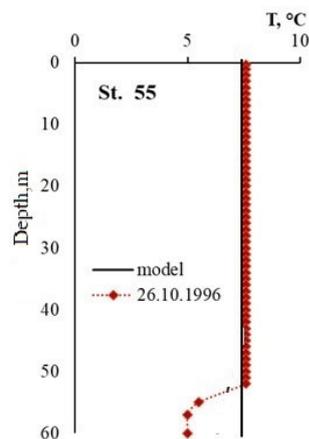


Fig.7. Example of incorrect reproduction of the temperature profile in the near bottom zone at station 55 on October 26, 1996. Symbols – sounding data, black line – calculation according to the model.

contributes to the accumulation of pollutants in shallow water areas, which worsens their ecological condition. Thus, the thermobar plays an important role in both THD processes and ecological processes in water bodies. The fact that the physics of thermobar is related to the temperature of maximum water density makes its identification in space and time quite convenient. To determine the time of formation and degradation of the thermobar, as well as its distribution across the water area, it is necessary to determine the location of the 4-degree isotherm on the surface of the water body based on contact measurements or using remote sensing methods. In addition, in the modeling of lake systems, the ability of the model to correctly reproduce the thermobar is a good criterion for its quality.

Figure 8 shows the results of determining the position of the thermobar based on the results of modeling and processing satellite images.

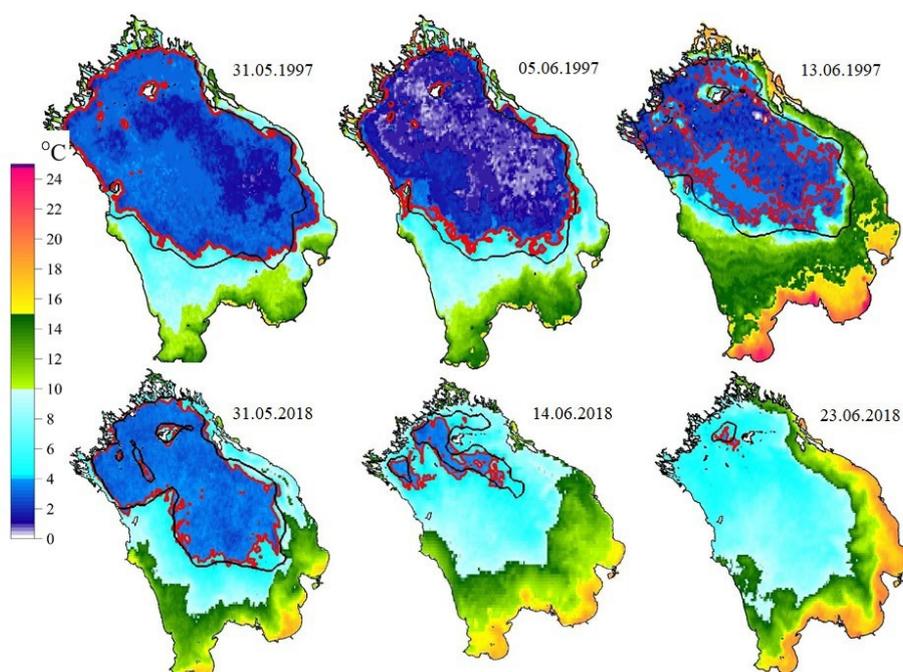


Fig.8. Distribution of the thermal bar in Lake Ladoga in the spring and early summer of 1997 and 2018. The red line shows the thermal bar position based on satellite images; the black line shows the model calculation. The color scale shows the water temperature (°C).

The data in Fig. 8 show that the model reproduces the distribution of thermobar across the lake area in a qualitatively and quantitatively satisfactory manner. The position of the front in the deep northern part of the lake almost exactly coincides with remote sensing data. This is quite understandable. At great depths, the water mass warms up very slowly, as a result of which the thermobar forms late. The differences observed in the shallower areas of the lake are explained by the fact that the formation and movement of the thermobar is determined not only by the proximity of the water temperature to the maximum density temperature, but also largely by the topography of the bottom. In the model, the bottom relief of the lake is approximated by rectangular cells, which naturally introduces errors in the reproduction of the true relief, leading to differences between the model and remote sensing data.

Of particular interest is the dynamics of the temporal parameters of the frontal zone, namely, the start and end dates of the thermal bar in the lake, as well as its duration. Figure 9 shows the results of model calculations and satellite image interpretation, demonstrating the temporal variability of these parameters between 1994 and 2020. From 1990 to 1993, the Institute of Limnology's database does not contain satellite images of the surface of Lake Ladoga at the necessary points in time.

Based on the results of modeling and satellite imagery data, it is impossible to draw a definitive conclusion about the temporal dynamics of the parameters of the thermobar passing through the lake's water area. According to the results of satellite image processing, there is a slight negative trend in the start and end dates of the thermal bar. Modeling results did not reveal such trends. At the same time, the duration of the thermobaric passage through the lake area remains constant according to both satellite and model data. Thus, based on indirect evidence, there is no reason to speak of a warming of the regional climate during the

open water period, in contrast to the ice period, where ice index values tend to decrease.

4. Conclusion

This paper presents the results of adapting a three-dimensional mathematical model of the hydrodynamics of an inland sea to the conditions of Lake Ladoga, followed by its verification using field and remote measurements. Replacing atmospheric forcing led to a significant improvement in calculations of the ice situation in the lake. The long-term temporal dynamics of the relative ice index of Lake Ladoga (RICI) have been calculated. The negative trend in the dynamics of the index over the last 20 years indicates a softening of winter conditions in the Lake Ladoga region.

The verification results showed that the model adequately reproduces the vertical thermal structure of the lake water mass, with the exception of isolated cases when reproducing the temperature profile in the bottom layers under autumn-winter convection conditions. This shortcoming of the model can be eliminated either by using a full-fledged submodel describing convective mixing, which will complicate the already complex 3D model, or by changing the vertical resolution of the model, which will increase the computational costs of the calculations.

The results of the thermobar modelling—an important phenomenon both in terms of the thermohydrodynamics of the lake and the functioning of its aquatic ecosystem—were close to those obtained from the interpretation of satellite images.

In the future, it is planned to further use the model to study a wide range of thermohydrodynamic and ecological processes in Lake Ladoga. These include the formation, development, and degradation of upwelling/downwelling processes, the spread of tributary waters in the lake's water area, and the prediction of the consequences of possible man-made disasters,

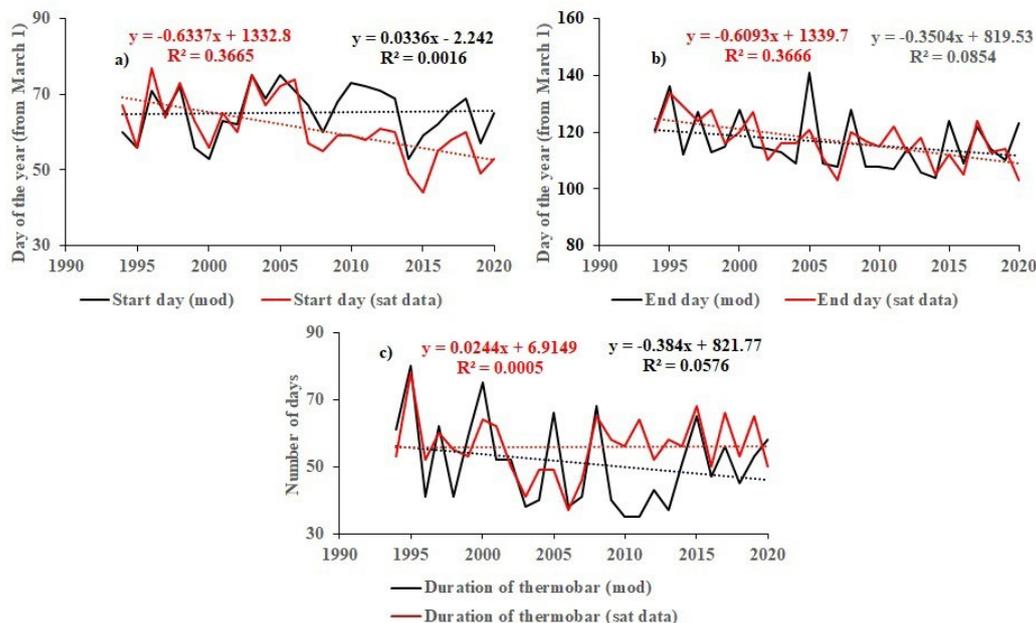


Fig.9. The start (a), end (b) and duration (c) of the thermal bar in Lake Ladoga in the period from 1994 to 2020. The modeling results are shown in black, and the results of satellite image interpretation are shown in red.

etc. In addition, it is expected that the MISH will be supplemented with appropriate modules to describe chemical and biological processes, which will allow it to be used as a model of the lake's ecosystem.

Acknowledgements

The study supported by grants from the Russian Science Foundation (project No. 23-17-20010) and the St. Petersburg Science Foundation (project No. 23-17-20010)

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests

References

- Astrakhancev G.P., Rukhovec L.A. 1986. Discrete hydrothermodynamic model of climatic circulation in a deep lake. *Vychislitel'nye protsessy i sistemy [Computational Systems and Processes]* 4: 135–178. (in Russian)
- Astrakhancev G.P., Egorova N.B., Rukhovec L.A. 1987. Numerical modeling of the year-round circulation of deep lakes. *Doklady AN SSSR [Reports of the Academy of Sciences of the USSR]* 296: 1331–1334. (in Russian)
- Astrakhancev G.P., Menshutkin V.V., Pisulin I.V. et al. 1992. Mathematical model for studying the reaction of the Ladoga Lake ecosystem to changes in anthropogenic load. SPb.: Preprint of the Association of Scientists "Future of SPb". (in Russian)
- Astrakhancev G.P., Menshutkin V.V., Petrova N.A. et al. 2003. Modeling of ecosystems of large stratified lakes. SPb.: Nauka. (in Russian)
- Chen C.T.A., Millero F.J. 1986. Precise thermodynamic properties for natural waters covering only the limnological range. *Limnology and Oceanography* 31: 657–662. DOI: [10.4319/lo.1986.31.3.0657](https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.3.0657)
- Filatov N.N., Balagansky A.F. 2021. Estimation of water balance elements. In: Kondratyev S.A., Pozdnyakov Sh.R., Rumyantsev V.A. (Eds.). *Current state and problems of anthropogenic transformation of the Ladoga Lake ecosystem under changing climate conditions*. Moscow, pp. 177–182. (in Russian)
- Filatov N.N., Rumyantsev V.A. 2021. Water level variability and its forecasting. In: Kondratyev S.A., Pozdnyakov Sh.R., Rumyantsev V.A. (Eds.). *Current state and problems of anthropogenic transformation of the Ladoga Lake ecosystem under changing climate conditions*. Moscow, pp. 182–193. (in Russian)
- Hibler W. 1980. Modeling a variable thickness sea ice cover. *Monthly Weather Review* 1: 1943–1973. DOI: [10.1175/1520-0493\(1980\)108<1943:MAVTSI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1980)108<1943:MAVTSI>2.0.CO;2)
- Ibrayev R.A. 2001. Model of enclosed and semi-enclosed sea hydrodynamics. *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling* 16(4): 291–304. DOI: [10.1515/rnam-2001-0404](https://doi.org/10.1515/rnam-2001-0404)
- Ibraev R.A. 2008. Mathematical modeling of thermo-hydrodynamic processes in the Caspian Sea. M.: Geos. (in Russian)
- Ibrayev R.A., Trukhchev D.I. 1998. Model study of the seasonal variability of the Black Sea circulation. NATO TU-Black Sea project ecosystem modeling as a management tool for the Black Sea, symposium on scientific results. Kluwer Academic Publishers 2: 212–217.
- Karetnikov S.G., Naumenko M.A. 2013. Ice regime. In: Rumyantsev V.A., Kondrat'ev S.A. (eds.). *Ladoga*. SPb., pp. 152–163. (in Russian)
- Lake Ladoga. Atlas. 2002. In: Rumyantsev V.A. (Ed.) SPb.: Russian Academy of Sciences. Institute of Limnology RAS. (in Russian)
- Launiainen J., Vihma T. 1990. Derivation of turbulent surface fluxes – an iterative flux-profile method allowing arbitrary observing heights. *Environmental Software* 5: 113–124. DOI: [10.1016/0266-9838\(90\)90021-W](https://doi.org/10.1016/0266-9838(90)90021-W)
- Marshall J., Adcroft A., Hill C. et al. 1997. A finite-volume, incompressible Navier Stokes model for studies of the ocean on parallel computers. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 102: 5753–5766. DOI: [10.1029/96JC02775](https://doi.org/10.1029/96JC02775)
- Menshutkin V.V., Rukhovec L.A., Filatov N.N. 2013. State and prospects of development of modeling of freshwater lake ecosystems. Use of models for solving problems of preservation of their water resources. SPb.: Nestor history. (in Russian)
- Munk W.H., Anderson E.R. 1948. Note on theory of the thermocline. *Journal of Marine Research* 7: 276–295. URL: https://elischolar.library.yale.edu/journal_of_marine_research/667
- Smagorinsky J., Manabe S., Holloway J.I. 1965. Numerical results from a nine level general circulation model of the atmosphere. *Monthly Weather Review* 93: 727–768. DOI: [10.1175/1520-0493\(1965\)093<0727:NRFANL>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1965)093<0727:NRFANL>2.3.CO;2)
- Ushakov K.V., Ibraev R.A. 2018a. Investigation of inter-annual variability and heat budget of an eddy-resolving numerical model reproducing tropical instability waves in the Pacific Ocean. *Meteorologiya i gidrologiya [Meteorology and Hydrology]* 11: 110–120. (in Russian)
- Ushakov K.V., Ibrayev R.A. 2018b. Assessment of mean world ocean meridional heat transport characteristics by a high-resolution model. *Russian Journal of Earth Sciences* 18: ES1004. DOI: [10.2205/2018ES000616](https://doi.org/10.2205/2018ES000616)
- Zakharov M.Yu., Lupyan E.A., Mazurov A.A. 1993. NOAA satellite series AVHRR instrument data processing program for personal computers. *Earth Exploration from Space* 4: 62–68. (in Russian)

Термогидродинамические процессы в Ладожском озере: верификация 3D модели

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Зверев И.С.^{1,2}, Каретников С.Г.¹, Поздняков Ш.Р.³, Голосов С.Д.^{1,2,*}

¹Институт озероведения РАН – СПб ФИЦ РАН, ул. Севастьянова, 9, Санкт-Петербург, 196105, Россия

²Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Нахимовский проспект, 36, Москва, 117997, Россия

³Санкт-Петербургское отделение РАН, Университетская набережная, 5, Санкт-Петербург, 199034, Россия

АННОТАЦИЯ. Представлены результаты адаптации к условиям Ладожского озера трехмерной математической модели гидродинамики внутреннего моря с последующей ее верификацией по данным натурных и дистанционных измерений. При адаптации построена сферическая расчетная сетка типа *B* с пространственным разрешением 1 км × 1 км. Уравнение состояния морской воды заменено на уравнение слабоминерализованной воды с максимумом плотности при температуре, близкой к 4 °С. Реализована процедура расчета поступления тепла и растворенных веществ в озеро через жидкие границы с водами притоков. Учет сток реки Невы. Атмосферный форсинг из реанализа NCEP/NCAR с пространственным разрешением 2,5° × 2,5° заменен на европейский аналог ERA5 с разрешением 0,25° × 0,25°. Верификация новой версии модели выполнена для трех районов озера - южного мелководного (≤ 40 м), центрального (~50 м) и северного глубоководного с глубинами до 230 м. Для оценки влияния климатических изменений на термогидродинамические процессы расчеты проводились с 1990 по 2020 г. Для верификации использовались как данные контактных измерений Института озероведения РАН, так и снимки со спутников NOAA и MODIS Terra/Aqua. Результаты верификации показали, что модель адекватно воспроизводит основные особенности термогидродинамических процессов в Ладожском озере, а именно: вертикальную термическую структуру водной массы озера, начало формирования и распространения вертикальной фронтальной зоны - термобара. Учет вод притоков позволяет проследить их дальнейшее распространение в озере. Замена атмосферного форсинга привела к значительному улучшению расчетов ледовой обстановки в озере. Результаты верификации новой версии модели следует признать удовлетворительными. Также отмечены и недостатки модели.

Ключевые слова: Ладожское озеро, термогидродинамические процессы, 3D математическое моделирование, профиль температуры, ледовитость, термобар, спутниковая информация

Для цитирования: Зверев И.С., Каретников С.Г., Поздняков Ш.Р., Голосов С.Д. Термогидродинамические процессы в Ладожском озере: верификация 3D модели // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1249-1267. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1249

1. Введение

Одной из основных проблем современной лимнологии является адекватная оценка механизмов изменчивости термогидродинамических (ТГД) процессов в озерах, а также представление об их будущих изменениях, связанных с глобальными и региональными изменениями климата. Термогидродинамические процессы во многом определяют условия функционирования водной экосистемы, влияя тем самым на качество воды в водоемах. Одним из эффективных методов исследования ТГД процессов является математическое моделирование.

Ввиду большой пространственной протяженности Ладожского озера (~ 250 × 130 км), наличия в нем резких перепадов глубин (максимальная глубина ~ 230 метров), сопряженных с высокой степенью изрезанности береговой линии, ТГД процессы в озере имеют ярко выраженную пространственно-временную неоднородность. Поэтому для их моделирования недостаточно применения широко распространенного в лимнологии одномерного подхода (см, например, модель FLake, www.lakemodel.net), в рамках которого считается, что вертикальная изменчивость процессов превалирует над горизонтальной. Для корректного воспроизведения ТГД

*Автор для переписки. Адрес e-mail: sergey.golosov@mail.ru (С.Д. Голосов)

Поступила: 24 сентября 2025;

Принята после доработки: 07 ноября 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



процессов в Ладоге необходимо применение 3D (трехмерного) подхода, который изначально получил широкое распространение в метеорологии и океанологии, а затем и в лимнологии. К настоящему времени количество трехмерных математических моделей, разработанных специально для озер, либо океанских моделей, адаптированных к озерным условиям, является весьма значительным. Подробное описание истории применения трехмерного подхода в моделировании разнотипных озер приведено в монографии Меншуткина В.В. (Меншуткин и др., 2013).

Среди озерных трехмерных моделей, специально разработанных для Ладожского озера, в первую очередь необходимо отметить модель Санкт – Петербургского Экономико- Математического Института РАН (Астраханцев и др., 1986; 1987; 1992; 2003), которая небезуспешно применялась для решения ТГД и экологических задач для Ладожского и Онежского озер. Самым большим недостатком данной модели является то, что в ней отсутствует учет непосредственного воздействия атмосферы на озеро. Тепловой поток через свободную поверхность озера не рассчитывается из уравнения теплового баланса, а оценивается из прямых оценок изменения теплосодержания озера. Последнее существенно ограничивает применимость модели при решении задач о влиянии изменчивости регионального климата на ТГД процессы в озерах и их экологическое состояние. Кроме того, недостаточное пространственное разрешение модели не позволяло воспроизводить весь спектр гидрофизических процессов в озере. В настоящее время ввиду реорганизации научной группы-разработчиков, данная модель недоступна для использования в дальнейших исследованиях Ладожского озера.

В последние годы все большее распространение (по крайней мере, в Российской Федерации) получает математическая модель гидродинамики внутреннего моря (МГВМ), разработанная в Институте вычислительной математики РАН (Ибраев, 2001; 2008). МГВМ изначально была предназначена для воспроизведения ТГД процессов в Каспийском море (Ибраев, 2008). Позднее она была доработана для исследований циркуляции в Мировом океане и его бассейнах (Ушаков и Ибраев, 2018; Ushakov and Ibrayev, 2018).

По сравнению с океаном внутренние моря обладают рядом особенностей, которые необходимо учитывать при их моделировании (Ибраев, 2008). Так важным элементом ТГД внутренних морей является наличие в них внутри- и межгодовой изменчивости уровня поверхности воды как реакции водоема на ненулевой водный баланс. Кроме того, во внутреннем море важен обмен водами через жидкие боковые границы (приток и сток рек), что влияет на формирование термического режима и химического состава основной водной массы. Также важной особенностью внутренних морей является то, что в них на глобальную (бассейновую) циркуляцию накладываются движения меньших простран-

ственно-временных масштабов – синоптических и топографических, что требует описания в модели всего спектра движений. Последнее требует построения для внутренних морей сеток более высокого пространственного разрешения.

В настоящей работе из соображений схожести Ладожского озера по перечисленным выше признакам с внутренним морем (Филатов и Балаганский, 2021; Филатов и Румянцев, 2021) предпринята попытка адаптации к условиям пресноводного Ладожского озера первой версии МГВМ, прошедшей успешную апробацию на Каспийском море, а также приводятся результаты ее верификации по данным натурных наблюдений на Ладожском озере и доступной спутниковой информации.

2. Материалы и методы

В МГВМ система трехмерных уравнений термогидродинамики внутреннего моря аппроксимируется в приближениях гидростатики и Буссинеска на сферической сетке типа *B* методом конечных объемов в вертикальных *z* – координатах (Marshall et al., 1997). В модели осуществлен переход от условия «жесткой крышки» к описанию свободной поверхности моря, что позволяет описывать распространение быстрых баротропных движений, а также изменчивость уровня воды в море в зависимости от изменчивости водного баланса (Ибраев, 2008). Основные характеристики модели приведены в Таблице 1.

Таким образом из данных Таблицы 1 следует, что в процессе адаптации МГВМ к условиям Ладожского озера в модель были внесены следующие изменения:

- построена сферическая расчетная сетка типа *B* высокого пространственного разрешения ($\approx 1\text{ км} \times 1\text{ км}$);
- уравнение состояния морской воды заменено на уравнение состояния слабоминерализованной воды, учитывающее наличие максимума плотности при температуре близкой к $4\text{ }^\circ\text{C}$;
- реализована процедура расчета поступления через жидкие границы тепла и растворенных веществ в озеро с водами притоков, а также сток р. Невы;
- атмосферный форсинг из реанализа NCEP/NCAR с пространственным разрешением $2,5^\circ \times 2,5^\circ$ заменен на европейский аналог ERA5 с более высоким разрешением $0,25^\circ \times 0,25^\circ$.
- в модели формирования морского льда использованы параметры пресной воды (плотность, температура замерзания, скрытая теплота плавления льда, теплоемкость льда). Соленость морского льда заменена на минерализацию пресной воды.

Расчеты проводились для всей акватории озера на период с 1990 по 2020 гг., но верификация производилась для трех районов – северного (с глубинами более 200 метров, район станции 105),

центрального (50 – 60 метров, район станции 55) и мелководного южного с глубинами до 40 метров (район станции 25). На Рис. 16 представлено расположение станций, выбранных для верификации модели. Данные станции были выбраны для верификации так как они включены в программу обязательных полевых исследований Института озераведения РАН с середины 60-х годов прошлого века. За эти годы по этим станциям накоплен значительный фактический материал.

Для верификации модели использовались данные вертикального термического зондирования в период открытой воды, а также круглогодичные данные спутниковых наблюдений за ледовой обстановкой и пространственным распределением поверхностной температуры воды в Ладожском озере в период с 1990 по 2020 гг.

Для верификации МГВМ в части качества воспроизведения ледовых условий и термобара использовались снимки, полученные со спутников серии NOAA, (<https://www.class.ngdc.noaa.gov>) и MODIS Terra/Aqua [<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>]. Все перечисленные спутники оснащены многоспектральной аппаратурой высокого пространственного разрешения (AVHRR), позволяющей рассчитывать температуру поверхности воды. Частота пролетов спутников над акваторией Ладожского озера – несколько раз в сутки. Для верификации модели в работе использовались снимки, полученные в светлое время суток при отсутствии облачности над акваторией озера. Для уменьшения атмосферной коррекции выбирались снимки с надирным расположением объекта на снимке. Учет атмосферного влияния на тепловое излучение поверхности воды осуществлялось по методике ИКИ РАН, использующей различие в атмосферном влиянии на прохождение теплового излучения от подстилающей поверхности в различных участках теплового спектрального диапазона (Захаров и др., 1993).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Атмосферный форсинг и ледовые условия в озере.

В качестве исходной метеорологической информации в МГВМ изначально использовались данные реанализа NCEP/NCAR (совместный проект Национальных Центров Предсказания

Таблица 1. Основные характеристики МГВМ.

Название модели	Модель гидродинамики внутреннего моря (МГВМ)
Поле глубин*	Данные института озераведения РАН
Горизонтальная сетка	Сферическая сетка <i>B</i> (Marshall et al., 1997)
Горизонтальное разрешение*	$\Delta\varphi = 0.54'$, $\Delta\lambda = 1.08'$ ($\approx 1\text{ км} \times 1\text{ км}$)
Вертикальная сетка	<i>z</i> -координата
Вертикальное разрешение*	$\Delta z = 2\text{ м}$ при $0 \leq z < 5$ $\Delta z = 2.5\text{ м}$ при $5 \leq z < 10$ $\Delta z = 5\text{ м}$ при $10 \leq z < 40$ $\Delta z = 10\text{ м}$ при $40 \leq z < 50$ $\Delta z = 25\text{ м}$ при $50 \leq z < 225$
Параметризация вертикальной турбулентности	Схема Манка-Андерсона (Munk and Anderson, 1948)
Параметризация горизонтальной турбулентности для импульса	Схема Смагоринского (Smagorinsky et al., 1965)
Схема горизонтальной турбулентности для <i>T</i> и <i>S</i>	$K_h = \text{const} = 5\text{ м}^2/\text{с}$
Метод решения	Решение делится на две части - решение 3D уравнений для бароклинных движений и решение 2D уравнений мелкой воды для баротропных движений. (Brayev, 2001).
Конвекция	Конвективное «приспособление»
Уравнение состояния*	(Chen and Millero, 1986)
Напряжение трения ветра	По статье (Launiainen and Vihma, 1990)
Потоки тепла на поверхности озера:	Из реанализа ERA5
1) Коротковолновая радиация*	
2) Длинноволновая радиация:	Из реанализа ERA5
а) входящая*	Закон Стефана-Больцмана
б) исходящая	
3) Явный поток тепла	По статье (Launiainen and Vihma, 1990)
4) Скрытый поток тепла	По статье (Launiainen and Vihma, 1990)
Донное трение	Параметризация донного трения (Brayev and Trukhchev, 1998)
Модель льда*	Модель морского льда Хиблера (Hibler, 1980), отсутствие дрейфа льда. В расчетах формирования льда использовались параметры пресной воды (плотность, температура замерзания, скрытая теплота плавления льда, теплоемкость льда). Соленость морского льда заменена на минерализацию пресной воды.
Реки*	Заданные объемные расходы, потоки тепла и соли из выпадающих рек.
Шаг по времени	300 с
Время расчета 1 модельного года на ноутбуке в конфигурации Intel Core I5 2.6GHz x 4 при указанных параметрах расчетной сетки	8 ч

Примечание: * - параметры и схемы, измененные при адаптации МГВМ к условиям Ладожского озера

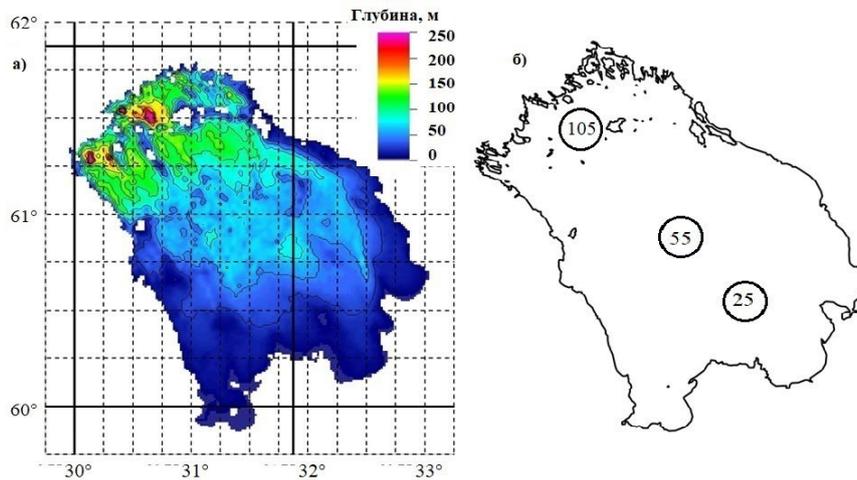


Рис.1. (а) – топография дна Ладожского озера, использованная при расчетах, и покрытие акватории Ладожского озера сетками реанализов NCEP/NCAR (сплошные линии) и ERA5 (пунктирные линии). (б) – расположение районов станций наблюдения, выбранных для верификации модели.

окружающей среды (NCEP) и Атмосферных Исследований (NCAR), США), (www.cdc.noaa.gov). Данные этого реанализа представлены на регулярной сетке широт и долгот 2,5 градуса, что не позволяет учесть пространственную неоднородность метеорологических параметров над акваторией озера. В качестве альтернативы реанализу NCEP/NCAR для моделирования атмосферного воздействия на озеро был взят реанализ ERA5 Европейского центра среднесрочного прогнозирования погоды (ECMWF). ERA5 – это реанализ пятого поколения ECMWF, представляющий собой дальнейшую модернизацию хорошо зарекомендовавшего себя реанализа глобального климата и погоды за последние десятилетия ERA Interim. Пространственное разрешение реанализа ERA5, использованного в настоящей работе, составляет 0,25° на регулярной сетке широт и долгот. На Рис. 1а показано покрытие акватории Ладожского озера сетками обоих реанализов.

Замена атмосферного воздействия на озеро была вызвана прежде всего тем, что расчеты по

модели показали неудовлетворительное воспроизведение ледовых условий при использовании реанализа NCEP/NCAR. Связано это в первую очередь с занижением температуры воздуха в зимние месяцы по сравнению с данными метеостанции. В качестве примера на Рис. 2 приведено сравнение данных обоих реанализов с данными метеонаблюдений в бухте Петрокрепость в различные сезоны года. Там же показаны результаты расчета толщины льда по данным реанализов в той же бухте. Очевидно сильное занижение температуры воздуха реанализом NCEP/NCAR в зимние месяцы, что отражается на расчете толщины льда, которая по данным наблюдений колеблется в бухте от 0,5 до 0,7 м (Ладожское озеро. Атлас, 2002).

Ввиду сложных гидрометеорологических условий на Ладожском озере в период ледостава контактные наблюдения в акватории озера не проводятся. Ледовая обстановка оценивается либо по наблюдениям на береговых метеостанциях, либо по данным дистанционного зондирования. На Рис. 3

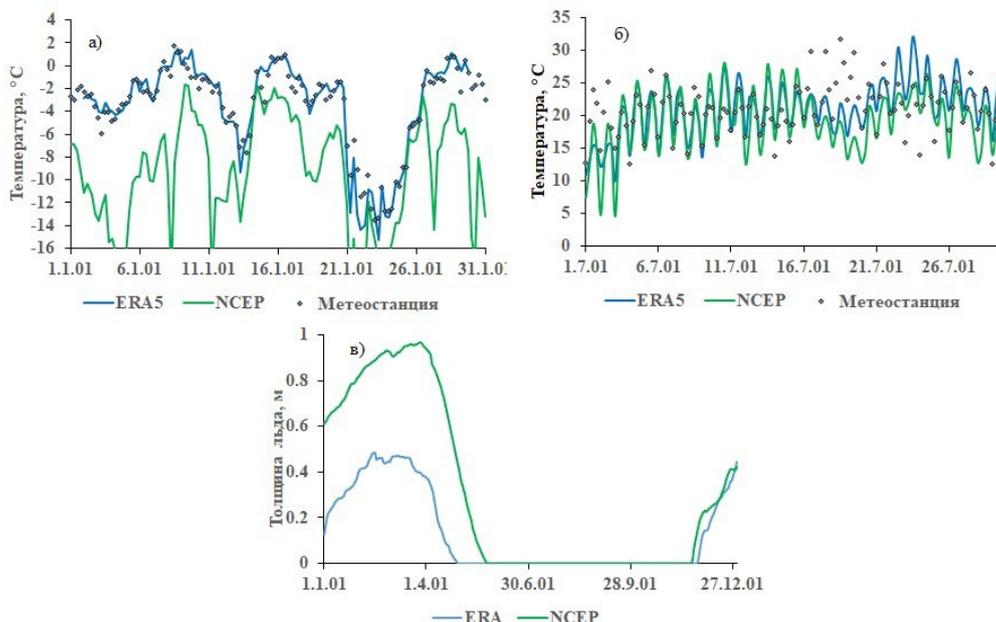


Рис.2. Температура воздуха зимой и летом 2001 года в бухте Петрокрепость в соответствии с данными метеорологических реанализов (а) и (б), и сезонная изменчивость толщины льда по данным моделирования (в).

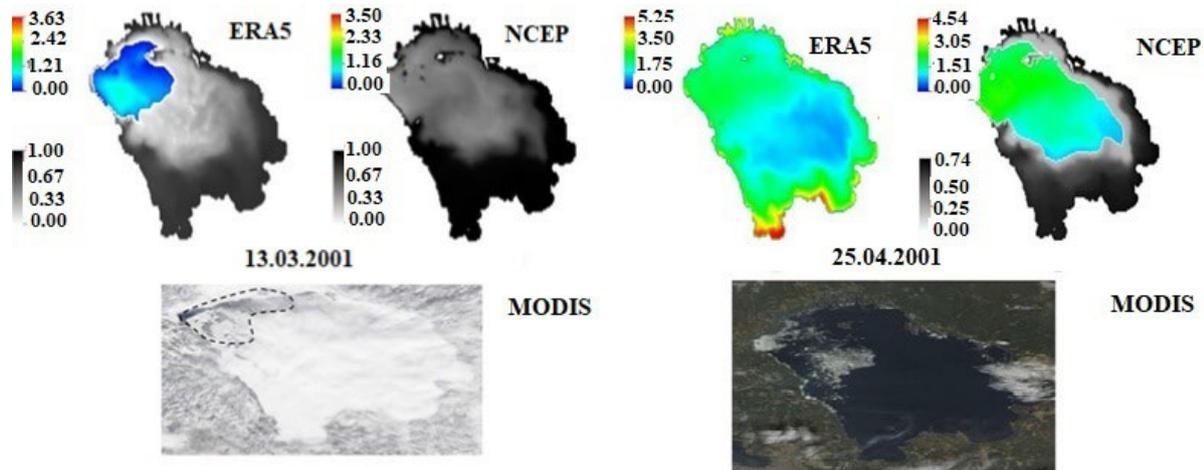


Рис.3. Температура поверхности воды (°C) - цветная область и толщина льда (м) – черно-белая область 13 марта и 25 апреля 2001 года, рассчитанные по данным реанализов NCEP/NCAR, ERA5, а также изображения поверхности озера, полученные со спутника Modis. Пунктирная линия – положение кромки льда по спутниковому изображению.

представлены примеры верификации МГВМ по спутниковым данным о временной динамике ледового покрова на Ладожском озере в 2001 году. Расчеты по модели были выполнены с двумя атмосферными форсингами. Как уже отмечалось выше, реанализ NCEP с грубой для озерных масштабов 2,5 градусной сеткой крайне неудовлетворительно воспроизводит ледовые процессы в озере. Данные Рис. 3 это подтверждают. Так по состоянию на 13 марта по спутниковым данным и по расчетам с использованием реанализа ERA5 северная часть озера еще свободна ото льда, тогда как расчет с реанализом NCEP показывает, что озеро полностью покрыто льдом. То же происходит и с расчетом таяния льда. По состоянию на 25 апреля спутниковые данные и расчет по ERA5 демонстрируют свободную ото льда поверхность озера. Расчет же с реанализом NCEP оставляет подо льдом добрую половину озера. Соответственно и сроки таяния льда на озере сдвигаются на июнь, чего никогда не было за всю историю наблюдений на Ладожском озере.

При этом расчет с ERA5 как минимум качественно совпадает со спутниковой информацией. На Рис. 4 представлены результаты оценки степени покрытия льдом поверхности озера по спутниковым и модельным данным в виде многолетней динамики относительного индекса ледовитости Ладожского озера RICI, предложенного в работе (Каретников и Науменко, 2013). Индекс представляет собой отношение суммарной площади под кривой изменения ледовитости озера за конкретный зимний сезон к площади, ограниченной медианными значениями, рассчитанными по данным всех имеющихся наблюдений.

Обращает на себя внимание практически систематическое расхождение в оценке минимальных значений индекса RICI между спутниковыми и модельными данными, тогда как максимальные значения близки по своей величине. Такого рода различия в оценках могут быть связаны с различиями между минимальным порогом чувствительности методики дешифрирования снимков и

заданием минимального значения толщины льда в модели. В модели минимальная толщина льда может быть задана сколь угодно малым числом, тогда как методика дешифрирования предполагает определение наличия/отсутствия льда по цветовой гамме подстилающей поверхности на снимке. В том случае, если подстилающая поверхность представляет собой ледовое поле тонкого прозрачного льда, то при дешифрировании она идентифицируется как вода. Поэтому в модели ледовый покров в начале ледостава занимает большую площадь по сравнению со спутниковыми данными. Результаты модельного численного эксперимента, выполненного с увеличенным значением минимальной толщины льда (5 см), представлены на Рис. 4 пунктирной линией. Данные эксперимента показали, что расхождения в значениях индексов RICI, полученных по модели и при дешифрировании снимков значительно снизились.

Кроме того, изменчивость RICI может служить косвенным показателем климатических изменений в регионе в зимний период. На Рис. 4 сложно выделить какие-либо значимые тенденции во временной динамике индекса. Однако, разбиение рассматри-

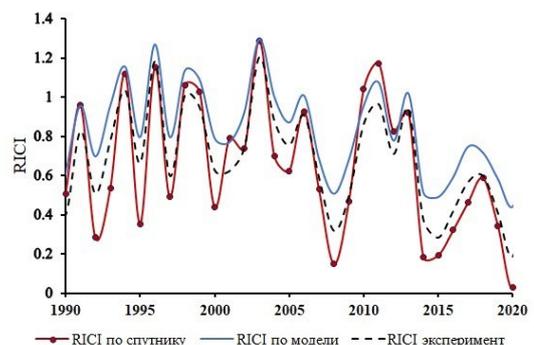


Рис.4. Многолетняя изменчивость индекса ледовитости Ладожского озера. Красная линия с маркерами – данные спутниковых снимков, сплошная синяя линия – результаты моделирования, пунктирная линия – результаты экспериментального расчета.

ваемого временного интервала на части позволяет сделать заключение, что приблизительно с начала 2000-х годов во временной динамике RICI прослеживается тенденция к снижению, т.е. ледовитость Ладожского озера уменьшается. Последнее свидетельствует о потеплении регионального климата в зимний период. На Рис. 5 представлены результаты временной динамики RICI в периоды с 1990 – 2002 и 2002 – 2020 гг., полученные по модели и при дешифрировании спутниковых снимков.

Таким образом соответствие между спутниковыми и модельными данными, по меньшей мере, в степени покрытия поверхности озера льдом представляется удовлетворительным.

3.2. Вертикальная термическая структура озера

При сравнении результатов моделирования с данными натурных наблюдений необходимо иметь в виду, что измеренные профили температуры не могут быть получены в точке с одними и теми же строго зафиксированными географическими координатами. Это связано со спецификой выполнения измерений с борта научного судна, которое в силу различных причин (ошибка определения координат точки измерения, дрейф судна во время работы и др.) не может быть абсолютно точно позиционировано в одном и том же месте в различные даты. Разброс в координатах точек измерения невелик, но может достигать сотен метров, что по масштабам всего озера немного. Тем не менее учитывая сложный рельеф дна озера, даже небольшой разброс в координатах станции может приводить к разбросу в глубине места измерения. Поэтому при сравнении данных моделирования с натурными данными уместно говорить о воспроизведении моделью вертикального распределения температуры не на строго определенной станции наблюдений, а в ее районе.

Для оценки качества воспроизведения МГВМ вертикальной термической структуры в Ладожском озере в различные сезоны года из имеющихся в базе данных Института озероведения были выбраны годы с наибольшей обеспеченностью натурными наблюдениями. При этом необходимо отметить, что все наблюдения относятся к периодам открытой воды. Зимние наблюдения ввиду сложной ледовой обстановки на озере не проводились. На

Рис. 6 представлены результаты расчетов вертикальных распределений температуры воды в озере для выбранных трех станций во время летнего прогрева озера (июнь – август) и развитой осенней конвекции (октябрь) в начале и в конце всего периода расчетов.

Несмотря на общее удовлетворительное совпадение между рассчитанными и измеренными профилями, тем не менее необходимо отметить, что модель лучше всего воспроизводит профиль температуры на всех станциях в те моменты, когда в озере присутствует выраженный верхний перемешанный слой (ВПС) ветрового либо конвективного происхождения. В тех случаях, когда водная масса в верхних слоях устойчиво стратифицирована модель дает заниженные значения температуры. Это может быть вызвано тем, что в модели не рассчитывается температура непосредственно на поверхности воды. Из-за особенностей построения расчетной сетки первое расчетное значение температуры приходится на глубину 1 м. При устойчивой стратификации приповерхностного слоя разница температур на поверхности и на глубине 1 м может достигать нескольких градусов. И наоборот, при выраженном верхнем перемешанном слое это обстоятельство роли не играет – температура в ВПС практически однородна по вертикали. Это прослеживается на всех «октябрьских» станциях как в 1991, так и в 2018 годах. Еще один недостаток модели заключается в отсутствии полноценного уравнения для плотностной конвекции. Вместо него используется т.н. «конвективное приспособление», которое срабатывает в том случае, когда плотность воды в верхней ячейке становится большей по сравнению с нижележащей. Тогда модель автоматически приравнивает температуру к среднему значению для обеих расчетных ячеек. Такая процедура оправдывает себя при малых вертикальных размерах ячеек. При больших размерах может сложиться ситуация, когда в природных условиях конвективное перемешивание не достигло глубины, соответствующей размерам нижней ячейки, а температура в ней уже считается средней для двух ячеек. Пример такой ситуации продемонстрирован на Рис. 7.

3.3. Термобар

Одной из визитных карточек пресноводных водоемов является термобар – вертикально ориен-

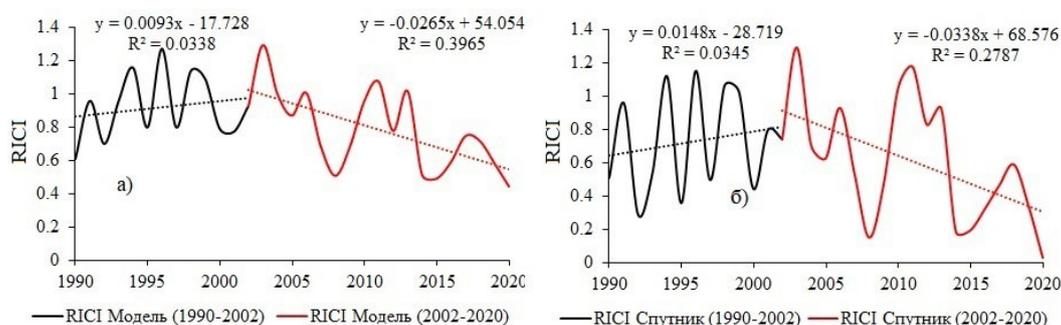


Рис.5. Изменчивость индекса ледовитости Ладожского озера RICI в различные периоды: а) – результаты моделирования, б) – данные спутниковых снимков.

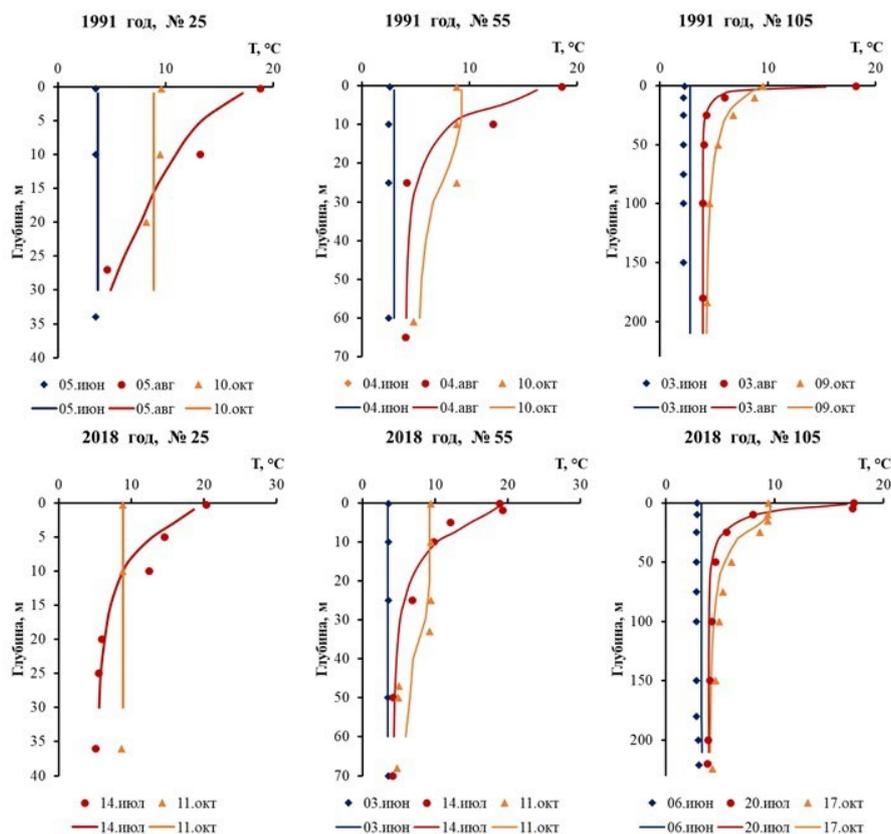


Рис.6. Рассчитанные (линии) и измеренные (символы) вертикальные профили температуры в Ладожском озере для разных станций.

тированная фронтальная зона, возникающая при прогреве/охлаждении водной массы до значений температуры, близкой к температуре максимальной плотности $T_{max} = 3,98$ °C. Природа термобара заключается в следующем. Весной, когда начинается прогрев воды, мелководная прибрежная зона водоема прогревается быстрее, чем удаленная от берега глубоководная зона. Температурное поле становится горизонтально неоднородным. Вследствие особенности уравнения состояния пресной воды – наличия температуры максимальной плотности – стратификация плотности по обе стороны от изотермы максимальной плотности ведет себя по-разному: устойчивая плотностная стратификация наблюдается в мелководной зоне и неустойчивая стратификация в глубоководной, где при температуре воды $T < T_{max}$ развивается плотностная конвекция с сильным нисходящим течением в узкой полосе между зонами. Соответствующая фронтальная граница раздела называется термическим баром. В процессе прогрева водоема область термобара смещается в сторону глубоководной зоны. Этот процесс продолжается до тех пор, пока температура холодной глубоководной зоны достигает значения T_{max} . Аналогичное явление можно наблюдать осенью: мелководная прибрежная зона охлаждается быстрее, чем глубоководная. Ее температура опускается ниже температуры максимума плотности раньше. Дальнейшее охлаждение озера, сохраняя тепловой конвективный режим в глубоководной зоне, приводит к образованию гидростатически устойчивой стратификации на мелководье.

Являясь фронтальной зоной, термобар замедляет обменные процессы между прибрежными и глубоководными водными массами, оказывая тем самым большое влияние на ТГД процессы и экологическое состояние водоема. Именно из-за термобара происходит накопление в прибрежных районах биогенных элементов, что обеспечивает высокую биологическую продуктивность. С другой стороны, термобар способствует накоплению загрязняющих

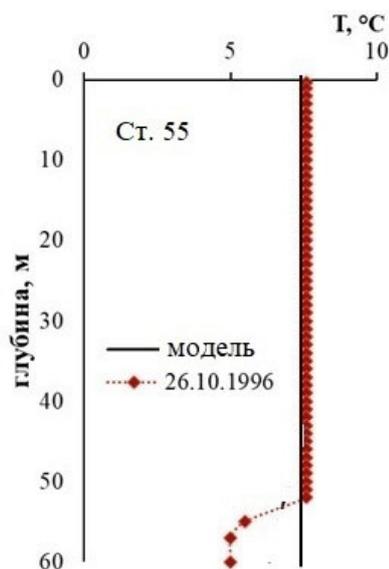


Рис.7. Пример некорректного воспроизведения профиля температуры в придонной области на ст. 55 26.10.1996 г. Символы – данные зондирования, черная линия – расчет по модели.

веществ в мелководных районах, что ухудшает их экологическое состояние. Таким образом, термобар играет важную роль как в ТГД, так и в экологических процессах в водоемах. То, что физика термобара связана с температурой максимальной плотности воды, делает его идентификацию в пространстве и времени достаточно удобной. Для определения времени зарождения и деградации термобара, а также его распространения по акватории необходимо определить местоположение 4-х градусной изотермы на поверхности водоема по данным контактных измерений или с использованием дистанционных методов зондирования. Кроме того, в моделировании озерных систем способность модели правильно воспроизводить термобар является хорошим критерием ее качества.

На Рис. 8 представлены результаты определения положения термобара по результатам моделирования и обработки спутниковых изображений.

Из данных Рис. 8 следует, что модель качественно и количественно удовлетворительно воспроизводит распространение термобара по акватории озера. Положение фронта на глубоководном севере озера практически точно совпадает с данными дистанционного зондирования. Это вполне объяснимо. На больших глубинах водная масса прогревается очень медленно, вследствие чего термобар формируется поздно. Различия, наблюдающиеся в более мелководных районах озера, объясняются тем, что формирование и продвижение термобара определяется не только близостью температуры воды к температуре максимальной плотности, но и во многом топографией дна. В модели рельеф дна озера аппроксимируется прямоугольными ячейками, что естественным образом вносит свои ошибки в воспроизведение истинного рельефа, что и приводит к различиям в модельных и дистанционных данных.

Отдельный интерес представляет динамика временных параметров фронтальной зоны, а именно – сроков начала и окончания термобара в озере, а также его продолжительности. На Рис. 9 представлены результаты расчетов по модели и дешифрирования спутниковых изображений, демонстрирующие временную изменчивость указанных параметров в период с 1994 по 2020 гг. С 1990 по 1993 гг. спутниковые снимки поверхности Ладожского озера в необходимые моменты времени в базе Института озероведения отсутствуют.

По результатам моделирования и данным спутниковых снимков нельзя сделать однозначного заключения о временной динамике параметров прохождения термобара по акватории озера. По результатам обработки спутниковых снимков присутствует незначительный отрицательный тренд в сроках начала и окончания термобара. Результаты моделирования таких трендов не выявили. При этом продолжительность прохождения термобара по акватории озера остается постоянной как по спутниковым, так и по модельным данным. Таким образом по косвенным признакам нет оснований говорить о потеплении регионального климата в период открытой воды в отличие от периода ледостава, где значения индекса ледовитости имеют тенденцию к уменьшению.

4. Заключение

В настоящей работе представлены результаты адаптации к условиям Ладожского озера трехмерной математической модели гидродинамики внутреннего моря с последующей ее верификацией по данным натурных и дистанционных измерений. Замена атмосферного форсинга привела к значительному улучшению расчетов ледовой обстановки в озере. Рассчитана многолетняя временная

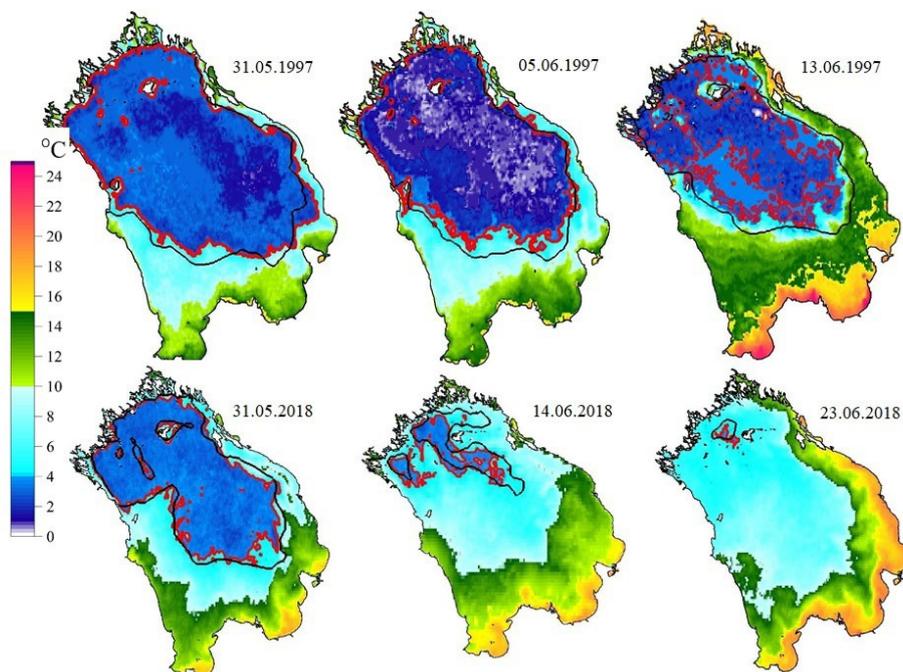


Рис.8. Распространение термобара в Ладожском озере весной и в начале лета 1997 и 2018 гг. Красная линия – положение термобара по спутниковым снимкам, черная – расчет по модели. Цветная шкала – температура воды (°C).

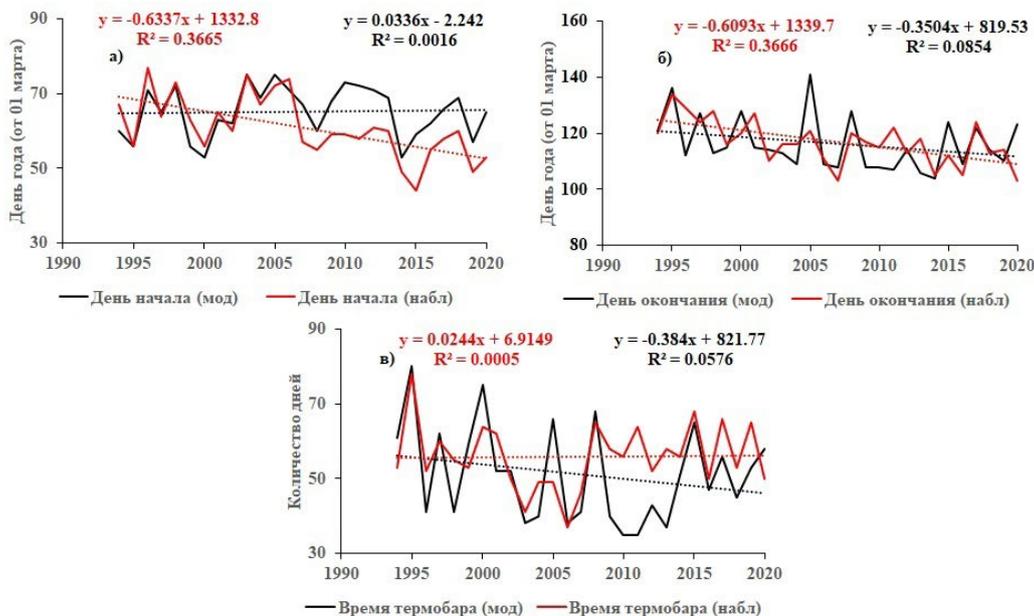


Рис.9. Сроки начала (а), окончания (б) и продолжительность существования (в) термобара в Ладожском озере в период с 1994 по 2020 гг. Черным цветом представлены результаты моделирования, красным – результаты дешифрирования спутниковых изображений.

динамика относительного индекса ледовитости Ладожского озера RICL. Наличие отрицательного тренда в динамике индекса в последние 20 лет свидетельствует о смягчении зимних условий в районе Ладожского озера.

Результаты верификации показали, что модель вполне адекватно воспроизводит вертикальную термическую структуру водной массы озера, за исключением отдельных случаев при воспроизведении профиля температуры в придонных слоях в условиях осенне-зимней конвекции. Данный недостаток модели может быть устранен либо использованием в ней полноценной подмодели, описывающей конвективное перемешивание, что приведет к усложнению и без того сложной 3D модели, либо изменением вертикального разрешения модели, что приведет в росту вычислительных затрат при проведении расчетов.

Результаты воспроизведения моделью термобара – важного явления как с точки зрения термогидродинамики озера, так и функционирования его водной экосистемы – оказались близкими к таковым, полученным при дешифрировании спутниковых снимков.

В перспективе планируется дальнейшее использование модели для исследований широкого круга термогидродинамических и экологических процессов в Ладожском озере. Среди них формирование, развитие и деградация процессов апвеллинга/даунвеллинга, распространение вод притоков в акватории озера, прогноз последствий возможных техногенных катастроф и др. Кроме того, предполагается, что МГВМ будет дополнена соответствующими модулями для описания химико-биологических процессов, что позволит использовать ее уже как модель экосистемы озера.

Благодарности

Исследование выполнено при поддержке грантов Российского научного фонда (проект № 23-17-20010) и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 23-17-20010)

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Астраханцев Г.П., Руховец Л.А. 1986. Дискретная гидротермодинамическая модель климатической циркуляции глубокого озера. Вычислительные процессы и системы 4: 135–178.
- Астраханцев Г.П., Егорова Н.Б., Руховец Л.А. 1987. Численное моделирование круглогодичной циркуляции глубоких озер. Доклады АН СССР 296: 1331–1334.
- Астраханцев Г.П., Меншуткин В.В., Писулин И.В. и др. 1992. Математическая модель для исследования реакции экосистемы Ладожского озера на изменение антропогенной нагрузки. СПб.: Препринт Ассоциации ученых «Будущее СПб».
- Астраханцев Г.П., Меншуткин В.В., Петрова Н.А. и др. 2003. Моделирование экосистем больших стратифицированных озер. СПб: Наука.
- Захаров М.Ю., Лупян Е.А., Мазуров А.А. 1993. Программа обработки данных прибора AVHRR спутников серии NOAA для персональных компьютеров. Исследование Земли из космоса 4: 62–68.
- Ибраев Р.А. 2008. Математическое моделирование термогидродинамических процессов в Каспийском море. М.: Геос.
- Каретников С.Г., Науменко М.А. 2013. Ледовый режим. В: Румянцев В.А., Кондратьев С.А. (ред.), Ладога. СПб., С. 152–163.

Ладожское озеро. Атлас. 2002. В: Румянцев В.А. (ред.). СПб.: Российская академия наук. Институт озераедения РАН.

Меншуткин В.В., Руховец Л.А., Филатов Н.Н. 2013. Состояние и перспективы развития моделирования экосистем пресноводных озер. Использование моделей для решения задач сохранения их водных ресурсов. СПб.: Нестор история.

Ушаков К.В., Ибраев Р.А. 2018. Исследование межгодовой изменчивости и бюджета тепла вихреразрешающей численной модели, воспроизводящей волны тропической неустойчивости в Тихом океане. *Метеорология и гидрология* 11: 110–120.

Филатов Н.Н., Балаганский А.Ф. 2021. Оценка элементов водного баланса. В: Кондратьев С.А., Поздняков Ш.Р., Румянцев В.А. (ред.). Современное состояние и проблемы антропогенной трансформации экосистемы Ладожского озера в условиях изменяющегося климата. М., С. 177–182.

Филатов Н.Н., Румянцев В.А. 2021. Изменчивость уровня воды и его прогнозирование. В: Кондратьев С.А., Поздняков Ш.Р., Румянцев В.А. (ред.). Современное состояние и проблемы антропогенной трансформации экосистемы Ладожского озера в условиях изменяющегося климата. М., С. 182–193.

Chen C.T.A., Millero F.J. 1986. Precise thermodynamic properties for natural waters covering only the limnological range. *Limnology and Oceanography* 31: 657–662. DOI: [10.4319/lo.1986.31.3.0657](https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.3.0657)

Hibler W. 1980. Modeling a variable thickness sea ice cover. *Monthly Weather Review* 1:1943–1973. DOI: [10.1175/1520-0493\(1980\)108<1943:MAVTSI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1980)108<1943:MAVTSI>2.0.CO;2)

Ibrayev R.A., Trukhchev D.I. 1998. Model study of the seasonal variability of the Black Sea circulation. NATO TU-Black Sea project ecosystem modeling as a management tool for the Black Sea, symposium on scientific results. Kluwer Academic Publishers 2: 212–217.

Ibrayev R.A. 2001. Model of enclosed and semi-enclosed sea hydrodynamics. *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling* 16(4): 291–304. DOI: [10.1515/rnam-2001-0404](https://doi.org/10.1515/rnam-2001-0404)

Launiainen J., Vihma T. 1990. Derivation of turbulent surface fluxes – an iterative flux-profile method allowing arbitrary observing heights. *Environmental Software* 5: 113–124. DOI: [10.1016/0266-9838\(90\)90021-W](https://doi.org/10.1016/0266-9838(90)90021-W)

Marshall J., Adcroft A., Hill C. et al. 1997. A finite-volume, incompressible Navier Stokes model for studies of the ocean on parallel computers. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 102: 5753–5766. DOI: [10.1029/96JC02775](https://doi.org/10.1029/96JC02775)

Munk W.H., Anderson E.R. 1948. Note on theory of the thermocline. *Journal of Marine Research* 7: 276–295. URL: https://elischolar.library.yale.edu/journal_of_marine_research/667

Smagorinsky J., Manabe S., Holloway JI. 1965. Numerical results from a nine level general circulation model of the atmosphere. *Monthly Weather Review* 93: 727–768. DOI: [10.1175/1520-0493\(1965\)093<0727:NRFANL>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1965)093<0727:NRFANL>2.3.CO;2)

Ushakov K.V., Ibrayev R.A. 2018. Assessment of mean world ocean meridional heat transport characteristics by a high-resolution model. *Russian Journal of Earth Sciences* 18: ES1004. DOI: [10.2205/2018ES000616](https://doi.org/10.2205/2018ES000616)

Eutrophication-driven *Trichodesmium erythraeum* blooms in Karimunjawa National Park, Indonesia

Widiaratih R.^{1,2*}, Patil C.Ya.², Wirasatriya A.¹, Putranto A.B.³, Maslukah L.¹, Widianingsih⁴, Pranowo W.S.⁵, Himawan D.¹, Satya E.D.⁶

¹ Department of Oceanography, Faculty of Marine and Fishery, University of Diponegoro, Jl. Prof. Jacob Rois, Central Java, 50275, Indonesia

² Department of Naval Architecture, Ocean & Marine Engineering, University of Strathclyde, 16 Richmond Street, Glasgow, G1 1XQ, United Kingdom

³ Department of Industrial Technology, Vocational School Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Jacob Rois, Tembalang, Semarang, Central Java, 50275, Indonesia

⁴ Department of Marine Science, Faculty of Marine and Fishery, Faculty of Marine and Fishery, University of Diponegoro, Jl. Prof. Jacob Rois, Central Java, 50275, Indonesia

⁵ Research Center for Climate and Atmosphere (PRIMA), National Research and Innovation Agency, Jl. Djujungan No. 133, Bandung, 40174, Indonesia

⁶ Director of Water and Air Police (Ditpolairud), Regional Police of Central Java, Jl. Yos Sudarso, No. 57, Semarang, Central Java, 50174, Indonesia

ABSTRACT. Harmful algal blooms (HABs) are increasingly frequent due to anthropogenic nutrient enrichment, posing significant ecological and economic threats. It includes hypoxia, toxin production, and a decline in tourism due to odour pollution. This study investigates the HAB event in Karimunjawa National Park (KNP) on September 19, 2023, attributed to nutrient loading from inadequate wastewater treatment in the shrimp pond. The bloom coincided with the shrimp harvest season, indicating a strong correlation between pond effluents and coastal eutrophication. To identify the dominant algal species and primary environmental drivers of bloom formation, nutrients and water quality parameters were analysed using field and satellite observations from three locations in KNP. Pearson's correlation analysis was applied to assess linear relationships among variables, while principal component analysis (PCA) was employed to determine key contributors to HAB development. The findings indicate that *Trichodesmium erythraeum* was the dominant bloom-forming species, proliferating due to biogeochemical imbalances induced by excessive nutrient enrichment. Phosphate ($r=0.952$), silicate ($r=0.832$), ammonia ($r=0.670$), and nitrate ($r=0.653$) were identified as key factors influencing bloom dynamics. Lower ammonia concentrations suggest uptake by phytoplankton, whereas microbial decomposition contributed to elevated phosphate levels. Additionally, high sunlight exposure ($r=0.877$) and low-currents hydrodynamic conditions ($r=0.197$) further facilitated bloom persistence. These findings underscore the urgent need for enhanced wastewater management policies in shrimp ponds and stricter environmental policies to mitigate future HABs occurrences and protect marine ecosystems and coastal economies.

Keywords: wastewater treatment, eutrophication, HAB, sunlight, hydrodynamics, biogeochemical cycle

For citation: Widiaratih R., Patil C.Ya., Wirasatriya A., Putranto A.B., Maslukah L., Widianingsih, Pranowo W.S., Himawan D., Satya E.D. Eutrophication-driven *Trichodesmium erythraeum* blooms in Karimunjawa National Park, Indonesia // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1268-1280. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1268

1. Introduction

The increase in harmful algal blooms (HABs) due to anthropogenic (human-driven) factors has become a major environmental concern. Key drivers include agricultural runoff (fertilizers), sewage discharge, industrial waste, and urban stormwater, all of which contribute excess nutrients to coastal waters and promote algal overgrowth. Recently, the HAB event had been documented in Karimunjawa National Park (KNP),

Indonesia, highlighting that even marine protected areas are not immune to the pressures of human-induced nutrient pollution and environmental change.

KNP is a marine conservation area of high ecological significance, supporting diverse coral reefs, reef fish, mangroves, and seagrass beds. These ecosystems contribute to coastal resilience, biodiversity conservation, and fisheries sustainability (Yuliana et al., 2017; Wijayanti et al., 2018;). The park's pristine marine

*Corresponding author. E-mail address: rikha.widiaratih@live.undip.ac.id (R. Widiaratih)

Received: July 18, 2025;

Accepted after revised: November 07, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



environment attracts domestic and international tourists, with activities such as snorkelling, diving, and cultural tourism driving a growing ecotourism industry (Satya et al., 2023). This sector has become a key economic driver, providing employment and supporting local livelihoods (Wijaya et al., 2021).

The KNP community has expanded into the Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pond, a key Indonesian fishery export commodity (Sidqi et al., 2022). However, its rapid expansion within KNP lacks adequate wastewater treatment, leading to unregulated effluent discharge and coastal water degradation due to insufficient regulatory oversight (Purnomo et al., 2022). Excessive nutrient enrichment from shrimp farming had contributed to HAB characterized by uncontrolled algal proliferation and toxin production, posing risks to marine biodiversity, human health, and coastal ecosystems (Endean et al., 1993).

The local community expressed significant concern over the HAB outbreak in KNP on September 19, 2023, following noticeable seawater discoloration (green, red, and black hues) and a strong unpleasant odour. These phenomena were reported in several coastal areas, particularly near shrimp ponds and popular beach locations, including Bobby Beach, Legon Lele Beach, and Menjangan Besar Island (Fig. 1). Recognizing the potential negative impact on tourism, residents initiated remedial actions to restore beach conditions. On September 22, 2023, a cleanup initiative was undertaken, involving seawater extraction using pumps to mitigate the effects of HAB.

HAB has detrimental impacts on the aquatic ecosystem of KNP. One notable consequence of HAB was the fish mortality in fishponds near Menjangan Besar Island, attributed to elevated nutrient levels from shrimp pond effluents, which contain excess shrimp feed residues and metabolic waste. These nutrient-rich conditions, coupled with optimal sunlight exposure, facilitated algal proliferation, leading to a sharp increase in dissolved oxygen (DO) consumption by algae. As a result, DO levels dropped below seawater

quality standards, causing hypoxia-induced fish mortality (Boyd et al., 1975). Beyond direct fish mortality, HABs also contribute to seafood contamination, particularly in fish and shellfish, posing serious public health risks. Contaminated seafood may contain toxins responsible for amnesic, diarrhetic, azaspiracid, neurotoxic, and paralytic shellfish poisoning (Morabito et al., 2018). Following the HAB events, the subsequent algal decomposition process further exacerbates marine ecosystem degradation. Decomposing algae settle on the seabed, leading to sedimentation, which obstructs sunlight penetration and increases organic matter accumulation. This triggers microbial activity, resulting in oxygen depletion, reduced pH levels, and coral tissue degradation, ultimately threatening coral reef sustainability (Weber et al., 2012).

HAB can be quantified using Chlorophyll-a (Chl-a) concentrations, a key indicator of phytoplankton biomass (Wang et al., 2017) and water fertility (Doering et al., 2006). HAB formation is typically driven by nutrient enrichment (ammonia, phosphate, nitrate, and silicate) (Paerl et al., 2007), water quality variables (total suspended solids (TSS), temperature, dissolved oxygen (DO), salinity, and pH) (Harvey et al., 2019), and hydrodynamic factors (currents, waves, and tides) (Qijun, 2010). However, the complex interactions between these factors and HAB dynamics remain poorly understood. This study aimed to explore the causes of HAB in KNP by identifying the main algal species involved and their links to nutrient input from shrimp ponds, water quality, and ocean currents.

Understanding the dominant algal species and the key environmental drivers of bloom formation is essential for predicting and managing HABs. Since different species vary in toxicity and ecological impact, identifying them improves risk assessment and response strategies. Environmental factors such as nutrient loading, temperature, and salinity, along with water quality indicators like TSS, DO, and pH, offer a critical insight into bloom dynamics. Together, these variables support improving the understanding of HAB dynamics and

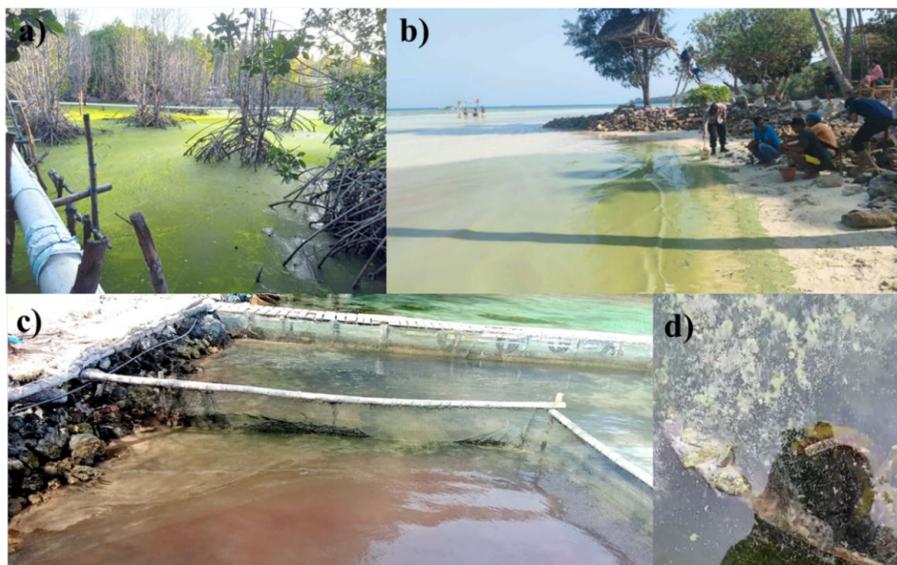


Fig.1. HABs in Karimunjawa, September 19, 2023 at: a) Mangrove area near fishpond; b) Bobby Beach; c) Menjangan Besar Island; and d) fish mortality in fish pond near Menjangan Besar Island.

guide effective water quality management. The objectives of this study were to: (i) identify bloom-forming algal and measure microalgae abundance; (ii) assess quantitatively distribution value of Chl-a, nutrients, TSS, water quality, and current patterns during and after the bloom, and (iii) examine the relationships between these factors. The results offer new insights into the HAB development and its environmental drivers in KNP.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

KNP comprises 27 islands, with Karimunjawa Island being the largest and most densely populated. However, Vannamei shrimp farming has expanded rapidly, with the plot of 33 shrimp ponds identified along Karimunjawa Island's coastline by 2022 (Fig. 2), raising concerns about coastal environmental impacts. This study utilizes field data (Table 1) and satellite data (Table 2).

HAB and their interactions with Chl-a, TSS, and nutrients are strongly influenced by seawater quality and ocean surface currents. Due to the limited availability of field data, seawater parameters (sea surface temperature, DO, salinity, and pH) and surface currents on September 19 and 22, 2023, were obtained from satellite and numerical model sources (Table 2). While satellite data provides high temporal resolution, its spatial limitations, particularly in coastal areas, necessitate interpolation, which may reduce accuracy (Apostolopoulos et al., 2020). Despite these constraints, satellite-derived data enables the identification of spa-

tiotemporal patterns during and after HABs cleanup, offering a comprehensive assessment of environmental dynamics.

During the field visit to Karimunjawa National Park (KNP) on September 22, 2023, the authors encountered a special situation: HABs had already been cleaned up by the local community to reduce impacts on marine tourism. As a result, direct sampling of the HABs was not possible at that time. However, samples from the most severely affected areas characterized by red-coloured seawater around Menjangan Besar Island and green-coloured seawater at Bobby Beach were obtained from local community members, who had collected surface water samples during the bloom event (September 19, 2023). These samples are indicated with red circles in Fig. 2. Consequently, the available HAB-related samples are limited in both spatial and temporal coverage. Nevertheless, these few samples provide valuable insight into the severity of the HAB event, even after the clean-up.

Post-cleanup surface water samples (2L each) were collected on September 22, 2023, from the shrimp pond outlet, Legon Lele Beach, Bobby Beach, and Menjangan Besar Island. At the shrimp pond outlet, a single sample was taken, while at the other sites, three samples were collected from different zones, including the shoreline, the mid-zone, and the furthest accessible point (indicated with green circles in Fig. 2). All surface water samples (2L each) were analysed for Chl-a, TSS, and nutrient concentrations, including ammonia, silicate, phosphate, and nitrate, under two conditions such as during the HAB event (September 19, 2023) and after the clean-up (September 22, 2023) (Table 1).

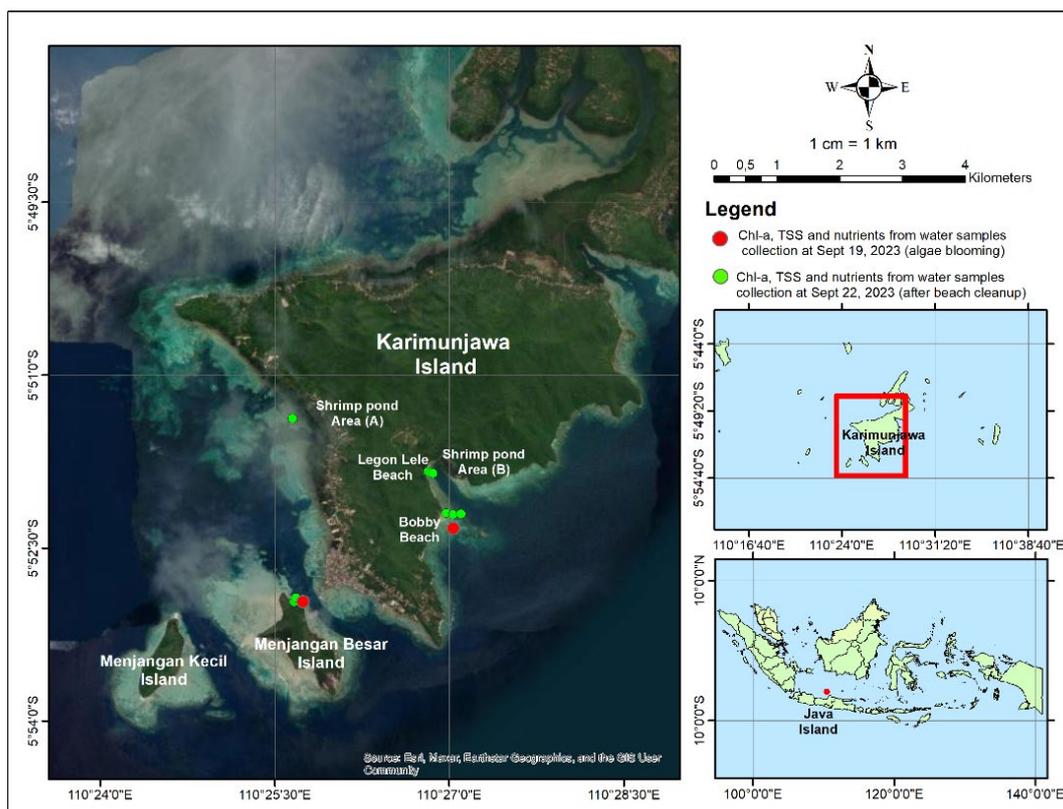


Fig.2. Research Area.

Table 1. Data source of field observation for Chl-a, TSS, and nutrients

Data	Samples	Date	Method
Chl-a	Surface water samples of 2 Liters for each station	1. During algal blooming on September 19, 2023, in Bobby beach and Menjangan Besar Island 2. After algal blooming cleanup on September 22, 2023, in Bobby Beach (3 stations), Legon Lele Beach (3 stations), Menjangan Besar Island (3 stations), shrimp pound channel (1 station)	APHA, 2005
Total Suspended Solid (TSS)			Chan et al., 2008
Ammonia			Zadorojny and Saxton, 1973; Parsons et al., 1984
Silicate			Mullin and Riley, 1955; Parsons et al., 1984
Phosphate			Murphy and Riley, 1962; Parsons et al., 1984
Nitrate			Morris and Riley, 1963; Parsons et al., 1984

2.2. Methods

Surface water samples were analysed in the laboratory following standardized protocols. Samples were stored in sealed bottles within a cool, dark environment to prevent degradation. Processing methods for Chl-a, TSS, and nutrients are detailed in Table 1. Chl-a was analysed via APHA spectrometry (Johan et al., 2014), while TSS was determined by measuring suspended solids in 1 L of filtered water (Chan et al., 2008). Nutrients were analysed using established method including ammonia (Parsons et al., 1984; Zadorojny and Saxton, 1973), nitrate (Morris and Riley, 1963; Parsons et al., 1984), phosphate (Murphy and Riley, 1962; Parsons et al., 1984), and silicate (Mullin and Riley, 1955; Parsons et al., 1984). Algal species were identified using binocular microscopy (400× magnification) (Lessard and Swift, 1986; Veldhuis and Kraay, 2000), and microalgae abundance was calculated using Stirling's formula (Stirling, 1999):

$$N = \frac{nxv}{V} \quad (1),$$

where N – total phytoplankton cells per Liter, n – average phytoplankton cells in 1 mL of sample, v – volume

of plankton concentrates (mL), and V – volume of water filtered (L). The result is expressed as cells per Liter (cells/L).

This study aims to identify key parameters influencing the HAB occurrence, focusing on nutrients, TSS, and water quality. Statistical analysis was conducted using Pearson's correlation and principal component analysis (PCA) to examine intervariable relationships. Pearson's correlation quantifies linear relationships between two variables (Liu, 2019), while PCA extends this approach to identify patterns among multiple variables. The Pearson correlation matrix is particularly useful in PCA when variables have different scales or units, necessitating standardization to ensure equal contributions. This allows PCA to emphasize relationships rather than absolute values (Polak et al., 2009). PCA offers several advantages, including dimensionality reduction, which condenses complex datasets while preserving key variance, facilitating clearer pattern identification. Additionally, PCA also provides dimensionality reduction, mitigates multicollinearity, and enhances data visualization, making it a powerful tool for analysing complex environmental interactions such as HAB formation (Patel et al., 2024).

Table 2. Data on water quality (SST, pH, Salinity, and DO) and hydrodynamics (currents) from satellite data

Data	Source	Spatial resolution	Temporal resolution	Access date	Website
Sea surface temperature	Operational Sea Surface Temperature and Ice Analysis (OSTIA)	0.05° × 0.05°	Daily	Dec 20, 2024	https://data.marine.copernicus.eu/product/SST_GLO_SST_L4_NRT_OBSERVATIONS_010_001/description
pH	Numerical model results	0.25° × 0.25°	Daily	Dec 20, 2024	https://data.marine.copernicus.eu/product/GLOBAL_ANALYSISFORECAST_BGC_001_028/description
Salinity	NASA's Soil Moisture Active Passive (SMAP) dan ESA's Soil Moisture Ocean Salinity (SMOS)	0.125° × 0.125°	Daily	Dec 20, 2024	https://data.marine.copernicus.eu/product/MULTIOBS_GLO_PHY_S_SURFACE_MYNRT_015_013/description
Dissolved oxygen (DO)	Numerical model results	0.25° × 0.25°	Daily	Dec 20, 2024	https://data.marine.copernicus.eu/product/GLOBAL_ANALYSISFORECAST_BGC_001_028/description
Sea surface currents	Numerical model (The Operational Mercator global ocean analysis and forecast)	0.083° × 0.083°	Daily	Dec 28, 2024	https://data.marine.copernicus.eu/product/GLOBAL_ANALYSISFORECAST_PHY_001_024/description

3. Results and discussion

3.1. Type and abundance of algal species HAB in KNP, Indonesia

Microalgal species identification was conducted through binocular microscopy at two locations at Bobby Beach and Menjangan Besar Island. Observations based on taxonomic classification (Guiry and Guiry, 2023) confirmed that *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg ex Gomont, 1892 was the bloom-forming species. *Trichodesmium erythraeum* is classified within the phylum Cyanophyta (Cyanobacteria) due to its peptidoglycan-containing cell walls (Fraga et al., 2025). As a prokaryotic organism, it lacks a true nucleus and forms filamentous colonies (Fig. 3). Instead of a nucleus, it contains a pseudo-nucleus with thylakoids, which play a crucial role in light absorption through specialized pigments called phycobilin (Frankenberg et al., 2001).

Trichodesmium erythraeum is a filamentous, diazotrophic cyanobacterium that fixes nitrogen in oligotrophic, subtropical, and tropical oceans, including Indonesian waters, sustaining marine productivity (Ding et al., 2022). Its blooms, driven by warm temperatures, nutrient inputs, and climate variability, shift from green (phycocyanin and allophycocyanin) in early stages to red (phycoerythrin and carotenoids) during senescence, releasing nutrients and potentially contributing to oxygen depletion and toxin production (Coll et al., 1978; García et al., 2021; Leney et al., 2018; Yamaji, 1980). Anthropogenic eutrophication, particularly nitrogen and phosphorus enrichment, intensifies bloom occurrence, with significant impacts on biogeochemical cycles and marine ecosystems (Sultana et al., 2022; Zhang et al., 2022). This phenomenon was observed near Menjangan Besar Island on September 19, 2023, where distinct red discoloration indicated an advanced bloom stage. These findings suggest that the bloom initiation likely occurred prior to September 12, 2023. However, spatiotemporal variation in the HAB development was observed

at Bobby Beach and Legon Lele Beach, where green discoloration was recorded on September 19, 2023, indicating differences in bloom onset and progression across sites.

The level of toxicity is influenced by the specific type of microalgal present. Previous studies in KNP identified *Prorocentrum lima*, a toxic dinoflagellate linked to seagrasses (Widiarti et al., 2019). However, on September 19, 2023, HAB was dominated by *Trichodesmium erythraeum*, a bloom-forming cyanobacterium that disrupts biodiversity (Mohanty et al., 2010). Characterized by a 7–14-day life cycle, *Trichodesmium erythraeum* thrives under high nutrients, temperature, and low turbulence, releasing aerosolized cyanotoxins that cause respiratory issues, skin irritation, seafood contamination, and gastrointestinal illness. Additionally, it promotes secondary toxic blooms, compounding ecological and human health risks (Flores-Chavarria et al., 2023; Guo and Tester, 1994).

A HAB event is defined by an algal concentration exceeding 1,000,000 cells/L, which induces adverse ecological impacts (Sarkar, 2018). In this study, algae abundance was quantified using Stirling's formula (Stirling, 1999), with measurements conducted in triplicate, yielding a mean value of 18,496,000 cells/L. Accordingly, the observed event in KNP meets the threshold for HAB classification (Table 3).

Table 3. Calculation of microalgae abundance

Calculation of microalgae abundance	Results of the calculation of the abundance of <i>Trichodesmium erythraeum</i> (cells/L)
1 st calculation	18,581,000
2 nd calculation	18,258,000
3 rd calculation	18,649,000
Average microalgae abundance	18,496,000

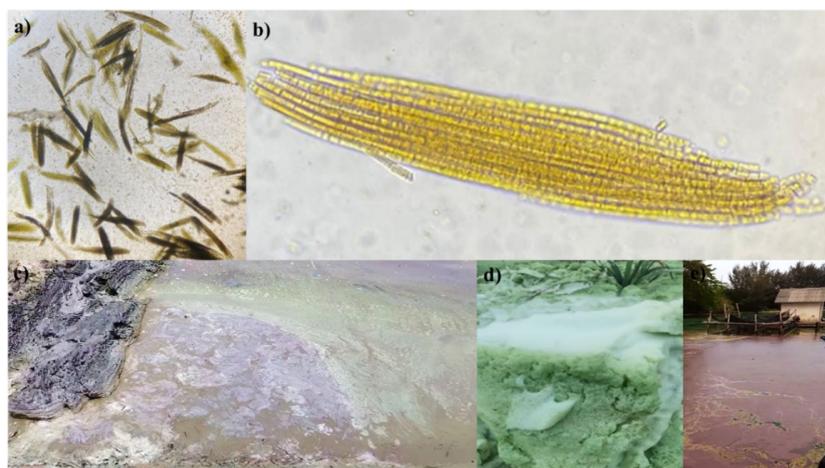


Fig.3. *Trichodesmium erythraeum* with magnification: a) 100x; b) 400x; c) harmful algal blooms (HABs) in surface water of Bobby Beach on September 19, 2023; d) green foam formed on Bobby Beach on September 19, 2023; e) algal blooming in surface water of Menjangan Besar Island on September 19, 2023.

3.2. Distribution values of Chl-a, nutrients, water quality, and current-hydrodynamics during algal blooming and post-HAB cleanup

The concentrations of Chl-a, nutrients, and water quality parameters during the HAB occurrence (September 19, 2023) and post-cleanup (September 22, 2023) are presented in Table 4. A clear relationship is observed between Chl-a and total suspended solids (TSS), where Chl-a primarily represents organic particulate matter, while TSS encompasses both organic and inorganic suspended particles larger than 2 μm , including sediment, algae, and bacteria (Yuan, 2021). This study confirms that phytoplankton, as indicated by Chl-a, contributes to TSS. However, TSS values consistently exceed Chl-a concentrations due to the presence of additional non-algae particles. During the HAB event in KNP, Chl-a concentrations reached exceptionally high levels of 198.557 $\mu\text{g/L}$ at Bobby Beach and 569.679 $\mu\text{g/L}$ at Menjangan Besar Island. TSS levels mirrored this trend, with values of 499.667 mg/L and 237 mg/L , respectively, demonstrating a direct correlation when Chl-a values are converted from $\mu\text{g/L}$ to mg/L .

Table 4 reveals distinct Chl-a and TSS patterns at Menjangan Besar Island and Bobby Beach, indicating different wastewater sources. Menjangan Besar Island, influenced by Shrimp Pond A (west Karimunjawa Island), exhibits red seawater due to higher Chl-a concentrations, likely intensified by the bacterial decomposition of *Trichodesmium erythraeum*, which can temporarily sustain elevated Chl-a if algal cells remain intact (Satpathy et al., 2007). In contrast, Bobby Beach, affected by Shrimp Pond B (east Karimunjawa Island), shows higher TSS levels, driven by multiple factors, including suspended algal biomass, contributing to particulate matter. Moreover, extracellular polymeric substances (EPS) and mucilage secretion from

Trichodesmium erythraeum, forming aggregates and high metabolic processes, release fine organic particles into the water column (Sudo, 1978). Furthermore, decomposition of particulate organic matter (POM) into dissolved organic matter (DOM), which interacts with metals in seawater, forming inorganic TSS (Du et al., 2022), and metal binding with sediments, clay, and silt, further increase TSS levels. These variations highlight the complex interactions between HAB activity, decomposition, and suspended solids, shaping water quality differences between the two sites.

The spatial distribution of Chl-a, TSS, and nutrients (ammonia, nitrate, phosphate, and silicate) during the HAB event on September 19, 2023, is illustrated in Fig. 4. Menjangan Besar Island exhibited higher Chl-a, lower TSS, and red seawater, contrasting with Bobby Beach, which remained in an earlier HAB phase. This pattern suggests advanced nitrogen cycle progression at Menjangan Besar Island, driven by bacterial decomposition, which transformed POM into DOM (Du et al., 2022), accumulating in water and sediment (Mickle, 1993). As a result, silicate, phosphate, and nitrate increased, while ammonia declined, indicating more active nitrification at Menjangan Besar Island than at Bobby Beach.

Nitrification is a crucial process in the marine nitrogen cycle, converting nitrogen into bioavailable forms essential for marine biota (Soratur et al., 2024). This biogeochemical cycle regulates nutrient availability, supports ecosystem productivity, and influences global nitrogen dynamics (Capone, 2008). Nitrification occurs in two stages (Arp and Stein, 2003), including ammonia (NH_3) oxidation to nitrite (NO_2^-) by nitrifying bacteria, requiring dissolved oxygen and providing energy for microbial metabolism. Moreover, nitrite (NO_2^-) oxidation to nitrate (NO_3^-), the primary nitrogen form assimilated by marine organisms (Beman et al., 2013). During the HAB event, Menjangan Besar Island

Table 4. Values of Chl-a, nutrients, water quality, and surface current hydrodynamics during algal blooming and after beach cleaning

Location and condition	Chl-a ($\mu\text{g/L}$)	TSS (mg/L)	Silicate (mg/L)	Phosphate (mg/L)	Ammonia (mg/L)	Nitrate (mg/L)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	DO (mg/L)	pH	Salinity (‰)	DIN : DIP	Currents (m/s)
Bobby Beach (AB)	198.557	499.667	0.005	0.453	0.584	46.029	28.747	6.244	7.926	33.487	102.842	0.145
Menjangan Besar Island (AB)	569.679	237.000	0.035	14.102	0.760	23.528	28.744	6.244	7.926	33.427	1.722	0.128
Shrimp Pond A (ABC)	20.651	392.667	0.019	0.009	0.456	0.224	28.494	6.448	8.027	34.675	76.921	0.133
MB1 (ABC)	1.807	28.333	0.003	0.031	0.146	0.238	28.492	6.448	8.027	34.688	12.402	0.120
MB2 (ABC)	1.587	19.667	0.005	0.011	0.036	0.163	28.492	6.448	8.027	34.688	18.062	0.120
MB3 (ABC)	1.484	24.667	0.005	0.042	0.602	0.143	28.491	6.448	8.027	34.688	17.724	0.120
BB1 (ABC)	12.043	180.000	0.007	0.011	0.511	0.190	28.496	6.448	8.027	34.701	63.410	0.130
BB2 (ABC)	2.671	17.667	0.004	0.062	0.036	0.156	28.496	6.448	8.027	34.701	3.115	0.130
BB3 (ABC)	3.141	18.000	0.004	0.007	0.002	0.109	28.496	6.448	8.027	34.702	16.634	0.130
LLB1 (ABC)	13.542	119.333	0.010	0.128	0.128	1.238	28.497	6.448	8.027	34.697	10.646	0.132
LLB2 (ABC)	2.559	49.667	0.003	0.007	0.018	0.136	28.497	6.448	8.027	34.697	23.253	0.132
LLB3 (ABC)	2.969	21.000	0.003	0.044	0.073	0.020	28.497	6.448	8.027	34.697	2.111	0.132

Note: AB (algal blooming); ABC (after beach cleaning); MB (Menjangan Besar); BB (Bobby Beach); LLB (Lagon Lele beach); DIN (dissolved inorganic nitrogen); DIP (dissolved inorganic phosphorus)

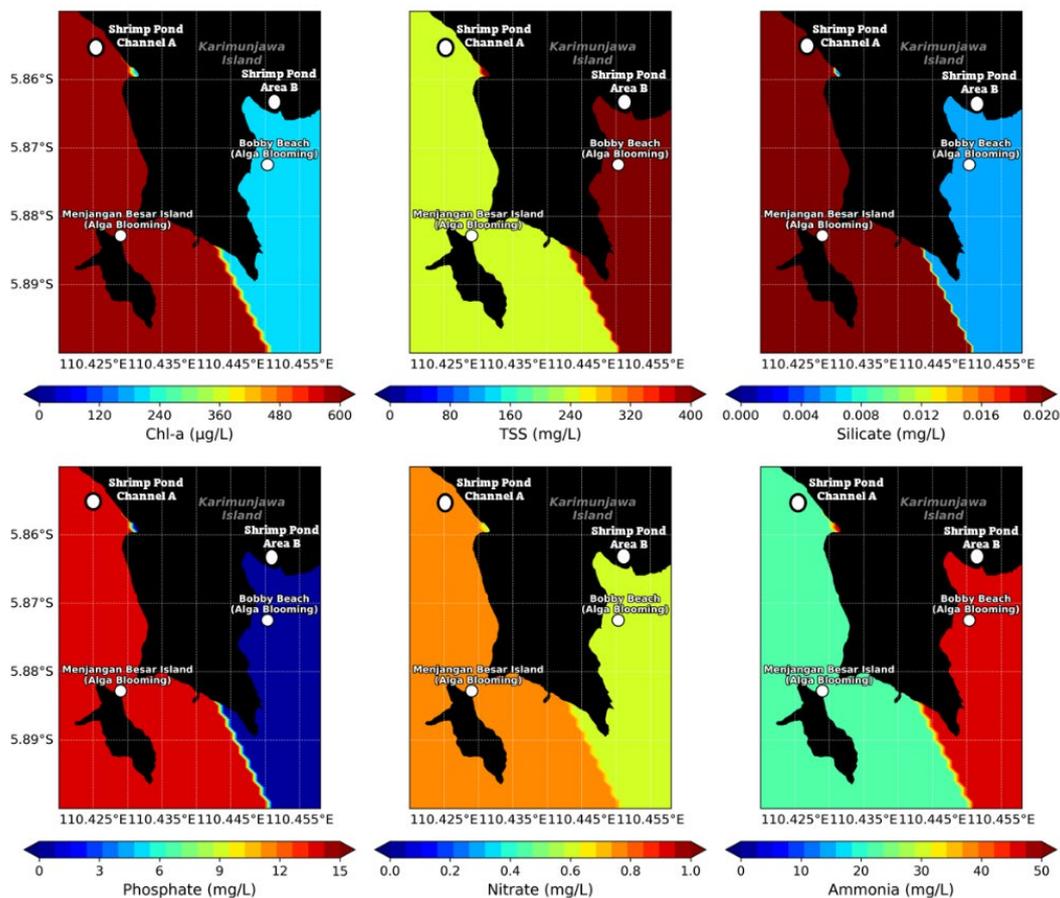


Fig.4. Distribution of Chl-a, TSS, silicate, phosphate, nitrate, and ammonia under HAB condition on September 19, 2023.

exhibited lower ammonia concentrations, suggesting active nitrification, as evidenced by higher nitrate levels compared to Bobby Beach. However, ammonia remained the dominant nutrient, indicating that eutrophication from shrimp pond wastewater, particularly from feed and fertilizer runoff, was the primary driver of elevated ammonia levels.

The DIN:DIP ratio indicates the balance between Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN) and Dissolved Inorganic Phosphorus (DIP), reflecting nutrient balance and helping identify the limiting nutrient for phytoplankton growth (O'Neil et al., 2024). The Redfield ratio (16:1, N:P) represents optimal conditions (Knapp et al., 2012). In this study, DIN includes ammonia and nitrate, while DIP is based on phosphate (Table 4). $\text{DIN:DIP} > 16$, found at Bobby Beach, indicates phosphorus limitation and potential for HABs. Conversely, $\text{DIN:DIP} < 16$ at Menjangan Besar Island suggests nitrogen limitation, likely post-bloom. Moreover, the DIN:DIP ratio plays a role in regulating phytoplankton biomass. An imbalance in this ratio can favour the growth of certain phytoplankton species, potentially leading to the dominance of harmful algal species under nutrient-enriched conditions (Ma et al., 2025). These results underscore the DIN:DIP ratio as a governing factor of HAB dynamics.

The post-cleanup spatial conditions of HAB-affected areas (September 22, 2023) are depicted in Fig. 5. Sampling was conducted at Menjangan Besar Island, Bobby Beach, Legon Lele Beach, and a shrimp pond outlet, with shrimp pond A analysed for nutrient contributions. Of the 33 shrimp ponds in the study

area, only the two closest (shrimp ponds A and B) were included. Following HAB cleanup via pumping, Chl-a, TSS, and nutrient concentrations significantly decreased compared to September 19, 2023.

Following post-HAB cleanup, Chl-a, TSS, and nutrient concentrations were significantly higher in the shrimp pond A outlet compared to other locations, confirming that shrimp pond effluent was the primary source of contamination. Although seawater from the shrimp pond A channel showed no visible discoloration on September 22, 2023, Chl-a (20.651 µg/L) and TSS (392.667 mg/L) remained elevated. Conversely, due to the greater distance from shrimp pond A, prior HAB removal, and seawater dilution, Chl-a and TSS levels at Menjangan Besar Island were substantially lower, at 1.807 µg/L and 28.333 mg/L, respectively.

On the east side, shrimp pond B discharge channel is located closest to Legon Lele Beach, followed by Bobby Beach. As a result, Chl-a concentrations were slightly higher at Legon Lele Beach (13.542 µg/L) compared to Bobby Beach (12.043 µg/L) due to its closer proximity to the nutrient source. However, TSS levels were higher at Bobby Beach (180 mg/L) than at Legon Lele Beach (119.333 mg/L) likely because of HAB conditions, further supported by the role of ocean currents in distributing TSS across the area. During the bloom, algae released mucus secretions and formed aggregates, contributing to increased suspended particles and the release of fine organic matter into the water column. Additionally, Chl-a and TSS values decreased further offshore due to dilution and hydrodynamic mixing (Liu et al., 2023).

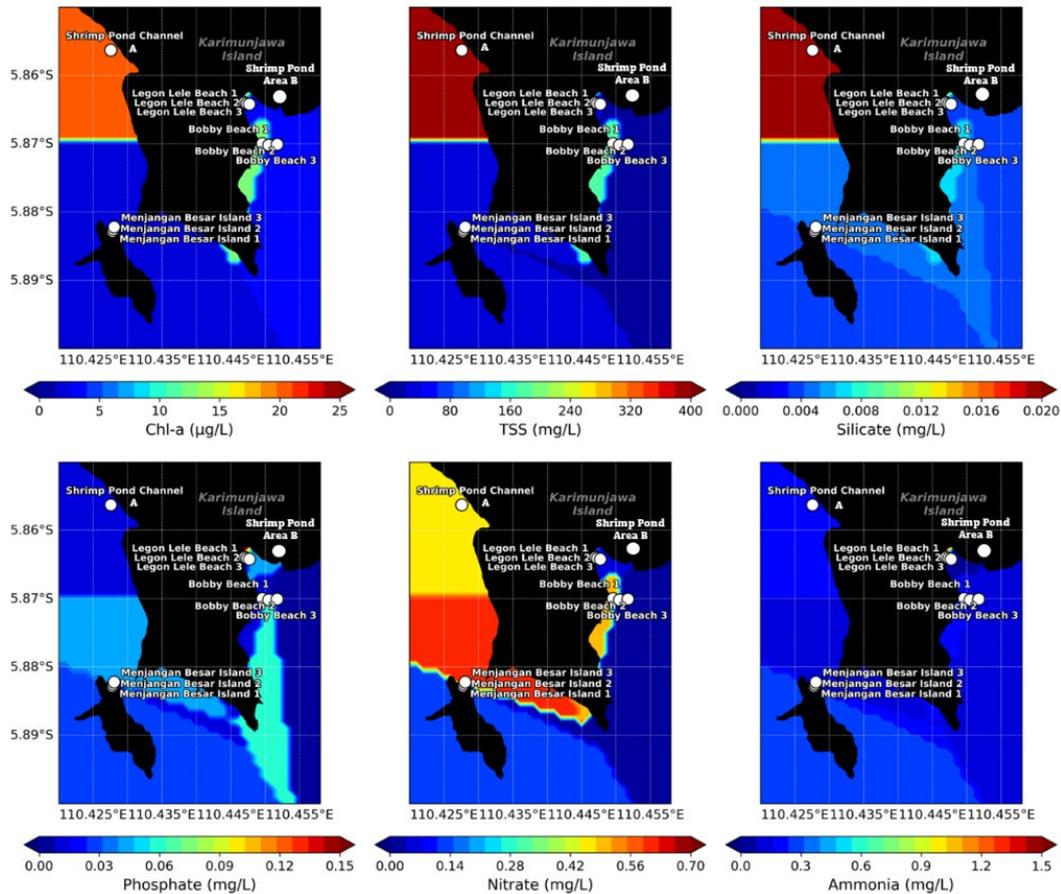


Fig.5. Distribution of Chl-a, TSS, silicate, phosphate; nitrate, and ammonia under after HAB clean-up condition on September 22, 2023.

The Chl-a and TSS patterns at Legon Lele Beach and Bobby Beach exhibit notable similarity, likely due to their proximity. However, a significant disparity is observed in ammonia concentrations, with Legon Lele Beach recording levels 10 times higher than Bobby Beach. This difference is attributed to the proximity of Legon Lele Beach to shrimp pond B wastewater discharge channel, which contains elevated ammonia levels. These findings indicate that the seawater in the area is heavily influenced by ammonia-rich effluent from shrimp pond B.

Hydrodynamic processes play a critical role in the formation and progression of HABs, influencing mixing, nutrient distribution, and water stratification (Yan et al., 2024). The results indicate that Chl-a, TSS, and nutrient concentrations generally decrease from the coastline seaward, primarily due to dilution by

ocean currents, which facilitate water mass distribution and mixing. In this study, surface ocean currents, a key hydrodynamic factor, were analysed and are illustrated in Fig. 6.

Surface current patterns, derived from the numerical model, were classified into two conditions, including during HAB (Fig. 6a) and post-HAB cleanup (Fig. 6b). Hydrodynamic conditions significantly influence HAB development, with low current speeds (< 0.24 m/s) promoting algal growth, enhancing energy metabolism and nutrient absorption (Song, 2023). In contrast, strong currents (> 0.5 m/s) can disrupt algal metabolism, reduce oxidation levels, and cause cellular damage, limiting HAB persistence.

As shown in Fig. 6, surface current velocities ranging from 0.12 to 0.15 m/s were classified as low-current conditions during HAB and after clean-up

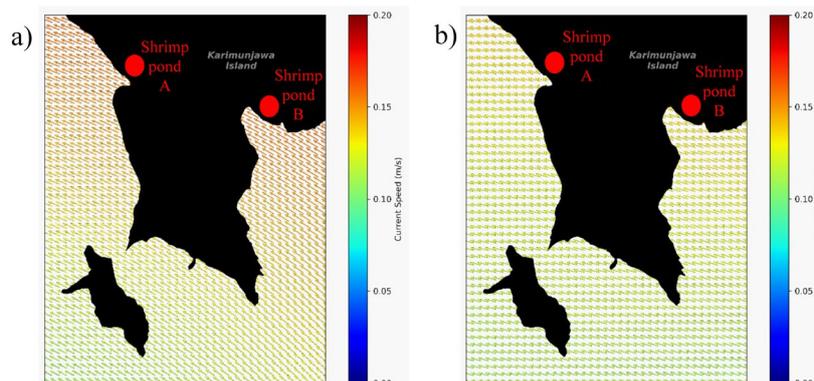


Fig.6. Sea surface current numerical model under: a) HAB condition at September 19, 2023; b) after HAB clean-up condition at September 22, 2023 (source: The Operational Mercator global ocean analysis and forecast, https://data.marine.copernicus.eu/product/GLOBAL_ANALYSISFORECAST_PHY_001_024/description).

conditions, which facilitated optimal algal growth and contributed to HAB formation. Low-current hydrodynamics contributes to HAB persistence, reducing mixing and keeping algae in surface layers by trapping nutrients and supporting prolonged bloom growth. Moreover, it enhances aggregation, increasing bloom intensity, and limits dispersal, leading to localized eutrophication. These factors collectively contribute to HAB persistence and expansion in low-energy aquatic environments.

The HAB event in September 2023 was influenced by the east monsoon, characterized by east-to-west winds, which played a significant role in hydrodynamic-driven nutrient transport. Surface currents facilitated the movement of effluent from shrimp pond A toward Menjangan Besar Island, leading to nutrient accumulation and HAB development. Similarly, discharges from pond B were transported toward Legon Lele Beach and Bobby Beach, further impacting coastal water quality and contributing to localized eutrophication.

3.3. Correlation between Chl-a, nutrients, water quality, and current hydrodynamics in KNP, Indonesia

PCA of Chl-a, nutrients, seawater quality, and current hydrodynamics (Table 5) quantifies linear relationships among variables, offering insights into key drivers of HAB formation and distribution. Results indicate a strong correlation between Chl-a and nutrient levels, with phosphate ($r=0.952$), silicate ($r=0.832$), ammonia ($r=0.670$), and nitrate ($r=0.653$), confirming that nutrient enrichment is a primary factor in HAB proliferation. These findings emphasize the role of eutrophication in sustaining algal blooms and highlight nutrient-driven mechanisms influencing bloom intensity and spatial distribution.

Additionally, Chl-a exhibits a positive correlation with sea surface temperature ($r=0.877$) but negative correlations with salinity ($r=-0.892$), dissolved oxygen ($r=-0.880$), and pH ($r=-0.880$), indicating the influence of water quality parameters on HAB development. A moderate correlation was observed between Chl-a and TSS ($r=0.448$), while currents showed a weak cor-

relation ($r=0.197$), suggesting a limited direct impact on HAB intensity but a potential role in HAB dispersion and spatial distribution. These findings highlight the critical role of nutrient enrichment and seawater quality in HAB formation, while hydrodynamic factors primarily influence their spread rather than initiation.

HAB formation is driven by sunlight, low currents, and nutrient dynamics. Nutrient levels peak before blooms and decline as microalgal metabolize them, with the DIN:DIP ratio playing a key role where nitrate triggers blooms, while phosphate limits growth (Sidabutar, 2016). Empirical evidence shows that high nitrate (DIN:DIP >16) at Bobby Beach coincided with active algal growth (green water), whereas phosphate dominance (DIN/DIP <16) at Menjangan Besar Island was linked to algal decomposition (red water). This supports findings by (Satpathy et al., 2007) concerning DIN:DIP that nitrogen initiates HABs (ammonia, $r=0.525$; and nitrate, $r=0.457$), while phosphate regulates their limiting factor ($r=-0.242$).

High ammonia levels and photosynthesis efficiency driven by solar radiation ($r=0.877$) enhance algal growth, increasing bacterial activity and depleting dissolved oxygen. This process also lowers salinity and pH induced by algal ion uptake. Salinity is slightly reduced ($r=-0.892$), while CO_2 release during decomposition increases acidity ($r=-0.880$). Algae species exhibit varying salinity tolerances, including *Aureoumbra lagunensis* (Shi et al., 2024) and *Karenia mikimotoi* (Buskey et al., 1998) thriving in low-salinity waters, as well as *Halimeda* spp. tolerating hypersaline conditions. Additionally, green algae demonstrate a broad salinity range of 6.8–27.2 PSU (Taylor et al., 2001).

TSS showed a moderate correlation with Chl-a ($r=0.448$) and a strong correlation with the DIN:DIP ratio ($r=0.845$), reflecting the combined influence of living phytoplankton and dead organic matter. A high correlation with ammonia ($r=0.745$) suggests significant biogeochemical interaction, beyond the presence of inorganic particles like sand and mud. This relationship is likely driven by organic waste and industrial effluents, where both TSS and ammonia contribute to eutrophication and HAB formation (Li et al., 2022). Additionally, a positive correlation with low-current

Table 5. Pearson correlation of Chl-a, TTS, nutrients, seawater quality, and currents.

Variables	Chl-a (µg/L)	TSS (mg/L)	Silicate (mg/L)	Phosphate (mg/L)	Nitrate (mg/L)	Ammonia (mg/L)	Temperature (°C)	DO (mg/L)	pH	Salinity (ppt)	DIN: DIP	Current (m/s)
Chl-a (µg/L)	1.000	0.448	0.832	0.952	0.653	0.670	0.877	-0.880	-0.880	-0.892	-0.001	0.197
TSS (mg/L)	0.448	1.000	0.443	0.218	0.657	0.745	0.670	-0.668	-0.666	-0.663	0.845	0.694
Silicate (mg/L)	0.832	0.443	1.000	0.878	0.630	0.307	0.560	-0.564	-0.563	-0.586	-0.011	0.043
Phosphate (mg/L)	0.952	0.218	0.878	1.000	0.552	0.414	0.692	-0.696	-0.696	-0.714	-0.242	-0.031
Nitrate (mg/L)	0.653	0.657	0.630	0.552	1.000	0.572	0.650	-0.655	-0.656	-0.665	0.457	0.159
Ammonia (mg/L)	0.670	0.745	0.307	0.414	0.572	1.000	0.943	-0.942	-0.941	-0.932	0.525	0.632
Temperature (°C)	0.877	0.670	0.560	0.692	0.650	0.943	1.000	-1.000	-1.000	-0.999	0.330	0.501
DO (mg/L)	-0.880	-0.668	-0.564	-0.696	-0.655	-0.942	-1.000	1.000	1.000	0.999	-0.328	-0.487
pH	-0.880	-0.666	-0.563	-0.696	-0.656	-0.941	-1.000	1.000	1.000	1.000	-0.326	-0.483
Salinity (ppt)	-0.892	-0.663	-0.586	-0.714	-0.665	-0.932	-0.999	0.999	1.000	1.000	-0.314	-0.466
DIN:DIP	-0.001	0.845	-0.011	-0.242	0.457	0.525	0.330	-0.328	-0.326	-0.314	1.000	0.609
Current (m/s)	0.197	0.694	0.043	-0.031	0.159	0.632	0.501	-0.487	-0.483	-0.466	0.609	1.000

hydrodynamics ($r=0.694$) supports the role of water retention in facilitating algal accumulation. These findings highlight the importance of suspended particles in nutrient transport and their broader impact on water quality and ecosystem health.

PCA was conducted to simplify complex multi-dimensional relationships and extract meaningful patterns within the dataset (Patel et al., 2024). This technique reduces the number of variables while preserving essential information by generating uncorrelated principal components (PCs), which are linear combinations of the original variables (Lever et al., 2017). The primary objective of PCA is to maximize variance capture, allowing for optimal data interpretation while minimizing information loss. By facilitating pattern recognition and dimensionality reduction, PCA enhances the efficiency and clarity of statistical analysis, making it a valuable tool for identifying key environmental drivers in the dataset.

PCA of HABs in KNP (Fig. 7) illustrates the relationships among nutrients, water quality, and hydrodynamic factors. Red arrows represent environmental variables, with similar directions indicating positive correlations, and longer arrows reflecting stronger influences on PCs. Rightward vectors, contributing predominantly to PC1, are closely associated with bloom conditions. PCA results align with Pearson correlations, showing strong associations between Chl-a and both phosphate and silicate, while ammonia shows the weakest nutrient correlation. DO, pH, and salinity are negatively correlated with Chl-a, indicating that HABs favour low-oxygen, low-salinity, and acidic conditions. TSS is strongly linked to Chl-a, reflecting increased algal biomass. Hydrodynamic influence appears at low currents, reinforcing nutrient enrichment as the primary driver of HABs. Additionally, DIN:DIP maintains

a positive correlation with HABs, supporting its role in both bloom development and post-bloom conditions.

PCA results indicate that Bobby Beach, representing the active bloom phase, is strongly driven by nutrient enrichment, particularly nitrate and ammonia. In contrast, Menjangan Besar Island, associated with the bloom decomposition phase, is more influenced by silicate and phosphate, with lower overall nutrient input. Green-marked cleanup sites (Shrimp Pond and MB1–MB3) show improved water quality, while blue and purple sites (BB1–BB3 and LLB1–LLB3) reflect further nutrient reduction, confirming cleanup effectiveness. The clear distinction between green, blue and purple sites implies varying effluent sources influencing spatial differences in water quality.

The correlation analysis provides insights into HAB formation (Fig. 8), characterized by elevated Chl-a concentrations driven by high nutrient availability, particularly POM from shrimp pond waste. Microbial activity converts DOM into bioavailable nutrients, releasing ammonia, phosphate, and silicate. Through nitrification, ammonia is oxidized to nitrite and subsequently to nitrate, fuelling phytoplankton growth illustrated in Fig. 8(C1). Sufficient sunlight and low-current hydrodynamics further enhance HAB outbreaks.

HAB depletes DO through algal respiration and microbial decomposition of dead algae, leading to hypoxic or anoxic conditions that may trigger toxin production, threatening marine ecosystems depicted in Fig. 8(C2). HAB also impact water quality, causing slightly lower salinity due to ion uptake during algal growth and reduced pH as decomposing algae release CO_2 , forming carbonic acid and increasing water acidity shown in Fig. 8(C3). Additionally, TSS levels rise due to increased algal biomass (organic TSS) and inorganic TSS from DOM binding with metals and sediments.

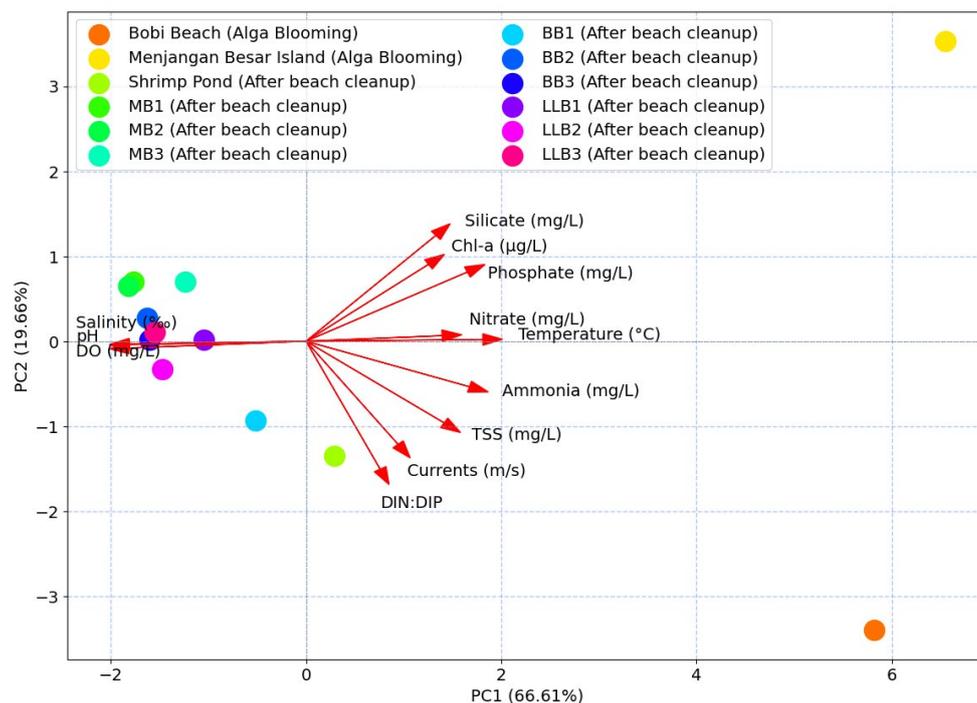


Fig.7. PCA analysis of Chl-a to nutrients, water quality, and hydrodynamic factors.

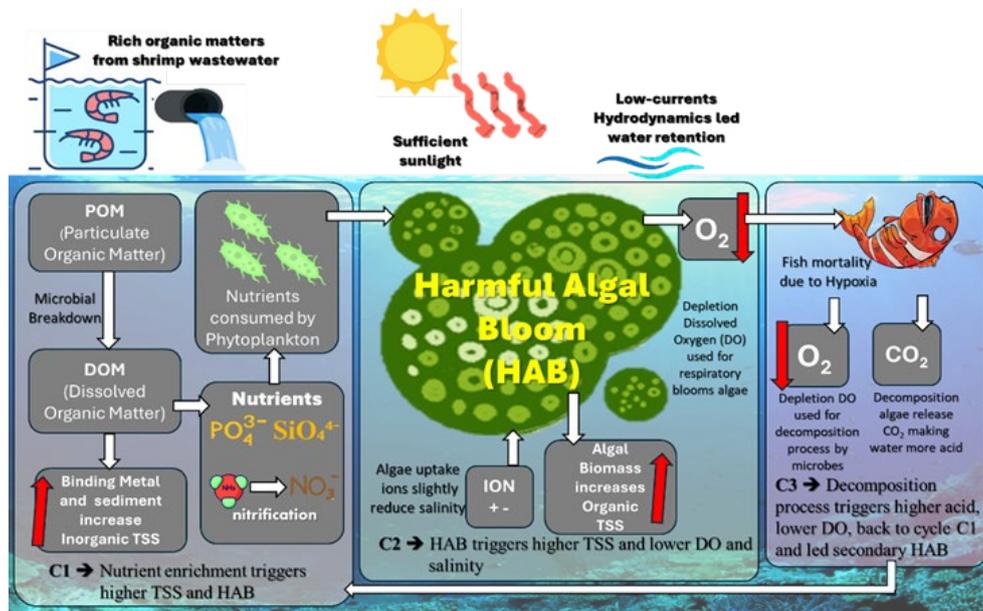


Fig.8. Mechanism of HABs in KNP.

4. Conclusions

The HAB outbreak in Karimunjawa National Park (KNP) on September 19, 2023, occurred under optimal bloom conditions, primarily driven by elevated nutrient inputs linked to Vannamei shrimp harvest cycles. These anthropogenic inputs were further intensified by intense sunlight during the dry season peak and the presence of low-current hydrodynamics, which collectively created a favourable environment for algal proliferation. The bloom event exemplifies a disturbance in the coastal biogeochemical cycle. It initiates with nutrient enrichment (chemical phase), transitions into rapid microalgal growth (biological phase), and proceeds to decomposition (geochemical phase). This terminal stage can result in hypoxic conditions, increasing the risk of secondary HABs that may exhibit heightened severity due to toxin production and further oxygen depletion.

Acknowledgements

This research was conducted under the Research, Development, and Application (RPP) Program of the Institution of Research and Community Service (LPPM), Diponegoro University, with funding support from the APBN of Universitas Diponegoro (2024) and Visiting Lecturer Program of World Class University, Faculty of Fisheries and Marine Science, Diponegoro University (2025). The authors express their sincere gratitude to all funding institutions and contributors, whose support was instrumental in the successful completion of this study. The research was carried out in accordance with institutional guidelines, as stipulated in the Activity Assignment Letter No. 569-02/UN7.D2/PP/VII/2024 issued by LPPM, Universitas Diponegoro.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- American Public Health Association (APHA). 2005. American Water Works Association, & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21st ed.). Washington, DC: APHA.
- Apostolopoulos D., Nikolakopoulos K.G., Boumpoulis V. et al. 2020. GIS based analysis and accuracy assessment of low-resolution satellite imagery for coastline monitoring. Proceedings Volume 11534, Earth Resources and Environmental Remote Sensing/GIS Applications XI: 115340B. DOI: [10.1117/12.2573440](https://doi.org/10.1117/12.2573440)
- Arp D.J., Stein L.Y. 2003. Metabolism of Inorganic N Compounds by Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38(6): 471–495. DOI: [10.1080/10409230390267446](https://doi.org/10.1080/10409230390267446)
- Beman J.M., Leilei Shih J., Popp B.N. 2013. Nitrite oxidation in the upper water column and oxygen minimum zone of the eastern tropical North Pacific Ocean. *ISME Journal* 7(11): 2192–2205. DOI: [10.1038/ismej.2013.96](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.96)
- Boyd C.E., Prather E.E., Parks R.W. 1975. Sudden Mortality of a Massive Phytoplankton Bloom. *Weed Science* 23(1): 61–97. URL: [https://www.jstor.org/stable/4042459?seq=1&cid=pdf](https://www.jstor.org/stable/4042459?seq=1&cid=pdf-stable/4042459?seq=1&cid=pdf)
- Buskey E.J., Wysor B., Hyatt C. 1998. The role of hypersalinity in the persistence of the Texas ‘brown tide’ in the Laguna Madre. In *Journal of Plankton Research* 20(8): 1553–1565. URL: <https://academic.oup.com/plankt/article/20/8/1553/1483528>
- Capone D.G. 2008. The marine nitrogen cycle. *Microbe* 3(4): 186–192. DOI: [10.1128/microbe.3.186.1](https://doi.org/10.1128/microbe.3.186.1)
- Chan L., Li Y., Stenstrom M.K. 2008. Protocol Evaluation of the Total Suspended Solids and Suspended Sediment Concentration Methods: Solid Recovery Efficiency and Application for Stormwater Analysis. *Water Environment Research* 80(9): 796–805. DOI: [10.2175/106143008x296497](https://doi.org/10.2175/106143008x296497)
- Coll R.M., Edwards M.R., Haaksma C. 1978. Some properties of allophycocyanin from a thermophilic blue-green alga. *Biophysical Chemistry* 8: 369–376. DOI: [10.1016/0301-4622\(78\)80018-0](https://doi.org/10.1016/0301-4622(78)80018-0)
- Ding X., Liu J., Zhang H. et al. 2022. Phytoplankton Community Patterns in the Northeastern South China Sea: Implications of Intensified Kuroshio Intrusion During the 2015/16 El Niño. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 127(2): e2021JC017998. DOI: [10.1029/2021JC017998](https://doi.org/10.1029/2021JC017998)

- Doering P.H., Chamberlain R.H., Haunert K.M. 2006. Chlorophyll-a and its use as an indicator of eutrophication in the Caloosahatchee Estuary, Florida. *Lessons Learned from Transferring Science to Watershed Management* 69: 51–72.
- Du Y.X., An S.L., He H. et al. 2022. Production and transformation of organic matter driven by algal blooms in a shallow lake: Role of sediments. *Water Research* 219(1): 118560. DOI: [10.1016/j.watres.2022.118560](https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118560)
- Edean R., Monks S.A., Griffith J.K. et al. 1993. Apparent relationships between toxins elaborated by the Cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* and those present in the flesh of the Narrow-barred Spanish Mackerel *Scomberomorus commersoni*. *Toxicon* 31(9): 1155–1165. DOI: [10.1016/0041-0101\(93\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90131-2)
- Flores-Chavarría A.M., Rodríguez-Jaramillo C., Band-Schmidt C.J. et al. 2023. Effect of dissolved metabolites of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): A histological study. *Heliyon* 9(6): e17018. DOI: [10.1016/j.heliyon.2023.e17018](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17018)
- Fraga M., Churro C., Leão-Martins J. et al. 2025. Cyanotoxins on the move - Freshwater origins with marine consequences: A systematic review of global changes and emerging trends. *Marine Pollution Bulletin* 216: 118017. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2025.118017](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.118017)
- Frankenberg N., Mukougawa K., Kohchi T. et al. 2001. Functional Genomic Analysis of the HY2 Family of Ferredoxin-Dependent Bilin Reductases from Oxygenic Photosynthetic Organisms. *The Plant Cell* 13(4): 965–978. DOI: [10.1105/tpc.13.4.965](https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.965)
- García A.B., Longo E., Bermejo R. 2021. The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. *Journal of Applied Phycology* 33(5): 3059–3070. DOI: [10.1007/s10811-021-02522-z](https://doi.org/10.1007/s10811-021-02522-z)
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). *Trichodesmium erythraeum Ehrenberg ex Gomont, 1892*. through: World Register of Marine Species. URL: <https://marinespecies.org/aphia.php?p=tax-details&id=660919> (Accessed 2023-09-2)
- Guo C., Tester P.A. 1994. Toxic effect of the bloom-forming *Trichodesmium* sp. (cyanophyta) to the copepod *Acartia tonsa*. *Natural Toxins* 2(4): 222–227. DOI: [10.1002/nt.2620020411](https://doi.org/10.1002/nt.2620020411)
- Harvey E.T., Walve J., Andersson A. et al. 2019. The effect of optical properties on secchi depth and implications for eutrophication management. *Frontiers in Marine Science* 5: 496. DOI: [10.3389/fmars.2018.00496](https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00496)
- Johan F., Jafri M.Z., Lim H.S. et al. 2014. Laboratory measurement: Chlorophyll-a concentration measurement with acetone method using spectrophotometer. In: 2014 IEEE International Conference on Industrial Engineering and Engineering Management, pp. 744–748. DOI: [10.1109/IEEM.2014.7058737](https://doi.org/10.1109/IEEM.2014.7058737)
- Knapp A.N., Dekaezemaeker J., Bonnet S. et al. 2012. Sensitivity of *Trichodesmium erythraeum* and *Crocospaera watsonii* abundance and N₂ fixation rates to varying NO₃⁻ and PO₄³⁻ concentrations in batch cultures. *Aquatic Microbial Ecology* 66(3): 223–236. DOI: [10.3354/ame01577](https://doi.org/10.3354/ame01577)
- Leney A.C., Tschanz A., Heck A.J.R. 2018. Connecting color with assembly in the fluorescent B-phycoerythrin protein complex. *FEBS Journal* 285(1): 178–187. DOI: [10.1111/febs.14331](https://doi.org/10.1111/febs.14331)
- Lessard E.J., Swift E. 1986. Short Communication Dinoflagellates from the North Atlantic classified as phototrophic or heterotrophic by epifluorescence microscopy. *Journal of Plankton Research* 8(6). DOI: [10.1093/plankt/8.6.1209](https://doi.org/10.1093/plankt/8.6.1209)
- Lever J., Krzywinski M., Altman N. 2017. Points of Significance: Principal component analysis. *Nature Methods* 14(7): 641–642. DOI: [10.1038/nmeth.4346](https://doi.org/10.1038/nmeth.4346)
- Li M., Zhang H., Sun H. et al. 2022. Effect of phosphate and ammonium concentrations, total suspended solids and alkalinity on lignin-induced struvite precipitation. *Scientific Reports* 12(1): 2901. DOI: [10.1038/s41598-022-06930-0](https://doi.org/10.1038/s41598-022-06930-0)
- Liu J., Qiu Z., Feng J. et al. 2023. Monitoring Total Suspended Solids and Chlorophyll-a Concentrations in Turbid Waters: A Case Study of the Pearl River Estuary and Coast Using Machine Learning. *Remote Sensing* 15(23): 5559. DOI: [10.3390/rs15235559](https://doi.org/10.3390/rs15235559)
- Liu X.S. 2019. A probabilistic explanation of Pearson's correlation. *Teaching Statistics* 41(3): 115–117. DOI: [10.1111/test.12204](https://doi.org/10.1111/test.12204)
- Ma W., Feng J., Zhang J. et al. 2025. Different responses of phytoplankton taxa to water N and P inputs in a freshwater wetland: A mesocosm study. *Marine Pollution Bulletin* 216: 117895. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2025.117895](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.117895)
- Mickle A.M. 1993. Pollution filtration by plants in wetland-littoral zones. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 144: 282–290. URL: <https://www.jstor.org/stable/4065012>
- Mohanty A.K., Satpathy K.K., Sahu G. et al. 2010. Bloom of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr.) and its impact on water quality and plankton community structure in the coastal waters of southeast coast of India. *Indian Journal of Marine Science* 39(3): 323–333. URL: <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/10669>
- Morabito S., Silvestro S., Faggio C. 2018. How the marine biotoxins affect human health. *Natural Product Research* 32(6): 621–631. DOI: [10.1080/14786419.2017.1329734](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329734)
- Morris A.W., Riley J.P. 1963. Determination of nitrate in sea. *Analytica Chimica Acta* 29: 272–279. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)88614-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88614-6)
- Mullin J.B., Riley J.P. 1955. The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Analytica chimica acta* 12: 162–176. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)87825-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)87825-3)
- Murphy J., Riley J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27: 31–36. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- O'Neil J.M., Heil C.A., Glibert P.M. et al. 2024. Plankton Community Changes and Nutrient Dynamics Associated with Blooms of the Pelagic Cyanobacterium *Trichodesmium* in the Gulf of Mexico and the Great Barrier Reef. *Water (Switzerland)* 16(12): 1663. DOI: [10.3390/w16121663](https://doi.org/10.3390/w16121663)
- Paerl H.W., Valdes-Weaver L.M., Joyner A.R. et al. 2007. Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Pamlico sound system, North Carolina. *Ecological Applications* 17(sp5): S88–S101. DOI: [10.1890/05-0840.1](https://doi.org/10.1890/05-0840.1)
- Parsons T.R., Maita Y., Lalli C.M. 1984. *A Manual of Chemical & Biological Methods for Seawater Analysis*-Pergamon Press. A. Wheaton & Co. Ltd. Exeter.
- Patel K., Tiwary G.J., Pandey K.K. et al. 2024. An unsupervised machine learning algorithm: PCA (Principal Component Analysis) comprehensive review. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science* 6(2): 1303–1314. DOI: [10.56726/irjmets49457](https://doi.org/10.56726/irjmets49457)
- Polak M., Heiser W.J., de Rooij M. 2009. Two types of single-peaked data: Correspondence analysis as an alternative to principal component analysis. *Computational Statistics and Data Analysis* 53(8): 3117–3128. DOI: [10.1016/j.csda.2008.09.010](https://doi.org/10.1016/j.csda.2008.09.010)
- Purnomo A., Mufti P., Takarina N. et al. 2022. Environmental Impact of the Intensive System of *Vannamei* Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Farming on the Karimunjawa-Jepara-Muria Biosphere Reserve, Indonesia. *International*

Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology 12: 873. DOI: [10.1016/j.csda.2008.09.010](https://doi.org/10.1016/j.csda.2008.09.010)

Qijun L. 2010. Reviews of influences from hydrodynamic conditions on algae. *Soil and Environmental Sciences* 19(7): 1732–1738.

Sarkar S.K. 2018. Marine algal bloom: Characteristics, causes and climate change impacts. Springer Nature Singapore. DOI: [10.1007/978-981-10-8261-0](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8261-0)

Satpathy K.K., Mohanty A.K., Sahu G. et al. 2007. On the occurrence of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr.) bloom in the coastal waters of Kalpakkam, east coast of India. *Indian Journal of Science and Technology* 1(2): 1–9. DOI: [10.17485/ijst/2007/v1i1/29204](https://doi.org/10.17485/ijst/2007/v1i1/29204)

Satya E.D., Sabdon A., Wijayanti D.P. et al. 2023. Mapping coral cover using Sentinel-2A in Karimunjawa, Indonesia. *Biodiversitas* 24(2): 827–836. DOI: [10.13057/biodiv/d240219](https://doi.org/10.13057/biodiv/d240219)

Shi X., Zou Y., Zhang Y. et al. 2024. Salinity decline promotes growth and harmful blooms of a toxic alga by diverting carbon flow. *Global Change Biology* 30(6): e17348. DOI: [10.1111/gcb.17348](https://doi.org/10.1111/gcb.17348)

Sidabutar T. 2016. Mass Mortality of Fish in Lampung Bay, Indonesia. *Omni Akuatika* 12(2): 17–25. DOI: [10.20884/1.oa.2016.12.1.27](https://doi.org/10.20884/1.oa.2016.12.1.27)

Sidqi J., Agroqua F.D.J., Fidari J.S. et al. 2022. The design model of intensive Vaname Shrimp Ponds for eco-green aquaculture development in the area of Probolinggo, East Java, Indonesia. *Agroqua* 20(1): 24–39.

Song Y. 2023. Hydrodynamic impacts on algal blooms in reservoirs and bloom mitigation using reservoir operation strategies: A review. *Journal of Hydrology* 620: 129375. DOI: [10.1016/j.jhydrol.2023.129375](https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2023.129375)

Soratur A., Venmathi Maran B.A., Kamarudin A.S. et al. 2024. Microbial Diversity and Nitrogen Cycling in Peat and Marine Soils: A Review. *Microbiology Research* 15(2): 806–822. DOI: [10.3390/microbiolres15020052](https://doi.org/10.3390/microbiolres15020052)

Stirling H.P. 1999. Chemical and Biological Methods of Water Analysis for Aquaculturists. *Pisces*. University of Stirling Institute of Aquaculture.

Sudo R. 1978. Some ecological observation on the decomposition of periphytic algae and aquatic plants (Vol. 12). Pergamon Press.

Sultana S., Awal S., Shaika N.A. et al. 2022. Cyanobacterial blooms in earthen aquaculture ponds and their impact on fisheries and human health in Bangladesh. *Aquaculture Research* 53(15): 5129–5141. DOI: [10.1111/are.16011](https://doi.org/10.1111/are.16011)

Taylor R., Fletcher R.L., Raven J.A. 2001. Preliminary Studies on the Growth of Selected “Green Tide” Algae in Laboratory Culture: Effects of Irradiance, Temperature, Salinity and Nutrients on Growth Rate. *Botanica Marina* 44(4): 327–336. DOI: [10.1515/BOT.2001.042](https://doi.org/10.1515/BOT.2001.042)

Veldhuis M.J.W., Kraay G.W. 2000. Flow cytometry analysis of phytoplankton 121. *Scientia Marina* 64(2): 121–134. DOI: [10.3989/scimar.2000.64n2121](https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2121)

Wang L., Wang X., Jin X. et al. 2017. Analysis of algae growth mechanism and water bloom prediction under the effect of multi-affecting factor. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24(3): 556–562. DOI: [10.1016/j.sjbs.2017.01.026](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.026)

Weber M., De Beer D., Lott C. et al. 2012. Mechanisms of damage to corals exposed to sedimentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(24): E1558–E1567. DOI: [10.1073/pnas.1100715109](https://doi.org/10.1073/pnas.1100715109)

Widiarti R., Zamani N.P., Bengen D.G. et al. 2019. The dinoflagellate causing ciguatera fish poisoning, *Prorocentrum lima*, in Karimunjawa island waters-Central Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 325(1): 012014. DOI: [10.1088/1755-1315/325/1/012014](https://doi.org/10.1088/1755-1315/325/1/012014)

Wijaya A., Pramono S.E., Melati I.S. et al. 2021. Toward the Community-based Sustainable Marine Tourism: Identifying the Impact of Tourism Development in Karimunjawa Island. *International Journal of Academic Research in Business and Social Sciences* 11(5): 275–288. DOI: [10.6007/IJARBS/v11-i5/9924](https://doi.org/10.6007/IJARBS/v11-i5/9924)

Wijayanti D.P., Indrayanti E., Nuryadi H. et al. 2018. DNA barcode of *Acropora hyacinthus* of Karimunjawa Archipelago. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 139(1): 012017. DOI: [10.1088/1755-1315/139/1/012017](https://doi.org/10.1088/1755-1315/139/1/012017)

Yamaji I. 1980. Illustrations of the marine plankton of Japan. *Hoikusha no genshoku zukan* 45: 537.

Yan Z., Kamanmalek S., Alamdari N. et al. 2024. Comprehensive Insights into Harmful Algal Blooms: A Review of Chemical, Physical, Biological, and Climatological Influencers with Predictive Modeling Approaches. *Journal of Environmental Engineering* 150(4). DOI: [10.1061/JOEEDU.EEENG-7549](https://doi.org/10.1061/JOEEDU.EEENG-7549)

Yuan L.L. 2021. Continental-scale effects of phytoplankton and non-phytoplankton turbidity on macrophyte occurrence in shallow lakes. *Aquatic Sciences* 83(1): 14. DOI: [10.1007/s00027-020-00769-1](https://doi.org/10.1007/s00027-020-00769-1)

Yuliana E., Boer M., Fahrudin A. et al. 2017. Biodiversity of reef fishes in marine protected area of Karimunjawa National Park. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis* 9(1): 29–43. DOI: [10.29244/jitkt.v9i1.17915](https://doi.org/10.29244/jitkt.v9i1.17915) (In Bahasa)

Zadorojny C., Saxton S. 1973. Spectrophotometric Determination of Ammonia. *Finger Source: Journal (Water Pollution Control Federation)* 45(5): 905–912. URL: <https://www.jstor.org/stable/i25037822>

Zhang W., Liu J., Xiao Y. et al. 2022. The Impact of Cyanobacteria Blooms on the Aquatic Environment and Human Health. *Toxins* 14(10): 658. DOI: [10.3390/toxins14100658](https://doi.org/10.3390/toxins14100658)

Blood cell morphology of the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa* Schweigger, 1812) from contrasting habitats in northeastern Algeria

Frih A.^{1,*}, Sahraoui L.², Hadiby R.³, Ziane N.¹, Frih H.⁴, Rouag R.⁵

¹Laboratory of Environmental Bio-surveillance, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar - Annaba University 12 P.O. Box, 23000 Annaba, Algeria

²Laboratory of Automation and Signals Annaba, Department of Electronics, Faculty of Engineers, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

³Ecobiology Laboratory for Marine Environments and Coastal Areas, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁴Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁵Laboratory of Environmental Sciences and Agro-ecology, Department of Biology, Faculty of Science, Chadli Bendjedid University, El Tarf, Algeria

ABSTRACT. We examined the blood cell profiles of the Iberian pond turtle, also known as the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa*) in two habitats in northeastern Algeria with markedly contrasting water quality. Blood smears were prepared from 38 adult turtles collected at a polluted reference site (Bouhamra) and an unpolluted site (Brabtia). Differential leukocyte counts and erythrocyte morphometrics (length, width, and surface area) were quantified. At Brabtia Reserve, heterophils were the most abundant leukocyte type (41.35%), followed by lymphocytes (27.54%) and monocytes (10.16%). At the Bouhamra site, heterophils are also dominant (57.86%), followed by monocytes (21.40%) and lymphocytes (12.80%). The average ratio of heterophils to lymphocytes (H/L) was 4.39 in the polluted site, Bouhamra, which is about three times higher than the ratio of 1.60 in the pristine, indicating elevated physiological stress. Erythrocyte dimensions differed significantly between sites. In turtles from Brabtia, mean erythrocyte length, width, and surface were 24.10 μm , 13.68 μm , and 260.97 μm^2 , respectively. Corresponding values in turtles from the degraded habitat (Bouhamra) were larger (25.07 μm , 13.96 μm , and 274.95 μm^2). Nuclear length, nuclear width, nuclear surface, and nuclear shape index (NL/NW) did not vary between habitats. Our results show that contamination mainly affects the size of red blood cells, while the morphological parameters of the nucleus remain stable. The higher H/L ratio at the polluted site (Bouhamra) also supports the use of leukocyte profiles as solid indicators of chronic environmental stress in freshwater turtles.

Keywords: *Mauremys leprosa*, blood cell morphology, H/L ratio, environmental stress, Algeria

For citation: Frih A., Sahraoui L., Hadiby R., Ziane N., Frih H., Rouag R. Blood cell morphology of the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa* Schweigger, 1812) from contrasting habitats in northeastern Algeria // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1281-1288. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1281

1. Introduction

Mauremys leprosa (Schweigger, 1812), also known as the Mediterranean pond turtle, is a freshwater turtle species endemic to southwestern Europe and northwestern Africa (Palacios et al., 2015; Laghzaoui et al., 2020). Two subspecies are present in the northwest of Africa: *M. leprosa leprosa* and *M. leprosa saharica*

(Fritz et al., 2006; Veríssimo et al., 2016). The subspecies *M. l. saharica* is widely distributed in Algeria, from the coastal zones to the Sahara (Rouag et al., 2024). The population of this species is decreasing for several reasons, and the reasons for this decline are numerous, including habitat loss, urbanisation, intensified agriculture, and habitat fragmentation (Mateo et al., 2003; Rouag et al., 2024; Díaz-Paniagua et al., 2015).

*Corresponding author. E-mail address: abdelaziz.frih@univ-annaba.dz (A. Frih)

Received: July 31, 2025;

Accepted after revised: November 07, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



In the present study, we evaluate the morphology and size of blood cells of *M. leprosa* in contrasted habitats to measure the impact of habitat quality on turtle physiology. The haematological profile is a commonly used practical method for assessing environmental effects. While many studies have described the blood profiles of reptiles (Sypek and Borysenko, 1988; Campbell, 1998; Stein, 1996; Mader, 2000; Sykes and Klaphake, 2008), reference values for many species are unavailable, particularly for freshwater turtles, where haematological reference values are still poorly understood. Haematological values can change due to factors such as gender, age, season, and location, and without reference values, it becomes difficult to compare and understand the results. This study aims to establish haematological values for *Mauremys leprosa* and provide a detailed description of blood cell morphology by comparing individuals from contrasting environments. These results will help improve the assessment of health status in wild populations of *Mauremys leprosa* and contribute valuable reference data for future ecological and conservation studies.

2. Material and Methods

The first site, Oued Bouhamra (36°52'25.0"N 7°43'23.0"E), is a polluted watercourse with low levels of dissolved oxygen (5.76-13.9 mg/L), high turbidity (28.3-31.2 NTU), high conductivity (2,731-1,950 μ S/cm) and high total dissolved solids (1,200-1,365 mg/L). This site has the characteristics of a degraded habitat. Several metallic elements also exceed or approach internationally established reference thresholds, including manganese (60.1 mg/L), nickel (17.07 mg/L), iron (1.48 mg/L), arsenic (0.063 mg/L), and lead (0.049 mg/L). These results suggest that the site is subject to significant anthropogenic inputs, reflecting a state of contamination that could potentially affect the ecological functioning of the aquatic ecosystem. The vegetation consists mainly of reeds (*Phragmites australis*) and rushes (*Juncus acutus*) on the banks and patches of ribbon grass (*Typha angustifolia*) in the middle of the stream. The pristine site is a pond situated in El Kala (36°51'09.0" N and 8°19'52.0" E), located in the Brabtia Zoological Park. The site is a spring-fed pond of 0.5 ha, surrounded by a belt of woody vegetation composed of *Fraxinus communis*, *Populus alba*, and *Alnus glutinosa*, with emergent vegetation composed of *Nuphar luteum*, *Juncus acutus*, and *Phragmites communis*. The study was conducted from March to August 2024. Sampling was conducted manually and with the aid of a dip net. Individual variables were measured for all specimens, such as body size and weight. Carapace length was measured using a digital caliper (precision \pm 0.1 mm). The body weight of the turtles was measured using a digital balance (precision \pm 1 g). Sex was determined by secondary sexual characteristics (e.g., plastral concavity, tail length) (Servan et al., 1989). We prepared a blood smear on a microscope slide using a 1 mL syringe with a 27 G, 0.5 inch, and 0.413 mm diameter needle taken from the caudal sinus at the base of the tail. The blood smears were then air-dried, fixed in abso-

lute methanol for 10 minutes and stained with Giemsa diluted 1:9 with phosphate buffer solution (pH 7.2) for 40 minutes. The blood smears were then used to identify and quantify leukocytes, as well as to measure the size of erythrocytes. The proportion of different types of leukocytes was assessed on the basis of an examination of 100 leukocytes under 1000x magnification under oil immersion. On each blood smear, the length (EL) and width (EW) of randomly selected erythrocytes, as well as the length (NL) and width (NW) of their nuclei, were measured. The size of the erythrocytes and their nuclei were calculated using the formulas: $S = \pi \times (L/2) \times (W/2)$, where S is the surface area (μm^2); L is the length (μm); and W is the width (μm) of the cell or nucleus (Petrov and Stepanyan, 2016). Cell and nuclear shapes were compared using the EL/EW and NL/NW ratios, while the nucleus/cytoplasm ratio was compared using the N/C ratio.

Photographs of blood cells were taken with the Olympus CX21 imaging system. SPSS software (version 29.0) was used to perform the statistical analyses. After performing Levene's and Shapiro-Wilk tests, the means were compared using a t-test and a U-test, presented with standard deviations (SD).

3. Results

3.1. Body size

In the pond at the Brabtia reserve, the females are larger and heavier than the males, but this difference is not statistically significant: Weight (males: 437.82 ± 193.84 g, range: 130-698 g; female: 584.00 ± 225.49 g, range: 230-799 g; $p > 0.05$), straight carapace length (male: 157.41 ± 32.10 mm, range: 102.5-197 mm; female: 164.33 ± 24.88 mm, range: 123-188 mm; $p > 0.05$). In the Bouhamra site, males and females do not differ significantly in terms of straight carapace length (males: 179.52 ± 31.18 mm, range 109.58-218.12; females: 174.49 ± 29.78 mm, range 129-220 mm; $P > 0.05$) and body weight (males: 699 ± 230.25 g, range: 195-980 g; females: 668.05 ± 260.48 g, range 258-1295 g; $P > 0.05$).

3.2. Differential white blood cell counts

In the pond at the Brabatia Reserve, heterophils are the most abundant leukocytes, with an average of 41.35% in both males and females. Lymphocytes are more abundant than monocytes, with an average of 27.54% and 10.16%, respectively. There are no significant differences between males and females except for basophils, which are more elevated in females. This difference was confirmed by a Student's t-test ($t = -2.35$; $p = 0.03$), as shown in (Table 1).

At the Bouhamra site, heterophils are the most abundant granulocytes, making up 53.67% of the leukocytes in males and 61.53% in females. They are followed by monocytes, which make up 19.47% in males and 23.09% in females. Lymphocytes account for 13.44% of males and 12.25% of females. All leukocyte subtypes except lymphocytes show significantly higher percentages in females than in males ($p < 0.001$). No

Table 1. Differential white blood cell counts in peripheral blood of male and female *M. leprosa* at the Brabtia site. For each leukocyte cell type, mean \pm SD and range are shown.

	Male (N = 9)		Female (N = 9)		t-Test	
	X \pm SD	Min-Max	X \pm SD	Min-Max	t	p
Lymphocyte (%)	28.11 \pm 9.38	18.27 - 50.43	26.97 \pm 7.01	19.99 - 42.27	-0.29	0.77
Heterophil (%)	39.16 \pm 9.56	22.70 - 54.59	43.54 \pm 8.03	27.31 - 52.87	1.05	0.30
Eosinophil (%)	13.53 \pm 5.13	7.00 - 21.64	11.84 \pm 4.75	6.60 - 20.53	-0.72	0.47
Basophil (%)	9.17 \pm 4.64	3.23 - 17.58	5.08 \pm 2.36	2.94 - 10.26	-2.35	0.03
Monocyte (%)	10.02 \pm 4.26	2.30 - 16.21	10.29 \pm 3.91	4.69 - 16.58	0.13	0.89
H/L	1.52 \pm 0.53	0.45 - 2.40	1.68 \pm 0.41	0.96 - 2.24	0.67	0.50

significant difference exists between males and females for the H/L ratio ($t = -0.77$, $p = 0.446$). The strong predominance of heterophils and the low proportion of lymphocytes indicate a stress-related leukocyte shift in both sexes. However, sex does not influence the H/L ratio at this polluted site, suggesting a generalized physiological stress response (Table 2).

A comparative analysis of leukocyte parameters in the *Mauremys leprosa* population from unpolluted and polluted sites revealed significant differences in all examined variables (Student's t-test, $p < 0.001$ for each parameter). More specifically, the proportion of lymphocytes was significantly higher at the unpolluted site (27.54%), while the proportions of heterophils, basophils, monocytes, and the H/L ratio were significantly higher in the polluted site population.

The percentage of eosinophils was significantly lower in individuals from the polluted site (2.89%) than in turtles from the unpolluted site (12.68%). These results demonstrate the significant impact of pollution on leukocyte composition, leading to a reduction in lymphocytes and an increase in leukocytes associated with the immunity response in populations exposed to pollutants. The H/L ratio indicates a state of physiological stress caused by a degraded environment; the average value is 4.39 for both males and females, which is almost three times higher than at the unpolluted site (1.60). This suggests the presence of stress or activation of the innate immune response (Aguirre et al., 1995; Davis et al., 2008). These results highlight the profound influence of environmental quality on the immune status of *M. leprosa*, supporting the use of leukocyte profiles as effective biomarkers of ecological health and pollution exposure in freshwater turtles (Fig. 1).

3.3. Erythrocyte measurement

At the Brabtia site, a morphometric analysis of *Mauremys leprosa* erythrocytes revealed no significant differences between males and females for any measured parameter. The average values of cell dimensions (length, width, and surface area) and nuclear dimensions, as well as morphometric ratios, were similar between sexes. All statistical tests (Mann-Whitney) showed non-significant differences ($p > 0.05$), including erythrocyte length ($U = 45.0$, $p = 0.72$); erythrocytes width ($U = 53.5$, $p = 0.26$); erythrocytes surface ($U = 37.0$, $p = 0.79$); nucleus length ($U = 43.0$, $p = 0.85$); nucleus width ($U = 38.5$, $p = 0.89$); and nucleus surface ($U = 35.0$, $p = 0.20$), as well as EL/EW ($U = 31.0$, $p = 0.421$), NL/NW ($U = 52.5$, $p = 0.308$), N/C ratio ($U = 27.5$, $p = 0.209$). This further confirms that blood cell size and shape in *Mauremys leprosa* are not sexually dimorphic at this site (Table 3).

At the Bouhamra site, the average length of erythrocytes in males was established as $25.12 \pm 0.21 \mu\text{m}$, and the width $13.95 \pm 0.18 \mu\text{m}$. The size was calculated as $276.66 \pm 6.28 \mu\text{m}^2$. The EL/EW ratio was identified as 1.8 ± 0.02 . The N/C ratio was 1.4. The average length of the nucleus was $9.76 \pm 0.11 \mu\text{m}$ and its width was $5.02 \pm 0.10 \mu\text{m}$. The average size was near $38.49 \pm 1.17 \mu\text{m}^2$. The NL/NW ratio was 1.93 ± 0.03 (Table 4). These values are close to those of females, where the average length of erythrocytes was $25.03 \pm 0.21 \mu\text{m}$, the width $14.00 \pm 0.20 \mu\text{m}$, and the size was $275.64 \pm 6.78 \mu\text{m}^2$. The EL/EW ratio was calculated as 1.79 ± 0.02 . The average length of the nucleus was calculated as $9.73 \pm 0.12 \mu\text{m}$ and the width as $5.01 \pm 0.12 \mu\text{m}$, and the size as $38.40 \pm 1.130 \mu\text{m}^2$. The NL/NW ratio of

Table 2. Differential white blood cell counts in peripheral blood of male and female *M. leprosa* at the Bouhamra site. For each leukocyte cell type, mean \pm SD and range are shown.

	Male (N = 14)		Female (N = 16)		t-Test	
	X \pm SD	Min-Max	X \pm SD	Min-Max	t	p
Lymphocyte (%)	13.44 \pm 3.53	9.64-19.38	12.25 \pm 1.95	8.94-15.18	1.17	0.251
Heterophil (%)	53.67 \pm 2.25	46.92-56.08	61.53 \pm 1.72	57.35-63.62	-10.60	0.000
Eosinophil (%)	2.68 \pm 0.11	2.35-2.80	3.08 \pm 0.09	2.87-3.18	-10.60	0.000
Basophil (%)	10.73 \pm 0.45	9.38-11.22	12.31 \pm 0.34	11.47-12.72	-10.60	0.000
Monocyte (%)	19.47 \pm 2.76	13.70-22.73	23.09 \pm 2.15	20.48-28.32	-3.98	0.000
H/L	4.26 \pm 1.10	2.51-5.72	4.55 \pm 0.80	3.52-6.07	-0.77	0.446

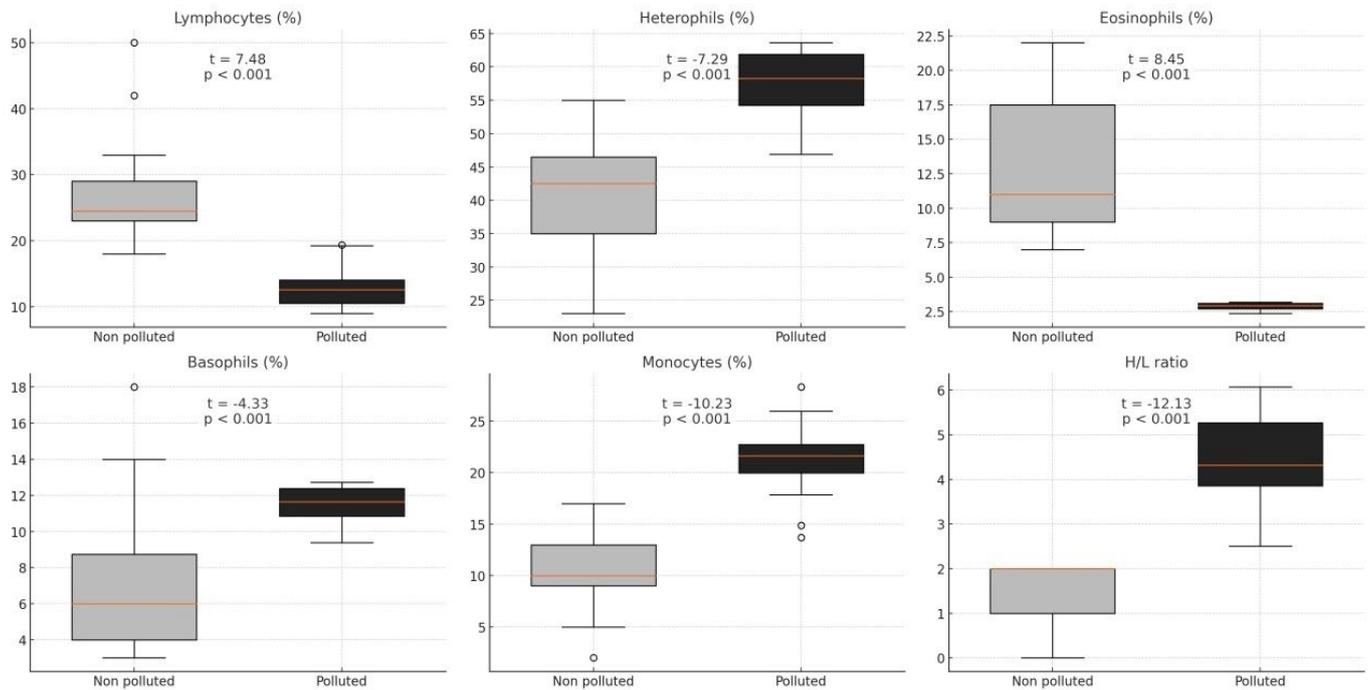


Fig.1. Comparison of leukocyte parameters between non-polluted and polluted sites in *Mauremys leprosa*.

1.93 ± 0.03 is also close to the male ratio. The Mann-Whitney tests of the morphometric descriptors of leukocytes carried out between males and females revealed no significant difference in all parameters, including erythrocyte length (U = 34.0, p = 0.38); erythrocyte width (U = 46.5, p = 0.057); erythrocyte surface (U = 38.0, p = 0.59); nucleus length (U = 30.0, p = 0.21); nucleus width (U = 42.5, p = 0.85); and nucleus surface (U = 37.0, p = 0.60) (Table 4).

The morphometric comparison of erythrocytes and their nuclei in individuals of *Mauremys leprosa* from unpolluted and polluted habitats reveals significant differences in erythrocyte morphology, particularly in length (EL), width (EW), surface (ES), and the EL/EW ratio. Erythrocyte length was significantly higher in turtles from the polluted site (25.07 ± 0.21 μm) than in those from the unpolluted site (24.10 ± 1.20 μm; p = 0.003), as was erythrocyte width (25.12 ± 0.21 μm vs. 24.16 ± 1.20 μm; p = 0.043). Similarly, the eryth-

rocyte surface (ES) was significantly higher in turtles from the polluted site (274.95 ± 5.72 μm²) than in turtles from the unpolluted site (260.97 ± 19.74 μm²; p = 0.009), and a significant increase in the EL/EW ratio was observed in turtles from the polluted site (p = 0.027). The nucleocytoplasmic ratio (N/C) was higher in turtles from the unpolluted site (0.15 ± 0.01) than in those from the polluted site (0.14 ± 0.00; p = 0.028). However, nuclear dimensions (NL and NW), nuclear surface (NS), and nuclear shape (NL/NW) did not differ significantly between habitats (Fig. 2).

4. Discussion

This study highlights the impact of habitat quality on blood cell morphology in *Mauremys leprosa*, reflecting the physiological effects of environmental pollution. Research conducted over the past indicates that the quantification of haematological parameters

Table 3. Measurements of erythrocytes and their nuclei in male and female Brabtia turtles and the Mann-Whitney U test statistics.

	Population (N = 18)			Male (N = 09)			Female (N = 09)			U-Test	
	X ± SD	Min	Max	X ± SD	Min	Max	X ± SD	Min	Max	U	P
EL (μm)	24.10 ± 1.20	21.90	25.30	24.16 ± 1.20	22.00	25.30	24.05 ± 1.27	21.90	25.30	45.0	0.724
EW (μm)	13.68 ± 0.46	12.78	14.40	13.80 ± 0.35	13.10	14.17	13.55 ± 0.54	12.78	14.40	53.5	0.268
EL/EW	1.76 ± 0.06	1.58	1.83	1.75 ± 0.07	1.58	1.80	1.77 ± 0.05	1.69	1.83	31.0	0.421
ES (μm ²)	260.97 ± 19.74	219.75	281.50	261.88 ± 17.97	231.00	281.10	260.06 ± 22.43	219.75	281.50	37.0	0.791
NL (μm)	9.68 ± 0.41	8.82	10.40	9.70 ± 0.48	8.82	10.40	9.67 ± 0.35	9.00	10.20	43.0	0.859
NW (μm)	5.04 ± 0.27	4.60	5.60	5.02 ± 0.32	4.60	5.60	5.07 ± 0.22	4.80	5.50	38.5	0.894
NL/NW	1.92 ± 0.05	1.81	2.02	1.94 ± 0.05	1.86	2.02	1.91 ± 0.05	1.81	1.96	52.5	0.308
NS (μm ²)	39.19 ± 4.06	33.20	48.50	38.68 ± 4.75	33.20	48.50	39.70 ± 3.44	35.40	45.00	35.0	0.659
N/C ratio	0.15 ± 0.02	0.14	0.20	0.15 ± 0.02	0.14	0.20	0.15 ± 0.02	0.14	0.18	27.5	0.209

Note: EL: Erythrocyte length; EW: Erythrocyte width; ES: Erythrocyte size; NL: Nucleus length; NW: Nucleus width; NS: Nucleus size; and NS/ES: Nucleocytoplasmic ratio.

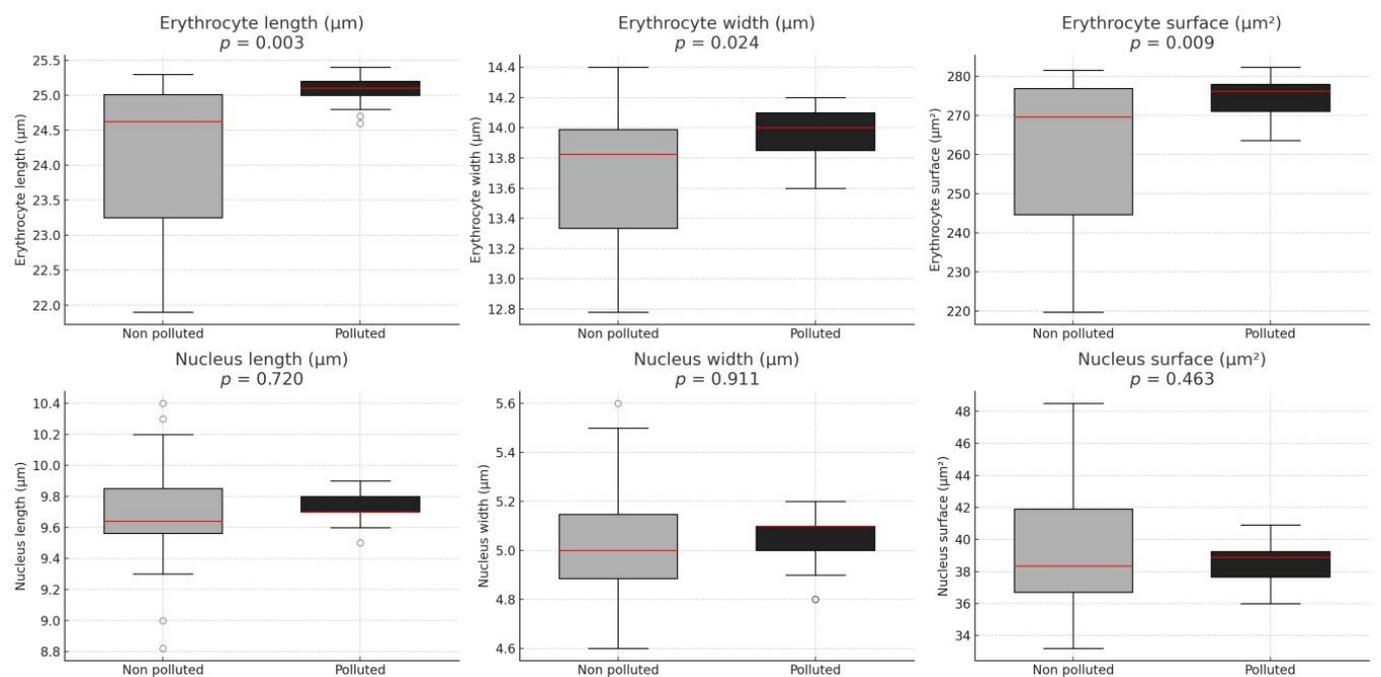
Table 4. Measurements of erythrocytes and their nuclei in male and female Bouhamra turtles and the Mann-Whitney U test statistics.

	Population (N = 19)			Male (N = 09)			Female (N = 10)			U-Test	
	X ±SD	Min	Max	X ±SD	Min	Max	X ±SD	Min	Max	U	P
EL (μm)	25.07 ± 0.21	24.7	25.4	25.12 ± 0.21	24.7	25.4	25.03 ± 0.21	24.6	25.3	34.0	0.38
EW (μm)	13.96 ± 0.2	13.6	14.2	13.95 ± 0.18	13.6	14.2	14.00 ± 0.20	13.6	14.2	46.5	0.93
EL/EW	1.8 ± 0.02	1.77	1.83	1.8 ± 0.02	1.77	1.83	1.79 ± 0.02	1.77	1.83	36.5	0.50
ES (μm ²)	274.95 ± 5.72	263.6	282.3	276.66 ± 6.28	269.1	282.3	275.64 ± 6.78	263.6	282.3	38.0	0.59
NL (μm)	9.72 ± 0.1	9.5	9.9	9.76 ± 0.11	9.6	9.9	9.73 ± 0.12	9.5	9.9	30.0	0.21
NW (μm)	5.04 ± 0.11	4.8	5.2	5.02 ± 0.10	4.8	5.2	5.01 ± 0.12	4.8	5.2	42.5	0.85
NL/NW	1.93 ± 0.03	1.9	2.0	1.93 ± 0.04	1.9	2.0	1.93 ± 0.03	1.9	1.98	36.5	0.49
NS (μm ²)	38.44 ± 1.21	36.0	40.9	38.49 ± 1.17	36.2	39.6	38.40 ± 1.130	36.0	40.9	37.0	0.53
N/C ratio	0.14	0.14	0.15	0.14	0.14	0.15	0.14	0.13	0.15	40.5	0.60

Note: EL: Erythrocyte length; EW: Erythrocyte width; ES: Erythrocyte size; NL: Nucleus length; NW: Nucleus width; NS: Nucleus size; and NS/ES: Nucleocytoplasmic ratio.

may be measured as a complement to the measurement of hormones in the study of vertebrate stress responses. Leukocyte profiles are particularly important in the study of physiology because they are directly linked to hormone levels. Considerable research has demonstrated that the adrenal and leukocyte responses to stress are closely related and similar across vertebrate taxa. (Gross and Siegel, 1983; McFarlane and Curtis, 1989; Romero and Reed, 2005; Davis et al., 2008). This hematological approach offers key advantages. Compared to adrenal hormone levels, which can vary quickly and need to be checked right away, white blood cell counts stay stable for a longer time after being checked, especially in ectotherms such as turtles (Romero and Reed, 2005; Davis et al., 2008). As shown in other studies, in contrast to many reptiles, the most common leukocytes in *M. leprosa* are not lymphocytes, but rather heterophils (Heatley and Russell, 2019).

In our study, heterophils were the most prevalent type of leukocyte in turtles living in pristine habitats, with mean values of 41.35%; lymphocytes followed with 28.11%. Heterophils were the most common leukocytes and were two times more prevalent than eosinophils. Similar high frequencies have been described for *Trachemys scripta* (Isis, 2002; Novoveský and Halán, 2019), *Mauremys leprosa* (Hidalgo-Vila et al., 2007; Marques et al., 2025), and Arrau turtle *Podocnemis expansa* (Rossini et al., 2012). However, the results of this research only partially corresponded with ours; the values of the other parameters differed greatly and only partially aligned with ours. It is important to note that the blood parameters of chelonians are influenced by many factors, such as season, age, sex, health status, geographic location, physiological state, and reproductive status (Christopher et al., 1999; Jacobson, 2007). Marques et al. (2025) found the

**Fig.2.** Comparative morphometric analysis of erythrocytes and nuclei between a non-polluted and a polluted site in *Mauremys leprosa*.

same result for *M. leprosa* in a Portuguese population, where heterophils dominated the leukocyte population at 61.53%, followed by lymphocytes at 28.89%. The average lymphocyte value for the Brabtia population is 28.11%, which is closer to the value found by Marques et al. (2025) in turtles from Porto d'Abrigo in Portugal. At the degraded site of Bouhamra, values are similar to those reported by Hidalgo-Vila et al. (2007) for *Mauremys leprosa* in Spain, with a high percentage of heterophils (61.53%) and a low percentage of lymphocytes (12.25). However, Hidalgo-Vila et al. (2007) did not provide information on the specific pollutants or their concentrations. Instead, they focused on haematological and biochemical parameters as indicators of environmental influence. By contrast, the presence of elevated levels of heavy metals such as manganese, nickel, iron, arsenic, and lead, together with detectable amounts of cadmium and mercury in Bouhamra, suggests that toxicological stress is the main factor underlying the observed haematological alterations (Christin et al., 1999; Sparling et al., 2010). Changes induced by stress lead to an increase in the number of heterophils while decreasing the number of lymphocytes. Given that the numbers of heterophils and lymphocytes are affected by stress in opposing directions, researchers frequently regard this ratio as an indicator of the stress response (Campbell, 1998; Santoro et al., 2020; Davis et al., 2008; Maxwell, 1993). The average H/L ratio value at the Brabtia site is 1.60, whereas at Bouhamra it is strongly higher at 4.39. This significant difference ($p=0.00$) suggests that stress levels are higher among the population at the polluted site. At both sites, sex-related differences in the H/L ratio were negligible, suggesting that environmental conditions exert a stronger influence on immune modulation than sexual dimorphism. Notably, at the polluted site, both males (4.26 ± 1.10) and females (4.55 ± 0.80) displayed comparably high H/L values, underscoring the systemic impact of pollutants across individuals. This leukocyte profile shift is a well-documented physiological reaction to chronic stressors such as pollution, infection, or habitat disturbance (Campbell, 1998; Santoro et al., 2020). The percentage of eosinophils is higher at the pristine site (12.68%) than at the degraded site (2.89%), and there is a highly significant difference

between the two environments ($p < 0.001$). As observed in some pollution studies (Mitchell, 1982; Claver and Quaglia, 2009; Kaiser et al., 2015), a decrease in eosinophils in a polluted environment may suggest chronic immunosuppressive stress, which can inhibit the normal production or mobilization of these cells. Such responses have often been associated with exposure to heavy metals, pesticides, and industrial effluents, all of which are known to interfere with hematopoiesis and immune regulation (Christin et al., 1999; Sparling et al., 2010). The reduction in eosinophil counts therefore appears to represent a sensitive biomarker of long-term pollutant exposure, reflecting sublethal effects that may compromise the overall health and disease resistance of exposed organisms.

This difference could also be due to by the presence of the most widespread reptilian blood parasite, *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885, in the population of the pristine site (personal communication). This factor may explain the higher percentage of eosinophils at this site, given that these cells are linked with defenses against parasites (Rupley, 1997; Kiesecker, 2002). A significant difference ($p < 0.001$) was also observed between populations at polluted and pristine sites in monocyte percentages. The percentage of these cells is twice as high at the Bouhamra pollution site (19.47%). The high proportion of heterophils and monocytes, combined with a reduction in lymphocytes (12.8%), suggests an increased mobilization of nonspecific cellular defenses, which is typical of a degraded environment.

Figure 3 shows the different blood cell types observed in the blood smears of turtles. In individuals from the Brabtia site (A, B), oval-shaped erythrocytes with a central basophilic nucleus are visible, along with several types of leukocytes: lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, and basophils with granule-rich cytoplasm. In individuals from the Bouhamra site (C), the same cell categories are present, particularly heterophils, together with nucleated thrombocytes, often occurring in clusters.

Individuals from the polluted site had larger erythrocytes (average length: $25.07 \pm 0.21 \mu\text{m}$; surface area: $274.95 \pm 5.72 \mu\text{m}^2$) than those from the unpolluted site (average length: $24.10 \pm 1.20 \mu\text{m}$; surface

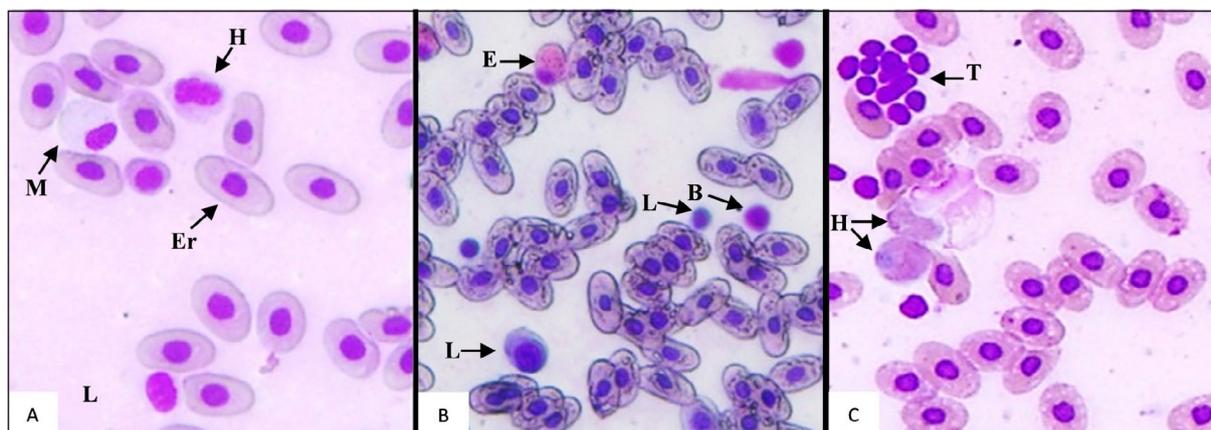


Fig.3. Photomicrographs of peripheral blood cells of the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa*) stained with May-Grünwald-Giemsa from Brabtia (A, B) and Bouhamra (C). Erythrocyte (Er); heterophil (H); thrombocyte (T); monocyte (M); eosinophil (E); basophil (B) and lymphocyte (L) (© Frih A.).

area: $260.97 \pm 19.74 \mu\text{m}^2$). However, nuclear dimensions (NL and NW) and the NL/NW ratio were similar at both sites, suggesting that nuclei are less sensitive to environmental disturbances than the cytoplasm. These values are significantly higher than those measured in other European populations. Perpiñán and Sánchez (2009) found *Mauremys leprosa* turtles at the Catalanian Reptile and Amphibian Rehabilitation Centre in Barcelona, Spain, with erythrocytes measuring $20.53 \pm 1.35 \mu\text{m}$ in length and $11.01 \pm 0.94 \mu\text{m}$ in width. Nucleus values were also lower, at $6.81 \pm 0.75 \mu\text{m}$ in length and $5.40 \pm 0.45 \mu\text{m}$ in width. In Turkey, *Mauremys rivulata* also exhibited lower values: an average erythrocyte length of $19.3 \mu\text{m}$, a width of $12.3 \mu\text{m}$, and a nucleus length of $6.7 \mu\text{m}$ and a width of $5.9 \mu\text{m}$ (Çiçek et al., 2015). The same observation applies to *Emys orbicularis* in Turkey, with erythrocytes measuring $20.1 \mu\text{m}$ in length and $12.7 \mu\text{m}$ in width. The nucleus is $7.2 \mu\text{m}$ in length and $6.1 \mu\text{m}$ in width.

The nucleus-to-cytoplasm ratio (N/C) is a valuable morphometric indicator that reflects the balance between the nuclear and cytoplasmic volumes of erythrocytes. Recent advances in cell biology have emphasised the importance of the nuclear-to-cytoplasmic (N/C) ratio as a key factor in determining cell function. This ratio links DNA content with cell size, biosynthetic capacity and cell-cycle progression (Balachandra et al., 2022). Alterations to this ratio have been observed in situations of cellular stress, such as oxidative damage and toxic exposure, and are linked to reduced proliferative capacity or the onset of senescence (Neumann and Nurse, 2007; Levy and Heald, 2010). In aquatic vertebrates, changes in nuclear morphology and the N/C ratio have been documented as sensitive indicators of contaminant exposure, particularly in environments enriched with heavy metals and organic pollutants (Da Silva Souza and Fontanetti, 2006; Cavas and Ergene-Gözükara, 2005). In this study, the N/C ratio was slightly higher in individuals of the species *Mauremys leprosa* from the unpolluted site (Brabtia: 0.15 ± 0.01) than in those from the polluted site (Bouhamra: 0.14 ± 0.00). This difference was statistically significant ($p = 0.028$). A lower N/C ratio may indicate cell enlargement resulting from cytoplasmic expansion, which can be caused by environmental stressors such as exposure to pollutants. These results are consistent with previous studies on reptiles and other vertebrates, in which environmental contaminants have been associated with morphological changes in erythrocytes, including a decrease in the N/C ratio (Metin et al., 2006; Petrov and Stepanyan, 2016). Therefore, the observed reduction in the N/C ratio in turtles from the polluted site could indicate cytoplasmic hypertrophy, which is a sign of environmental stress. Thus, integrating differential leukocyte counts, the heterophil-to-lymphocyte ratio, and nuclear-to-cytoplasmic measurements may provide a more comprehensive assessment of the physiological stress induced by chronic pollution in freshwater turtles.

5. Conclusion

Our results confirm that alterations in haematological parameters can serve as ecological sentinels

for diagnosing the impact of pollution on freshwater turtle populations. Leukocyte profiles and erythrocyte morphometric characteristics offer a dual, integrated immunological and physiological approach to assessing health status. It would be relevant to extend this analysis by considering other factors, such as age, season, and specific pollutant concentrations. Future studies could also explore gene expression associated with the immune response to refine the interpretation of cytological data.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aguirre A.A., Balazs G.H., Spraker T.R. et al. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological Zoology* 68:831–854.
- Balachandra S., Sarkar S., Amodeo A.A. 2022. The nuclear-to-cytoplasmic ratio: Coupling DNA content to cell size, cell cycle, and biosynthetic capacity. *Annual Review of Genetics* 56: 165–185. DOI: [10.1146/annurev-genet-080320-030537](https://doi.org/10.1146/annurev-genet-080320-030537)
- Campbell T. 1998. Interpretation of the reptilian blood profile. *Exotic Pet Practice* 3(1): 33–37.
- Cavas T., Ergene-Gözükara S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of fish exposed to a wastewater from a petroleum refinery. *Mutation Research* 582: 61–67. DOI: [10.1016/j.aquatox.2005.06.001](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001)
- Christin M.S., Ménard L., Gendron A.D. et al. 1999. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1940–1947. DOI: [10.1016/j.aquatox.2003.11.007](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.007)
- Christopher M.M., Berry K.H., Wallis I.R. et al. 1999. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 212–238. DOI: [10.7589/0090-3558-35.2.212](https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.2.212)
- Cicek K., Arikan H., Ayaz D. 2015. Blood cell morphology and erythrocytes count of two freshwater turtles, *Emys orbicularis* and *Mauremys rivulata*, from Turkey. *Ecologia Balkanica* 7(1): 21–27.
- Claver J.A., Quaglia A.I. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in non-mammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18: 87–97. DOI: [10.1053/J.JEPM.2009.04.006](https://doi.org/10.1053/J.JEPM.2009.04.006)
- Da Silva Souza T., Fontanetti C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waters from Monjolinho River, São Carlos, São Paulo, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29: 525–528. DOI: [10.1016/j.mrgentox.2006.02.010](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.010)
- Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760–772.
- Díaz-Paniagua C., Andreu A.C., Keller C. 2015. *Galápago leproso, Mauremys leprosa*. In: Salvador A., Marco A. (Eds.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Fritz U., Barata M., Busack S.D. et al. 2006. Impact of mountain chains, sea straits and peripheral populations on genetic and taxonomic structure of a freshwater turtle, *Mauremys leprosa*. *Zoologica Scripta* 35: 97–108. DOI: [10.1111/j.1463-6409.2005.00218.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00218.x)

Gross W.B., Siegel H.S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases* 27: 972–979.

Heatley J.J., Russell K.E. 2019. Hematology. In: Divers S.J., Stahl S.J. (Eds.). *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery*. St. Louis, MO: Elsevier, pp 301–319.

Hidalgo-Vila J., Díaz-Paniagua C., Pérez-Santigosa N. et al. 2007. Hematologic and biochemical reference intervals of free-living Mediterranean pond turtles (*Mauremys leprosa*). *Journal of Wildlife Diseases* 43: 798–801. DOI: [10.7589/0090-3558-43.4.798](https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.798)

International Species Information System (ISIS). 2002. *Physiological Reference Ranges for Trachemys scripta* (Common Slider). Apple Valley, MN, USA.

Jacobson E.R. 2007. *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Kaiser K., Devito J., Jones C.G. et al. 2015. Reproductive and immune effects of chronic corticosterone treatment in male White's tree frogs, *Litoria caerulea*. *Conservation Physiology* 3: cov022. DOI: [10.1093/conphys/cov022](https://doi.org/10.1093/conphys/cov022)

Kiesecker J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9900–9904.

Laghzaoui E.M., Abbad A., El Mouden E.H. 2020. Host-parasite association of *Placobdella costata* (Glossiphoniidae: Hirudinea) and *Mauremys leprosa* (Geoemydidae: Testudinoidea) in aquatic ecosystems of Morocco. *Parasitology Research* 119: 3459–3467. DOI: [10.1007/s00436-020-06809-x](https://doi.org/10.1007/s00436-020-06809-x)

Levy D.L., Heald R. 2010. Nuclear size is regulated by importin α and Ntf2 in *Xenopus*. *Cell* 143: 288–298. DOI: [10.1016/j.cell.2010.09.012](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.012)

Mader D.R. 2000. Normal hematology of reptiles. In: Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C. (Eds.). *Veterinary hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1126–1132.

Marques G.N., Guerra J.S., Leal M.O. et al. 2025. Hematological and blood chemistry profiles of the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa*) in a Portuguese wildlife rehabilitation center. *Frontiers in Veterinary Science* 12: 1504336. DOI: [10.3389/fvets.2025.1504336](https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1504336)

Mateo J.A., Pleguezuelos J.M., Fahd S. et al. 2003. Los anfibios, los reptiles y el estrecho de Gibraltar. Un ensayo sobre la herpetofauna de Ceuta y su entorno. Instituto de Estudios Ceutíes, Ceuta.

Maxwell M.H. 1993. Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal* 49: 34–43.

Mcfarlane J.M., Curtis S.E. 1989. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil:lymphocyte ratio. *Poultry Science* 68: 522–527. DOI: [10.3382/ps.0680522](https://doi.org/10.3382/ps.0680522)

Metin K.O., Türkozan F., Kargin Kiral Y. et al. 2006. Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European Pond Turtle *Emys orbicularis*. *Acta Veterinaria Brno* 75: 49–55. DOI: [10.2754/avb200675010049](https://doi.org/10.2754/avb200675010049)

Mitchell J. 1982. The effect of host age on *Rana temporaria* and *Gorgoderina vitelliloba* interactions. *International Journal of Parasitology* 12: 601–604.

Neumann F.R., Nurse P. 2007. Nuclear size control in fission yeast. *Journal of Cell Biology* 179: 593–600. DOI: [10.1083/jcb.200708054](https://doi.org/10.1083/jcb.200708054)

Novoveský E., Halán M. 2019. Observation of seasonal changes of selected hematological parameters in *Trachemys* spp. *Folia Veterinaria* 63: 46–53. DOI: [10.2478/fv-2019-0037](https://doi.org/10.2478/fv-2019-0037)

Palacios C., Urrutia C., Knapp N. et al. 2015. Demographic structure and the genetic diversity of *Mauremys leprosa* in its northern range reveal new populations and a mixed origin. *Salamandra* 51: 221–230.

Perpiñán D., Sánchez C. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the European pond turtle (*Emys orbicularis*) and the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 19: 119–127. DOI: [10.5818/1529-9651-19.4.119](https://doi.org/10.5818/1529-9651-19.4.119)

Petrov Y.P., Stepanyan I.E. 2016. A method for the quantitative assessment of nuclear erythrocytes shape. *Tsitologiya* 58: 548–554.

Romero L.M., Reed J.M. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 140: 73–79. DOI: [10.1016/j.cbpb.2004.11.004](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.11.004)

Rouag R., Ziane N., De Sousa M. 2024. A tentative list of reptilian fauna of Algeria and their conservation status. *Biodiversity Data Journal* 12: e120471. DOI: [10.3897/BDJ.12.e120471](https://doi.org/10.3897/BDJ.12.e120471)

Rossini M., Blanco P.A., Marín E. et al. 2012. Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Research in Veterinary Science* 92: 128–131. DOI: [10.1016/j.rvsc.2010.10.026](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.026)

Rupley A.E. 1997. *Manual of avian practice*. Philadelphia: Saunders.

Santoro F., Ieva R., Musaico F. et al. 2020. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts in-hospital complications in Takotsubo syndrome: results from a prospective multicenter registry. *Clinical Cardiology* 43: 1239–1245. DOI: [10.1002/clc.23442](https://doi.org/10.1002/clc.23442)

Servan J., Zaborski P., Dorizzi M. et al. 1989. Détermination du sexe ratio adulte de la tortue *Emys orbicularis* dans des populations provenant de 7 étangs de Brenne (Indre, France). *Canadian Journal of Zoology* 67: 1279–1284.

Sparling D.W., Linder G., Bishop C.A. et al. 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. 2nd edition. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Boca Raton, FL: CRC Press.

Stein G. 1996. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. In: Mader D.R. (Ed.). *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: Saunders, p. 473–483.

Sykes J.M., Klaphake E. 2008. Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 11: 481–500. DOI: [10.1016/j.cvex.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.005)

Sypek J., Borysenko M. 1988. Reptiles. In: Rowley A.F., Ratcliffe N.A. (Eds.). *Vertebrate blood cells*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 211–256.

Veríssimo J., Znari M., Stuckas H. et al. 2016. Pleistocene diversification in Morocco and recent demographic expansion in the Mediterranean pond turtle *Mauremys leprosa*. *Biological Journal of the Linnean Society* 119: 943–959. DOI: [10.1111/bij.12849](https://doi.org/10.1111/bij.12849)

Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms

Zelinskiy S.N.*^{ORCID}, Danilovtseva E.N.^{ORCID}, Glyzina O.Yu.^{ORCID}, Sukhanova L.V.^{ORCID},
Strelova M.S.^{ORCID}, Pal'shin V.A.^{ORCID}, **Annenkov V.V.**^{ORCID}

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya Str., Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Vital dyes capable of staining developing skeletal elements made of carbonate or calcium phosphate contain carboxyl groups that can interact with calcium ions. These dyes are in demand both in research of the biomineralization mechanisms and in the tagging of fish and mollusks in ecological and aquaculture experiments. At the same time, negatively charged dye molecules such as calcein do not penetrate cell membranes well. This necessitates the use of high concentrations, which can cause toxic effects and non-specific staining. This article describes an effective method for synthesizing a new fluorescent dye, QE2, containing a weakly basic amino group and two carboxyl groups in the form of methyl esters capable of hydrolysis in a weakly alkaline environment or under the action of enzymes. The fluorescence of QE2 and its hydrolysis product significantly depends on the polarity of the environment, intensifying in a nonpolar environment with a simultaneous shift in emission from the green-blue to the blue region. The dye is able to easily penetrate living cells, as shown by the example of dinoflagellate culture. Growing organisms with calcium skeletons (gastropods, fish) in the presence of QE2 leads to fluorescent staining of growth areas (gastropod shell aperture, fish spine and fin elements). The QE2 dye can be used to track areas of calcium mineralization, assess the polarity of cell organelles, introduce markers into fish for experiments in ecology and aquaculture, and stain cell cultures and skeletal elements for confocal microscopy studies.

Keywords: fluorescence, vital dye, coumarin, calcium skeletons, dinoflagellates, gastropods, whitefish

For citation: Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu., Sukhanova L.V., Strelova M.S., Pal'shin V.A., Annenkov V.V. Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1289-1304. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289

1. Introduction

The vital staining of skeletal elements of living organisms with fluorescent dyes is used to monitor growth, study the influence of various factors on organisms, and investigate the mechanisms of biomineral structure formation. In the case of organisms with a siliceous skeleton (diatoms, sponges), compounds containing substituents with electron-donating nitrogen atoms at the fluorophore are used. These dyes easily penetrate biomineralizing cells and bind to growing siliceous structures, allowing to trace the growth of these structures (Annenkov et al., 2010; Kucki and Fuhrmann-Lieker, 2012; Shimizu et al., 2001). Calcein, alizarin, and tetracycline (Fig. 1) are used for staining skeletal elements based on calcium carbonate or phosphate (González-Pabón et al., 2021; Mount et al., 2004;

Prentice et al., 2006; Vidavsky et al., 2015). Such compounds are in demand in environmental research and aquaculture, where they are used to introduce fluorescent markers into the shells of mollusks and the fins of fish. This allows the subsequent tracking of specimens in their natural environment. The dyes are introduced with food or into aquarium water in fairly high concentrations (20-500 μM) (Davis and Honeyfield, 2020; Gao et al., 2024; Prentice et al., 2006; Ramesh et al., 2017), significantly exceeding the concentration of dyes in experiments with siliceous organisms (0.5-1 μM). Previously (Zelinskiy et al., 2023), we reported on the synthesis of the coumarin dye QA2 (Fig. 1), which effectively stains synthetic calcium carbonate and calcium phosphate. Attempts to use QA2 at a concentration of 1 μM for in vivo staining of the shells of Baikal gastropods *Benedictia baicalensis* were unsuccessful.

*Corresponding author. E-mail address: jt1233@mail.ru (S. Zelinskiy)

Received: November 02, 2025;

Accepted after revised: December 01, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



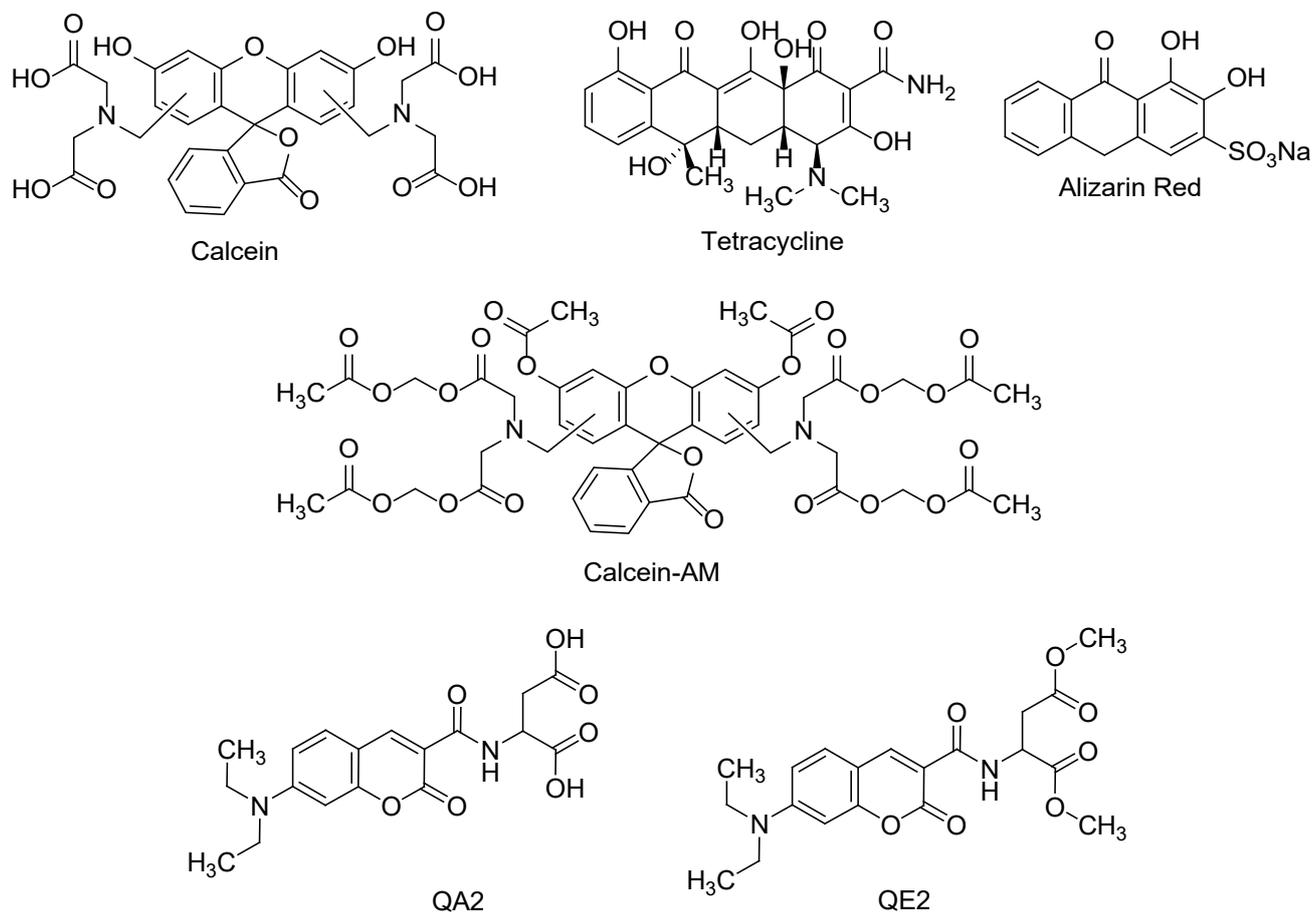


Fig.1. Structures of calcium-specific fluorescent dyes.

The dyes for calcium structures described above contain carboxyl and phenolic groups capable of binding with calcium ions. On the other hand, these groups cause a negative charge on the dye molecules, which prevents them from penetrating negatively charged cell membranes. The use of high concentrations of dyes results in nonspecific staining of organisms, including soft tissues (Mohler, 2003) and fully formed calcium structures, such as the central parts of mollusk valves (Gao et al., 2024) and fin ray segments (Lü et al., 2019). Moreover, the use of dyes in concentrations of hundreds of mg/L or the introduction of comparable amounts into feed may have toxic effects even after brief exposure (Gao et al., 2024). To solve this problem, it has been proposed (Tsien, 1981) to transform the acidic groups into ester groups, making the molecule neutral or even positively charged in the case of calcein. Acetoxymethyl is proposed as a modifying group, which is removed by enzymatic hydrolysis when entering a living cell. In the case of calcein, the new dye was named Calcein-AM and it is mainly used as a reagent to determine the vital status of cells. Calcein AM itself does not exhibit fluorescence, but it does so in living cells, allowing them to be distinguished from dead cells. Calcein AM is promising for visualizing calcium structures in living cells (Sviben et al., 2016), but examples of such works are few, which is due to the high cost of the dye (200 dollars/mg or more). The use of such an expensive dye is acceptable in cell cultures, but impossible when working in natural environments and aquaculture. In addition, the fluorescein fragment

in calcein emits in the yellow-green region of the spectrum, overlapping with the autofluorescence of mollusks (Delvene et al., 2022; Donaldson, 2020; Spires and North, 2022) and algae (Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007), which may complicate the interpretation of results.

The aim of this work was to synthesize a weakly basic analogue of the coumarin dye QA2 (Zelinskiy et al., 2023) containing ester groups capable of being converted into acids under the action of the corresponding enzymes. A synthesis strategy has been developed that allows the target product (QE2, Fig. 1) to be obtained in a single-step reaction without the intermediate formation of QA2. The ability of QE2 to penetrate living cells was studied using the dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. The staining of calcium structures was demonstrated using Baikal gastropods *B. baicalensis* and Baikal lake-river whitefish *Coregonus fluviatilis*.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

Acetonitrile was HPLC grade (Cryochrom, St. Petersburg, Russia). All other solvents and reagents were reagent grade (Vekton JSC, Petersburg, Russia). Ethanol (95 wt%) was refluxed with sodium hydroxide and distilled. Ethyl acetate was washed with an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride, and distilled. Dichloromethane and n-hexane were stirred with concentrated sulfuric acid for 3 hours, washed with dis-

tiled water, an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride, and distilled. Dimethylformamide (DMF) was shaken for 30 minutes with anhydrous CuSO_4 , filtered through a Büchner funnel, distilled in vacuum and kept with 3A molecular sieves. Triethylamine was dried with CaH_2 and distilled. Succinimidyl ester of 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic and dimethyl L-aspartate hydrochloride were prepared following the techniques reported in (Berthelot et al., 2005) and (Thangavelu et al., 2017), respectively.

2.2. Instrumentation

Absorption, excitation and emission spectra were measured with SM-2203 spectrofluorimeter (CJSC Spectroscopy, Optics and Lasers – Modern Developments, Republic of Belarus, Minsk) in 10 mm quartz cuvette. A pulsed xenon lamp was used as an excitation source in the device. The relative quantum yield, Q_s , of the sample can be calculated using the following equation (Levitus, 2020):

$$Q_s = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

where the subscripts S and R denote the sample and reference respectively. Q_R is the known quantum yield of the reference standard, Int is the integrated fluorescence spectrum intensity, A is the absorbance of the solution at the excitation wavelength (λ_{ex}), and n is the refractive index of the solution solvent. Fluorescein disodium salt in 0.1 M NaOH was used as the reference standard.

Light and fluorescent microscopy was performed with MOTIC AE-31T inverted microscope with HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for green, yellow and red emission and 365 nm for blue emission. A Moticam Pro 205A camera was used to record the images.

Chromatographic experiments were performed with HPLC system Milichrom A-02 (EcoNova, Novosibirsk, Russia) with a column ProntoSIL-120-5-C18 (2×75 mm, $5 \mu\text{m}$) using gradient elution mode with a 0.05 M phosphate buffer of pH 6.86 as eluent A and acetonitrile as eluent B. The mobile phase's composition changed as follows: 0–1875 μL , 20-50% B; 1875–2500 μL , isocratic condition, 50% B. Eluent flow rate was set 0.150 mL/min, column temperature 35°C , sample volume 10 μL , analysis time 16.7 min. Detection wavelengths were 210 and 260 nm.

The ^1H NMR spectrum was recorded in CDCl_3 at room temperature on a Bruker DPX-400 spectrometer. Chemical shifts (δ in ppm) were measured with accuracy of 0.01, and referred to TMS.

2.3. Synthesis of dimethyl 2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)succinate (QE2)

To a magnetically stirred solution of succinimidyl ester of 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid (2.70 g, 7.53 mmol) in dry DMF (28 mL), dimethyl

L-aspartate hydrochloride (1.49 g, 7.54 mmol) was added at room temperature. After dissolution, triethylamine (0.98 g, 9.7 mmol) was added to the mixture. Stirring was continued for 8 hours and the reaction vessel was put into a refrigerator (10°C). In 15 hours, the reaction mixture was warmed to RT and quenched by adding 450 g of 3.1% of potassium carbonate aqueous solution and extracted with dichloromethane (4×100 mL). The combined extract was dried with anhydrous potassium carbonate and concentrated with a rotary evaporator. The reddish-brown liquid residue was separated by flash chromatography on a column (silica gel 40–63 μm , $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}=8:2$, $R_f=0.51$) using a SepaBean Machine T flash chromatograph. The target fraction was concentrated under reduced pressure and kept under rotary vane pump vacuum at $40\text{--}50^\circ\text{C}$ for 3 hours to give QE2 (Fig. 2) as a yellow solid (1.11 g, 36%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 9.57 (1H, d, $J=7.82$ Hz, H-7), 8.67 (1H, s, H-6), 7.42 (1H, d, $J=8.80$ Hz, H-5), 6.64 (1H, dd, $J=2.44, 8.80$ Hz, H-4), 6.50 (1H, d, $J=1.96$ Hz, H-3), 5.10 (1H, dt, $J=3.72, 7.83$ Hz, H-8), 3.79 (3H, s, H-10), 3.73 (3H, s, H-10), 3.46 (4H, q, $J=7.01$ Hz, H-2), 3.08 (1H, dd, $J=4.89, 16.63$ Hz, H-9) and 2.97 (1H, dd, $J=5.14, 16.88$ Hz, H-9), 1.25 (6H, t, $J=7.10$ Hz, H-1).

2.4. Hydrolytic stability of QE2

The stability of QE2 to hydrolysis was studied in aqueous solutions with pH 4.00 (acetate buffer, 0.05 M), 6.86 (phosphate buffer, 0.05 M), and 9.18 (borate buffer, 0.01 M). Samples were prepared by adding a methanol solution of the dye (0.25 mg/ml, 0.240 ml) to 1.260 ml of the corresponding buffer until a final dye concentration of 0.04 mg/ml (0.099 mM) was reached. The solutions were left at room temperature (25°C) in a dark place and analyzed by HPLC over time. The proportion of dye remaining in the solution was determined as the ratio of the dye peak area (absorbance at 260 nm) to the total area of the dye peak and the peaks of the decomposition products.

2.5. Staining living organisms with QE2 dye

2.5.1. Dinoflagellates

The strain *G. corollarium* SCCAP K-0983 was isolated from the northern part of the Baltic Sea, Sweden (Sundström et al., 2009). The monoculture was grown on f/2-Si medium (Guillard and Ryther, 1962) based

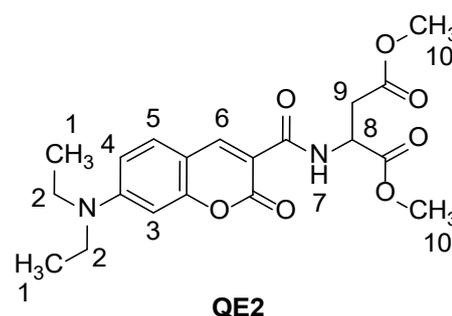


Fig.2. Structure of dye QE2.

on artificial seawater (salinity 11%). Cultivation was carried out in 25–50 ml plastic flasks at a temperature of 4 °C and illumination of 13–21 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ with a day:night interval of 12:12 h. To study dye uptake into cells, 5 μl of dye at a concentration of 100 μM was added to 0.5 ml of medium with dinoflagellates, and dye uptake into cells was studied using a fluorescence microscope.

2.5.2. Gastropods

B. baicalensis gastropods were collected by divers at a depth of 10–30 m in the vicinity of Listvyanka village. The mollusks were kept in three 3.6-liter aquariums with constant aeration at a temperature of 9°C and fed with filamentous Baikal algae. At the beginning of the experiment, 12 individuals were placed in each aquarium. Lighting was provided by daylight without direct sunlight, with a daylight intensity of 3–6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (May–July 2025).

After acclimatization for 7 days, an experiment was started to stain the shells with two dyes, QA2 and QE2, with the third aquarium serving as a control. Dyes were added to aquariums No. 1 and No. 2 to a concentration of 1 μM . Every week, 1.5 liters of water from the aquarium was replaced with 1.5 liters of fresh Baikal water, adding dyes to a concentration of 1 μM .

2.5.3. Fish

In this experiment, 6-month-old *C. fluviatilis* fry measuring 3.5 to 6 cm in length were used. The dye was administered both as an additive to the feed and directly into the aquarium. The fish were kept in glass aquariums at a temperature of 13°C with 12/12 day/night lighting cycles and constant aeration. Fifty percent of the water was replaced six times a week.

The feed was prepared by evenly moistening dry feed (LLC “NPK Ruslo”, Russia, malt, for whitefish and salmonids, size 0.3 mm) with a solution of QE2 in acetone (concentration 2 mg/ml) and then drying it in a vacuum at 35°C. After drying, the feed was impregnated with an aqueous solution of sodium alginate (0.05% by mass) and dried in a vacuum at 35°C. After drying, the feed was passed through a sieve with a pore size of 0.31 mm. The content of QE2 dye in the fish feed was 2 mg/g (4.94 $\mu\text{mol}/\text{g}$), and sodium alginate was 0.69 mg/g.

The aquarium used for the experiment involving the addition of dye to the feed contained 80 liters of water and 12 fish. The feed was administered at a rate

of 1.5 g per day (50% in the morning and 25% in the afternoon and evening).

When the dye was added to the aquarium, the water volume was 20 liters, the number of fish was 4, and the water change and feeding regime were similar to the previous experiment. The dye stock solution in DMSO (1 mM, 404.4 mg/L) was added every morning (5 mL) after the water change, diluting the stock solution in 1 L of water. On the first day of the experiment, 10 mL of the dye stock solution was added. The dye concentration in the water was 1 μM (404.4 $\mu\text{g}/\text{L}$).

3. Results and discussion

QE2 dye was prepared by the reaction of succinimidyl ester of 7-(diethylamino) coumarin-3-carboxylic acid with dimethyl L-aspartate hydrochloride (Fig. 3). The structure of the new dye was confirmed by ^1H NMR spectroscopy, and its purity was confirmed by HPLC. A study of the dye's behavior in water (Table 1) showed that it is sufficiently stable in neutral and slightly acidic environments, whereas in alkaline medium (pH = 9.18) it degrades by 50% within 4 hours.

The absorption, excitation, and emission spectra of the new dye (Figs. 4 and 5) are close to those of the QN2 and QA2 dyes (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023). The main absorption peak is in the 400–460 nm range with a shift to the blue region as the polarity of the solvent decreases in the water-ethanol-hexane row. The excitation and emission spectra behave similarly. In the case of hexane, additional peaks appear in the absorption and emission spectra. The quantum yield of fluorescence decreases sharply with increasing polarity of the medium (Table 2). Similar phenomena have been observed previously for coumarin-containing dyes (Annenkov et al., 2019 and references in this article) and were explained by the influence of the solvent on the aromatic system and an increase in the probability of non-radiative relaxation of the excited state of molecules in polar solvents.

Table 1. Change in the content of dye QE2 in solution, % of initial content

Time, h	pH 4.00	pH 6.86	pH 9.18
2	100	98	63
4	100	-	51
24	100	94	6
5 days	92	82	-

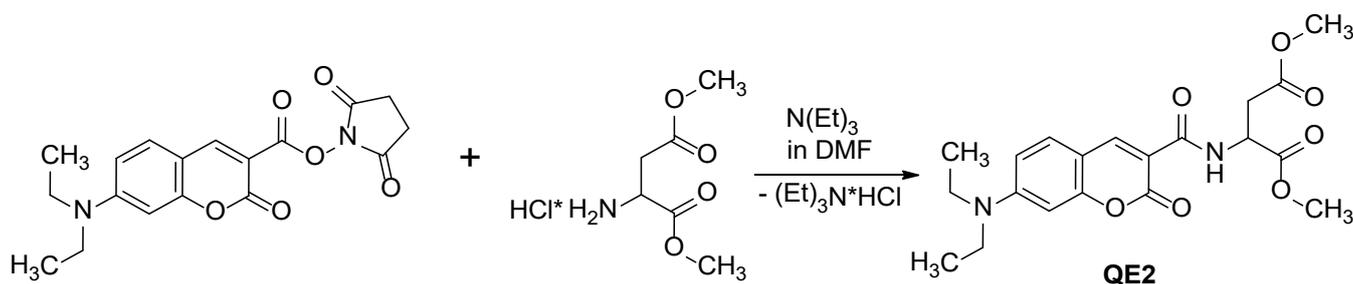


Fig.3. Scheme of dye QE2 synthesis.

Table 2. Spectral characteristics and relative fluorescence quantum yield (Q) for QE2

Solvent	Excitation wavelength, nm	ϵ ($\times 10^{-3}$ L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)*	Q, %
Water	433	38.09	2.2
95% ethanol	423	39.84	11.1
hexane	405	40.31	99.3

Note: * Extinction coefficient for excitation wavelength

The ability of QE2 dye molecules to penetrate living cells was evaluated using *G. corollarium* dinoflagellate cells (Fig. 6). When QE2 was added to the culture medium at a concentration of 1 μ M, a characteristic blue fluorescence of the cells was observed. In the case of the acidic dye QA2, no cell staining was observed. Coumarin-containing dyes are capable of luminescence in the green region of the spectrum (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023), but only blue fluorescence was observed when staining dinoflagellates. The green region of the spectrum is located above 500 nm, and when transferred to a nonpolar solvent, the luminescence shifts to a shorter wavelength region, suggesting that QE2 is located in nonpolar vesicles. A sharp increase in the quantum yield of fluorescence in a nonpolar medium (Table 2) makes it possible to observe the luminescence of cells without removing the dye from the medium, which is a problem when using rhodamine dyes.

Cultivation of Baikal gastropods *B. baicalensis* in a medium with 1 μ M QE2 added (Fig. 7) resulted in the appearance of characteristic blue fluorescence of the shell on the side of the aperture, where the shell growth occurs. When fluorescence is excited by light with a wavelength of 470 nm (Fig. 7C), a red-yellow-green fluorescence of the shell is observed, noted both in the control group and when using the QA2 dye. These facts indicate the need to use dyes with blue fluorescence to detect calcium-mineralizing structures.

The keeping of *C. fluviatilis* fish in the presence of QE2 dye, added either to feed (2 mg/g) or to the aquarium (1 μ M), resulted in fluorescent staining of the fish (Fig. 8). Observation of whole organisms (Fig. 8B) is hampered by light scattering, including on the protective slime layer covering the bodies of fish. Nevertheless, the fluorescence of the caudal fin and spine can be noted. Fluorescence in the abdomi-

nal cavity is probably associated with the presence of dye-containing feed. Mechanical removal of muscle tissue (Fig. 8C) allows for a clearer view of the staining of the spine and fin. Microphotographs of a more purified preparation (Fig. 8D-G) also indicate a significantly brighter fluorescence of samples with QE2 compared to the autofluorescence of control preparations. In the case of the caudal fin (Fig. 8H-J), the boundaries of the bone segments are stained, especially the joints between segments (Fig. 8J). In contrast to the action of high concentrations of acidic dyes (Lü et al., 2019), there is no nonspecific staining of previously formed bone segments. The introduction of dye into aquarium water led to similar results with a significantly higher reagent consumption (2.02 mg per fish per day compared to 0.25 mg when QE2 was added to the feed).

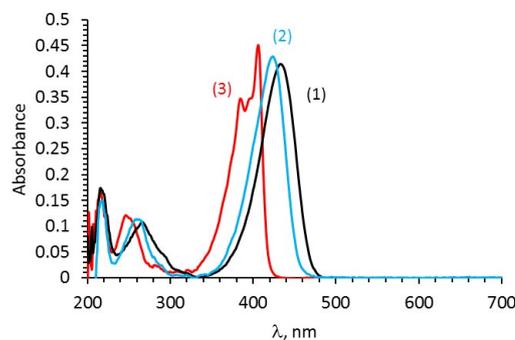


Fig. 4. Absorption spectra of QE2 solutions in various solvents: (1) – water, (2) – ethanol, (3) – hexane. Concentration 10 μ M.

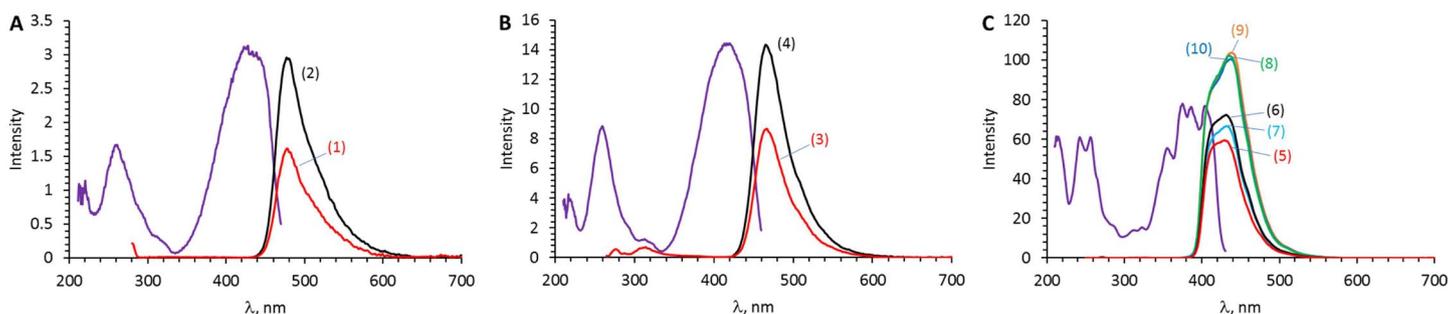


Fig. 5. Excitation and fluorescence spectra of QE2 solutions in water (A), 95% ethanol (B), and hexane (C). Monochromator slits 5 nm (input) and 5 nm (output). Dye concentration 10 μ M. Excitation spectra were measured for fluorescence at 478 (A), 466 (B), and 437 nm (C). Excitation wavelengths, in nm: (1), (3) – 260, (2) – 428, (4) – 420, (5) – 242, (6) – 256, (7) – 355, (8) – 374, (9) – 385, (10) – 403.

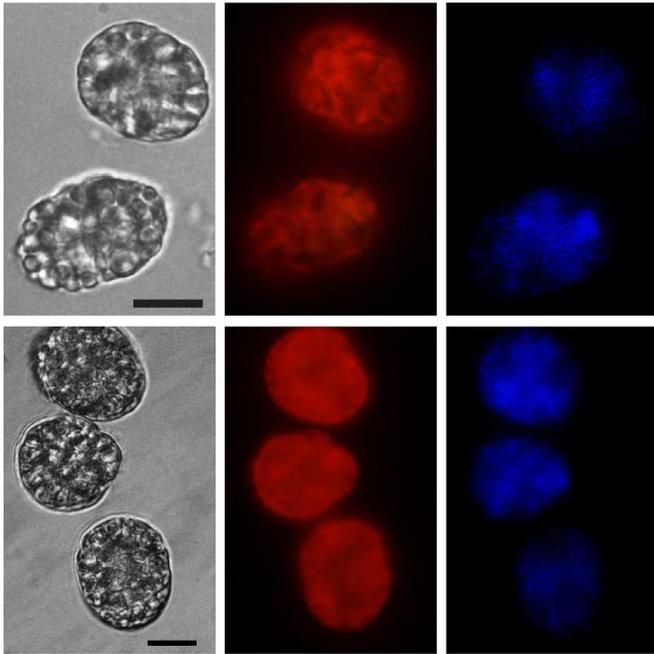


Fig.6. Microphotographs of dinoflagellate *G. corollarium* 5 min after adding QE2 dye at a concentration of 1 μM . Scale bar: 10 μm .

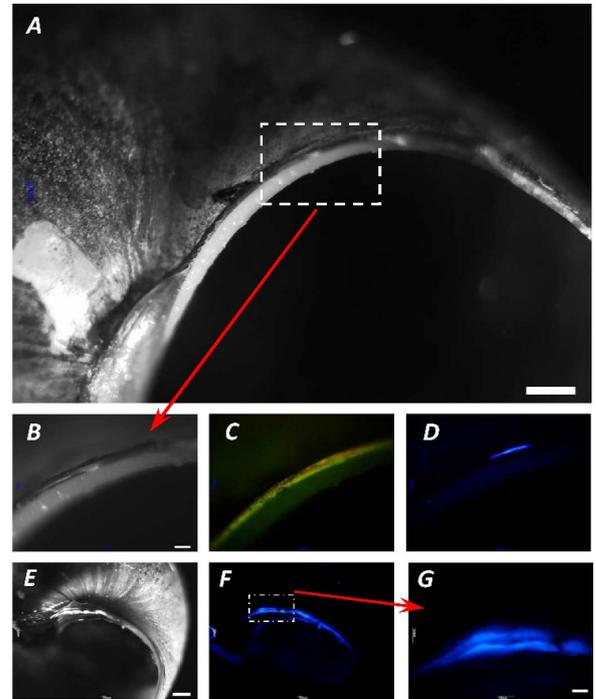


Fig.7. Visible (A, B, and E) and fluorescent (C, D, F, and G) microphotographs of *B. baicalensis* gastropod shells cultivated in the presence of 1 μM QE2, viewed from the aperture. A-D – cultivation for one month, E-G – two months. Scale bar: 500 (A, E, and F) and 100 (B-D and G) μm .

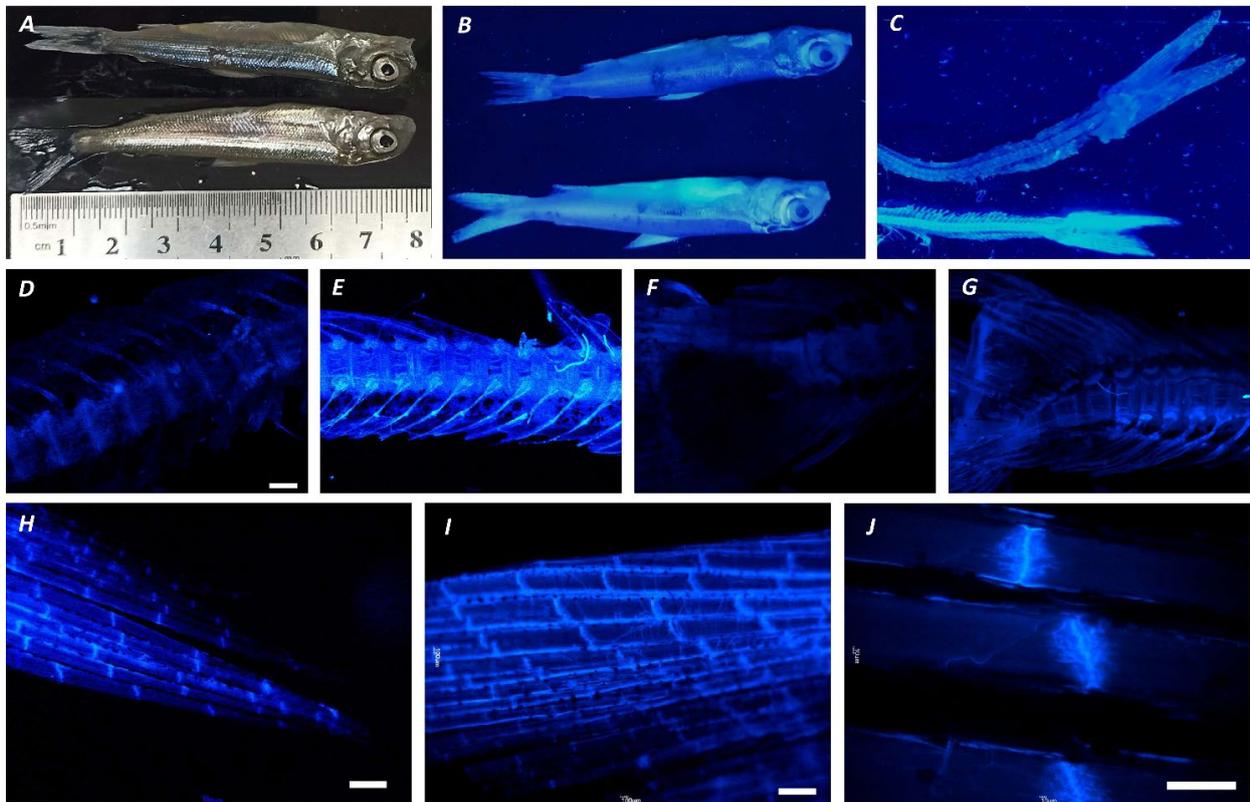


Fig.8. Photographs of *C. fluviatilis* fish under natural lighting (A) and under LED lighting with a wavelength of 365 nm (B, C). C – fish skeletons after mechanical removal of muscle tissue. The upper image refers to a specimen from the control group, the lower one – from the experimental group, after cultivation for 14 days with feed modified with QE2 dye. D-J – fluorescent microphotographs: of the spine (D-G) and caudal fin (H-J) after cleaning by soaking in water at 100°C for 5 minutes. D and F – control group samples, images in pairs D-E and F-G were obtained with the same microscope video camera settings. Scale bar: 500 (D-G and H-I) and 100 μm (J).

4. Conclusions

An effective method has been developed for synthesis of the new fluorescent dye QE2. It contains a weakly basic amino group and two carboxyl groups in the form of methyl esters, which are capable of hydrolysis in a weakly alkaline medium or under the action of enzymes. The dye is able to easily penetrate living cells, as demonstrated by the example of dinoflagellate culture. Cultivation of organisms with calcium skeletons (gastropods, fish) in the presence of QE2 leads to fluorescent staining of growth areas (gastropod shell apertures, fish spine and fin elements). The fluorescence of QE2 and its hydrolysis product QA2 (Zelinskiy et al., 2023) significantly depends on the polarity of the environment, intensifying in a nonpolar environment with a simultaneous shift in emission from the green-blue to the blue region.

Thus, the QE2 dye can be used to track areas of calcium mineralization, assess the polarity of cell organelles, tag fish for experiments in ecology and aquaculture, and stain cell cultures and skeletal elements for confocal microscopy studies.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project # 122012600070-9. The authors would like to thank A. P. Fedotov and I. V. Khanaev for providing gastropod samples, as well as the Ultramicroanalysis Center and the Experimental Freshwater Aquarium Complex of Baikal Hydrobionts (LIN SB RAS) for providing equipment.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407: 44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Berthelot T., Talbot J.C., Lain G. et al. 2005. Synthesis of Nε-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Nε-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11: 153–160. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)
- Davis R.P., Honeyfield D.C. 2020. Efficacy and practical limitations of calcein as a marking agent in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to sunlight and frozen sample storage. *Fisheries Research* 232: 105736. DOI: [10.1016/j.fishres.2020.105736](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105736)
- Delvene G., Lozano R.P., Piñuela L. et al. 2022. Autofluorescence of microborings in fossil freshwater bivalve shells. *Lethaia* 55(4): 1–12. DOI: [10.18261/let.55.4.7](https://doi.org/10.18261/let.55.4.7)
- Donaldson L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25: 2393. DOI: [10.3390/molecules25102393](https://doi.org/10.3390/molecules25102393)
- Gao J., Xie X., Liu X.-F. et al. 2024. Efficacy of calcein as a chemical marker of *Potamocorbula laevis*. *Frontiers in Marine Science* 11: 1379571. DOI: [10.3389/fmars.2024.1379571](https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1379571)
- González-Pabón M.A., Tortolero-Langarica J.J.A., Calderon-Aguilera L.E. et al. 2021. Low calcification rate, structural complexity, and calcium carbonate production of *Pocillopora* corals in a biosphere reserve of the central Mexican Pacific. *Marine Ecology* 42: e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)
- Kucki M., Fuhrmann-Lieker T. 2012. Staining diatoms with rhodamine dyes: control of emission colour in photonic biocomposites. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 727–33. DOI: [10.1098/rsif.2011.0424](https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0424)
- Levitus M. 2020. Tutorial: measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)
- Lü H., Fu M., Zhang Z. et al. 2019. Marking fish with fluorochrome dyes. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 28: 117–135. DOI: [10.1080/23308249.2019.1681358](https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1681358)
- Mohler J.W. 2003. Producing fluorescent marks on atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction. *North American Journal of Fisheries Management* 23: 1108–1113. DOI: [10.1577/M02-143](https://doi.org/10.1577/M02-143)
- Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304: 297–300. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)
- Prentice J.A., J. Schlechte W., Betsill R.K. 2006. Longevity of oxytetracycline and calcein in double-marked batches of fry and fingerling largemouth bass. *Proceedings of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 60: 174–179.
- Ramesh K., Hu M.Y., Thomsen J. et al. 2017. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications* 8: 1709. DOI: [10.1038/s41467-017-01806-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8)
- Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent staining of living plant cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M. et al. (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols*. Cham, pp.153–165. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)
- Shimizu K., Del Amo Y., Brzezinski M.A. et al. 2001. A novel fluorescent silica tracer for biological silification studies. *Chemistry and Biology* 8: 1051–1060. DOI: [10.1016/s1074-5521\(01\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00072-2)
- Spires J.E., North E.W. 2022. Marking the shells of juvenile and adult eastern oysters, *Crassostrea virginica*, with the fluorochrome dye calcein and measuring growth and mortality after marking. *Journal of Molluscan Studies* 88: eyac004. DOI: [10.1093/mollus/eyac004](https://doi.org/10.1093/mollus/eyac004)
- Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium corollarium* sp. nov. (dinophyceae)—a new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the Baltic sea. *Journal of Phycology* 45: 938–952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)
- Sviben S., Gal A., Hood M.A. et al. 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. *Nature Communications* 216(7): 11228. DOI: [10.1038/ncomms11228](https://doi.org/10.1038/ncomms11228)
- Tang Y.Z., Dobbs F.C. 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2306–2313. DOI: [10.1128/AEM.01741-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01741-06)
- Thangavelu B., Mutthamsetty V., Wang Q. et al. 2017. Design and optimization of aspartate N-acetyltransferase

inhibitors for the potential treatment of Canavan disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25: 870–885. DOI: [10.1016/j.bmc.2016.11.060](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.060)

Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290(5806): 527–528. DOI: [10.1038/290527a0](https://doi.org/10.1038/290527a0)

Vidavsky N., Masic A., Schertel A. et al. 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *Journal of Structural Biology* 192(3): 358–365. DOI: [10.1016/j.jsb.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.017)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244–252. DOI: [10.31951/2658-3518-2](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2)

Слабоосновный флуоресцентный краситель для прижизненной окраски кальциевых структур в живых организмах

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Зелинский С.Н.*^{ORCID}, Даниловцева Е.Н.^{ORCID}, Глызина О.Ю.^{ORCID}, Суханова Л.В.^{ORCID},
Стрелова М.С.^{ORCID}, Пальшин В.А.^{ORCID}, **Анненков В.В.**^{ORCID}

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 3 ул. Улан-Баторская, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Прижизненные красители, способные окрашивать формирующиеся скелетные элементы из карбоната или фосфата кальция, содержат карбоксильные группы, способные к взаимодействию с ионами кальция. Данные красители востребованы как в исследованиях механизмов биоминерализации, так и при введении меток в рыб и моллюсков при экологических и аквакультурных экспериментах. В то же время, молекулы красителей, несущие отрицательный заряд, например, кальцеина, плохо проникают через клеточные мембраны, что приводит к необходимости использования высоких концентраций, вызывающих токсические эффекты и неспецифическую окраску. В данной статье разработан эффективный метод синтеза нового флуоресцентного красителя QE2, содержащего слабоосновную аминогруппу и две карбоксильные группы в форме метиловых эфиров, способных к гидролизу в слабощелочной среде или под действием ферментов. Флуоресценция QE2 и продукта его гидролиза существенно зависит от полярности среды, усиливаясь в неполярном окружении с одновременным смещением испускания из зелёно-голубой в синюю область. Краситель способен легко проникать в живые клетки, что показано на примере культуры динофлагеллят. Культивирование организмов с кальциевыми скелетами (гастроподы, рыбы) в присутствии QE2 приводит к флуоресцентному окрашиванию зон роста (устья раковин гастропод, элементы скелета и плавников рыб). Краситель QE2 может найти применение для отслеживания зон кальциевой минерализации, оценки полярности клеточных органелл, введения меток в рыбы для экспериментов в области экологии и аквакультур, окрашивания клеточных культур и скелетных элементов для исследования методом конфокальной микроскопии.

Ключевые слова: флуоресценция, витальный краситель, кумарин, кальциевые скелеты, динофлагелляты, гастроподы, сиговые рыбы

Для цитирования: Зелинский С.Н., Даниловцева Е.Н., Глызина О.Ю., Суханова Л.В., Стрелова М.С., Пальшин В.А., Анненков В.В. Слабоосновный флуоресцентный краситель для прижизненной окраски кальциевых структур в живых организмах // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1289-1304. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289

1. Введение

Прижизненное окрашивание скелетных элементов живых организмов флуоресцентными красителями используется для мониторинга роста, изучения влияния разных факторов на организмы, а также при исследовании механизмов образования биоминеральных структур. В случае организмов с кремнистым скелетом (диатомовые водоросли, губки) применяются соединения, содержащие заместители с электронодонорными атомами азота при флуорофоре. Данные красители легко про-

никают в биоминерализирующие клетки и связываются с растущими кремнистыми структурами, что позволяет проследить рост этих структур (Annenkov et al., 2010; Kucki and Fuhrmann-Lieker, 2012; Shimizu et al., 2001). Для окраски скелетных элементов на основе карбоната или фосфата кальция получили распространение кальцеин, ализарин и тетрациклин (Рис. 1) (González-Pabón et al., 2021; Mount et al., 2004; Prentice et al., 2006; Vidavsky et al., 2015). Подобные соединения востребованы в экологических исследованиях и работах в области аквакультур для введения флуоресцентных меток

*Автор для переписки. Адрес e-mail: jt1233@mail.ru (С. Зелинский)

Поступила: 02 ноября 2025;

Принята после доработки: 01 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



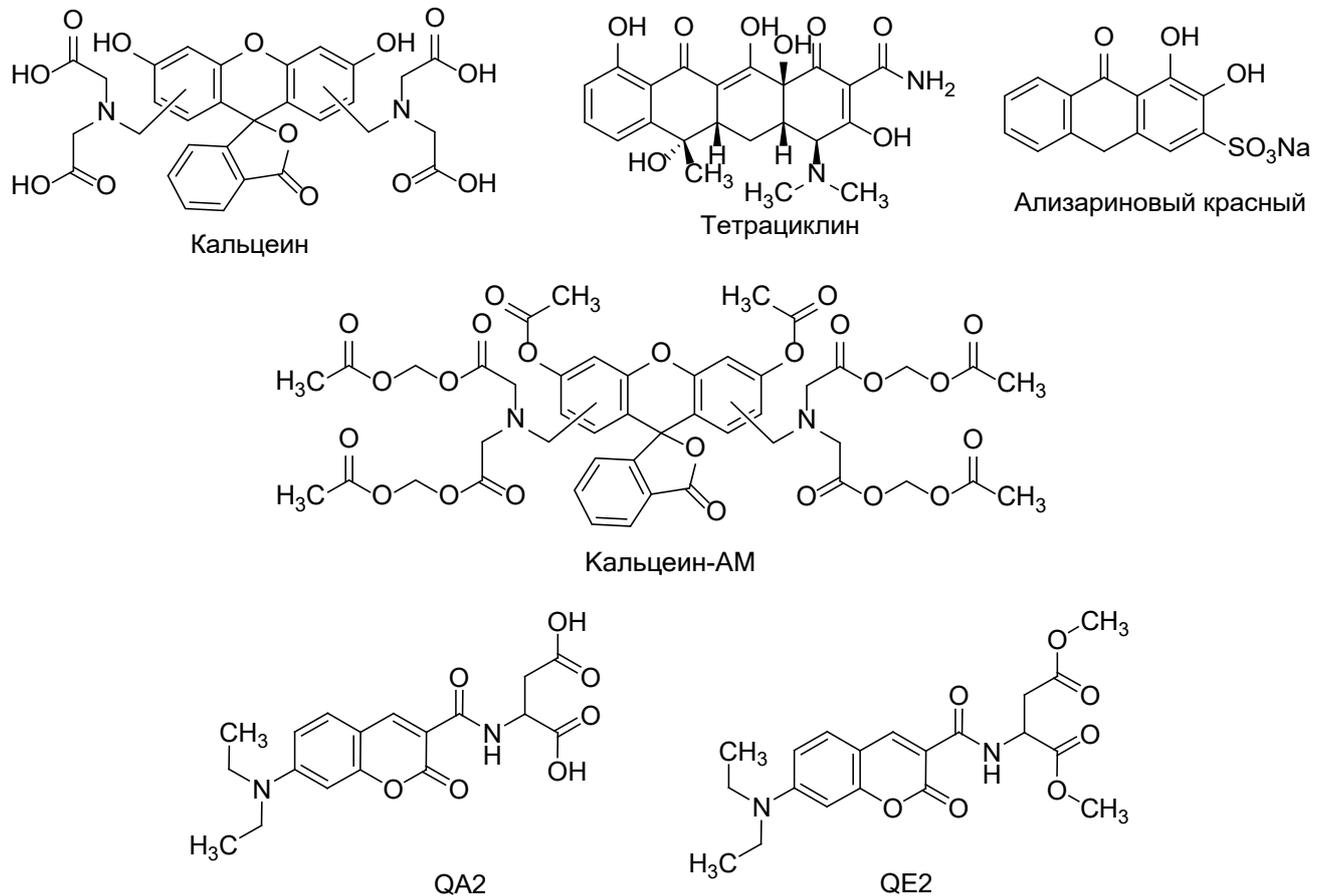


Рис. 1. Структурные формулы кальций-специфичных флуоресцентных красителей.

в панцири моллюсков, плавники рыб для последующего отслеживания особей в природной среде. Красители вводятся с кормом или в аквариальную воду в достаточно высоких концентрациях (20-500 мкМ) (Davis and Honeyfield, 2020; Gao et al., 2024; Prentice et al., 2006; Ramesh et al., 2017), значительно превышающих концентрацию красителей в экспериментах с кремнистыми организмами (0,5-1 мкМ). Ранее (Zelinskiy et al., 2023) мы сообщали о синтезе кумаринового красителя QA2 (Рис. 1), который хорошо окрашивает синтетический карбонат и фосфат кальция. Попытки использовать QA2 в концентрации 1 мМ для прижизненной окраски панцирей байкальских гастропод *Benedictia baicalensis* оказались неудачными.

Описанные выше красители для кальциевых структур содержат карбоксильные и фенольные группы, способные к связыванию с ионами кальция. С другой стороны, эти группы обуславливают отрицательный заряд молекул красителей, что препятствует их проникновению через отрицательно заряженные клеточные мембраны. Использование высоких концентраций красителей приводит к неспецифической окраске организмов, включая мягкие ткани (Mohler, 2003) и полностью сформированные кальциевые структуры, например, центральные части створок моллюсков (Gao et al., 2024) и сегменты лучей плавников (Lü et al., 2019). Кроме того, использование красителей в концентрации сотен мг/л или введение сопоставимых количеств в корм может оказать токсическое воздействие даже при непродолжительном контакте (Gao et al., 2024). Для

решения этой проблемы предложено (Tsien, 1981) трансформировать кислотные группы в эфирные, делая молекулу нейтральной или даже положительно заряженной в случае кальцеина. В качестве модифицирующей группы предложена ацетоксиметильная, которая при попадании в живую клетку удаляется за счёт ферментативного гидролиза. В случае кальцеина новый краситель получил наименование кальцеин АМ и он используется, в основном, в качестве реагента, позволяющего понять витальный статус клеток. Сам кальцеин АМ не обладает флуоресценцией, но начинает светиться в живых клетках, что позволяет отличать их от мёртвых. Кальцеин АМ перспективен для визуализации кальциевых структур в живых клетках (Sviben et al., 2016), но примеры подобных работ немногочисленны, что связано с высокой стоимостью красителя (200 и более долларов/мг). Использование столь дорогого красителя допустимо в случае клеточных культур, но невозможно при работах в природной среде и аквакультурах. Кроме того, флуоресцентный фрагмент в кальцеине излучает в жёлто-зелёной области спектра, перекрываясь с автофлуоресценцией моллюсков (Delvene et al., 2022; Donaldson, 2020; Spires and North, 2022) и водорослей (Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007), что может затруднить интерпретацию результатов.

Целью данной работы являлся синтез слабоосновного аналога кумаринового красителя QA2 (Zelinskiy et al., 2023), содержащего эфирные группы, способные к превращению в кислотные под действием соответствующих ферментов.

Разработана стратегия синтеза, позволяющая получать целевой продукт (QE2, Рис. 1) одностадийной реакцией, без промежуточного образования QA2. Изучена способность QE2 проникать в живые клетки на примере динофлагеллят *Gymnodinium corollarium*. Окрашивание кальциевых структур продемонстрировано с использованием байкальских гастропод *B. baicalensis* и байкальского озерно-речного сига *Coregonus fluviatilis*.

2. Материалы и методы

2.1. Химические реагенты

Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил сорта «0» («Криохром», Санкт-Петербург, Россия). Все остальные растворители и реагенты были квалификации «хч» (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург, Россия). Этанол (95 мас.%) кипятили с гидроксидом натрия и перегоняли. Этилацетат промывали водным раствором бикарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция и перегоняли. Дихлорметан и н-гексан перемешивали с концентрированной серной кислотой в течение 3 часов, промывали дистиллированной водой, водным раствором бикарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция и перегоняли. Диметилформамид (ДМФА) встряхивали в течение 30 минут с безводным CuSO_4 , фильтровали через воронку Бюхнера, перегоняли в вакууме и выдерживали с молекулярными ситами 3А. Триэтиламин сушили над CaH_2 и перегоняли. Сукцинимидиловый эфир 7-диэтиламинокумарин-3-карбоновой кислоты и гидрохлорид диметил-L-аспартата получены по методикам, описанным в (Berthelot et al., 2005) и (Thangavelu et al., 2017), соответственно.

2.2. Приборы

Спектры поглощения, возбуждения и испускания измеряли на спектрофлуориметре CM-2203 (ЗАО «Спектроскопия, Оптика и Лазеры – Авангардные Разработки», Республика Беларусь, г. Минск) в кварцевой кювете толщиной 10 мм. В качестве источника возбуждения в приборе использовалась импульсная ксеноновая лампа. Относительный квантовый выход флуоресценции рассчитывали по формуле (Levitus, 2020):

$$Q_S = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

где подстрочные S и R обозначают краситель и стандарт сравнения. Q_R - известный квантовый выход стандарта сравнения, Int - интеграл спектра флуоресценции, A - поглощение при длине волны возбуждения флуоресценции (λ_{ex}), n - коэффициент преломления растворителя. В качестве стандарта сравнения использовали динатриевую соль флуоресцеина в 0,1 М NaOH.

Световую и флуоресцентную микроскопию проводили с помощью инвертированного микроскопа MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103

W/2 OSRAM. Длина волны возбуждения составляла 470 нм для красной, зелёной и жёлтой эмиссии и 365 нм для синей эмиссии. Для записи изображений использовали камеру Moticom Pro 205A.

Аналитическую хроматографию проводили с использованием ВЭЖХ-системы «Милихром А-02» (ЭкоНова, Новосибирск, Россия) с колонкой ProntoSIL-120-5-C18 (2 × 75 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования с использованием 0,05 М фосфатного буфера с pH 6,86 в качестве элюента А и ацетонитрила в качестве элюента В. Состав подвижной фазы изменялся следующим образом: 0–1875 мкл, 20–50% В; 1875–2500 мкл, изократически, 50% В. Скорость потока элюента составляла 150 мкл/мин, температура колонки 35 °С, объем пробы 10 мкл, время анализа 16,7 мин. Длины волн детектирования составляли 210 и 260 нм.

^1H ЯМР спектр записали для раствора в CDCl_3 при комнатной температуре на спектрометре Bruker DPX-400. Химические сдвиги (δ в м.д.) измеряли с точностью 0,01 относительно ТМС.

2.3. Синтез диметил 2-(7-(диэтиламино)-2-оксо-2Н-хромен-3-карбоксамидо) сукцината (QE2)

К перемешиваемому на магнитной мешалке раствору сукцинимидилового эфира 7-диэтиламинокумарин-3-карбоновой кислоты (2,70 г, 7,53 ммоль) в сухом ДМФА (28 мл) при комнатной температуре добавили гидрохлорид диметил-L-аспартата (1,49 г, 7,54 ммоль). После растворения к смеси добавили триэтиламин (0,98 г, 9,7 ммоль). Перемешивание продолжали в течение 8 часов, затем реакционный сосуд поместили в холодильник (10 °С). Через 15 часов реакционную смесь нагрели до комнатной температуры, добавили в неё 450 г 3,1% водного раствора карбоната калия и проэкстрагировали дихлорметаном (4 × 100 мл). Объединенный экстракт высушили безводным карбонатом калия и сконцентрировали на роторном испарителе. Красновато-коричневый жидкий остаток подвергли разделению методом флэш-хроматографии на колонке (силикагель 40–63 мкм, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt} = 8:2$, $R_f = 0,51$) с помощью флэш-хроматографа SepaBeap Machine T. Целевую фракцию концентрировали при пониженном давлении и выдерживали под вакуумом масляного насоса при 40–50 °С в течение 3 часов, получив QE2 (Рис. 2)

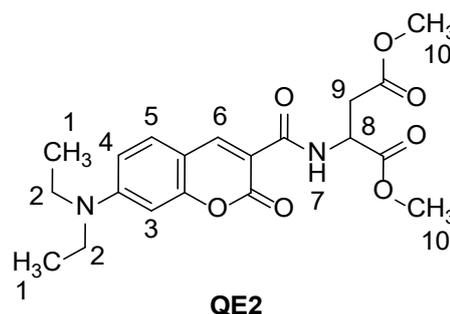


Рис.2. Структура красителя QE2.

в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ (м.д.): 9.57 (1H, d, $J=7,82$ Hz, H-7), 8.67 (1H, s, H-6), 7.42 (1H, d, $J=8,80$ Hz, H-5), 6.64 (1H, dd, $J=2,44, 8,80$ Hz, H-4), 6.50 (1H, d, $J=1,96$ Hz, H-3), 5.10 (1H, dt, $J=3,72, 7,83$ Hz, H-8), 3.79 (3H, s, H-10), 3.73 (3H, s, H-10), 3.46 (4H, q, $J=7,01$ Hz, H-2), 3.08 (1H, dd, $J=4,89, 16,63$ Hz, H-9) и 2.97 (1H, dd, $J=5,14, 16,88$ Hz, H-9), 1.25 (6H, t, $J=7,10$ Hz, H-1).

2.4. Устойчивость QE2 к гидролизу

Устойчивость к гидролизу QE2 изучали в водных растворах с pH 4,00 (ацетатный буфер, 0,05 М), 6,86 (фосфатный буфер, 0,05 М) и 9,18 (боратный буфер, 0,01 М). Образцы готовили добавлением метанольного раствора красителя (0,25 мг/мл, 0,240 мл) к 1,260 мл соответствующего буфера до достижения конечной концентрации красителя 0,04 мг/мл (0,099 мМ). Растворы оставляли при комнатной температуре (25 °C) в темном месте и анализировали методом ВЭЖХ во времени. Долю красителя, оставшегося в растворе, определялся как отношение площади пика красителя (поглощение на 260 нм) к общей площади пика красителя и пиков продуктов разложения.

2.5. Окрашивание живых организмов красителем QE2

2.5.1. Динофлагелляты

Штамм *G. corollarium* SCCAP K-0983 выделен из северной части Балтийского моря, Швеция (Sundström et al., 2009). Монокультуру выращивали на среде f/2-Si (Guillard and Ryther, 1962) на основе искусственной морской воды (солёность 11%). Культивирование проводили в пластиковых колбах объёмом 25–50 мл при температуре 4 °C и освещённости 13–21 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ с интервалом день: ночь 12: 12 ч. Для изучения вхождения красителя в клетку к 0,5 мл среды с динофлагеллятами добавляли 5 мкл красителя концентрацией 100 мМ и изучали вхождение красителя в клетки с помощью флуоресцентного микроскопа.

2.5.2. Гастроподы

Гастроподы *B. baicalensis* собирались водозадами на глубине 10–30 м в районе посёлка Листвянка. Моллюски содержали в трёх аквариумах объёмом 3,6 л с постоянной аэрацией воздухом при температуре 9°C, в качестве корма использовали нитчатые байкальские водоросли. В начале эксперимента в каждый аквариум поместили по 12 особей. Освещение осуществляли дневным светом без прямых солнечных лучей с интенсивностью дневного света 3–6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ (май-июль 2025 года).

После акклиматизации в течение 7 дней начат эксперимент по окрашиванию раковин двумя красителями QA2 и QE2, третий аквариум был контролем. В аквариумы №1 и №2 были добавлены красители до концентрации 1 мМ. Каждую неделю

меняли 1,5 л воды из аквариума на 1,5 л свежей байкальской воды, добавляя красители до концентрации 1 мМ.

2.5.3. Рыбы

В эксперименте использовали мальков *C. fluviatilis* в возрасте 6 месяцев, длиной от 3,5 до 6 см. Краситель вводили как добавлением в корм, так и непосредственным введением в аквариум. Рыбы содержались в стеклянных аквариумах, при температуре 13°C со сменой освещения день/ночь в режиме 12/12 при постоянной аэрации воздухом. Замена 50% воды проводилась шесть раз в неделю.

Приготовление корма осуществляли равномерным смачиванием сухого корма (ООО «НПК Русло», Россия, мальковый, для сиговых и лососевых рыб, размер 0,3 мм) раствором QE2 в ацетоне (концентрация 2 мг/мл) и дальнейшей сушкой в вакууме при 35°C. После высушивания корм пропитывали водным раствором альгината натрия (0,05 масс %) и высушивали в вакууме при 35°C. После сушки корм пропускали через сито с размером пор 0,31 мм. Содержание красителя QE2 в корме для рыб составляло 2 мг/г (4,94 мкмоль/г), альгината натрия 0,69 мг/г.

Аквариум для эксперимента с введением красителя в корм содержал 80 л воды и 12 рыб. Корм вводили по 1,5 г в сутки (50% утром и по 25% днем и вечером).

При добавлении красителя в аквариум объём воды составлял 20 л, количество рыб – 4, смена воды и режим кормления аналогичны предыдущему эксперименту. Стоковый раствор красителя в ДМСО (1 мМ, 404,4 мг/л) добавляли каждый день утром (по 5 мл) после смены воды, разбавляя сток в 1 л воды. В первый день эксперимента добавили 10 мл стокового раствора красителя. Концентрация красителя в воде составляла 1 мМ (404,4 мкг/л).

3. Результаты и обсуждение

Краситель QE2 получен путем реакции сукцинимидилового эфира 7-(диэтиламино) кумарин-3-карбоновой кислоты с гидрохлоридом диметил-L-аспартата (Рис. 3). Структура нового красителя подтверждена спектроскопией ^1H ЯМР, чистота – методом ВЭЖХ. Изучение состояния красителя в воде (Таблица 1) показало его достаточную устойчивость в нейтральной и слабокислой среде, тогда как в щелочной среде (pH = 9,18) он разрушается на 50% за 4 часа.

Таблица 1. Изменение содержания красителя QE2 в растворе, % от исходного.

Время, ч	pH 4.00	pH 6.86	pH 9.18
2	100	98	63
4	100	-	51
24	100	94	6
5 суток	92	82	-

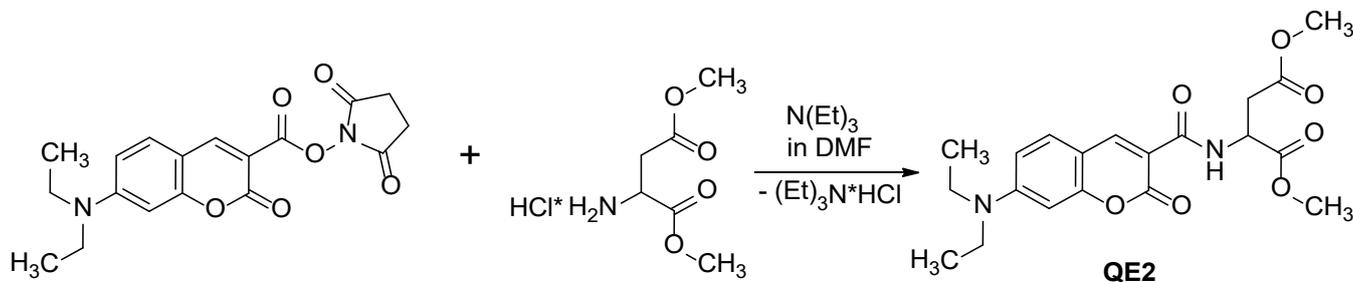


Рис.3. Схема синтеза красителя QE2.

Спектры поглощения, возбуждения и испускания нового красителя (Рис. 4, 5) близки к спектрам красителей QN2 и QA2 (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023). Основной пик поглощения находится в области 400-460 нм со сдвигом в голубую область при понижении полярности растворителя в ряду вода – этанол – гексан. Аналогичным образом ведут себя спектры возбуждения и испускания. В случае гексана в спектрах поглощения и испускания проявляются дополнительные пики. Квантовый выход флуоресценции резко понижается при повышении полярности среды (Таблица 2). Аналогичные явления наблюдались ранее для кумарин-содержащих красителей (Annenkov et al., 2019; и литература в этой статье) и объяснялись влиянием растворителя на ароматическую систему и повышением вероятности безызлучательной релаксации возбужденного состояния молекул в полярных растворителях.

Возможность проникновения молекул красителя QE2 в живые клетки оценена с использованием клеток динофлагеллят *G. corollarium* (Рис. 6). При добавлении в культуральную среду QE2 в концентрации 1 мкМ наблюдали характерное синее свечение клеток. В случае кислого красителя QA2 окрашивания клеток не наблюдали. Кумарин-содержащие красители способны к свечению в зелёной области спектра (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023), но при окрашивании динофлагеллят наблюдали только синюю флуоресценцию. Зелёная область спектра расположена выше 500 нм, а при переходе в неполярный растворитель свечение сдвигается в более коротковолновую область, что позволяет предположить нахождение QE2 в неполярных везикулах. Резкое повышение квантового выхода флуоресценции в неполярной среде (Таблица 2) приво-

дит к возможности наблюдения свечения клеток без удаления красителя из среды, что представляет определённую проблему при использовании родаминовых красителей.

Таблица 2. Спектральные характеристики и относительный квантовый выход флуоресценции (Q) для QE2

Растворитель	Длина волны возбуждения, нм	ϵ ($\times 10^{-3}$ л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹)*	Q, %
Вода	433	38,09	2,2
95% этанол	423	39,84	11,1
гексан	405	40,31	99,3

Примечание: * Коэффициент экстинкции для длины волны возбуждения

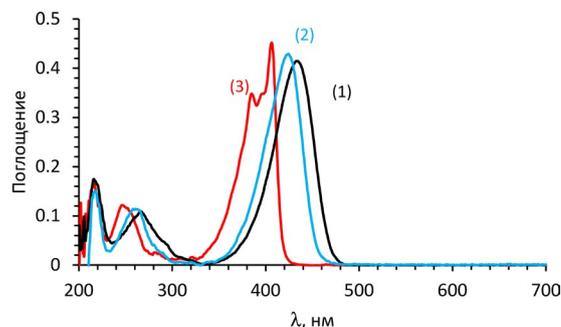


Рис.4. Спектры поглощения растворов QE2 в различных растворителях: (1) – вода, (2) – этанол, (3) – гексан. Концентрация 10 мкМ.

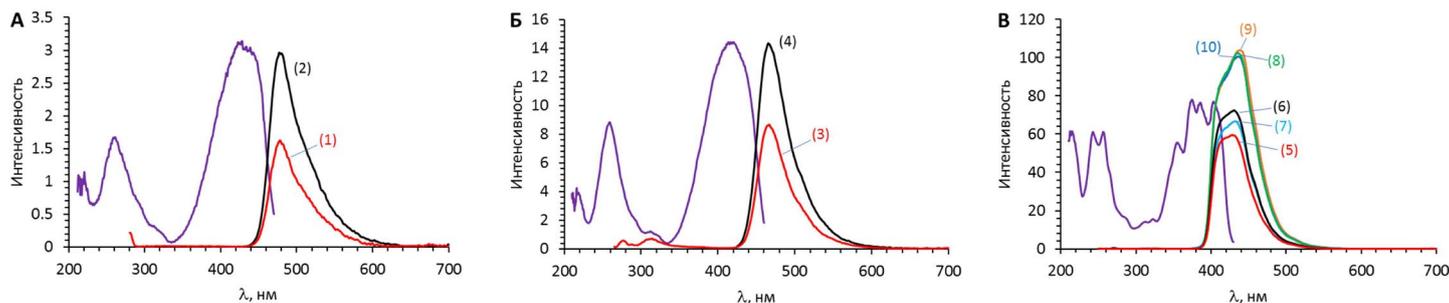


Рис.5. Спектры возбуждения и флуоресценции растворов QE2 в воде (А), 95% этаноле (Б) и гексане (В). Щели монохроматоров 5 (на вход) и 5 (на выход) нм. Концентрация красителя 10 мкМ. Спектры возбуждения измеряли для флуоресценции при 478 (А), 466 (В) и 437 нм (В). Длины волн возбуждения, в нм: (1), (3) – 260, (2) – 428, (4) - 420, (5) – 242, (6) – 256, (7) – 355, (8) – 374, (9) – 385, (10) – 403.

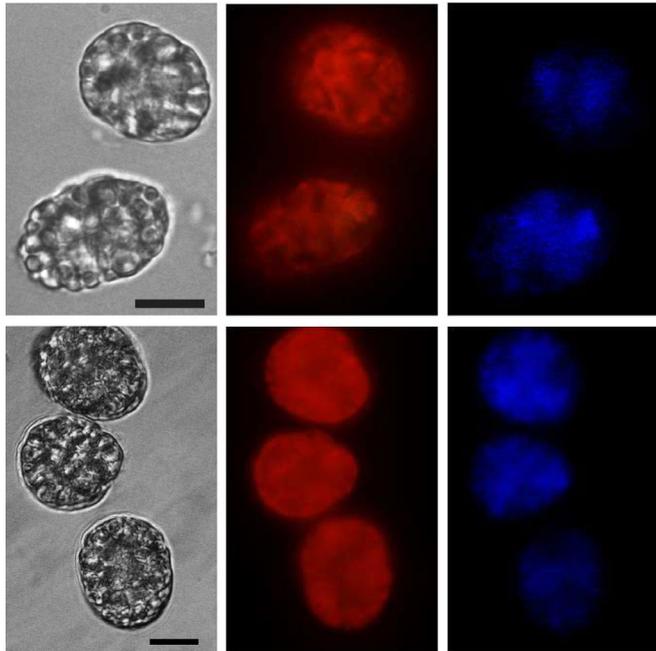


Рис.6. Микрофотографии динофлагеллят *G. corollarium* через 5 мин после добавления красителя QE2 в концентрации 1 μM . Масштаб: 10 мкм.

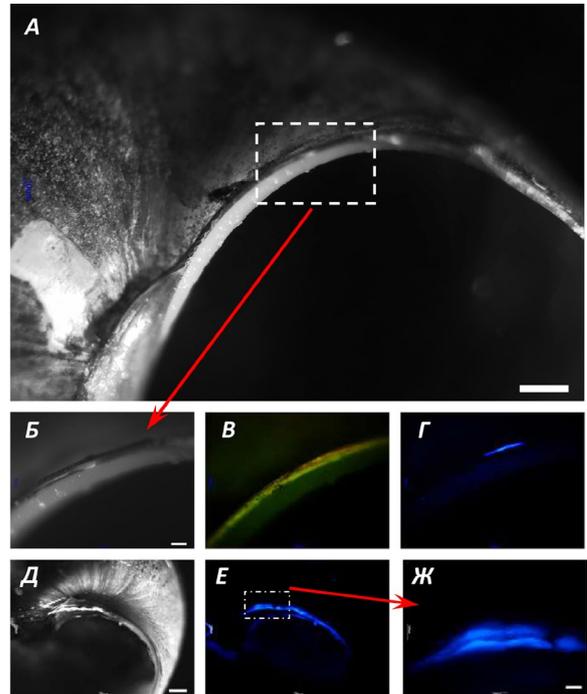


Рис.7. Видимые (А, Б и Д) и флуоресцентные (В, Г, Е и Ж) микрофотографии раковин гастропод *B. Baicalensis* культивированных в присутствии 1 μM QE2, вид со стороны устья. А-Г – культивирование в течение одного, Д-Ж – двух месяцев. Масштаб: 500 (А, Д и Е) и 100 (Б-Г и Ж) мкм.

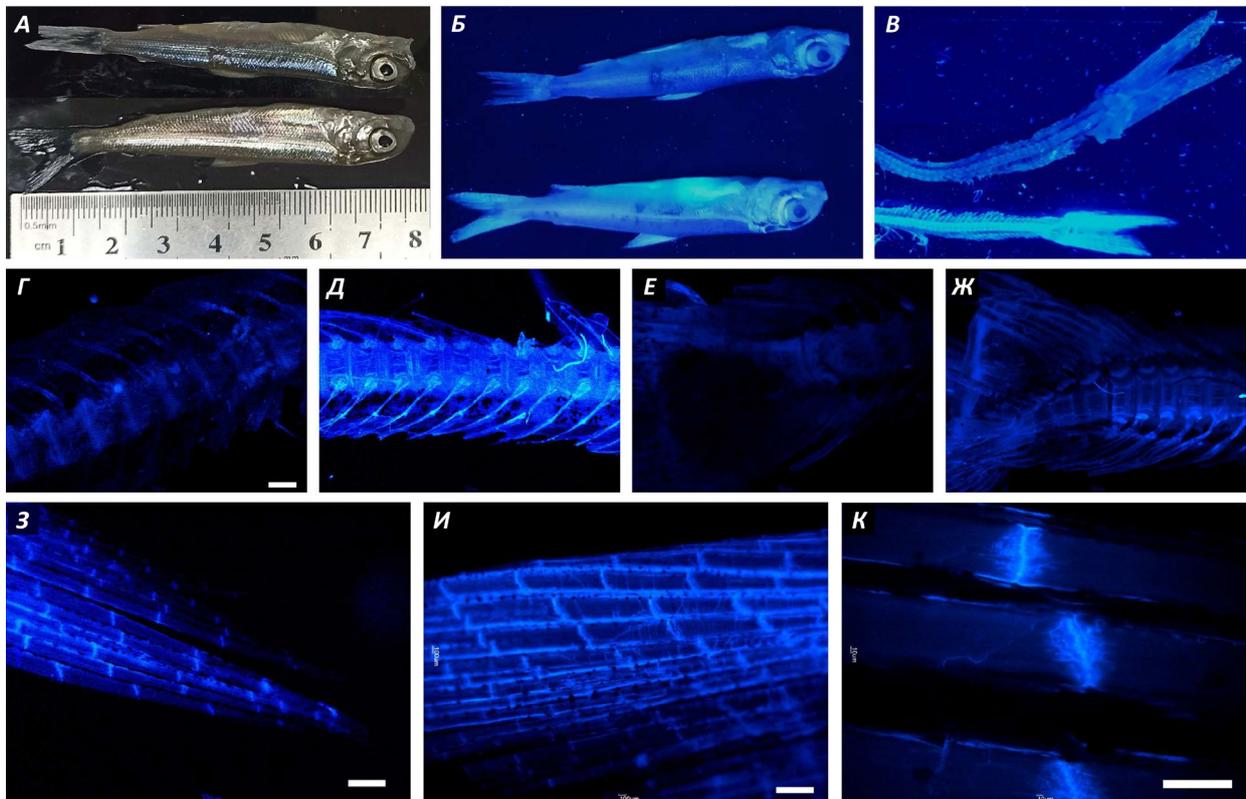


Рис.8. Фотографии рыб *S. fluviatilis* при естественном освещении (А) и при освещении светодиодами с длиной волны 365 нм (Б, В). В – скелеты рыб после механического удаления мышечных тканей. Верхнее изображение относится к экземпляру из контрольной группы, нижнее – из экспериментальной, после культивирования в течение 14 дней с кормом, модифицированным красителем QE2. Г-К – флуоресцентные микрофотографии: позвоночника (Г-Ж) и хвостового плавника (З-К) после очистки выдерживанием в воде 100 $^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут. Г и Е – образцы контрольной группы, изображения в парах Г-Д и Е-Ж получены при одинаковых настройках видеокамеры микроскопа. Масштаб: 500 (Г-Ж и З-И) и 100 мкм (К).

Выращивание байкальских гастропод *B. baicalensis* в среде с добавлением 1 μM QE2 (Рис. 7) привело к появлению характерной синей флуоресценции раковины со стороны устья, где происходит её рост. При возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 470 нм (Рис. 6С) наблюдается красно-жёлто-зелёное свечение раковины, отмечаемое как в контрольной группе, так и при использовании красителя QA2. Данные факты указывают на необходимость использования красителей со свечением в синей области для выявления кальций-минерализующихся структур.

Содержание рыб *C. fluviatilis* в присутствии красителя QE2, добавляемого либо в корм (2 мг/г) либо в аквариум (1 μM) привело к флуоресцентному окрашиванию рыб (Рис. 8). Наблюдение цельных организмов (Рис. 8В) осложняется рассеянием света, в том числе на защитной слизи, покрывающей тела рыб. Тем не менее, можно отметить свечение хвостового плавника и позвоночника. Флуоресценция в области брюшной полости связана, вероятно, с присутствием корма, содержащего краситель. Механическое удаление мышечных тканей (Рис. 8В) позволяет более наглядно увидеть окраску позвоночника и плавника. Микрофотографии более очищенного препарата (Рис. 8Г-Ж) также указывают на существенно более яркое свечение образцов с QE2 в сравнении с автофлуоресценцией контрольных препаратов. В случае хвостового плавника (Рис. 8З-К) окрашенными оказываются границы костных сегментов, особенно сочленения сегментов (Рис. 8К). В отличие от действия высоких концентраций кислотных красителей (Lü et al., 2019) неспецифического окрашивания сформировавшихся ранее костных сегментов не происходит. Введение красителя в аквариальную воду привело к аналогичным результатам при существенно большем расходе реагента (2,02 мг на одну рыбу в день в сравнении с 0,25 мг в случае добавления QE2 в корм).

4. Выводы

Разработан эффективный метод синтеза нового флуоресцентного красителя QE2, содержащего слабоосновную аминогруппу и две карбоксильные группы в форме метиловых эфиров, способных к гидролизу в слабощелочной среде или под действием ферментов. Краситель способен легко проникать в живые клетки, что показано на примере культуры динофлагеллят. Культивирование организмов с кальциевыми скелетами (гастроподы, рыбы) в присутствии QE2 приводит к флуоресцентному окрашиванию зон роста (устья раковин гастропод, элементы скелета и плавников рыб). Флуоресценция QE2 и продукта его гидролиза QA2 (Zelinskiy et al., 2023) существенно зависит от полярности среды, усиливаясь в неполярном окружении с одновременным смещением испускания из зелёно-голубой в синюю область.

Таким образом, краситель QE2 может найти применение для отслеживания зон кальциевой минерализации, оценки полярности клеточных

органелл, введения меток в рыбы для экспериментов в области экологии и аквакультур, окрашивания клеточных культур и скелетных элементов для исследования методом конфокальной микроскопии.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9. Авторы выражают благодарность А. П. Федотову и И. В. Ханаеву за предоставленные образцы гастропод, а также ЦКП «Ультрамикрoанализ» и УНУ «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» (ЛИН СО РАН) за предоставленное оборудование.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407: 44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Berthelot T., Talbot J.C., Lain G. et al. 2005. Synthesis of Ne-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Ne-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11: 153–160. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)
- Davis R.P., Honeyfield D.C. 2020. Efficacy and practical limitations of calcein as a marking agent in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to sunlight and frozen sample storage. *Fisheries Research* 232: 105736. DOI: [10.1016/j.fishres.2020.105736](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105736)
- Delvene G., Lozano R.P., Piñuela L. et al. 2022. Autofluorescence of microborings in fossil freshwater bivalve shells. *Lethaia* 55(4): 1–12. DOI: [10.18261/let.55.4.7](https://doi.org/10.18261/let.55.4.7)
- Donaldson L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25: 2393. DOI: [10.3390/molecules25102393](https://doi.org/10.3390/molecules25102393)
- Gao J., Xie X., Liu X.-F. et al. 2024. Efficacy of calcein as a chemical marker of *Potamocorbula laevis*. *Frontiers in Marine Science* 11: 1379571. DOI: [10.3389/fmars.2024.1379571](https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1379571)
- González-Pabón M.A., Tortolero-Langarica J.J.A., Calderon-Aguilera L.E. et al. 2021. Low calcification rate, structural complexity, and calcium carbonate production of *Pocillopora* corals in a biosphere reserve of the central Mexican Pacific. *Marine Ecology* 42: e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)
- Kucki M., Fuhrmann-Lieker T. 2012. Staining diatoms with rhodamine dyes: control of emission colour in photonic biocomposites. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 727–33. DOI: [10.1098/rsif.2011.0424](https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0424)
- Levitus M. 2020. Tutorial: measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum

yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)

Lü H., Fu M., Zhang Z. et al. 2019. Marking fish with fluorochrome dyes. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 28: 117–135. DOI: [10.1080/23308249.2019.1681358](https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1681358)

Mohler J.W. 2003. Producing fluorescent marks on atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction. *North American Journal of Fisheries Management* 23: 1108–1113. DOI: [10.1577/M02-143](https://doi.org/10.1577/M02-143)

Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304: 297–300. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)

Prentice J.A., J. Schlechte W., Betsill R.K. 2006. Longevity of oxytetracycline and calcein in double-marked batches of fry and fingerling largemouth bass. *Proceedings of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 60: 174–179.

Ramesh K., Hu M.Y., Thomsen J. et al. 2017. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications* 8: 1709. DOI: [10.1038/s41467-017-01806-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8)

Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent staining of living plant cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M. et al. (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols*. Cham, pp.153–165. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)

Shimizu K., Del Amo Y., Brzezinski M.A. et al. 2001. A novel fluorescent silica tracer for biological silification studies. *Chemistry and Biology* 8: 1051–1060. DOI: [10.1016/s1074-5521\(01\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00072-2)

Spires J.E., North E.W. 2022. Marking the shells of juvenile and adult eastern oysters, *Crassostrea virginica*, with the fluorochrome dye calcein and measuring growth and mortality after marking. *Journal of Molluscan Studies* 88: eyac004. DOI: [10.1093/mollus/eyac004](https://doi.org/10.1093/mollus/eyac004)

Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium corollarium* sp. nov. (dinophyceae)—a new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the Baltic sea. *Journal of Phycology* 45: 938–952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)

Sviben S., Gal A., Hood M.A. et al. 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. *Nature Communications* 216(7): 11228. DOI: [10.1038/ncomms11228](https://doi.org/10.1038/ncomms11228)

Tang Y.Z., Dobbs F.C. 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2306–2313. DOI: [10.1128/AEM.01741-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01741-06)

Thangavelu B., Mutthamsetty V., Wang Q. et al. 2017. Design and optimization of aspartate N-acetyltransferase inhibitors for the potential treatment of Canavan disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25: 870–885. DOI: [10.1016/j.bmc.2016.11.060](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.060)

Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290(5806): 527–528. DOI: [10.1038/290527a0](https://doi.org/10.1038/290527a0)

Vidavsky N., Masic A., Schertel A. et al. 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *Journal of Structural Biology* 192(3): 358–365. DOI: [10.1016/j.jsb.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.017)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244–252. DOI: [10.31951/2658-3518-2](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2)

Invasive fish and its consequences in the freshwater ecosystem of undivided Midnapore, West Bengal, India

Chanda A.^{1,2,*}, Das P.¹, Sahu S.K.²

¹Natural & Applied Sciences Research centre, Raja N. L. Khan Women's College (Autonomous), Vidyasagar University, Midnapore, Paschim Medinipur, West Bengal, 721102, India

²Department of Environmental Science, Sambalpur University, Jyoti Vihar, Burla, Sambalpur, Odisha, 768019, India

ABSTRACT. A primary goal of the current study is to conduct a complete survey of the diversity of freshwater exotic fish in Midnapore, West Bengal, India, with special attention paid to their effects on local fish species. Freshwater fish species from all the blocks in the three districts under study have been surveyed. According to observations, there are 14 foreign freshwater fish species in the research region, classified into 12 genera and 7 families. Two species, *Barbonymus gonionotus* and *Piaractus brachypomus*, are recorded for the first time from the study area and are comparatively recent phenomena. Most exotic fish species (12 species) were introduced in India as food fish for aquaculture purposes; two species were introduced for mosquito control for their larvicidal feeding habits. Of the twelve food fishes, three are also used in aquariums as pet fish among the residents of the study area. The ecological consequences of the exotic fish species on local fish diversity is an added criterion of the present investigation. All species in the study area have a complete set of distributional information. Thus, the focus of the current study is on the exotic fish faunal diversity in the study area.

Keywords: exotic, fish, diversity, ecological, consequence

For citation: Chanda A., Das P., Sahu S.K. Invasive fish and its consequences in the freshwater ecosystem of undivided Midnapore, West Bengal, India // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1305-1312. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1305

1. Introduction

Any species that a man has accidentally or intentionally transferred from its native environment and released is considered an exotic species (Kottelat and Whitten, 1996). As per IUCN, an invasive species is an alien species that establishes itself in naturally occurring or partially naturally occurring ecosystems or habitats, leads to a change, and poses a threat to the native biological diversity of the area. All categories of living organisms, including invasive or exotic species, can be found in these widely dispersed habitats around the globe (Raghubanshi et al., 2005). It has been more than a century since exotic fish were first introduced to Indian waters. While the country was under British rule, such fisheries were possibly introduced for recreational fisheries. Francis Day (1863) first tried to introduce the brown trout (*Salmo trutta fario*) in the Nilgiri region, but he was unsuccessful for the same purpose (Jhingran, 1975). This was followed by the addition of exotic fishes from various countries to more and more water bodies of India for augmenting fish production

through aquaculture, for sport fishery, mosquito control, weed control, ornamental purposes, etc., with successes and failures. Larvicidal fishes, including *Poecilia reticulata* and *Gambusia affinis*, were added in 1908 and 1928, respectively, to reduce mosquito larvae in stagnant waters where they were not well established. The ornamental fish species, which are imported to our country, have progressive results in the aquarium trade, but their insecticidal value did not reach a satisfactory level. Because of human activity related to pleasing, ornamental fish kept in aquarium tanks are easily transferred into natural water bodies, but their effects on the ecosystem have not been studied.

Exotic fish species were distributed around the world for a number of reasons, such as (a) promoting species diversity in aquatic systems and boosting local fishery potential, (b) game fishing, (c) aquarium fish keeping, and (d) preventing pests like mosquitoes (Kumar, 2000). Additionally, exotic fishes of one country may spread to nearby countries via floods and other causes. For this reason, the uncontrolled import and introduction of aquatic species, particularly fishes,

*Corresponding author. E-mail address: chandaangsuman182@gmail.com (A. Chanda)

Received: June 04, 2025;

Accepted after revised: December 10, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



caused alarm all over the world because it led to a broad variety of problems, including the extinction of native species. The invasive fishes seriously compete with the indigenous species in relation to habitat and food supply. They pose a threat to local fish populations, can spread disease-causing pathogens and parasites, can create hybrids, and can degrade aquatic organisms' genetic purity. Therefore, each and every cause mentioned above is responsible for the loss of local fish diversity (Nyman, 1991b). The optimum threat not only affects the quantity of biodiversity but also influences the socio-economy of the people, who depend on the aqua-resources for their daily life maintenance (Philipp et al., 1995). Approximately 20% of the world's recorded freshwater fishes are either extinct or are at the edge of extinction (Moyle and Leidy, 1992). In the long run, the addition of exotic species may cause a highly deleterious problem. According to Nyman (1991a), changes in the aquatic ecosystem caused by the introduction of alien species have the potential to be irreversible and may even result in the extinction of several species. Welcomme (1988b) reported that 168 fish species under 37 families were introduced into its non-native habitats, and as less as 67 species became permanent inhabitants in different water bodies, among which 27 species turned into real pests.

India is one of the countries with the highest biodiversity, having 1027 different species of freshwater fish (Gopi et al., 2017). According to Mogalekar et al. (2017), the West Bengal state is home to 267 different species of freshwater fish, 13 of which are considered invasive species in the freshwater ecology. The previous existing kinds of literature such as Paul and Chanda (2014; 2017), Jana et al. (2015), Pahari et al. (2017), Kisku et al. (2017), Kar et al. (2017), and Chanda (2020) provided information on the diversity of native fish in various rivers and water bodies in the study area except Jana et al. (2021), who only separately enlisted four

exotic species during the diversity study of fish in the Kapaleswari River, but none has emphasized the diversity of exotic fish and their ecological consequences in the area under investigation.

As an outcome, the current study will undoubtedly bring attention to the exotic fish faunal diversity at the regional level, particularly in the districts of Purba Medinipur, Paschim Medinipur, and Jhargram located in the West Bengal state. Moreover, such a study will alert the fisherman community and policymakers to take suitable steps to protect indigenous aquatic biodiversity in the study area.

2. Materials and methods

2.1. Geography of the study area

The present study area is located in the south-western part of the West Bengal state. It has mostly lateritic soil content, and some areas of this state contain loamy soil. Study site (Fig. 1) includes three districts namely Purba Medinipur ($21^{\circ}38'-22^{\circ}31'N$; $87^{\circ}17'-88^{\circ}12' E$), Paschim Medinipur ($21^{\circ}45'-22^{\circ}57'N$; $87^{\circ}03'-87^{\circ}53'E$), and Jhargram ($21^{\circ}52'-22^{\circ}48'N$; $86^{\circ}34'-87^{\circ}20'E$). The climate in the study area is a result of the interaction between the northeasterly and southwesterly monsoons.

2.2. Collection of fish samples

Between July 2019 and January 2021, the specimens were collected from a variety of locations, including beels, ponds, rivers, as well as from market survey of the area. Samples were collected by gill nets, drag nets, and scoop nets with the active help of local fishermen. Morning (7 am to 9 am) was the most common time of sampling. After being collected, the specimens were immediately put into formaldehyde solution at a concentration of 4% and transported to the author's lab, R.N.L.K Women's College.

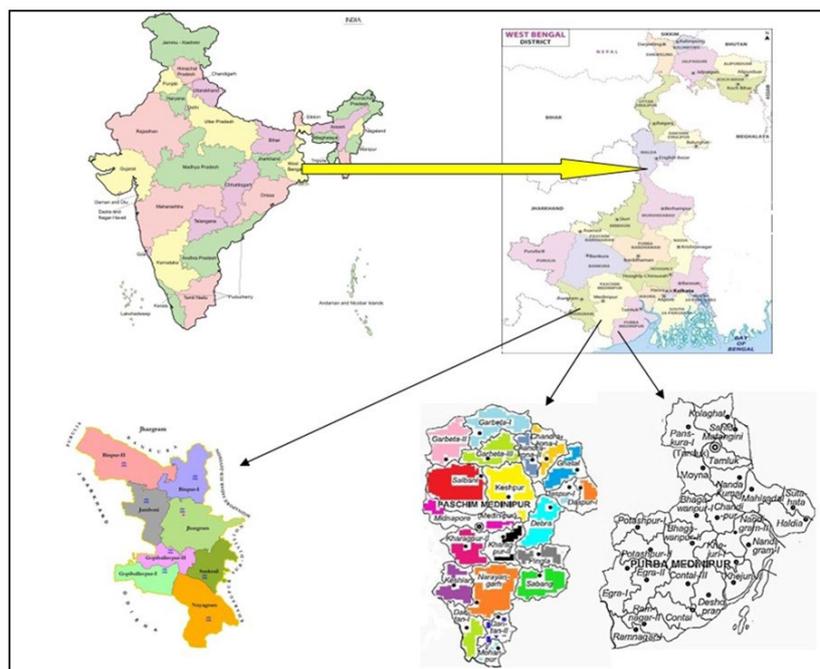


Fig.1. Study Site.

2.3. Laboratory procedure and identification

Finally, the specimens were washed and kept in a labelled container with 6% formaldehyde. Size, colour, pattern, number of fins, fin form, fin rays, number of scales, etc. were some of the morphological characteristics of the specimens, which were examined. Jhingran (1991), Jayaram (2002; 2010), Day (1889), and FishBase were used to properly identify the fish specimens (2021). The meristematic system of Tawar and Jhingran (1991) and Jayaram (2002; 2010) was used for all fish measurements. The range of the species was documented (Table 1). The present status of exotic fish conservation was determined as per the IUCN Red List (2021). Invasiveness for each species under research

was estimated by determining the relative abundance of the species.

3. Results and discussion

The current survey has revealed 14 exotic freshwater fish from 12 genera and 7 families (Table 1). Out of the fourteen recorded species, two—*Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850) and *Piaractus brachypomus* (G. Kuvier, 1818)—are reported here for the first time from the area under investigation, which is a relatively new event. Cyprinidae species were common and dominant at all study sites (42.86%), followed by Poeciliidae (14.29%) and Chichlidae (both 14.29%) (Fig. 2). The relative abundance value calculated for exotic fish species from the study area shows that *Hypophthalmichthys*

Table 1. Distribution and conservation status of different exotic fish in the study area.

Family	Species Name	Local Name	Habitat	Maximum size (TL)	Use	Blocks	IUCN
Cyprinidae	<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)	Gold carp	Fr	40 cm	Or, Fo	Jhargram: Jhargram Paschim Medinipur: Ghatal, Debra, Sabang, Pingla, Keshpur, Daspur-I & II, Khargpur-I & II, Keshiary, Narayangarh Purba Medinipur: Egra-I & II, Contai-I & III, Mahisadal, Moyna, Panskura, Pataspur-I & II, Bhagwanpur-I & II, Tamluk, Nandigram-I	LC
	<i>Barbonymus gonionotus</i> (Bleeker, 1850)	Java punti	Fr	20 cm	Fo	Jhargram: Gopiballavpur-I, Binpur I, Sankrail, Jhargram Paschim Medinipur: Midnapore, Daspur-I & II, Garhbeta-II & III, Debra, Garhbeta-I, Keshiary, Sabang, Narayangarh Purba Medinipur: Mahisadal, Moyna, Pataspur-I, Pataspur-II, Bhagwanpur-I, Nandigram-I	LC
	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Valenciennes, 1844)	Grass carp	Fr	150 cm	Fo	Jhargram: Jamboni, Binpur-II, Gopiballavpur-I & II, Sankrail Paschim Medinipur: Ghatal, Debra, Sabang, Pingla, Midnapore, Garhbeta I, Salboni, Keshpur, Daspur-I & II, Khargpur-I & II, Keshiary, Narayangarh Purba Medinipur: Egra-I & II, Contai-I & III, Mahisadal, Moyna, Panskura, Pataspur-I & II, Bhagwanpur-I & II, Tamluk, Nandigram-I	NE
	<i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)	Common carp	Fr	120 cm	Fo	Jhargram: Binpur-I & II, Gopiballavpur-I & II, Nayagram, Sankrail, Jamboni, Jhargram Paschim Medinipur: Garhbeta-I & II & III, Chandrakona-I&II, Salboni, Keshpur, Ghatal, Daspur-I & II, Midnapore, Khargpur-I & II, Pingla, Debra, Keshiary, Narayangarh, Sabang, Mohanpur, Datan-I&II Purba Medinipur: Egra-I & II, Contai-I & II, Mahisadal, Moyna, Nandigram-I, Panskura, Patashpur-I & II, Tamluk, Sahid Matangini, Nandigram-II, Bhagwanpur-I & II, Kolaghat, Chandipur, Doshpran, Nandakumar	VU
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Valenciennes, 1844)	Silver carp	Fr	150 cm	Fo	Jhargram: Binpur-I & II, Gopiballavpur-I & II, Nayagram, Sankrail, Jamboni, Jhargram Paschim Medinipur: Garhbeta-I & II & III, Chandrakona I&II, Salboni, Keshpur, Ghatal, Daspur-I & II, Midnapore, Khargpur-I&II, Pingla, Debra, Keshiary, Narayangarh, Sabang, Mohanpur Purba Medinipur: Egra-I & II, Contai-I & II, Mahisadal, Moyna, Nandigram-I, Panskura, Patashpur-I & II, Bhagwanpur-I&II, Tamluk	NT
	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> (Richardson, 1845)	Bighead	Fr	146 cm	Fo	Jhargram: Gopiballavpur-I&II, Sankrail, Jhargram Paschim Medinipur: Debra, Garhbeta-II & III, Sabang, Salboni, Keshpur, Datan-I & II Purba Medinipur: Egra-I & II, Bhagwanpur-I&II, Contai-I&III, Nandigram-I & II, Panskura, Pataspur-II, Tamluk, Sahid Matangini, Chandipur, Doshpran, Nandakumar	DD

Family	Species Name	Local Name	Habitat	Maximum size (TL)	Use	Blocks	IUCN
Poeciliidae	<i>Gambusia affinis</i> (Baird and Girard, 1853)	Gambusia	Fr, Br	04 cm	Or	Paschim Medinipur: Daspur-I&II, Chandrakona-I, Sabang Purba Medinipur: Bhagwanpur I, Mahisadal, Tamluk, Nandigram-I&II	LC
	<i>Poecilia reticulata</i> (Peters, 1859)	Guppy	Fr, Br	05 cm	Or	Paschim Medinipur: Ghatal, Debra, Sabang Purba Medinipur: Mahisadal, Haldia, Tamluk	NE
Chichlidae	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Peters, 1852)	Tilapia	Fr, Br	39 cm	Fo	Jhargram: Gopiballavpur-I, Sankrail Paschim Medinipur: Midnapore, Garhbeta I&III, Salboni, Keshpur, Daspur-I&II, Khargpur-I&II, Keshiary, Narayangarh, Mohanpur Purba Medinipur: Egra-I&II, Contai-I&III, Mahisadal, Moyna, Nandigram-I &II, Panskura, Pataspur-I, Pataspur-II, Bhagwanpur-I &II, Tamluk, Sahid Matangini, Kolaghat, Chandipur, Deshpran, Nandakumar	NT
	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)	Nilotica	Fr, Br	60 cm	Fo	Jhargram: Binpur-II, Gopiballavpur-I Paschim Medinipur: Midnapore, Debra, Garhbeta-I, Khargpur-I&II Purba Medinipur: Mahisadal, Moyna, Bhagwanpur-I &II, Pataspur I, Nandigram-I, Pataspur-II	NE
Osphronemidae	<i>Osphronemus goramy</i> Lacepède, 1801	Goramy	Fr, Br	70 cm	Or, Fo	Purba Medinipur: Egra-I & II, Haldia, Kolaghat, Tamluk, Chandipur	LC
Clariidae	<i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822)	Thai magur	Fr	170 cm	Fo	Jhargram: Binpur- I & II, Gopiballavpur- I Paschim Medinipur: Midnapore, Garhbeta- I & II, Keshpur, Daspur II, Khargpur I&II, Keshiary, Narayangarh, Mohanpur Purba Medinipur: Egra- I & II, Mahisadal, Nandigram, Panskura, Pataspur- I &II, Bhagwanpur- I & II, Haldia, Sahid Matangini, Kolaghat, Chandipur, Deshpran, Nandakumar	LC
Pangasidae	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage, 1878)	Panngus	Fr	130 cm	Fo	Jhargram: Binpur- I & II, Gopiballavpur- I & II, Nayagram, Jhargram Paschim Medinipur: Chandrakona I&II, Salboni, Keshpur, Ghatal, Daspur -I &II, Midnapore, Khargpur-I&II, Pingla, Debra, Keshiary, Narayangarh, Sabang, Mohanpur Purba Medinipur: Egra- I & II, Contai- I &II, Nandigram- I, Panskura, Patashpur- I & II, Bhagwanpur- I	EN
Serrasalimidae	<i>Piaractus brachypomus</i> (G. Kuvier, 1818)	Rupchand	Fr	45 cm	Or, Fo	Paschim Medinipur: Ghatal, Daspur -I Purba Medinipur: Moyna, Nandigram I, Panskura, Potaspur-I, Tamluk	NE

Note: IUCN = International Union for Conservation of Nature; TL = Total Length; EN = Endangered; VU = Vulnerable; NT = Near Threatened; LC = Least Concern; DD = Data Deficient; NE = Not Evaluated; Fo = Food; Or = Ornamental; Fr = Fresh water; Br = Brackish water

molitrix (Valenciennes, 1844) has the maximum invasiveness (11.5%), followed by *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 and *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) (both 10.3%). (Fig. 3, Table 1.). Here, the invasiveness of the exotic fish species is expressed in terms of their relative abundance because maximum invasiveness is due to the availability of the species in maximum habitat and in maximum number. The invasiveness of the species is also relative to its length of exposure to the natural habitat. The chronological gradient of invasiveness of the fish species is listed in Table 2. *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) is the maximum abundant species and available in the maximum habitat of the study area, and *Piaractus brachypomus* (Kuvier, 1818) is the least abundant species and available in the restricted habitat of the study area. As per the IUCN Red List, 35.7% of exotic fish in the study area are in the least concern category, while

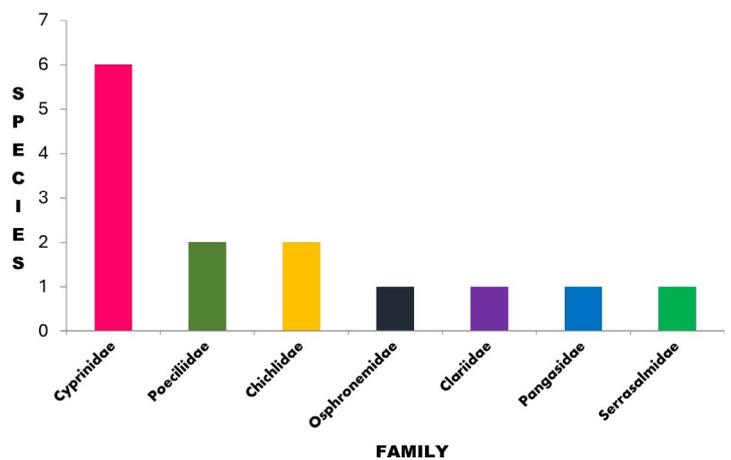


Fig.2. Family level species diversity.

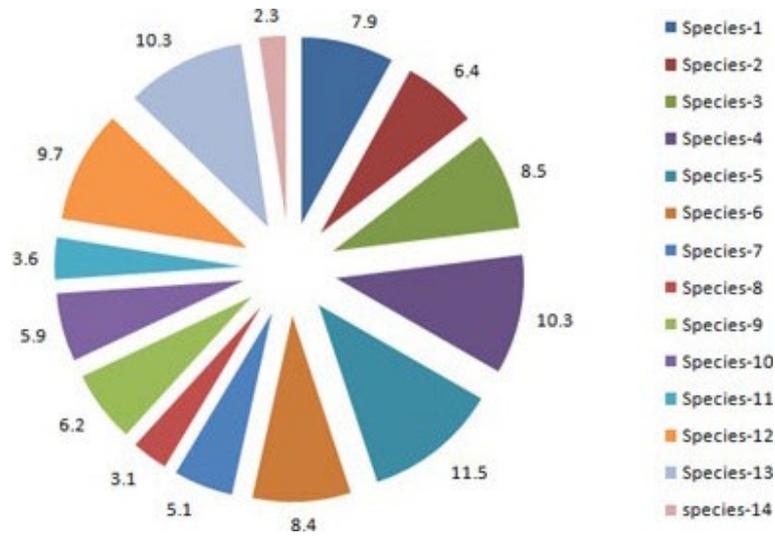


Fig.3. Relative abundance (merit of invasiveness).

28.5% of exotic fishes are in the not evaluated category and 14.2% are in the near threatened category. The endangered, vulnerable, and data deficient categories are of 7.1% each in the study area (Fig. 4).

There are sufficient numbers of fish species that can be cultivated in our country. Any further introduction of exotic fish species into any aquatic bodies would pose a threat to the existing species diversity. The addition of major exotic species such as tilapia, pangasius, etc. has a higher adverse impact on the aquatic ecology, as well as on farming techniques, because farmers alter farm construction and input materials for exotic fish farming in the study area. The significant entry of enzootics and foreign pathogens is always a great threat resulting from the introduction of exotic species. Alien species introductions lead to increased competition for resources and may also cause gene loss, predation, and pathogen inoculation within native species. Instead of indiscriminately introducing exotic species into our native aquatic habitat, we need to focus on protecting our present indigenous fish population and taking measures to enhance the quality of the cultivable fish population. To protect the native fish species that

are already present in the study area, appropriate and effective measures should be implemented. The import and trading of aqua-organisms should be restricted through monitoring. In this regard, local, national, and international governing bodies have to play a vital role to regulate the illegal entry of exotic fish.

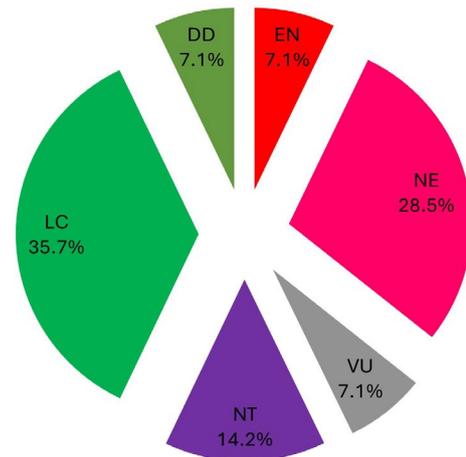


Fig.4. IUCN category (%) of exotic fishes in the study area.

Table 2. Invasiveness of different exotic fish found in the study area

Sl. No. In Table 1	Species Name	Invasiveness in percentage
5.	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Valenciennes, 1844)	11.5
4.	<i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758	10.3
13.	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage, 1878)	10.3
12.	<i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822)	9.7
3.	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Valenciennes, 1844)	8.5
6.	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> (Richardson, 1845)	8.4
1.	<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)	7.9
2.	<i>Barbonymus gonionotus</i> (Bleeker, 1850)	6.4
9.	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Peters, 1852)	6.2
10.	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)	5.9
7.	<i>Gambusia affinis</i> (Bird and Girard, 1853)	5.1
11.	<i>Osphronemu sgoramy</i> Lacepède 1801	3.6
8.	<i>Poecilia reticulata</i> Peters, 1859	3.1
14.	<i>Piaractus brachypomus</i> (G. Kuvier, 1818)	2.3

Furthermore, educational campaigning should be initiated to explain the hazards of releasing exotic species into the native environment and encourage the proper disposition of unwanted fish. We have to educate fishers, fish farmers, fish entrepreneurs, hobbyists, and fish keepers, as well as the average person, that releasing exotic species into the environment is dangerous to the environment.

3.1. Adverse effects on local species

The addition of non-native fish into aquatic ecosystems is controversial, despite significant contributions to aquaculture. Any new species introduced to an ecosystem will have an effect because it will share resources with the native species, but most of the time, the effects may not be noticeable. Exotic fishes are frequently recognized as a threat to native populations, with respect to aquatic diversity resulting from competition for foraging, habitat alteration, ecosystem degradation, and genetic interaction through cross fertilization with native species. It is believed that small native species in the study area suffer from the addition of farmed alien species like the Thai magur, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822).

Although non-indigenous species were only introduced for aquaculture in India, they are commonly found in the inland rivers, reservoirs, floodplains, canals, and wetlands of several states. During the monsoon season, it is easy for non-native species to spread from closed culture systems to open water resources in flood-prone areas. The spread of fast-growing, non-native fish impacts native ecosystems and threatens native, comparatively smaller species. Populations of these introduced fish have grown exponentially, and their range is expanding fast beyond the sites of introduction. Recently, it has been observed that a large number of non-native fishes are found in the local aquatic habitat of the study area. The aquaculturists and inexperienced farmers accidentally introduced non-native fishes into open waters due to their lack of knowledge or awareness. The effects of these escaped fishes were studied, and it was found that they cause ecological problems in several natural aquatic systems (Singh, 2021). Non-native species that were fully established in the local habitat, acclimatised in natural ecosystems, and can reproduce naturally mostly pose ecological risks. These species tend to have very large populations in natural environments when conditions are ideal.

The availability of basic knowledge and cultural techniques for non-native fish species makes them attractive to aquaculturists, as they can easily and quickly adapt to new environments and compete in new markets. Aquaculture entrepreneurs and farmers have been trying for years to bring in new fish strains and varieties like the Viet-Koi to boost production and compete on the global market. Despite productivity concerns, the government authorities took into account environmental and biodiversity factors to protect the local aquatic ecosystem. The government of India authorised National Committee to monitor the import of non-native species into Indian water bodies.

3.2. Novel contribution of the study

This research provides the first documented record of two exotic fish species, *Barbonymus gonionotus* and *Piaractus brachypomus* in the study area of Purba Medinipur, Paschim Medinipur, and Jhargram, West Bengal (Fig. 2). These species have not been previously reported in this region, marking a new addition to the exotic fish fauna. This study also offers a detailed examination of the ecological consequences of exotic fish invasions, particularly their relative abundance and invasiveness in the region (Table 2).

3.3. Comparison with other regions of India

The results on invasive fish species in West Bengal align with patterns observed in other parts of India, where exotic species such as *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* have also become widespread (Kumar, 2000). However, this study emphasizes that in West Bengal, species like *Hypophthalmichthys molitrix* and *Pangasianodon hypophthalmus* have shown exceptional invasiveness, likely due to their adaptability to the region's monsoonal climate and abundant water bodies. Similar invasions were observed in such states as Andhra Pradesh and Tamil Nadu (Jana et al., 2015), where non-native species outcompeted native fish populations in certain water bodies.

3.4. Assumptions regarding the successful spread of some species

Species such as *Hypophthalmichthys molitrix* and *Cyprinus carpio* have a high tolerance for diverse aquatic environments and can reproduce rapidly in local habitats (Moyle and Leidy, 1992). Intentional introductions for aquaculture and ornamental purposes, coupled with accidental releases, facilitated their spread. The monsoon season further aids their distribution into new habitats (Philipp et al., 1995). Some species are more competitive in terms of food resources and habitat occupation. For instance, *Clarias gariepinus* outcompeted smaller native species due to its predatory nature and large size (Nyman, 1991a).

3.5. Future trends in invasive species spread

Species *Hypophthalmichthys molitrix* and *Cyprinus carpio* will continue to dominate freshwater ecosystems, particularly in regions with abundant aquaculture activities and seasonal flooding (Welcomme, 1988a). With the continued spread of invasive species, hybridization with native fish species may become more prevalent, leading to genetic erosion (Raghubanshi et al., 2005). As global trade and aquaculture expand, the introduction of new invasive species is expected. Surveillance and regulatory measures will need to evolve to address these threats effectively (Moyle and Leidy, 1992).

These insights underline the urgency of regulating the introduction of exotic species and monitoring their impact on local biodiversity to mitigate long-term ecological risks.

4. Conclusion

This study highlights the significant impact of exotic fish species on the freshwater ecosystems of Purba Medinipur, Paschim Medinipur, and Jhargram in West Bengal, revealing 14 exotic species from 7 families and 12 genera. Notably, *Barbonymus gonionotus* and *Piaractus brachypomus* were recorded for the first time in the region. The study further identifies *Hypophthalmichthys molitrix*, *Cyprinus carpio*, and *Pangasianodon hypophthalmus* as the most invasive species, with *Hypophthalmichthys molitrix* showing the highest relative abundance and invasiveness. These findings underscore the ecological risks posed by the introduction of non-native species, including competition with native species, habitat alteration, and genetic risks.

The spread of these species mirrors patterns observed across other parts of India, where non-native fish have become dominant in aquatic ecosystems, often outcompeting indigenous species. The spread of successful invaders can be attributed to their adaptability, rapid reproduction, and human-mediated introductions for aquaculture, ornamental purposes, and pest control. However, some species fail to establish populations due to environmental incompatibilities or competition from established native species.

To safeguard native aquatic species, it is imperative to implement stringent policies, improve regulatory oversight, and raise awareness among local communities and stakeholders about the risks posed by non-native species. Immediate action is required to prevent irreversible ecological damage and ensure the long-term sustainability of local fisheries and ecosystems.

Acknowledgements

Authors are thankful to the Department of Science and Technology & Biotechnology, Government of West Bengal for granting money in the form of a research project [350 (Sanc.)/ST/P/S and T/17G-13/2018; Dated 14.03.2019]. Corresponding author is highly grateful to the Dept. Of Environmental Science, Sambalpur University for giving him a chance to be a post-doctoral research scholar.

Conflict of interest

There is no conflict of interest for the present manuscript.

References

Chanda A. 2020. A revision to the freshwater fish diversity of Paschim Medinipur and Jhargram district of West Bengal, India. *Uttar Pradesh Journal of Zoology* 41(9): 24–39.

Day F. 1889. *Fauna of British India, including Ceylon and Burma* Vol. 2, 558p.

Froese R., Pauly D. 2021. FishBase. World Wide Web electronic publication. URL: www.fishbase.org (Retrieved: 04.26.2021).

Gopi K.C., Mishra S.S., Kosygin L. 2017. Pisces. Current Status of Freshwater Faunal Diversity in India, Zoological Survey of India, Kolkata, pp. 527–570.

IUCN Red List of Threatened Species. 2021. URL: <https://www.iucnredlist.org> (Retrieved: 5.22.2021).

Jana A., Sit G., Chanda A. 2021. Ichthyofaunal Diversity of River Kapaleswari at Paschim Medinipur District of West Bengal, India. *Flora and Fauna* 27(1): 113–124. DOI: [10.33451/florafauna.v27i1pp113-124](https://doi.org/10.33451/florafauna.v27i1pp113-124)

Jana A., Sit G., Maiti K. 2015. Ichthyofaunal diversity of Keleghai river at Medinipur district in West Bengal. *International Research Journal of Basic and Applied Sciences* 1: 24–26.

Jayaram K.C. 2002. *Fundamentals of fish taxonomy*. New Delhi: Narendra publishing house.

Jayaram K.C. 2010. *The Freshwater Fishes of the Indian Region* (Revised second edition). New Delhi: Narendra publishing house.

Jhingran V.G. 1975. *Fish and fisheries of India*. Delhi: Hindustan Publishing Corporation.

Jhingran V.G. 1991. *Fish and Fisheries of India*. New Delhi: Hindustan Publishing Corporation.

Kar A., Bhattacharya M., Ghorai M. et al. 2017. Ichthyofaunal Diversity of Kangsabati River at Paschim Medinipur District, West Bengal, India. In *Proceedings of the zoological society* 70(2): 165–173. DOI: [10.1007/s12595-016-0172-0](https://doi.org/10.1007/s12595-016-0172-0)

Kisku S., Chini D.S., Bhattacharya M. et al. 2017. A cross-sectional study on water quality in relation to fish diversity of Paschim Medinipur, West Bengal, India through geoinformatics approaches. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 43(4): 283–289. DOI: [10.1016/j.ejar.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.12.001)

Kottelat M., Whitten T. 1996. Freshwater biodiversity in Asia: with special reference to fish. *The World Bank technical paper* 343: 59.

Kumar A.B. 2000. Exotic fishes and freshwater fish diversity. *Zoos' Print Journal* 15(11): 363–367.

Mogalekar H.S., Canciyal J., Ansar C.P. et al. 2017. Freshwater fish diversity of West Bengal, India. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(2): 37–45.

Moyle P.B., Leidy R.A. 1992. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: the role of invasive species and their impact on freshwater fish populations. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2(1): 65–72.

Nyman L. 1991. Conservation of freshwater fish. *Protection of biodiversity and genetic variability in aquatic ecosystems*. Fisheries Development Series (Sweden), pp. 38.

Nyman A. 1991. The ecological and economic consequences of introducing exotic species in aquatic environments. *Aquatic Biology Journal* 19(2): 10–18.

Pahari R.P., Chakraborty D., Sarkar K.S. et al. 2017. Ichthyofaunal diversity in Keleghai river, West Bengal, India. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bioscience* 6(6): 29–38.

Paul B., Chanda A. 2014. Indigenous ornamental fish faunal diversity in Paschim Medinipur, West Bengal, India. *International Research Journal of Biological Sciences* 3(6): 94–100. URL: <http://www.isca.in/IJBS/Archive/v3/i6/15.ISCA-IRJBS-2014-101.pdf>

Paul B., Chanda A. 2017. A checklist of small indigenous freshwater fish fauna of undivided Paschim Medinipur, West Bengal, India. *International Journal Of Current Trends In Science and Technology* 7(11): 20393–20400. DOI: [10.15520/ctst.v7i11.149](https://doi.org/10.15520/ctst.v7i11.149)

Philipp D.P., Epifanio J.M., Mardsen J.E. et al. 1995. *Protection of Aquatic Biodiversity*. In: *Proceedings of the World Fisheries Congress. Theme 3*. New Delhi: Oxford and IBH Publ. Co., pp. 282.

Raghubanshi A.S., Rai L.C., Gaur J.P. et al. 2005. Invasive alien species and biodiversity in India. *Current Science* 88(4): 539–540.

Singh A.K. 2021. State of aquatic invasive species in tropical India: An overview. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 24 (2): 13–23. DOI: [10.14321/ae hm.024.02.05](https://doi.org/10.14321/ae hm.024.02.05)

Talwar P.K., Jhingran A.G. 1991. *Inland Fishes of India and Adjacent Countries*. Vols. 1 & 2: 1–1158.

Welcomme R.L. 1988. International introductions of inland aquatic species. In: Food & Agriculture Org, pp. 294.

Welcomme R.L. 1988. Ecology of Exotic Fish Species in the Global Freshwater Ecosystem. *International Journal of Fish Biology* 16(3): 145–156.

Genomic basis of Baikal sponge tissue degradation caused by a free-living *Flavobacterium* with host-glycan-targeting polysaccharide utilization loci

Panova Yu.A.^{1,2}, Belikov S.I.^{1*}, Chernogor L.I.¹

¹Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

²Siberian Federal University, Svobodny Prospect, 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

ABSTRACT. Here we present the complete genome sequence of the *Flavobacterium* sp. strain PLB03 isolated from the primmorphs cell culture of the *Lubomirskia baikalensis* sponge and compare it with pathogenic free-living members of the genus *Flavobacterium*. Strain *Flavobacterium* sp. PLB03 exhibits pronounced lytic activity towards sponge cells and causes death of symbiotic microalgae (the Trebouxiophyceae). The *Flavobacterium* sp. PLB03 genome has 5,925,828 bp and a GC content of 34.3%. An average nucleotide identity (ANI) of 98.9% revealed that strain *Flavobacterium* sp. PLB03 has the highest similarity to *Flavobacterium* CSZ. Comparative genomic analysis of the strain and phylogenetically related *Flavobacterium* indicated that *Flavobacterium* sp. PLB03 has a large genome size characteristic of the environmental genus *Flavobacterium*, and the peptidase (PEP) to glycoside hydrolase (GH) gene ratio is 1.8, suggesting that strain PLB03 exhibits characteristics similar to nonpathogenic strains.

Keywords: *Flavobacterium* sp. PLB03, freshwater sponges, CAZymes, PULs, Type IX secretion system, genomic islands, opportunistic pathogenicity

For citation: Panova Yu.A., Belikov S.I., Chernogor L.I. Genomic basis of Baikal sponge tissue degradation caused by a free-living *Flavobacterium* with host-glycan-targeting polysaccharide utilization loci // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1313-1328. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1313

1. Introduction

Lake Baikal is one of the oldest lakes in geological history, containing nearly 20% of the world's freshwater reserves. The lake is distinguished by its diversity of endemic flora and fauna, and Baikal sponges are most abundant organisms in the coastal zone, with a biomass of over 700 g/m² (Kozhov, 1972; 2013; Pile et al., 1997; Semiturkina et al., 2009).

A disease affecting freshwater sponges was first discovered in 2011, when pink specimens were found in the central basin of Lake Baikal (Bormotov, 2012). The death of the sponge primary symbiont, the green alga *Choricystis* sp., and its replacement by the *Synechococcus* sp. cyanobacterium caused discoloration of the sponges (Denikina et al., 2016; Belikov et al., 2019). In subsequent years, the external signs of the disease changed, and from 2013 to the present, sponges have shown various symptoms of damage, such as discoloration, tissue necrosis, and the formation of brown and dirty-purple bacterial biofilms. Sponge numbers have declined significantly, and diseased sponges are

now found throughout Lake Baikal. Multiple changes in the littoral ecosystem of Lake Baikal accompany disease and death of sponges (Timoshkin et al., 2016; Khanaev et al., 2018).

Previously, we demonstrated that sponge disease is associated with changes and dramatic shifts in the composition of the microbial community of Baikal sponges. We found that the observed imbalance in the microbial communities of diseased sponges is caused by various microorganisms that, acting in concert, intensify their negative impact, leading to the death of Baikal sponges (Belikov et al., 2019).

We conducted an experimental infection of the cell culture of primmorphs with the bacterial suspension of the diseased sponge to identify microorganisms pathogenic to sponges. A significant increase in the relative content of bacteria of the *Oxalobacteraceae* family, up to 25.65%, and the *Flavobacteriaceae* family, up to 62.04%, was detected along with a simultaneous decrease in the number of other microorganisms (Chernogor et al., 2020a; Chernogor et al., 2020b). Based on the genome analysis of the isolated

*Corresponding author. E-mail address: sergeibelikov47@gmail.com (S.I. Belikov)

Received: November 20, 2025;

Accepted after revised: December 09, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Janthinobacterium SLB01 and *Flavobacterium* SLB02 strains, we hypothesized the possible cooperative interaction of these two bacteria in the development of sponge disease (Petrushin et al., 2020; Belikov et al., 2021).

The *Flavobacterium* is known to be ubiquitous. For example, type strains of *Flavobacterium* spp. were isolated from various sources, including freshwater, the Antarctic Sea ice, the rhizosphere, and diseased fish (Yi et al., 2005; Ali et al., 2009; Chen et al., 2012; Ekwe et al., 2017). The number of officially described *Flavobacterium* species is rapidly increasing and includes 448 species as of October 2025 (<https://lpsn.dsmz.de/genus/Flavobacterium>).

For the first time, the strain *Flavobacterium* sp. PLB03 was isolated from cell culture of the primmorphs of diseased sponge *L. baikalensis*. The role of these bacteria and their link with disease development and mortality of sponges remain poorly understood. In this study, we present the assembled and annotated genome of the strain *Flavobacterium* sp. PLB03 and compare with the genomes of fish-pathogenic and non-pathogenic *Flavobacterium*. The genome sequence of the strain *Flavobacterium* sp. PLB03 and its analysis are expected to provide more comprehensive information on disease-associated factors. Identifying these genomic features will help understand the causes of the disease distribution and mortality of Baikal sponges.

2. Materials and Methods

2.1. Genome sequencing, quality control, and assembly

Raw Illumina sequencing reads were evaluated using FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010) to assess base quality, GC content, and adapter contamination. Low-quality bases and adapter sequences were trimmed using Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014). The genome was assembled with SPAdes v3.15.4 (Bankevich et al., 2012; Prjibelski et al., 2020) using default k-mer iterations. Assembly quality and contamination were assessed using FCS-GX (Astashyn et al., 2024) to detect and remove putative foreign contigs. Contigs shorter than 200 bp or flagged as contaminants were discarded, yielding the final assembly used for downstream analyses.

2.2. Genome annotation

The final assembly was annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v6.9 (Tatusova et al., 2016), which integrates *ab initio* gene prediction, HMM-based protein family classification, and curated functional models from RefSeq. Annotation included coding sequences, non-coding RNAs, tRNAs, and rRNA fragments, and pseudogenes.

2.3. Genomes Included in the Analysis

To place *Flavobacterium* sp. PLB03 into a phylogenomic and functional context, we selected 14 publicly available genomes representing both free-living and fish-pathogenic lineages of the genus *Flavobacterium*.

Genomes were retrieved from NCBI GenBank between March and May 2025. The final comparative dataset included the following species: *F. sp.* CSZ, *F. piscisymbiosum* F-30, *F. piscis* CCUG 60099, *F. bizetiae* HJ-32-4, *F. bizetiae* FlaQc-53, *F. bizetiae* CIP 105534, *F. aquidurensis* DSM 18293, *F. johnsoniae* FJOH, *F. pectinovorum* ZE23VCel01, *F. soyae* SCIV07, *F. collinsii* FlaQc-26, *F. lipolyticum* F-126, *F. chilense* DSM 24724, and *F. psychroterrae* CCM 8827, as well as the fish-pathogenic species *F. columnare* 04017018, *F. psychrophilum* JIP02-86, *F. branchiophilum* FL-15, and *F. tractae* ATCC BAA-2541. Detailed assembly statistics and genome annotation features for all strains are provided in Supplementary Table S1.

2.4. Phylogeny and ANI analysis

An exploratory genome-based phylogenetic analysis was conducted using the TYGS platform (Meier-Kolthoff and Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022) to identify the closest taxa and to select appropriate reference genomes for downstream comparative analyses. Because the genome assembly of *Flavobacterium* sp. PLB03 is highly fragmented, and all recovered 16S rRNA gene sequences were incomplete, we used the housekeeping gene *gyrB* for phylogenetic reconstruction. This approach follows previous recommendations for *Flavobacterium* taxonomy, where *gyrB* provides higher phylogenetic resolution and is preferred when 16S rRNA is unavailable or incomplete (Peeters and Willems, 2011).

Whole-genome Average Nucleotide Identity (ANI) was calculated using FastANI (Jain et al., 2018). For this analysis, we included the following genomes representing closely related members of the genus *Flavobacterium*: *F. sp.* CSZ, *F. piscisymbiosum* strain F-30, *F. piscis* CCUG 60099, *F. bizetiae* strain HJ-32-4, *F. sp.* KBS0721, *F. bizetiae* strain FlaQc-53, and *F. bizetiae* strain CIP 105534. These genomes were selected based on TYGS clustering results and on their proximity to *Flavobacterium* sp. PLB03 in preliminary analyses.

2.5. Detection of antimicrobial resistance and virulence genes

Potential antimicrobial resistance (AMR) genes and virulence factor candidates were screened using ABRicate v1.0.1 (Seemann, 2016) against the CARD, NCBI AMR, and VFDB (Chen et al., 2016; Liu et al., 2022) databases using Galaxy platform 2024.

2.6. Identification of secretion systems

Type IX secretion system (T9SS) components were identified with manual inspection of annotated genes and BLASTp search.

2.7. Genomic island prediction

Genomic islands (GIs) were predicted using IslandViewer 4 (Bertelli et al., 2017), which integrates the SIGI-HMM and IslandPath-DIMOB methods. Genes within GIs were annotated using PGAP. Functional cat-

egories including mobile elements, secretion components, CAZymes, TonB-dependent receptors and proteases were recorded.

2.8. Protease annotation and MEROPS comparative analysis

Proteases were annotated by BLASTp searches against the MEROPS (Rawlings et al., 2014; 2018; Rawlings and Bateman, 2021) database (E-value $\leq 1e-10$). Family-level counts were summarized for *Flavobacterium* sp. PLB03 and compared with reference species, particularly *Flavobacterium johnsoniae*. Proteases were classified by catalytic type (serine, metalloprotease, cysteine, and aspartic) and by predicted subcellular localization.

2.9. Identification of CAZymes and polysaccharide utilization loci (PULs) and analysis across *Flavobacterium* species

Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) were annotated using dbCAN3 (Zheng et al., 2023). Only enzymes supported by at least two methods were retained. Polysaccharide utilization loci (PULs) were predicted using the dbCAN CGC pipeline, which detects co-localized CAZymes, SusC/D-like TonB-dependent transporters and transcriptional regulators. PUL substrates were inferred based on CAZy family composition, dbCAN substrate prediction, and literature on known PUL architectures in *Flavobacteria* and other *Bacteroidetes*.

To contextualize *Flavobacterium* sp. PLB03 within the genus, we first compared CAZyme repertoires across 15 *Flavobacterium* genomes, including environmental representatives and fish-pathogenic species. This broad-scale analysis revealed major patterns of CAZyme diversity and showed that *Flavobacterium* sp. PLB03 possesses one of the most expanded CAZyme repertoires, particularly in host-glycan-associated families.

Because PUL architectures differ greatly between distant species and lack locus-level homology across the genus, detailed PUL comparison was restricted to six representative genomes: *Flavobacterium* sp. PLB03, *F. johnsoniae*, *F. piscisymbiosum*, *F. bizetiae*, *F. tractae*, and *F. columnare*.

Comparative analyses of CAZyme profiles, PUL repertoires and MEROPS family distributions were performed across 15 *Flavobacterium* genomes. Data matrices were constructed from family-level counts and analyzed by hierarchical clustering using Ward's method and Euclidean distances in R.

3. Results

3.1. Genome assembly and annotation results

The draft genome assembly comprised 334 contigs with a total length of 6,003,505 base pairs (bp). After removing short contigs (<200 bp) and contaminants, the final assembly contained 93 contigs span-

ning a total of 5,925,828 bp, the N50 value of 542,557 bp, and a GC content of 34.3%. This genome assembly was submitted to GenBank under accession number JBLIYN000000000 and prepared for downstream annotation and analysis with PGAP. Key assembly and annotation metrics are summarized in Table 1.

The genome size is larger than that of fish-pathogenic *Flavobacterium* species and comparable to environmental strains with expanded metabolic repertoires (Supplementary Table S1).

3.2. Phylogeny and ANI analysis

An exploratory analysis using the TYGS service and an analysis of BLAST results in NCBI indicated that the sequences of *Flavobacterium* sp. PLB03 are most closely related to the sequences of unspecified species *Flavobacterium* sp. CSZ, *Flavobacterium* sp. KBS0721 and *F. bizetiae*, *F. piscisymbiosum*, and *F. piscis*. ANI-based genomic comparisons with these genomes revealed that *Flavobacterium* sp. PLB03 forms a tight species-level cluster only with *Flavobacterium* sp. CSZ, with ANI of 98.96%, clearly above the 95% species threshold. All other analyzed *Flavobacterium* genomes showed ANI values of 89.3–90.8% relative to *Flavobacterium* sp. PLB03, demonstrating interspecies-level divergence. The closest species outside the *Flavobacterium* sp. PLB03-CSZ pair was *F. piscisymbiosum* F-30 (90.8% ANI), a known fish-associated taxon, although still far below the species boundary (Table S2 Supplementary). Together, these results indicate that *Flavobacterium* sp. PLB03 and *F. sp. CSZ* form a distinct species-level lineage.

Phylogenetic analysis of *gyrB* placed *Flavobacterium* sp. PLB03 within an environmental lineage of *Flavobacterium*, which was most closely related to *Flavobacterium* sp. CSZ and at a significant distance from *F. psychrophilum*, *F. columnare*, and *F. branchiophilum*, being fish pathogens (Fig. 1).

Table 1. Raw reads and genomic features statistics of *Flavobacterium* sp. PLB03

Property	<i>Flavobacterium</i> sp. PLB03
Raw reads	7,220,904
Assembly length, bp	5,925,828
Number of contigs	93
Longest contig's length, bp	940,434
N50, bp	542,557
N90, bp	198,207
GC content	34.3%
Total number of genes	5,104
Protein-coding sequences	4,975
tRNAs	64
Noncoding RNAs	3
Pseudogenes	32
GenBank accession number	JBLIYN000000000

3.3. Detection of antimicrobial resistance and virulence genes

At standard stringency thresholds (≥ 75 – 90% identity and coverage), no virulence factors were detected by Abricate in the genome of *Flavobacterium* sp. PLB03. When the thresholds were relaxed to 60% identity and 60% coverage, Abricate reported four hits showing partial similarity to virulence-associated proteins described in other bacterial taxa: *katA*, *htpB* (GroEL/Hsp60), *neuC1* (UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase), and one protein annotated in VFDB as a Dot/Icm type IV secretion system effector (*lpg2370*).

All matches displayed low amino acid identity (66–68%) and incomplete alignment coverage (70–90%), indicating distant homology rather than functional equivalence. These genes encode core house-keeping functions widely conserved in bacteria and are not considered bona fide virulence determinants in the genus *Flavobacterium*. Thus, *Flavobacterium* sp. PLB03 does not encode conventional virulence systems described in fish pathogens such as *F. psychrophilum* and *F. columnare*.

3.4. Genomic islands

IslandViewer predicted 23 genomic islands (GIs), ranging from 4.1 to 74.9 kbp and totaling approximately 540 kbp (10–12% of the genome). GI-associated genes included hypothetical proteins, mobile elements, TonB-dependent receptors, and selected Type IX Secretion System components. Genomic islands were dispersed across the genome rather than forming large clusters (Fig. 2). Most GIs were predicted by at least two independent algorithms, indicating high confidence in their boundaries.

The predicted genomic islands were enriched in hypothetical proteins (32%, $n = 129$), along with transposases and integrases (4%), membrane-associated proteins (4%), and regulatory elements such as helix–turn–helix (HTH) transcriptional regulators (4%). Several islands also contained components typical of *Flavobacterium*, including Type IX secretion system-associated genes, TonB-dependent receptors, and SusC/RagA TonB-linked outer membrane proteins ($n = 4$), and IS6-family transposases ($n = 4$).

3.5. Carbohydrate-active enzymes (CAZymes)

The *Flavobacterium* sp. PLB03 genome encodes 392 CAZymes, including 185 glycoside hydrolases, 53 glycosyltransferases, 36 carbohydrate esterases, 14 polysaccharide lyases, 28 carbohydrate-binding modules, and 7 auxiliary activity enzymes. This places *Flavobacterium* sp. PLB03 among the most CAZyme-rich freshwater *Flavobacterium* species studied (Table 2). The CAZyme repertoire not only covers a wide range of plant and algal polysaccharides (xylan, pectin, xyloglucan, beta-glucan, mannan, alginate, and alpha-glucan) but also includes families typically associated with host glycans, such as GH29, GH33, GH92, GH95, GH105,

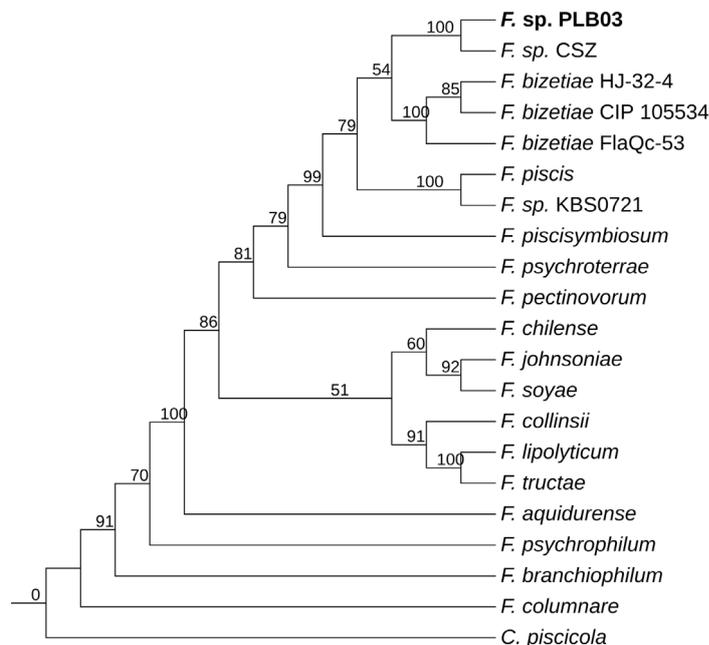


Fig.1. Neighbor-Joining tree based on complete *gyrB* sequences.

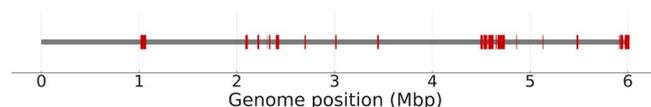


Fig.2. Genomic island distribution across the genome of the *Flavobacterium* sp. PLB03.

GH127, PL12, PL29, and CBM32. The latter are key to degradation of mucins, glycosaminoglycans, and eukaryotic glycoproteins.

3.6. Polysaccharide utilization loci

Using dbCAN3 and the CGC pipeline, we identified 32 polysaccharide utilization loci (PULs) in the *Flavobacterium* sp. PLB03 genome. Comparative analysis with five species (*F. johnsoniae*, *F. bizetiae*, *F. piscisymbiosum*, *F. tractae*, and *F. columnare*) revealed a total of 134 PULs (Supplementary Table S3). *Flavobacterium* sp. PLB03 is among the species with the highest number of PULs, comparable only to *F. piscisymbiosum* and *F. bizetiae*, whereas fish pathogens encode far fewer PULs (1–11).

Structure-based comparison of PUL architectures revealed at least 11 PULs unique to *Flavobacterium* sp. PLB03 across all evaluated genomes. The most notable and unique clusters target host-associated glycans, as shown in Table 3.

None of these architectures were identified in the other five species.

3.7. Protease analysis

MEROPS-based annotation of proteases and protease inhibitors revealed a broad enzymatic diversity across the analyzed *Flavobacterium* genomes. After normalization of MEROPS annotation to unified fam-

Table 2. Comparative distribution of CAZy classes across 15 *Flavobacterium* strains.

Species	CAZy-genes	GH	GT	CE	PL	CBM	AA
<i>Flavobacterium</i> sp. PLB03	392	185	53	36	14	28	7
<i>F. soyae</i> SCIV07	408	183	66	32	10	36	6
<i>F. piscisymbiosum</i> F-30	386	175	57	38	13	24	7
<i>F. pectinovorum</i> ZE23VCel01	392	172	60	33	11	34	3
<i>F. johnsoniae</i> FJOH	382	165	59	31	12	29	4
<i>F. bizetiae</i> HJ-32-4	363	153	58	33	9	25	3
<i>F. aquidurensis</i> DSM 18293	343	149	39	42	14	18	5
<i>F. chilense</i> DSM 24724	348	134	54	34	15	28	4
<i>F. psychroterrae</i> CCM 8827	331	127	46	28	15	32	3
<i>F. tractae</i> ATCC BAA-2541	276	55	57	25	7	7	6
<i>F. lipolyticum</i> F-126	278	55	60	24	7	8	6
<i>F. collinsii</i> FlaQc-26	270	59	52	21	9	7	5
<i>F. branchiophilum</i> FL-15 (пат.)	180	29	51	14	2	7	2
<i>F. columnare</i> 04017018 (пат.)	154	18	44	12	3	1	1
<i>F. psychrophilum</i> JIP02-86 (пат.)	137	10	45	9	0	0	1

Note: GH – glycoside hydrolases; GT – glycosyltransferases; CE – carbohydrate esterases; PL – polysaccharide lyases; CBM – carbohydrate-binding modules; AA – auxiliary activities.

ily codes, all species showed a conserved protease core dominated by the I39, S33, M14, S12, and S9 families (Supplementary Table S3). Among these, the inhibitor family I39 was the most abundant across nearly every genome. Despite this shared core, the species-by-family protease matrix showed marked differences in the degree of family expansion. Some species possessed compact repertoires, while others exhibited substantial enrichment of multiple S- and I-families. The *Flavobacterium* sp. PLB03 encoded high counts in several major protease families (Fig.3).

Further comparison of protease families within Cluster 2 revealed four MEROPS families present exclusively in the *Flavobacterium* sp. PLB03 but absent in all other members of its cluster: M10, S1, T2, and T3. All four families are present in species from Clusters 1 and 3 but absent from the other cluster-2 genomes.

4. Discussion

The *Flavobacterium* sp. PLB03 genome exhibits a combination of traits typical of free-living members of the genus together with modules commonly associated with host interaction. Phylogenetic placement and high

ANI values clearly demonstrate that *Flavobacterium* sp. PLB03 forms a distinct species-level lineage together with *Flavobacterium* sp. CSZ, while remaining distant from well-characterized fish pathogens such as *F. psychrophilum*, *F. columnare*, and *F. branchiophilum*. This positioning supports the view that *Flavobacterium* sp. PLB03 is primarily an environmental taxon rather than a specialized pathogen.

Despite the absence of classical virulence determinants, even with relaxed detection thresholds, the *Flavobacterium* sp. PLB03 genome has several functional features that may contribute to its ability to degrade sponge tissues. The genome is larger than the genomes of fish-pathogenic species and encodes an expanded metabolic repertoire. For instance, 392 CAZyme genes place *Flavobacterium* sp. PLB03 among the richest carbohydrate-degrading freshwater *Flavobacterium* species analyzed previously. Noteworthy is the presence of CAZy families typically linked to the degradation of eukaryotic glycoconjugates, including GH29, GH33, GH92, GH95, GH105, GH127, PL12, PL29, and CBM32. These enzymes enable the breakdown of mucins, glycosaminoglycans, and complex animal glycoproteins—key structural polysaccharides in sponge tissues.

Table 3. Host-glycan and algal polysaccharide-targeting PUL identified in *Flavobacterium* sp. PLB03

PUL type	Key CAZy families	Notes
Mucin-degrading PUL	GH105, GH88, PL12/PL8, CBM32	Canonical mucin-targeting architecture
Glycosaminoglycan (GAG) PUL (×2)	GH154, GH159, GH128, PL12/PL8	Two separate GAG-specific loci
Host glycan / animal glycoprotein PUL	GH29, GH33, GH92, GH130	Large locus enriched in fucosidases, sialidases and α-mannosidases
Arabinogalactan / AGP-type PUL	GH105, GH128, GH154, PL42	Targets arabinogalactan and AGP-like substrates
Alginate-specific PUL	PL6, PL17, CE20	Unique alginate-degrading locus absent from other species

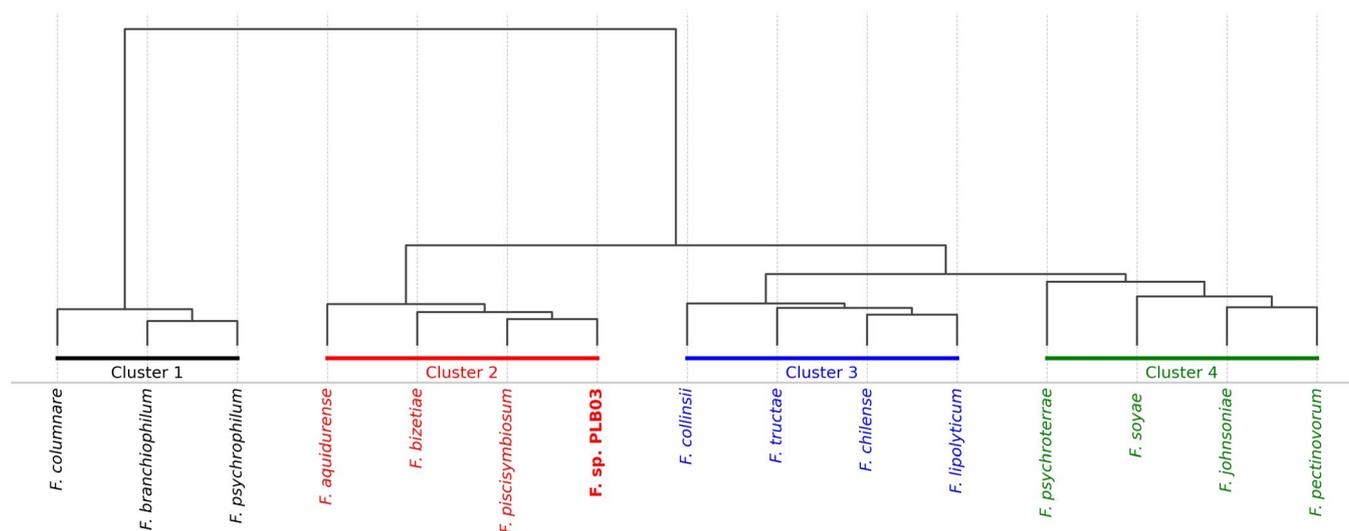


Fig.3. Hierarchical clustering of *Flavobacterium* species based on MEROPS protease family profiles.

This metabolic potential is reflected in the architecture of the 32 identified PULs. Among them, there are at least five large *Flavobacterium* sp. PLB03 specific clusters targeting host-associated glycans: a canonical mucin-degrading PUL, two independent glycosaminoglycan (GAG) loci, a large host-glycan/animal glycoprotein PUL enriched in fucosidases, sialidases and α -mannosidases, an AGP-type arabinogalactan PUL, and a unique alginate-degrading locus absent from all comparative genomes. Such a diversified PUL repertoire suggests a broad substrate range and is characteristic of “opportunistic” *Flavobacteria* capable of exploiting both environmental polysaccharides and those of eukaryotic origin.

The presence of 23 genomic islands, comprising 10–12% of the genome, provides additional evidence for adaptive versatility. These islands are enriched in hypothetical proteins, mobile elements, TonB-dependent receptors, components of the Type IX secretion system, and SusC/RagA-like transporters, indicating active genome modularity and potential horizontal gene acquisition. The dispersed distribution of GI-associated TonB–SusC modules aligns with the typical organization of PULs in *Flavobacterium*, further supporting the idea of substrate-driven genome plasticity.

Protease analysis revealed a broadened MEROPS repertoire in *Flavobacterium* sp. PLB03, including four families (M10, S1, T2, and T3) absent from other members of its cluster but present in more metabolically flexible species. These proteases may contribute to the degradation of proteinaceous components of sponge tissues. In *Flavobacterium*, proteases frequently act synergistically with CAZymes during the breakdown of complex organic matrices, suggesting a complementary role in substrate acquisition.

Taken together, the genomic features of *Flavobacterium* sp. PLB03 indicate that it is not a classical pathogen but rather an environmentally adapted bacterium with an expanded capacity for the degradation of complex organic substrates, including those of eukaryotic origin. The combination of a rich CAZyme and PUL repertoire, unique host glycan-targeting loci, diverse proteases, and modular genomic islands pro-

vides a mechanistic basis for the observed ability of *Flavobacterium* sp. PLB03 to degrade sponge tissues and green microalgae. These findings support the speculation that *Flavobacterium* sp. PLB03 represents an ecologically versatile organism capable of opportunistic interactions with host organisms.

5. Conclusions

The analyzed strain *Flavobacterium* sp. PLB03 is a new species belonging to a group of free-living (environmental) *Flavobacterium* with a large genome. ANI calculations with values of 89.4–90.8% that are significantly below the thresholds used to distinguish members of closely related species confirm that the *Flavobacterium* sp. PLB03 is a unique species. The strain *Flavobacterium* sp. PLB03 lacks typical virulence factors but possesses extensive metabolic capabilities for invasion and destruction of host tissue. *Flavobacterium* sp. PLB03 is a likely symbiont of sponges, as it has a unique set of specific enzymes that degrade host glucans, which is unusual for the genus *Flavobacterium*. An analysis of its ability to degrade polysaccharides revealed that the strain *Flavobacterium* sp. PLB03 has significant potential in this field. However, further research is needed to identify the specific polysaccharides that this strain degrades, which will contribute to our understanding of the ecological role and biotechnological applications of the *Flavobacterium* strains.

Acknowledgements

This study is funded by the State Project of Limnological Institute Siberian Branch of Russian Academy of Sciences No. 0279-2021-0011. This material is based upon work supported by the Russian Science Foundation Project No. 19-14-00088 and the Russian Foundation for Basic Research No. 16-04-00065; 16-54-150007; 18-04-00224.

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ali Z., Cousin S., Fruhling A. et al. 2009. *Flavobacterium rivuli* sp. nov., *Flavobacterium sub-saxonicum* sp. nov., *Flavobacterium swingsii* sp. nov. and *Flavobacterium reichenbachii* sp. nov., isolated from hard water rivulet. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 2610–2617.
- Andrews S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics.
- Astashyn A., Tvedte E.S., Sweeney D. et al. 2024. Rapid and sensitive detection of genome contamination at scale with FCS-GX. Genome Biology 25: 1–25. DOI: [10.1186/S13059-024-03198-7](https://doi.org/10.1186/S13059-024-03198-7)/FIGURES/4
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology 19(5):455–477. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Belikov S., Belkova N., Butina T. et al. 2019. Diversity and shifts of the bacterial community associated with Baikal sponge mass mortalities. PLOS One 14: 3. DOI: [10.1371/journal.pone.0213926](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213926)
- Belikov S.I., Petrushin I.S., Chernogor L.I. 2021. Genome analysis of the Janthinobacterium sp. strain SLB01 from the Diseased Sponge of the *Lubomirskia baikalensis*. Current Issues in Molecular Biology 43: 2220–2237. DOI: [10.3390/cimb43030156](https://doi.org/10.3390/cimb43030156)
- Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P. et al. 2017. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. Nucleic Acids Research 45: W30–W35. DOI: [10.1093/nar/gkx343](https://doi.org/10.1093/nar/gkx343)
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data. Bioinformatics 30: 2114–2120.
- Bormotov A.E. 2012. What has happened to Lake Baikal sponges? Science first hand 2: 32. URL: <https://scfh.ru/en/papers/what-has-happened-to-lake-baikal-sponges/>
- Chen L., Zheng D., Liu B. et al. 2016. VFDB 2016: Hierarchical and refined dataset for big data analysis - 10 years on. Nucleic Acids Research 44: D694–D697. DOI: [10.1093/NAR/GKV1239](https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1239)
- Chen W.-M., Huang W.-C., Young C.-C. et al. 2012. *Flavobacterium tilapiae* sp. nov., isolated from a freshwater pond, and emended descriptions of *Flavobacterium defluvii* and *Flavobacterium johnsoniae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 827–834. DOI: [10.1099/ijs.0.041178-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.041178-0)
- Chernogor L., Klimenko E., Khanaev I. et al. 2020. Microbiome analysis of healthy and diseased sponges *Lubomirskia baikalensis* by using cell cultures of primmorphs. PeerJ 8: e9080. DOI: [10.7717/peerj.9080](https://doi.org/10.7717/peerj.9080)
- Chernogor L.I., Petrushin I.S., Khanaev I.V. et al. 2020. Study of changes in microbiomes of sponges *Lubomirskia baikalensis* using the cell culture of primmorphs. Limnology and Freshwater Biology 4: 647–648. DOI: [10.31951/2658-3518-2020-A-4-647](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-4-647)
- Denikina N.N., Dzyuba E.V., Belkova N.L. et al. 2016. The first case of disease of the sponge *Lubomirskia baikalensis*: investigation of its microbiome. Translated in Biology Bulletin 43: 263–270. DOI: [10.1134/S106235901603002X](https://doi.org/10.1134/S106235901603002X)
- Ekwe A.P., Ahn J.-H., Kim S.B. 2017. *Flavobacterium keumense* sp. nov., isolated from freshwater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67: 2166–2170. DOI: [10.1099/ijsem.0.001920](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001920)
- Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses. 2024. Nucleic Acids Research. Oxford Academic, n.d. URL: <https://academic.oup.com/nar/article/52/W1/W83/7676834?login=false> (accessed: 11.16.25).
- Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M. et al. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nature communications 9(1): 5114. DOI: [10.1038/S41467-018-07641-9](https://doi.org/10.1038/S41467-018-07641-9)
- Khanaev I.V., Kravtsova L.S., Maikova O.O. et al. 2018. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: sponge disease and the problem of conservation of diversity. Journal of Great Lakes Research 44: 77–85. DOI: [10.1016/j.jglr.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.10.004)
- Kozhov M. 2013. Lake Baikal and its life. Springer Science business Media. DOI: [10.1007/978-94-015-7388-7](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7388-7)
- Kozhov M.M. 1972. Essays on Baikal studies. Irkutsk: East Siberian Publisher. (in Russian)
- Liu B., Zheng D., Zhou S. et al. 2022. VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Research 50: D912–D917. DOI: [10.1093/nar/gkab1107](https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107)
- Meier-Kolthoff J.P., Carbasse J.S., Peinado-Olarte R.L. et al. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. Nucleic Acids Research 50: D801–D807. DOI: [10.1093/NAR/GKAB902](https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB902)
- Meier-Kolthoff J.P., Göker M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. Nature Communications 10: 1–10. DOI: [10.1038/s41467-019-10210-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3)
- Peeters K., Willems A. 2011. The gyrB gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of Flavobacterium strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. FEMS Microbiology Letters 321: 130–140. DOI: [10.1111/J.1574-6968.2011.02326.X](https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2011.02326.X)
- Petrushin I., Belikov S., Chernogor L. 2020. Cooperative interaction of *Janthinobacterium* sp. SLB01 and *Flavobacterium* sp. SLB02 in the diseased sponge *Lubomirskia baikalensis*. International journal of molecular sciences 21: 1–13. DOI: [10.3390/ijms21218128](https://doi.org/10.3390/ijms21218128)
- Pile A.J., Patterson M.R., Savarese M. et al. 1997. Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2. Sponge abundance, diet, feeding efficiency, and carbon flux. Limnology and Oceanography 42: 178–184. DOI: [10.4319/lo.1997.42.1.0178](https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.1.0178)
- Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. Current Protocols in Bioinformatics 70: e102. DOI: [10.1002/CPBI.102;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER](https://doi.org/10.1002/CPBI.102;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER)
- Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D. et al. 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Research 46: D624–D632. DOI: [10.1093/nar/gkx1134](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134)
- Rawlings N.D., Bateman A. 2021. How to use the MEROPS database and website to help understand peptidase specificity. Protein science: a publication of the Protein Society 30: 83–92. DOI: [10.1002/pro.3948](https://doi.org/10.1002/pro.3948)
- Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J. et al. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research 42: D503–509. DOI: [10.1093/nar/gkt953](https://doi.org/10.1093/nar/gkt953)
- Seemann T. 2016. ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. URL: <https://github.com/tseemann/abricate>
- Semiturkina N.A., Efremova S.M., Timoshkin O.A. 2009. State-of-the art of biodiversity and ecology of spongi fauna of Lake Baikal with special attention to the diversity, peculiarities of ecology and vertical distribution of Porifera on Berezovy ecology test site. In: Timoshkin O.A. (Ed.), Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area. Novosibirsk, pp. 891–901. (in Russian)
- Tatusova T., Dicuccio M., Badretdin A. et al. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Research 44: 6614–6624. DOI: [10.1093/NAR/GKW569](https://doi.org/10.1093/NAR/GKW569)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *Journal of Great Lakes Research* 42: 487–497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Yi H., Oh H.-M., Lee J.-H. et al. 2005. *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 637–641. DOI: [10.1099/ijs.0.63423-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63423-0)

Zheng J., Ge Q., Yan Y. et al. 2023. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research* 51: W115–W121. DOI: [10.1093/nar/gkad328](https://doi.org/10.1093/nar/gkad328)

Геномные основы деградации тканей байкальских губок за счет свободно живущих флавобактерий с локусами утилизации полисахаридов, ориентированными на гликаны хозяина

Панова Ю.А.^{1,2}, Беликов С.И.^{1*}, Черногор Л.И.¹

¹ Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

² Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041, Россия

АННОТАЦИЯ. В данной работе мы представляем полную последовательность генома штамма *Flavobacterium* sp. PLB03, выделенного из культуры клеток примморф губки *Lubomirskia baikalensis*, и сравниваем его с патогенными и свободно живущими представителями рода *Flavobacterium*. Штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 проявляет выраженную литическую активность в отношении клеток губки, а также вызывает гибель симбиотических микроводорослей (*Trebouxiophyceae*). Геном *Flavobacterium* sp. PLB03 имеет длину 5 925 828 п.н. и содержание ГЦ 34,3%. Средняя идентичность нуклеотидов (ANI) 98,9% показала, что штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 имеет наибольшее сходство с *Flavobacterium* CSZ. Сравнительный геномный анализ штамма и филогенетически родственного рода *Flavobacterium* показал, что изолированный штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 имеет большой размер генома, характерный для экологического рода *Flavobacterium*, а соотношение генов пептидаз и гликозидгидролаз составляет 1,8, что позволяет предположить, что штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 обладает характеристиками, сходными с непатогенными штаммами.

Ключевые слова: *Flavobacterium* sp. PLB03, пресноводные губки, CAZymes, локусы утилизации полисахаридов, система секреции IX типа, геномные острова, условная патогенность

Для цитирования: Панова Ю.А., Беликов С.И., Черногор Л.И. Геномные основы деградации тканей байкальских губок за счет свободно живущих флавобактерий с локусами утилизации полисахаридов, ориентированными на гликаны хозяина // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1313-1328. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1313

1. Введение

Озеро Байкал — одно из древнейших озёр в геологической истории, содержащее почти 20% мировых запасов пресной воды. Озеро отличается разнообразием эндемичной флоры и фауны, а байкальские губки являются наиболее многочисленными организмами в прибрежной зоне с биомассой более 700 г/м² (Кожов, 1972; 2013; Pile et al., 1997; Semiturkina et al., 2009).

Заболевание, поражающее пресноводные губки, было впервые обнаружено в 2011 году, когда в центральной котловине озера Байкал были обнаружены розовые особи (Bormotov, 2012). Изменение цвета губок было вызвано гибелью их основного симбионта, зелёной водоросли *Choricystis* sp. и дальнейшей заменой на цианобактерии *Synechococcus* sp. (Denikina et al., 2016; Belikov et al., 2019). В после-

дующие годы внешние признаки заболевания губок быстро менялись, затем с 2013 года и по настоящее время наблюдались различные симптомы поражения тканей губок, такие как изменение цвета, некроз тканей и образование коричневых и грязно-фиолетовых бактериальных биопленок. Численность губок значительно сократилась, и в настоящее время больные губки встречаются по всему озеру Байкал. Кроме того, отмечено, что заболевание и гибель байкальских губок сопровождается многочисленными изменениями в экосистеме литорали озера Байкал (Timoshkin et al., 2016; Khanaev et al., 2018).

Ранее нами было показано, что заболевание губок связано с изменениями и резкими сдвигами в составе микробных сообществ байкальских губок. Нами установлено, что наблюдаемый дисбаланс в микробных сообществах больных губок обусловлен

*Автор для переписки. Адрес e-mail: sergeibelikov47@gmail.com (С.И. Беликов)

Поступила: 20 ноября 2025;

Принята после доработки: 09 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



различными микроорганизмами, которые, действуя согласованно, усиливают свое негативное воздействие, приводящее к гибели байкальских губок (Belikov et al., 2019).

Для выявления патогенных для губок микроорганизмов нами было проведено экспериментальное заражение клеточной культуры примморф бактериальной суспензией от больных губок. Выявлено значительное увеличение относительного содержания бактерий семейства *Oxalobacteraceae* – до 25,65% и семейства *Flavobacteriaceae* – до 62,04% при одновременном снижении численности других микроорганизмов (Chernogor et al., 2020a; Chernogor et al., 2020b). На основании анализа геномов выделенных штаммов *Janthinobacterium* SLB01 и *Flavobacterium* SLB02 была выдвинута гипотеза о возможном совместном взаимодействии этих двух бактерий в развитии болезни губок (Petrushin et al., 2020; Belikov et al., 2021).

Известно, что бактерии представители рода *Flavobacterium* широко распространены. Например, типовые штаммы *Flavobacterium* spp. были выделены из различных источников, включая пресную воду, морской лед Антарктики, ризосферу и больных рыб (Yi et al., 2005, Ali et al., 2009, Chen et al., 2012, Ekwe et al., 2017). Число официально описанных видов *Flavobacterium* быстро растет и по состоянию на октябрь 2025 года включает 448 видов (<https://lpsn.dsmz.de/genus/Flavobacterium>).

Штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 был впервые выделен из клеточных культур примморф больной губки *L. baikalensis*. Роль этих бактерий и их связь с развитием заболеваний и гибелью губок остаются недостаточно изученными. В данном исследовании мы представляем собранный и аннотированный геном *Flavobacterium* sp. PLB03, и сравниваем его с геномами патогенных для рыб и непатогенных *Flavobacterium*. Ожидается, что последовательность генома *Flavobacterium* sp. PLB03 и проведенный анализ предоставят более полную информацию о факторах, связанных с заболеваниями. Выявление этих геномных особенностей поможет понять причины столь широкого распространения заболеваний и гибели байкальских губок.

2. Материалы и методы

2.1. Секвенирование генома, контроль качества и сборка

Необработанные прочтения секвенирования Illumina оценивали с помощью FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010) для оценки качества оснований, содержания GC и загрязнения адаптерами. Низкокачественные основания и последовательности адаптеров обрезали с помощью Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014). Геном собирали с помощью SPAdes v3.15.4 (Bankevich et al., 2012; Prjibelski et al., 2020) с использованием стандартных итераций k-меров. Качество сборки и загрязнение оценивали с помощью FCS-GX (Astashyn et al., 2024) для обнаружения и удаления предполагаемых чужеродных контигов. Контиги короче 200 п.н. или поме-

ченные, как загрязняющие отбрасывали, что давало окончательную сборку, используемую для последующих анализов.

2.2. Аннотация генома

Финальная сборка была аннотирована с помощью инструмента NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) версии 6.9 (Tatusova et al., 2016), который объединяет *ab initio* предсказание генов, классификацию семейств белков на основе HMM и подобранные функциональные модели RefSeq. Аннотация включала кодирующие последовательности, некодирующие РНК, тРНК, фрагменты рРНК и псевдогены.

2.3. Геномы, включенные в анализ

Для изучения филогеномного и функционального контекста *Flavobacterium* sp. PLB03 мы отобрали 14 общедоступных геномов, представляющих, как свободноживущие, так и патогенные для рыб линии рода *Flavobacterium*. Геномы были получены из NCBI GenBank в период с марта по май 2025 года. Итоговый сравнительный набор данных включал следующие виды: *F. sp. CSZ*, *F. piscisymbiosum* F-30, *F. piscis* CCUG 60099, *F. bizetiae* HJ-32-4, *F. bizetiae* FlaQc-53, *F. bizetiae* CIP 105534, *F. aquidurensis* DSM 18293, *F. johnsoniae* FJOH, *F. pectinovorum* ZE23VCel01, *F. soyae* SCIV07, *F. collinsii* FlaQc-26, *F. lipolyticum* F-126, *F. chilense* DSM 24724, *F. psychroterrae* CCM 8827, as well as the fish-pathogenic species *F. columnare* 04017018, *F. psychrophilum* JIP02-86, *F. branchiophilum* FL-15, and *F. tractae* ATCC BAA-2541. Подробная статистика сборки и характеристики аннотации генома для всех штаммов приведены в Таблице S1 Приложения.

2.4. Филогения и анализ средней идентичности нуклеотидов

Был проведен филогенетический анализ генома с использованием платформы TYGS (Meier-Kolthoff and Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022) для выявления наиболее близких таксонов и выбора подходящих референтных геномов, для последующего сравнительного анализа. Поскольку геном *Flavobacterium* sp. PLB03 сильно фрагментирован, а все восстановленные последовательности генов 16S рРНК были неполными, для филогенетической реконструкции мы использовали ген домашнего хозяйства *gusB*. Этот подход соответствует предыдущим рекомендациям по таксономии флавобактерий, где *gusB* обеспечивает более высокое филогенетическое разрешение и предпочтителен в случаях, когда 16S рРНК недоступна или неполна (Peeters and Willems, 2011). Средняя идентичность нуклеотидов (ANI) по всему геному была рассчитана с помощью FastANI (Jain et al., 2018). Для этого анализа мы включили следующие геномы, представляющие близкородственных представителей рода *Flavobacterium*: *F. sp. CSZ*, *F. piscisymbiosum*

штамм F-30, *F. piscis* CCUG 60099, *F. bizetiae* штамм HJ-32-4, *F. sp.* KBS0721, *F. bizetiae* штамм FlaQc-53 и *F. bizetiae* штамм CIP 105534. Эти геномы были отобраны на основе результатов кластеризации TYGS и их близости к *Flavobacterium sp.* PLB03 в предварительных анализах.

2.5. Выявление генов устойчивости к противомикробным препаратам и генов вирулентности

Потенциальные гены устойчивости к противомикробным препаратам и факторы вирулентности были проверены с помощью ABRicate v1.0.1 (Seemann, 2016) по базам данных CARD, NCBI AMR и VFDB (Chen et al., 2016; Liu et al., 2022) с использованием платформы Galaxy 2024.

2.6. Идентификация систем секреции

Компоненты системы секреции IX типа (T9SS) были идентифицированы с помощью ручного просмотра аннотированных генов и поиска BLASTp.

2.7. Прогнозирование геномных островов

Геномные острова (ГО) были предсказаны с помощью IslandViewer 4 (Bertelli et al., 2017), который объединяет методы SIGI-HMM и IslandPath-DIMOB. Гены в пределах ГО были аннотированы с помощью PGAP. Были зарегистрированы функциональные категории, включая мобильные элементы, компоненты секреции, углевод-активные ферменты (CAZymes), ТопВ-зависимые рецепторы и протеазы.

2.8. Аннотация протеаз и сравнительный анализ по базе MEROPS

Протеазы были аннотированы с помощью поиска BLASTp в базе данных MEROPS (Rawlings et al., 2014; 2018; Rawlings and Bateman, 2021) (E -value $\leq 1e-10$). Количество протеаз на уровне семейств было суммировано для штамма *Flavobacterium sp.* PLB03 и сравнено с референтными видами, в частности, *Flavobacterium johnsoniae*. Протеазы были классифицированы по каталитическому типу (сериновые, металлопротеазы, цистеиновые, аспарагиновые) и по предполагаемой субклеточной локализации.

2.9. Идентификация CAZymes и локусов утилизации полисахаридов (ПУЛ) и анализ по видам *Flavobacterium*

Углевод-активные ферменты (CAZymes) были аннотированы с помощью dbCAN3 (Zheng et al., 2023). Были отобраны только ферменты, подтвержденные как минимум двумя методами. Локусы утилизации полисахаридов (ПУЛ) были предска-

заны с помощью конвейера dbCAN CGC, который обнаруживает со-локализованные CAZy-рецепторы, SusC/D-подобные ТопВ-зависимые транспортеры и регуляторы транскрипции. Субстраты ПУЛ были определены на основе состава семейства CAZymes, прогнозирования субстратов dbCAN и данных литературы об известной архитектуре ПУЛ у *Flavobacteria* и других *Bacteroidetes*.

Чтобы определить контекст *Flavobacterium sp.* PLB03 в пределах рода, мы сравнили репертуары CAZymes в 15 геномах флавобактерий, включая представителей окружающей среды и виды, патогенные для рыб. Этот широкомасштабный анализ выявил основные закономерности разнообразия CAZymes и показал, что *Flavobacterium sp.* PLB03 обладает одним из самых расширенных репертуаров CAZymes, особенно в семействах, ассоциированных с гликанами хозяина. Поскольку архитектура ПУЛ значительно различается у разных видов и отсутствует гомология на уровне локусов в пределах рода, детальное сравнение ПУЛ было ограничено шестью репрезентативными геномами: *Flavobacterium sp.* PLB03, *F. johnsoniae*, *F. piscisymbiosum*, *F. bizetiae*, *F. tractae* и *F. columnare*.

Сравнительный анализ профилей CAZymes, репертуаров ПУЛ и распределений семейств базы MEROPS был проведен по 15 геномам флавобактерий. Матрицы данных были построены на основе подсчетов на уровне семейств и проанализированы методом иерархической кластеризации с использованием метода Уорда и евклидовых расстояний в R.

3. Результаты

3.1. Результаты сборки и аннотации генома

Черновик сборки генома включал 334 контига общей длиной 6 003 505 пар оснований (п.н.). После удаления коротких контигов (<200 п.н.) и контаминантов, окончательная сборка содержала 93 контига общей длиной 5 925 828 п.н., значение N50 составляло 542 557 п.н., а содержание GC – 34,3%. Эта сборка генома была представлена в GenBank под номером доступа JBLIYN000000000 и подготовлена для последующей аннотации и анализа с помощью PGAP. Основные показатели сборки и аннотации представлены в Таблице 1.

Размер генома больше, чем у патогенных для рыб видов *Flavobacterium*, и сопоставим с природными штаммами с расширенным метаболическим репертуаром (Таблице S1 Приложения).

3.2. Филогения и анализ средней идентичности нуклеотидов

Анализ исследования, с применением сервиса TYGS и анализ результатов BLAST в NCBI показали, что последовательности *Flavobacterium sp.* PLB03 наиболее тесно связаны с последовательностями неустановленного вида *Flavobacterium sp.* CSZ, и *Flavobacterium sp.* KBS0721 и *F. bizetiae*, *F.*

piscisymbiosum и *F. piscis*. Геномное сравнение этих штаммов на основе средней идентичности нуклеотидов показало, что *Flavobacterium* sp. PLB03 образует тесный кластер на видовом уровне только с *Flavobacterium* sp. CSZ с ANI 98,96%, что значительно превышает 95% порог видовой принадлежности. Все остальные проанализированные геномы *Flavobacterium* показали значения средней идентичности нуклеотидов 89,3–90,8% относительно *Flavobacterium* sp. PLB03, что указывает на межвидовую дивергенцию. Ближайшим видом вне пары *Flavobacterium* sp. PLB03 - CSZ был *F. piscisymbiosum* F-30 (90,8% ANI), известный таксон, связанный с рыбами, хотя и значительно ниже видовой границы (таблица S2 Приложения). В совокупности эти результаты показывают, что *Flavobacterium* sp. PLB03 и *F. sp. CSZ* образуют отдельную видовую линию.

Филогенетический анализ *gyrB* поместил *Flavobacterium* sp. PLB03 в экологическую линию флавобактерий, наиболее близкую к *Flavobacterium* sp. CSZ и находящуюся на значительном расстоянии от *F. psychrophilum*, *F. columnare* и *F. branchiophilum*, которые являются патогенами рыб (Рис. 1).

3.3. Выявление генов устойчивости к противомикробным препаратам и генов вирулентности

При стандартных пороговых значениях строгости (идентичность и покрытие ≥ 75 –90%), Abricate не обнаружил факторов вирулентности в геноме *Flavobacterium* sp. PLB03. При снижении пороговых значений до 60% идентичности и 60% покрытия, Abricate сообщил о четырёх совпадениях, демонстрирующих частичное сходство с белками, ассоциированными с вирулентностью, описанными в других бактериальных таксонах: *katA*, *htpB* (GroEL/Hsp60), *neuC1* (UDP-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза) и одним белком, аннотированным в VFDB как эффектор системы секреции Dot/Icm типа IV (*lpg2370*).

Все совпадения показали низкую аминокислотную идентичность (66–68%) и неполное покрытие выравнивания (70–90%), что указывает на отдалённую гомологию, а не на функциональную эквивалентность. Эти гены кодируют основные функции «домашнего хозяйства», широко распространённые у бактерий, и не считаются полноценными детерминантами вирулентности рода *Flavobacterium*. Таким образом, штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 не кодирует традиционные системы вирулентности, описанные у патогенных для рыб штаммов, таких как *F. psychrophilum* и *F. columnare*.

3.4. Геномные острова

IslandViewer предсказал 23 геномных острова размером от 4,1 до 74,9 т.п.н. и общим размером около 540 т.п.н. (10–12% генома). Гены, ассоциированные с геномными островами, включали гипотетические белки, мобильные элементы, рецеп-

торы, зависимые от TonB, и отдельные компоненты системы секреции IX типа. Геномные острова были рассредоточены по всему геному и не образовывали крупные кластеры (Рис. 2). Большинство геномных островов были предсказаны как минимум двумя независимыми алгоритмами, что свидетельствует о высокой достоверности их границ.

Таблица 1. Статистика необработанных прочтений и геномных признаков *Flavobacterium* sp. PLB03

Свойство	<i>Flavobacterium</i> sp. PLB03
Необработанные прочтения	7 220 904
Длина сборки, п.н.	5 925 828
Количество контигов	93
Длина самого длинного контига, п.н.	940 434
N50, п.н.	542 557
N90, п.н.	198 207
Содержание GC	34,3%
Общее количество генов	5 104
Белок-кодирующие последовательности	4 975
tРНК	64
Некодирующие РНК	3
Псевдогены	32
Номер доступа в GenBank	JBLIYN000000000

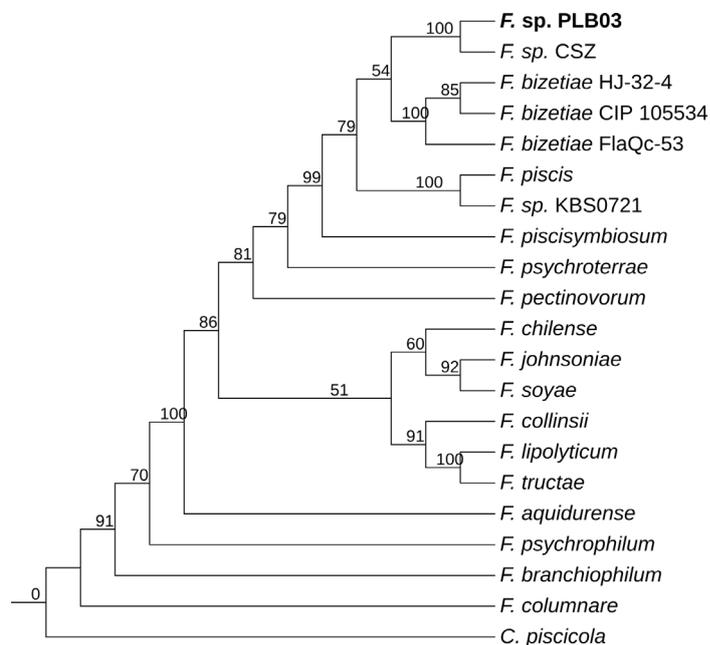


Рис.1. Дерево объединения соседей, основанное на полных последовательностях *gyrB*.

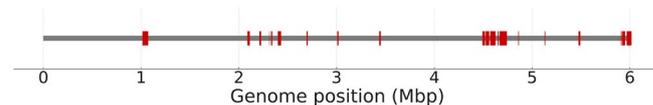


Рис.2. Распределение геномных островов в геноме *Flavobacterium* sp. PLB03.

Предсказанные геномные острова были обогащены гипотетическими белками (32%, $n = 129$), а также транспозазами и интегразами (4%), мембранно-ассоциированными белками (4%) и регуляторными элементами, такими, как транскрипционные регуляторы типа «спираль-поворот-спираль» (4%). Некоторые острова содержали компоненты, типичные для флавобактерий, включая гены, ассоциированные с системой секреции типа IX, рецепторы, зависимые от TonB, и белки наружной мембраны, связанные с SusC/RagA TonB ($n = 4$), а также транспозазы семейства IS6 ($n = 4$).

3.5. Углевод-активные ферменты (CAZymes)

Геном *Flavobacterium* sp. PLB03 кодирует 392 CAZymes, включая 185 гликозид гидролаз, 53 гликозил трансферазы, 36 углеводов эстераз, 14 полисахарид лиаз, 28 углеводов связывающих модулей и 7 ферментов вспомогательной активности. Это делает *Flavobacterium* sp. PLB03 одним из наиболее богатых углевод-активными ферментами микроорганизмов среди изученных пресноводных видов флавобактерий (Таблица 2). Репертуар CAZymes охватывает широкий спектр полисахаридов растений и водорослей (ксилан, пектин, ксиланоглюкан, бета-глюкан, маннан, альгинат, альфа-глюкан), а также семейства, обычно ассоциированные с гликанами хозяина, такие как GH29, GH33, GH92, GH95, GH105, GH127, PL12, PL29 и CBM32. Последние играют ключевую роль в деградации муцинов, гликозаминогликанов и гликопротеинов.

3.6. Локусы утилизации полисахаридов

С помощью dbCAN3 и конвейера CGC в геноме *Flavobacterium* sp. PLB03 было идентифицировано 32 локуса утилизации полисахаридов

(ПУЛ). Сравнительный анализ с пятью видами (*F. johnsoniae*, *F. bizetiae*, *F. piscisymbiosum*, *F. tractae*, *F. columnare*) выявил в общей сложности 134 ПУЛ (см. Дополнительную таблицу S3). *Flavobacterium* sp. PLB03 входит в число видов с наибольшим количеством ПУЛ, сопоставимых только с *F. piscisymbiosum* и *F. bizetiae*, тогда, как патогенные для рыб штаммы кодируют гораздо меньшее количество ПУЛ (от 1 до 11).

Сравнение архитектур ПУЛ на основе структур выявило по меньшей мере 11 ПУЛ, уникальных для штамма *Flavobacterium* sp. PLB03, среди всех исследованных геномов. Наиболее заметные уникальные кластеры нацелены на гликаны, ассоциированные с хозяином (Таблица 3).

Ни одна из этих структур не была выявлена у остальных пяти видов флавобактерий.

3.7. Анализ протеаз

Аннотация протеаз и ингибиторов протеаз с помощью базы MEROPS выявила широкое ферментативное разнообразие в проанализированных геномах флавобактерий. После нормализации аннотации MEROPS по унифицированным кодам семейств, все виды имели консервативное ядро протеаз, в котором доминировали семейства I39, S33, M14, S12 и S9 (Дополнительная таблица S4). Среди них семейство ингибиторов I39 было наиболее распространенным практически во всех геномах. Несмотря на общее ядро, матрица протеаз по видам и семействам показала существенные различия в степени расширения семейств. Некоторые виды обладали компактными репертуарами, в то время как другие демонстрировали значительное обогащение несколькими S- и I-семействами. Геном штамма *Flavobacterium* sp. PLB03 кодировал большое количество генов нескольких основных семейств протеаз (Рис. 3).

Таблица 2. Сравнительное распределение классов CAZy среди 15 штаммов

Виды	CAZy-гены	GH	GT	CE	PL	CBM	AA
<i>Flavobacterium</i> sp. PLB03	392	185	53	36	14	28	7
<i>F. soyae</i> SCIV07	408	183	66	32	10	36	6
<i>F. piscisymbiosum</i> F-30	386	175	57	38	13	24	7
<i>F. pectinovorum</i> ZE23VCel01	392	172	60	33	11	34	3
<i>F. johnsoniae</i> FJOH	382	165	59	31	12	29	4
<i>F. bizetiae</i> HJ-32-4	363	153	58	33	9	25	3
<i>F. aquidurensense</i> DSM 18293	343	149	39	42	14	18	5
<i>F. chilense</i> DSM 24724	348	134	54	34	15	28	4
<i>F. psychroterrae</i> CCM 8827	331	127	46	28	15	32	3
<i>F. tractae</i> ATCC BAA-2541	276	55	57	25	7	7	6
<i>F. lipolyticum</i> F-126	278	55	60	24	7	8	6
<i>F. collinsii</i> FlaQc-26	270	59	52	21	9	7	5
<i>F. branchiophilum</i> FL-15 (пат.)	180	29	51	14	2	7	2
<i>F. columnare</i> 04017018 (пат.)	154	18	44	12	3	1	1
<i>F. psychrophilum</i> JIP02-86 (пат.)	137	10	45	9	0	0	1

Примечание: GH – гликозид гидролазы; GT – гликозил трансферазы; CE – углеводов эстеразы; PL – полисахарид лиазы; CBM – углеводов связывающие модули; AA – вспомогательные активности.

Таблица 3. Гликаны хозяина и водорослевые полисахариды, нацеленные на локусы утилизации полисахаридов, выявленные в *Flavobacterium* sp. PLB03

Тип ЛУП	Ключевые семейства CAZymes	Примечания
Муцин-деградирующие ЛУП	GH105, GH88, PL12/PL8, CBM32	Каноническая архитектура, нацеленная на муцин
Гликозаминогликан (GAG) ЛУП	GH154, GH159, GH128, PL12/PL8	Два отдельных GAG-специфичных локуса
Гликан хозяина/гликопротеин животного происхождения ЛУП	GH29, GH33, GH92, GH130	Большой локус, обогащенный фукозидазами, сиалидазами и α -маннозидазами
Арабиногалактан/AGP-тип	GH105, GH128, GH154, PL42	Нацелен на арабиногалактан и AGP-подобные субстраты
Альгинат-специфичные ЛУП	PL6, PL17, CE20	Уникальный Локус, разрушающий альгинат, отсутствует у других видов

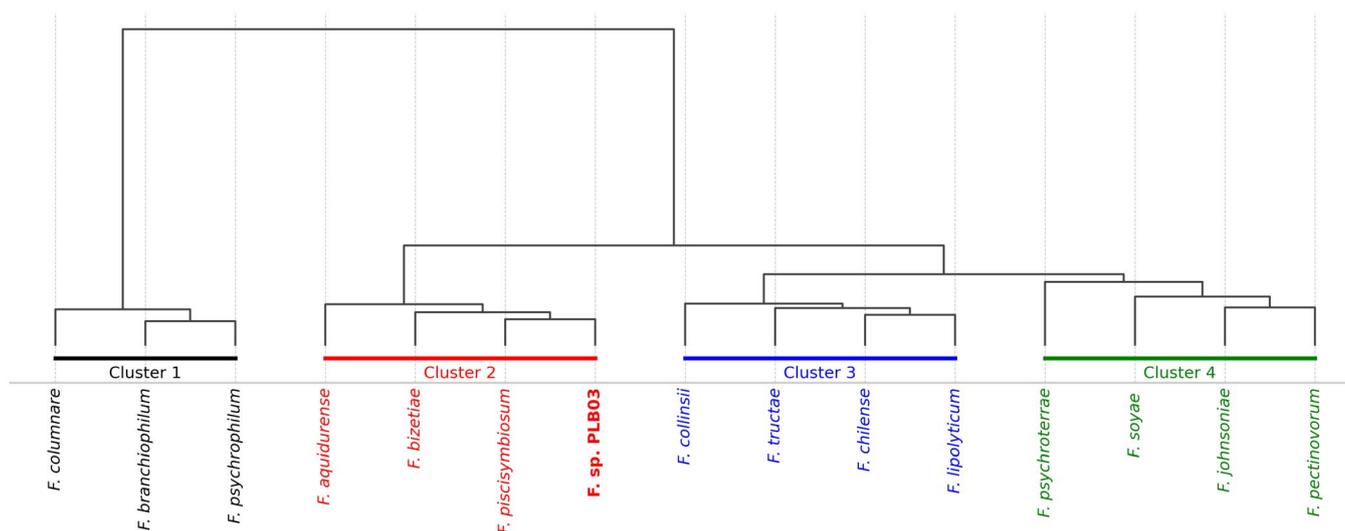
Дальнейшее сравнение семейств протеаз в кластере 2 выявило четыре семейства MEROPS: M10, S1, T2, T3, которые присутствуют исключительно в геноме штамма *Flavobacterium* sp. PLB03, но отсутствуют у остальных представителей этого кластера. Все четыре семейства присутствуют у отдельных видов из кластеров 1 и 3, но отсутствуют в геномах других представителей кластера 4.

4. Обсуждение

Геном изолированного штамма *Flavobacterium* sp. PLB03 демонстрирует сочетание признаков, типичных для свободноживущих представителей рода *Flavobacterium*, с модулями, обычно связанными с взаимодействием, с хозяином. Филогенетическое расположение и высокие значения средней идентичности нуклеотидов ясно демонстрируют, что *Flavobacterium* sp. PLB03 образует отдельную видовую линию вместе с *Flavobacterium* sp. CSZ, оставаясь при этом далёким от хорошо охарактеризованных патогенных для рыб штаммов, таких как *F. psychrophilum*, *F. columnare* и *F. branchiophilum*. Такое расположение подтверждает мнение о том, что штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 является, прежде всего, экологическим таксоном, а не специализированным патогеном.

Несмотря на отсутствие классических детерминант вирулентности — даже при смягченных порогах обнаружения — геном *Flavobacterium* sp. PLB03 содержит ряд функциональных особенностей, которые могут усиливать его способности разрушать ткани губок и зеленых симбиотических микроводорослей. Отмечено, что геном *Flavobacterium* sp. PLB03 больше, чем у патогенных для рыб штаммов и кодирует расширенный метаболический репертуар. Так, 392 гена CAZymes делают геном штамма *Flavobacterium* sp. PLB03 одним из наиболее богатых углевод-утилизирующих видов среди пресноводных *Flavobacterium*, изученных ранее. Особое внимание привлекает наличие семейств CAZymes, обычно связанных с деградацией эукариотических гликоконъюгатов, включая GH29, GH33, GH92, GH95, GH105, GH127, PL12, PL29 и CBM32. Эти ферменты обеспечивают расщепление муцинов, гликозамино-гликанов и сложных животных гликопротеинов — ключевых структурных полисахаридов в тканях губок.

Этот метаболический потенциал отражен в архитектуре 32 идентифицированных локусов утилизации полисахаридов (ПУЛ). Среди них есть как минимум пять крупных кластеров, специфичных для *Flavobacterium* sp. PLB03, нацеленных на ассоциированные с хозяином гликаны: канонический ПУЛ, деградирующий муцин, два независимых локуса

**Рис.3.** Иерархическая кластеризация видов *Flavobacterium* на основе профилей семейства протеаз по MEROPS.

гликозаминогликанов (GAG), большой ПУЛ, связанный с гликанами хозяина/животным гликопротеином, обогащенный фукозидазами, сиалидазами и α -маннозидазами, ПУЛ, связанный с арабиногалактаном типа AGP, и уникальный локус, деградирующий альгинат, отсутствующий во всех сравниваемых геномах. Такой разнообразный репертуар ПУЛ предполагает широкий спектр субстратов и характерен для «оппортунистических» флавобактерий, способных использовать как полисахариды окружающей среды, так и полисахариды эукариотического (животного) происхождения. Дополнительным доказательством адаптивной универсальности служит наличие 23 геномных островов, составляющих 10–12% генома. Эти острова обогащены гипотетическими белками, мобильными элементами, TonB-зависимыми рецепторами, компонентами системы секреции IX типа и SusC/RagA-подобными транспортерами, что указывает на активную модульность генома и потенциальное горизонтальное приобретение генов. Распределенное распределение модулей TonB–SusC, ассоциированных с геномными островами, согласуется с типичной организацией ПУЛ у флавобактерий, что дополнительно подтверждает идею о субстрат-зависимой пластичности генома.

Анализ протеаз выявил расширенный репертуар MEROPS у *Flavobacterium* sp. PLB03, включающий четыре семейства (M10, S1, T2, T3), которые отсутствуют у других представителей этого кластера, но присутствуют у более метаболически гибких видов. Эти протеазы могут способствовать деградации белковых компонентов тканей губок. У флавобактерий протеазы часто действуют синергетически с CAZymes при разрушении сложных органических матриц, что указывает на их взаимодополняющую роль в усвоении субстрата.

В совокупности, геномные особенности штамма *Flavobacterium* sp. PLB03 указывают на то, что это не классический патоген, а скорее экологически адаптированные бактерии с расширенной способностью к деградации сложных органических субстратов, в том числе животного и растительного происхождения. Сочетание богатого репертуара CAZymes и ПУЛ, уникальных локусов, ориентированных на гликаны хозяина, разнообразных протеаз и модульных геномных островов обеспечивает механистическую основу наблюдаемой способности *Flavobacterium* sp. PLB03 деградировать ткани губок и зеленых микроводорослей. Эти данные подтверждают интерпретацию того, что изолированный штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 представляет собой экологически универсальный организм, способный к оппортунистическим взаимодействиям с организмами-хозяевами.

5. Выводы

Исследованный нами геном штамма *Flavobacterium* sp. PLB03 является новым видом и относится к группе свободноживущих (экологически распространенных) флавобактерий, с большим геномом. Расчеты средней идентичности нуклеоти-

дов со значениями 89,4–90,8%, значительно ниже пороговых значений, используемых для различения представителей близкородственных видов, подтверждают, что штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 является уникальным видом. Штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 не обладает типичными факторами вирулентности, но обладает широкими метаболическими возможностями для инвазии и разрушения тканей хозяина. Кроме того, *Flavobacterium* sp. PLB03, вероятно, является симбионтом губок, поскольку обладает уникальным набором специфических ферментов, расщепляющих гликаны хозяина, что необычно для рода *Flavobacterium*. Анализируя его способность расщеплять полисахариды, мы установили, что штамм *Flavobacterium* sp. PLB03 обладает значительным потенциалом в этой области. Однако необходимы дальнейшие исследования для определения конкретных полисахаридов, которые расщепляет этот штамм, что будет способствовать нашему пониманию экологической роли и биотехнологических применений штаммов флавобактерий.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственного задания Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук № 0279-2021-0011. Материал подготовлен на основе работ, поддержанных проектом Российского научного фонда № 19-14-00088 и Российским фондом фундаментальных исследований № 16-04-00065; 16-54-150007; 18-04-00224.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Кожов М.М. 1972. Очерки по байкаловедению. Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство.
- Ali Z., Cousin S., Fruhling A. et al. 2009. *Flavobacterium rivuli* sp. nov., *Flavobacterium sub-saxonicum* sp. nov., *Flavobacterium swingsii* sp. nov. and *Flavobacterium reichenbachii* sp. nov., isolated from hard water rivulet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2610–2617.
- Andrews S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics*.
- Astashyn A., Tvedte E.S., Sweeney D. et al. 2024. Rapid and sensitive detection of genome contamination at scale with FCS-GX. *Genome Biology* 25: 1–25. DOI: [10.1186/S13059-024-03198-7/FIGURES/4](https://doi.org/10.1186/S13059-024-03198-7/FIGURES/4)
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5):455–477. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Belikov S., Belkova N., Butina T. et al. 2019. Diversity and shifts of the bacterial community associated with Baikal sponge mass mortalities. *PLOS One* 14: 3. DOI: [10.1371/journal.pone.0213926](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213926)
- Belikov S.I., Petrushin I.S., Chernogor L.I. 2021. Genome analysis of the *Janthinobacterium* sp. strain SLB01 from

the Diseased Sponge of the *Lubomirskia baikalensis*. *Current Issues in Molecular Biology* 43: 2220–2237. DOI: [10.3390/cimb43030156](https://doi.org/10.3390/cimb43030156)

Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P. et al. 2017. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research* 45: W30–W35. DOI: [10.1093/nar/gkx343](https://doi.org/10.1093/nar/gkx343)

Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.

Bormotov A.E. 2012. What has happened to Lake Baikal sponges? *Science first hand* 2: 32. URL: <https://scfh.ru/en/papers/what-has-happened-to-lake-baikal-sponges/>

Chen L., Zheng D., Liu B. et al. 2016. VFDB 2016: Hierarchical and refined dataset for big data analysis - 10 years on. *Nucleic Acids Research* 44: D694–D697. DOI: [10.1093/NAR/GKV1239](https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1239)

Chen W.-M., Huang W.-C., Young C.-C. et al. 2012. *Flavobacterium tilapiae* sp. nov., isolated from a freshwater pond, and emended descriptions of *Flavobacterium defluvii* and *Flavobacterium johnsoniae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 827–834. DOI: [10.1099/ijs.0.041178-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.041178-0)

Chernogor L., Klimenko E., Khanaev I. et al. 2020. Microbiome analysis of healthy and diseased sponges *Lubomirskia baikalensis* by using cell cultures of primmorphs. *PeerJ* 8: e9080. DOI: [10.7717/peerj.9080](https://doi.org/10.7717/peerj.9080)

Chernogor L.I., Petrushin I.S., Khanaev I.V. et al. 2020. Study of changes in microbiomes of sponges *Lubomirskia baikalensis* using the cell culture of primmorphs. *Limnology and Freshwater Biology* 4: 647–648. DOI: [10.31951/2658-3518-2020-A-4-647](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-4-647)

Denikina N.N., Dzyuba E.V., Belkova N.L. et al. 2016. The first case of disease of the sponge *Lubomirskia baikalensis*: investigation of its microbiome. *Translated in Biology Bulletin* 43: 263–270. DOI: [10.1134/S106235901603002X](https://doi.org/10.1134/S106235901603002X)

Ekwe A.P., Ahn J.-H., Kim S.B. 2017. *Flavobacterium keumense* sp. nov., isolated from freshwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 2166–2170. DOI: [10.1099/ijsem.0.001920](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001920)

Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses. 2024. *Nucleic Acids Research*. Oxford Academic, n.d. URL: <https://academic.oup.com/nar/article/52/W1/W83/7676834?login=false> (accessed: 11.16.25).

Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M. et al. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications* 9(1): 5114. DOI: [10.1038/s41467-018-07641-9](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9)

Khanaev I.V., Kravtsova L.S., Maikova O.O. et al. 2018. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: sponge disease and the problem of conservation of diversity. *Journal of Great Lakes Research* 44: 77–85. DOI: [10.1016/j.jglr.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.10.004)

Kozhov M. 2013. *Lake Baikal and its life*. Springer Science business Media. DOI: [10.1007/978-94-015-7388-7](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7388-7)

Liu B., Zheng D., Zhou S. et al. 2022. VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research* 50: D912–D917. DOI: [10.1093/nar/gkab1107](https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107)

Meier-Kolthoff J.P., Carbasse J.S., Peinado-Olarte R.L. et al. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 50: D801–D807. DOI: [10.1093/NAR/GKAB902](https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB902)

Meier-Kolthoff J.P., Göker M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 10: 1–10. DOI: [10.1038/s41467-019-10210-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3)

Peeters K., Willems A. 2011. The *gyrB* gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of *Flavobacterium* strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. *FEMS Microbiology Letters* 321: 130–140. DOI: [10.1111/J.1574-6968.2011.02326.X](https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2011.02326.X)

Petrushin I., Belikov S., Chernogor L. 2020. Cooperative interaction of *Janthinobacterium* sp. SLB01 and *Flavobacterium* sp. SLB02 in the diseased sponge *Lubomirskia baikalensis*. *International journal of molecular sciences* 21: 1–13. DOI: [10.3390/ijms21218128](https://doi.org/10.3390/ijms21218128)

Pile A.J., Patterson M.R., Savarese M. et al. 1997. Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2. Sponge abundance, diet, feeding efficiency, and carbon flux. *Limnology and Oceanography* 42: 178–184. DOI: [10.4319/lo.1997.42.1.0178](https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.1.0178)

Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70: e102. DOI: [10.1002/CPBI.102;PAGE=STRING:ARTICLE/CHAPTER](https://doi.org/10.1002/CPBI.102;PAGE=STRING:ARTICLE/CHAPTER)

Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D. et al. 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research* 46: D624–D632. DOI: [10.1093/nar/gkx1134](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134)

Rawlings N.D., Bateman A. 2021. How to use the MEROPS database and website to help understand peptidase specificity. *Protein science: a publication of the Protein Society* 30: 83–92. DOI: [10.1002/pro.3948](https://doi.org/10.1002/pro.3948)

Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J. et al. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42: D503–509. DOI: [10.1093/nar/gkt953](https://doi.org/10.1093/nar/gkt953)

Seemann T. 2016. ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. URL: <https://github.com/tseemann/abricate>

Semiturkina N.A., Efremova S.M., Timoshkin O.A. 2009. State-of-the art of biodiversity and ecology of spongiofauna of Lake Baikal with special attention to the diversity, peculiarities of ecology and vertical distribution of Porifera on Berezovy ecology test site. In: Timoshkin O.A. (Ed.), *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Novosibirsk, pp. 891–901. (in Russian)

Tatusova T., Dicuccio M., Badretdin A. et al. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research* 44: 6614–6624. DOI: [10.1093/NAR/GKW569](https://doi.org/10.1093/NAR/GKW569)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *Journal of Great Lakes Research* 42: 487–497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Yi H., Oh H.-M., Lee J.-H. et al. 2005. *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 637–641. DOI: [10.1099/ijs.0.63423-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63423-0)

Zheng J., Ge Q., Yan Y. et al. 2023. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research* 51: W115–W121. DOI: [10.1093/nar/gkad328](https://doi.org/10.1093/nar/gkad328)

Nanoplastics as a substrate for fungal growth *Lecanicillium coprophilum* (Cordycipitaceae, Hypocreales)

Annenkov V.V.¹, Pal'shin V.A.^{1*}, Danilovtseva E.N.¹, Polyakova M.S.^{2,3}, Mincheva E.V.²

¹Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

²Baikal Museum Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya Str., 1, Listvyanka, 664520, Russia

³Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lermontov Str., 132, Irkutsk, 664033 Russia

ABSTRACT. Anthropogenic pollution of the environment by plastic waste represents one of the most serious environmental problems. Nanoplastics, particles smaller than 1000 nm, pose a particular danger, as their small size and high specific surface area result in high bioavailability and toxicity for a wide range of aquatic organisms. Fungi are promising candidates for cleaning contaminated ecosystems due to their metabolic capabilities for breaking down complex molecules. In this study, for the first time, we experimentally investigated the ability of the micromycete, *Lecanicillium coprophilum*, to use nanoparticles of synthetic polymers—polyvinyl chloride (PVC), polystyrene (PS), and polymethyl methacrylate (PMMA)—as a growth substrate. Fluorescence microscopy and measurements of polymer concentrations in the medium proved that this fungus can not only adsorb nanoplastics on the surface of its hyphae but also metabolize them. Non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) revealed statistically significant differences in mycelial biomass accumulation in media containing different plastics at 10°C. PS was the most favorable substrate for the growth of *L. coprophilum*. The median mycelial biomass values demonstrated a consistent ranking of polymers by favorability: PS > PMMA > PVC, which remained across different cultivation temperatures. This paper also discusses the enzymatic activity of *L. coprophilum* and the potential contribution of enzymes, particularly lipases, to the biodegradation of nanoplastics by this fungal species.

Keywords: nanoplastics, bioremediation, micromycetes, fluorescent dye

For citation: Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Danilovtseva E.N., Polyakova M.S., Mincheva E.V. Nanoplastics as a substrate for fungal growth *Lecanicillium coprophilum* (Cordycipitaceae, Hypocreales) // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1329-1342. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1329

1. Introduction

The rapid development of the chemical, medical, and cosmetics industries has significantly improved human life. However, it has had a negative consequence: the release, often unintentional, of numerous chemical substances into ecosystems, sometimes with devastating effects. Anthropogenic pollution of the environment with plastic waste is one of the most serious global environmental problems. Nanoplastics (NPs), particles smaller than 1000 nm, formed from the fragmentation of macro- and microplastics, are of particular concern, as they are now present in all natural environments. Due to their small size and high specific

surface area, NPs exhibit increased bioavailability and toxicity for a wide range of aquatic organisms, including heterotrophic unicellular organisms (Annenkov et al., 2023) and photosynthetic diatoms (Sendra et al., 2019; Palshin et al., 2020; Baudrimont et al., 2020). In this context, the search for effective methods to neutralize NPs is a relevant scientific challenge.

Bioremediation is one of the methods for combating chemical pollution. It involves biologically mediated processes, through which undesirable compounds are transformed, degraded, immobilized, and removed from an ecosystem. Fungi are promising candidates for this purpose, as they possess metabolic capabilities for breaking down complex molecules, including chemi-

*Corresponding author. E-mail address: PVA666@lin.irk.ru (V.A. Pal'shin)

Received: November 21, 2025;

Accepted after revised: December 12, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



cally stable macromolecules of industrial plastics, pesticides, and pharmaceutical and cosmetic products. Some fungi (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Penicillium* spp.) can degrade polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride, and other synthetic plastics (Sánchez, 2020; Saeed et al., 2022; Khatua et al., 2024; Ibrahim et al., 2024).

The use of fungi and other organisms for bioremediation must be combined with adherence to biosafety standards; the organisms used must not cause adverse effects upon contact with humans. Fungi are of great interest in this regard, as they exist in environments that surround humans, which inherently suggests their harmlessness. Members of the genus *Lecanicillium* are known as biocontrol agents (entomopathogens and mycoparasites) (Goettel et al., 2008; Meng et al., 2022), as well as for their biotechnological activity. Fungi of this genus are considered plant protection agents (bioinsecticides) due to their ability to infect insects, nematodes, and harmful fungi (Goettel et al., 2008; Meng et al., 2022). It has recently been demonstrated that *L. coprophilum* can synthesize zinc oxide nanoparticles, possessing an antimicrobial effect against plant-pathogenic bacteria and fungi (Anuar et al., 2025). This study was initiated by repeated observations of spontaneous mycelial biomass growth in laboratory dispersions of polyvinyl chloride (PVC) nanoparticles. The isolated and identified micromycete belonged to the species *L. coprophilum*. During the preparation of this paper for submission, data on the ability of *L. coprophilum* to degrade polyethylene have been published (Kheswa et al., 2025). However, the ability of this fungal species to utilize other types of plastics, especially in nano-form, as a substrate has not been previously studied.

The aim of this study was to investigate the ability of the fungus *L. coprophilum* to use NPs, such as polyvinyl chloride (PVC), polystyrene (PS), and polymethyl methacrylate (PMMA), as growth substrates.

2. Materials and methods

The synthesis of nanoparticles utilized PVC (Russia, Usolye-Sibirskoye) with a molecular weight of 1600 kDa, PS (Merk, 192 kDa) and PMMA from disposable spectrophotometer cuvettes (BRAND GMBH + CO KG). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was used without prior purification. Tetrahydrofuran (THF) was boiled with sodium wires under an argon atmosphere, filtered, and distilled over LiAlH_4 under an argon. Acetone was purified by distillation.

Dispersions of plastic nanoparticles were obtained in accordance with previously developed methods (Palshin et al., 2020; Annenkov et al., 2021). Dibenzylfluorescein (DBF), which exhibits fluorescence in the green region, was used to stain the nanoparticles. A solution of the polymer and the fluorescent dye in tetrahydrofuran (acetone for PMMA) was added dropwise to an intensively stirred aqueous SDS solution, followed by stirring for 1 hour to allow the organic solvent to evaporate. An excess of SDS was removed by centrifuging the dispersions, followed by re-suspending the

nanoparticles in water and filtering through a syringe filter with a pore size of 0.45 μm . Particle sizes were measured by dynamic light scattering using a Photocor Complex instrument. The polymer concentrations in the obtained dispersions were determined using UV spectroscopy for PS (a CM-2203 spectrofluorimeter) and IR spectroscopy for PVC according to (Annenkov et al., 2021). Particle sizes and initial dispersion concentrations are listed in Table 1.

The micromycete monoculture was isolated on potato dextrose agar. Species identification was carried out using the ITS1-2 molecular genetic marker (the universally accepted DNA barcode for fungi). DNA was extracted from the fungal monoculture using a modified Doyle and Dickson protocol (Doyle and Dickson, 1987). The ITS1-2 fragment was amplified using primers ITS1 F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990). The parameters for 35 amplification cycles were as follows: DNA pre-denaturation at 94°C–4 min, denaturation at 94°C–1 min, primer annealing at 55°C–1 min, and elongation at 72°C–1 min (5 minutes in the final cycle). Sanger sequencing was performed at the “Genomics” shared use center (Novosibirsk).

The maximum likelihood algorithm in the IQ-TREE program (Nguyen et al., 2015; Kalyaanamoorthy et al., 2017) was used to find the optimal model of nucleotide substitution and construct a phylogenetic tree.

Based on the minimum value of the Bayesian Information Criterion (BIC), the TIM2 + F + G4 model was selected as the best of nucleotide substitution. Pairwise genetic distances were calculated using MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

Light and fluorescence microscopy were performed on an inverted MOTIC AE-31T microscope with an HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. A 470 nm excitation filter (emission from 525 nm) was used to induce green and yellow fluorescence.

The morphology of the fungus was studied using a FEI Quanta 200 scanning electron microscope. For this purpose, the fungal mycelium was divided into the central upper part of the colony, the peripheral hyphae, and the central inner part, which were put into corresponding Eppendorf tubes. The tubes were frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. The dried samples were placed on an aluminum holder using double-sided tape. A 20 nm gold layer was sputter-coated onto the sample (Desktop Sputter and Carbon Coater DSCR).

Table 1. Characteristics of nanoplastic dispersions.

Polymer	Concentration, mg/L		Diameter, nm
	Stock solution	Working solution	
PVC	1856	100	94
PMMA	311	100	170
PS	859	100	208

Cultivation of the fungus at different temperatures

To study the influence of NP type and temperature, NP dispersions with an identical polymer concentration of 100 mg/L were prepared. The prepared dispersions were sterilized by autoclaving. Hyphae of *L. coprophilum* were placed into the dispersions and cultivated at 4, 10, and 25 °C. After 76 days of cultivation in the NP dispersions, the mycelium was separated by filtration. The residue on the filter was washed with 10 mL of distilled water and dried together with the pre-weighed filter paper to determine the dry mass. For statistical analysis, the non-parametric Kruskal-Wallis test (for comparing three or more groups) was applied, followed by Dunn’s post-hoc analysis with Holm-Bonferroni correction.

Enzymatic Activity

The enzymatic activity of the fungus was assessed at temperatures of 4°C, 10°C, and 25°C on Petri dishes with selective media: amylase activity on a starch-containing medium (Gopinath et al., 2005), cellulase activity on a carboxymethylcellulose medium (Sunitha et al., 2013), laccase activity on an ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)) medium (Ramírez et al., 2012), and lipase activity on a Tween-20 medium (Gopinath et al., 2005). Protease activity was determined using a skim milk medium (Ramírez et al., 2012).

3. Results and discussion

During storage of non-sterile dispersions of PVC, PS, and PMMA nanoparticles (without fungicidal or bactericidal additives) at 10-11°C, a mass morphologically similar to fungal mycelium was visually detected in the PVC samples after 1-2 months (Fig. 1). This phenomenon was not observed in dispersions of the other plastics.

The phylogenetic tree based on the ITS1-2 sequences from the studied fungus and sequences of



Fig.1. The appearance of the mycelium-like mass forming in aqueous dispersions of PVC nanoparticles at 10-11°C (PVC concentration is 328 mg/L, diameter of particle is 96 nm).

other *Lecanicillium* species available in the GenBank database demonstrates that the studied fungus reliably belongs to the species *L. coprophilum* (Fig. 2). It is identical to other members of this species isolated from various sources (PP106253 and MH177616). Members of *L. coprophilum* form a shared clade with the species *L. calimantanense* and *L. wallacei*. The pairwise genetic distances between *L. coprophilum* and *L. calimantanense* and *L. wallacei* are 0.053 and 0.011, respectively. Overall, genetic distances between different species of the genus *Lecanicillium* range from 0.004 to 0.146.

The results of scanning electron microscopy are shown in Fig. 3. Optimization of the sample preparation protocol prevented the collapse of spores. We observed smooth-walled mycelium and conidiophores with fusiform conidia (non-motile asexual spores), which corresponds to the morphological description of the species. We also observed swollen hyphae, which are one of the distinctive morphological features distinguishing *L. coprophilum* from *L. calimantanense* and *L. wallacei* (Su et al., 2019).

Upon inoculation of the *L. coprophilum* mycelium

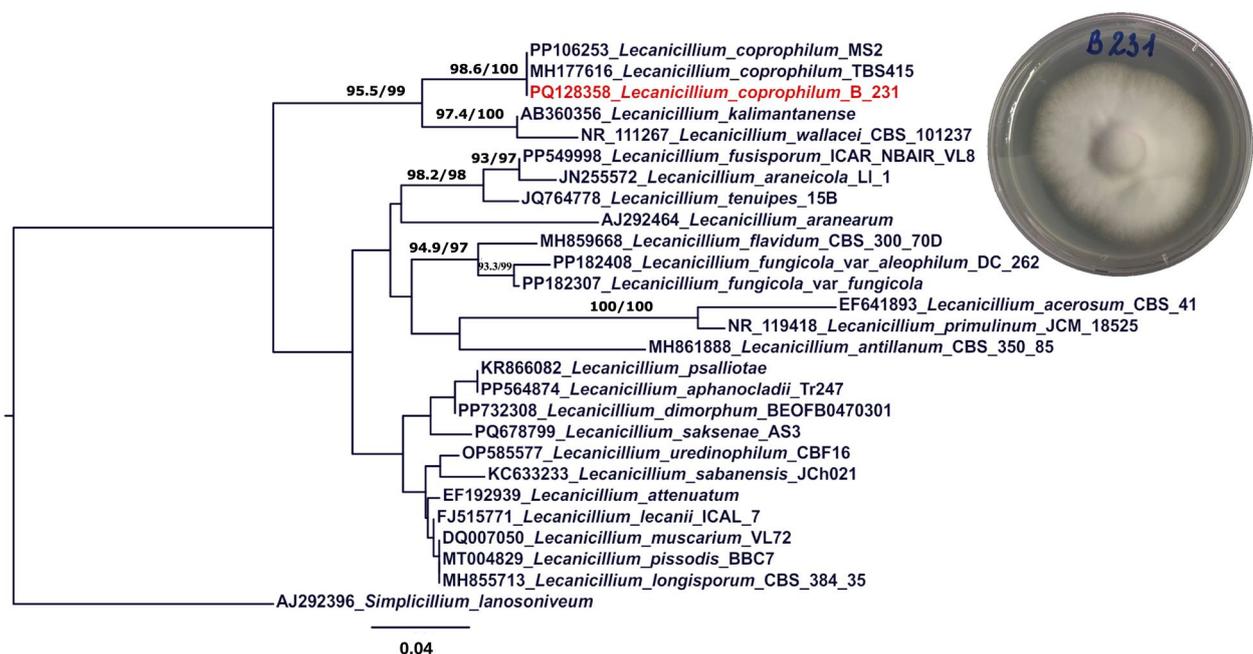


Fig.2. The phylogenetic tree based on the ITS1-2 sequences using the IQTree program and a photograph of the *L. coprophilum* culture. The studied species is highlighted in red in the tree. Statistical support values below 50% are not shown.

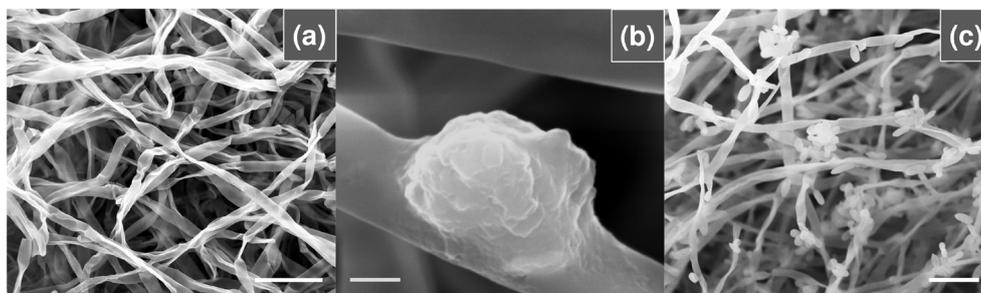


Fig.3. SEM photomicrographs of the smooth-walled mycelium of *L. coprophilum* (a), swollen hyphae, and conidiophores with fusiform conidia (b and c). Scale: (a) and (c)–10 μm , (b)–1 μm .

into freshly prepared and sterilized polymer dispersions (Fig. 4), the formation of visible fungal biomass after 76 days was observed for all studied plastic types—PS, PVC, and PMMA. Analysis of the samples using fluorescence microscopy (Fig. 5) visualized the interaction between plastic nanoparticles and the *L. coprophilum* mycelium. The images clearly indicated the green fluorescence, corresponding to NP, which is uniformly distributed both on the surface and within internal regions (Fig. 5-d). When the fungus grows in non-sterile conditions with high concentrations of PVC nanoparticles, areas of bright fluorescence are also observed on the external surface of the hyphae, which may indicate local adsorption of nanoparticles (Fig. 5-b). Noteworthy is that the fluorescent dye (dibenzylfluorescein) was distributed within the nanoparticle mass in the course of their synthesis, not merely on their surface, and it is not washed out into the aqueous phase (Annenkov et al., 2021). Therefore, such a uniform fluorescence distribution as shown in Fig. 5-d, f requires the nanoparticles to be distributed inside the hyphae and/or to be degraded with the following distribution of the fluorescent hydrophobic marker within the organism. Thus, the observed dye distribution suggests that, in addition to passive adsorption, there is an active process of nanoparticle uptake. This observation serves as morphological evidence of the fungus's ability not only to colonize the surface of nanoplastics but also to metabolize them.

Cultivation of *L. coprophilum* in nanoplastic dispersions was accompanied by acidification of the medium (pH decreases of 0.3-0.5 units) compared to the control measurements (pH of PMMA dispersion–6.82, PVC–7.18, and PS–7.12). PS dispersions at 4°C (pH 6.71) showed the most pronounced change, indicating active fungal metabolism. The observed acidification could result from the excretion of organic acids, which is characteristic of fungi when utilizing complex substrates.

Measurement of the residual plastic concentration in the dispersions revealed a decrease of 10.7%, 17.3%, and 10.4% for PS, PVC, and PMMA, respectively. These data are consistent with the fluorescence microscopy results and indirectly suggest an active biochemical degradation of the polymers by the fungus. At the same time, the control experiment revealed that fungal growth was also observed in an SDS solution, which was used as a dispersion stabilizer. However, the SDS concentration in the dispersions was an order of magnitude lower (~30 times lower) than the NP concentration, and it was primarily concentrated on the



Fig.4. Photographs of synthetic polymer dispersions before (top) and after (bottom) inoculation with the *L. coprophilum* fungus and incubation for 76 days at 10-11°C. The initial nanoparticle concentration is 100 mg/L.

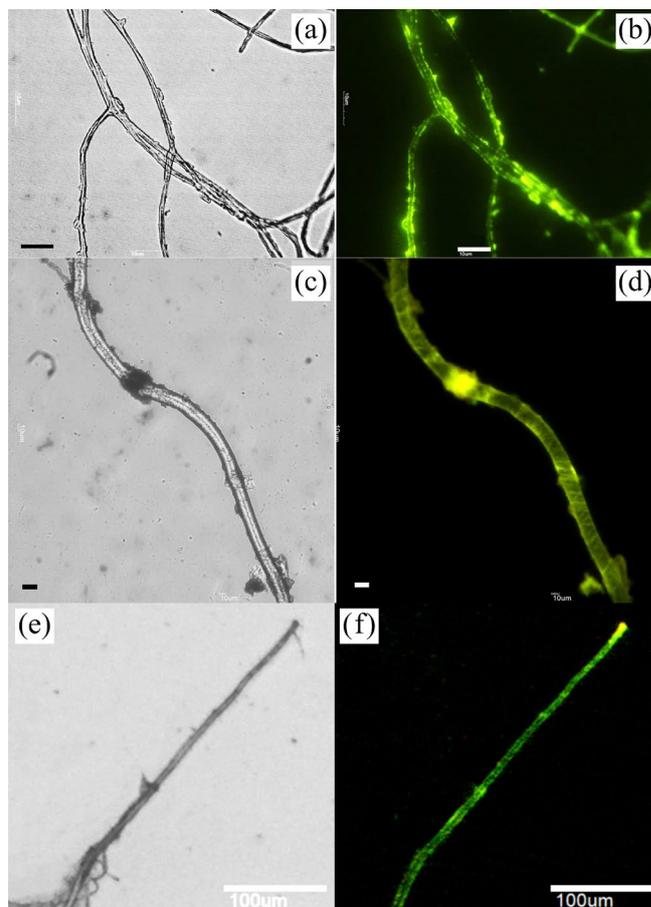


Fig.5. Light and fluorescence micrographs of *L. coprophilum* hyphae after growth in media containing NP stained with a fluorescent dye: (a-b)–non-sterile PVC dispersion, (c-d)–sterile PVC dispersion, and (e-f)–sterile PS dispersion. The green fluorescence comes from NP particles. Scale: (a-b)–10 μm , (c-d) – 20 μm , and (e-f)–100 μm .

particle surfaces to ensure their stability. The fluorescence microscopy data, indicating uniform intracellular localization of fluorescence, suggest that, despite the potential metabolism of the stabilizer, the plastic nanoparticles also serve as a substrate for fungal mycelial growth. Additional studies are required to unambiguously differentiate the contribution of the stabilizer and the polymer particles to the fungus metabolism.

The Kruskal-Wallis test showed that the type of polymer affects the accumulation of the *L. coprophilum* mycelial biomass (Fig. 6). At 10°C, the differences were statistically significant ($H=7.20$ and $p=0.027$). At 4°C and 25°C, there was a pronounced trend toward differences ($p=0.058$ and $p=0.066$, respectively), which is likely due to the limited sample size ($n=3$).

At all temperature regimes, PS promoted the greatest biomass accumulation, followed by PMMA and PVC. The obtained results indicate that PS is the most favorable substrate for the growth of the studied micromycete. This may be explained by differences in the hydrophobicity and/or chemical structure of the polymers that affect mycelial adhesion and subsequent colonization and uptake. A post-hoc analysis using the Holm-Bonferroni correction (Dunn's test) revealed at 10°C a statistically significant difference in biomass accumulation only between PVC and PS ($Z = -2.683$, $p = 0.022$). The differences between the PMMA-PS ($Z = -1.342$, $p = 0.180$) and PMMA-PVC ($Z = 1.342$, $p = 0.180$) pairs did not reach the level of statistical significance that is most likely due to the small sample size.

A study of the enzymatic activity of the *L. coprophilum* fungus (Table 2) revealed hydrolase group enzymes (amylase, lipase, and protease), among which, lipase is of particular importance in the context of this study. The activity of this enzyme, along with protease and amylase, indirectly indicates that the fungus can hydrolyze ester bonds, which is a fundamental mechanism for attacking synthetic polymers structurally similar to the natural substrates of these enzymes. The relatively high extracellular activity of lipase and protease, which was observed at 4°C against a background

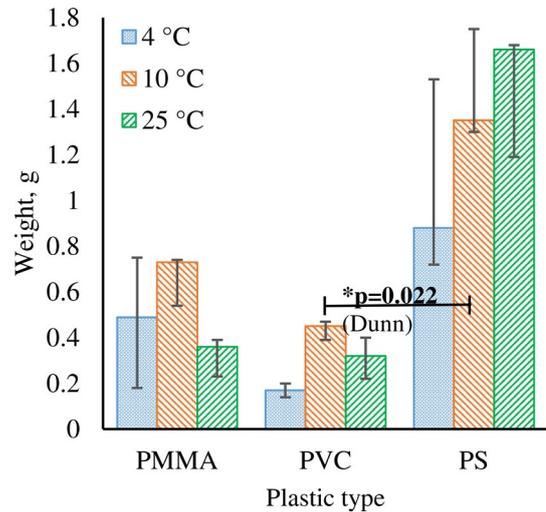


Fig.6. Comparative analysis of mycelial biomass accumulation by *L. coprophilum* in PVC, PMMA, and PS nanoparticle dispersions at 4, 10, and 25°C. Median values are shown. *— at 10°C, the differences are statistically significant (post-hoc analysis using the Holm-Bonferroni correction (Dunn's test), $p=0.022$).

of absent or low biomass increase, suggests an adaptive orientation of the *L. coprophilum* metabolism under these conditions. In this scenario, the colony primarily secretes exoenzymes rather than focusing on growth. Overall, the high extracellular lipase activity suggests that this enzyme may play a key role in the degradation of PMMA, which contains ester groups.

While some other fungi that had been studied using the same methodology showed a positive reaction for laccases (Polyakova et al., 2025), the investigated *L. coprophilum* did not exhibit laccase activity. At the same time, in some studies, laccases and related oxidative enzymes were considered the key initial catalysts for the biodegradation of PVC (Kirbas et al., 1999; Zhang et al., 2022; Temporiti et al., 2022). Perhaps *L. coprophilum* employs a fundamentally different non-oxidative mechanism of plastics degradation.

Table 2. Enzymatic activity of the *L. coprophilum* fungus

Enzyme type	Substrate	Temperature, °C	Diameter, mm	
			Colony	Reaction zone
Amylases	Starch	4	0	0
		10	10.3 ± 0.4	16.7 ± 0.5
		25	30.3 ± 1.4	32.3 ± 1.4
Cellulases	Carboxymethylcellulose	4	0	0
		10	0	0
		25	0	0
Laccases	ABTS	4	0	0
		10	0	0
		25	0	0
Lipases	Tween 20	4	0	30.3 ± 1.5
		10	13.8 ± 0.4	33.7 ± 1.2
		25	26.6 ± 0.5	47.3 ± 0.8
Proteases	Skim milk	4	8.3 ± 0.5	22.7 ± 1.0
		10	14.8 ± 1.0	30.0 ± 0.9
		25	37.3 ± 0.5	54.5 ± 0.6

4. Conclusions

For the first time, we experimentally investigated the ability of the *L. coprophilum* micromycete to use nanoparticles of synthetic polymers, namely, polyvinyl chloride (PVC), polystyrene (PS), and polymethyl methacrylate (PMMA), as a substrate for growth. This study revealed that this fungal species is capable not only of adsorbing NPs on the hyphal surface but also of incorporating them into its metabolism. Fluorescence microscopy data, which demonstrated the intracellular localization of particles, as well as a decrease in polymer concentration in the medium, confirmed this result.

The accumulation of mycelial biomass depended on both the polymer type and the temperature. In particular, there was a significant difference between PS and PVC in biomass quantity at 10°C. Notably, PS supported consistently high fungal growth at all temperatures studied (from 4 to 25°C). For the other two plastics (PVC and PMMA), visual analysis of the data indicated a trend towards maximum biomass accumulation at 10°C. The median mycelial biomass values demonstrate a consistent ranking of polymers in terms of favorability: PS > PMMA > PVC, which remains constant across all cultivation temperatures. However, additional experiments with an increased number of replicates are required to confirm the optimal growth temperature on these substrates.

The relatively high extracellular activity of hydrolytic enzymes, particularly lipases, in *L. coprophilum* indicates a potential ability to break down ester and other chemical bonds in polymers. The absence of activity of laccases in *L. coprophilum*, which are often considered potential agents for the oxidative biodegradation of plastics, suggests a likely alternative non-oxidative degradation mechanism. To date, the mechanism of plastic biodegradation by various organisms remains poorly understood, and our data also indicate that it may proceed via several pathways.

Thus, this study demonstrates that *L. coprophilum*, a widespread and biotechnologically significant fungus, can utilize various types of nanoplastics as a substrate. This opens prospects for considering it a potential agent for the bioremediation of plastic pollution. To confirm the direct biodegradation process, elucidate the biochemical mechanisms, and assess its efficacy under real-world conditions, further research with an increased sample size is necessary. The obtained data contribute to understanding the ecological role of micromycetes in the biogeochemical cycling of plastics and expand the list of candidate organisms for the development of environmental cleanup technologies.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project No. 122012600070-9.

The authors thank Marcel Kabilov (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Genomics Core Facility) for his expert comments and comprehensive discussion of the results, which contrib-

uted to the improvement of this work, as well as to the Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS for providing the equipment.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2021. Submicro- and nanoplastics: how much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution* 278: 116910. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116910](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910)
- Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Annenkova N.V. et al. 2023. Uptake and effects of nanoplastics on the dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(5):1124–1133. DOI: [10.1002/etc.5604](https://doi.org/10.1002/etc.5604)
- Anuar M.S.K., Khairuddin N.H., Zainal Z.S. et al. 2025. *Lecanicillium coprophilum*-mediated green synthesis of zinc oxide nanoparticles displaying antimicrobial activity against important rice pathogens. *Mycologia* 117(5): 801–817. DOI: [10.1080/00275514.2025.2525718](https://doi.org/10.1080/00275514.2025.2525718)
- Baudrimont M., Arini A., Guégan C. et al. 2020. Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environmental Science and Pollution Research* 27: 3746–3755. DOI: [10.1007/s11356-019-04668-3](https://doi.org/10.1007/s11356-019-04668-3)
- Doyle J.J., Dickson E.E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36: 715–722. DOI: [10.2307/1221122](https://doi.org/10.2307/1221122)
- Goettel M.S., Koike M., Kim J.J. et al. 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology* 98(3): 256–261. DOI: [10.1016/j.jip.2008.01.009](https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009)
- Gopinath S.C.B., Hilda A., Anbu P. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* 46(2): 119–126. DOI: [10.1007/S10267-004-0221-9](https://doi.org/10.1007/S10267-004-0221-9)
- Ibrahim S.S., Ionescu D., Grossart H.-P. 2024. Tapping into fungal potential: Biodegradation of plastic and rubber by potent Fungi. *Science of The Total Environment* 934: 173188. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2024.173188](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173188)
- Kalyanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K. et al. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods* 14(6): 587–589. DOI: [10.1038/nmeth.4285](https://doi.org/10.1038/nmeth.4285)
- Khatua S., Simal-Gandara J., Acharya K. 2024. Myco-remediation of plastic pollution: current knowledge and future prospects. *Biodegradation* 35(3): 249–279. DOI: [10.1007/s10532-023-10053-2](https://doi.org/10.1007/s10532-023-10053-2)
- Kheswa N., Gokul A., Dube N. 2025. Identification of novel polyethylene-degrading fungi from South African landfill soils: *Arthrographis kalrae*, *Lecanicillium coprophilum*, and *Didymosphaeria variabile*. *Biodegradation* 36(4): 71. DOI: [10.1007/s10532-025-10170-0](https://doi.org/10.1007/s10532-025-10170-0)
- Kirbas Z., Keskin N., Güner A. 1999. Biodegradation of Polyvinylchloride (PVC) by White Rot Fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 63: 335–342. DOI: [10.1007/s001289900985](https://doi.org/10.1007/s001289900985)
- Meng Y., Wellabada Hewage Don P.I.D., Wang D. 2022. A new strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from Tibetan Plateau and its insecticidal activity. *Microorganisms* 10(9): 1832. DOI: [10.3390/microorganisms10091832](https://doi.org/10.3390/microorganisms10091832)
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A. et al. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution* 32(1): 268–274. DOI: [10.1093/molbev/msu300](https://doi.org/10.1093/molbev/msu300)

Palshin V.A., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2020. Fluorescent nanoplastic particles: synthesis and influence on diatoms. *Limnology and Freshwater Biology* 5: 1067–1072. DOI: [10.31951/2658-3518-2020-A-5-1067](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-5-1067)

Polyakova M.S., Pudovkina T.A., Bedoshvili E.D. et al. 2025. A new ecological niche of *Paraphaeosphaeria sporulosa*: taxonomy, phylogeny, and enzymatic activity. In: Abstracts of the VIII International Vereshchagin Baikal Conference on September 8–14, 2025. Irkutsk: IGU Publishing House, pp. 469–470. (in Russian)

Ramírez M.G.C., Rivera-Ríos J.M., Téllez-Jurado A. et al. 2012. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management* 95: S256-S259. DOI: [10.1016/j.jenvman.2010.10.045](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.045)

Saeed S., Iqbal A., Deeba F. 2022. Biodegradation study of Polyethylene and PVC using naturally occurring plastic degrading microbes. *Archives of Microbiology* 204: 497. DOI: [10.1007/s00203-022-03081-8](https://doi.org/10.1007/s00203-022-03081-8)

Sánchez C. 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances* 40: 107501. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2019.107501](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501)

Sendra M., Staffieri E., Yeste M.P. et al. 2019. Are the primary characteristics of polystyrene nanoplastics responsible for toxicity and ad/absorption in the marine diatom

Phaeodactylum tricorutum? *Environmental Pollution* 249: 610–619. DOI: [10.1016/j.envpol.2019.03.047](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.047)

Su L., Zhu H., Guo Y. et al. 2019. *Lecanicillium coprophilum* (Cordycipitaceae, Hypocreales), a new species of fungus from the feces of Marmota monax in China. *Phytotaxa* 387(1): 55–62. DOI: [10.11646/PHYTOTAXA.387.1.4](https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.387.1.4)

Sunitha V.H., Devi D.N., Srinivas C. 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences* 9(1): 01–09. DOI: [10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148](https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148)

Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725–2729. DOI: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197)

Temporiti M.E.E., Nicola L., Nielsen E. et al. 2022. Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms* 10(6): 1180. DOI: [10.3390/microorganisms10061180](https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180)

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18(1): 315–322.

Zhang Z., Peng H., Yang D. et al. 2022. Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae. *Nature Communications* 13:5360. DOI: [10.1038/s41467-022-32903-y](https://doi.org/10.1038/s41467-022-32903-y)

Нанопластики как субстрат для роста гриба *Lecanicillium coprophilum* (Cordycipitaceae, Нурocreales)



Анненков В.В.¹, Пальшин В.А.^{1*}, Даниловцева Е.Н.¹, Полякова М.С.^{2,3}, Минчева Е.В.²

¹ Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

² Байкальский Музей Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Академическая, 1, Листвянка, 664520, Россия

³ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Антропогенное загрязнение окружающей среды пластиковыми отходами представляет собой одну из наиболее серьезных экологических проблем. Особую опасность представляют нанопластики — частицы размером менее 1000 нм, так как из-за своих малых размеров и высокой удельной поверхности для них характерна высокая биодоступность и токсичность для широкого круга гидробионтов. Многообещающими кандидатами для очистки загрязненных экосистем являются грибы, так как они обладают метаболическими возможностями для расщепления сложных молекул. В данной работе впервые экспериментально изучена способность микромицета *Lecanicillium coprophilum* использовать наночастицы синтетических полимеров — поливинилхлорида (ПВХ), полистирола (ПС) и полиметилметакрилата (ПММА) — в качестве субстрата для роста. С помощью флуоресцентной микроскопии и учета концентрации полимеров в среде доказано, что данный гриб способен не только адсорбировать нанопластики на поверхности своих гиф, но и вовлекать их в свой метаболизм. Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскела-Уоллиса) выявил статистически значимые различия накопления биомассы мицелия в среде с разными пластиками при 10°C. Наиболее благоприятным субстратом для роста *L. coprophilum* оказался ПС. Медианные значения биомассы мицелия демонстрируют устойчивое ранжирование полимеров по степени благоприятности: ПС > ПММА > ПВХ, сохраняющееся при различных температурах культивирования. Также в работе обсуждается ферментативная активность *L. coprophilum* и возможный вклад ферментов, в частности липаз, в биодеградацию нанопластика данным видом гриба.

Ключевые слова: Нанопластик, биоремедиация, микромицеты, флуоресцентный краситель

Для цитирования: Анненков В.В., Пальшин В.А., Даниловцева Е.Н., Полякова М.С., Минчева Е.В. Нанопластики как субстрат для роста гриба *Lecanicillium coprophilum* (Cordycipitaceae, Нурocreales) // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1329-1342. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1329

1. Введение

Бурное развитие химической, медицинской, косметической промышленности существенно улучшило жизнь людей, но негативным последствием этого стало попадание, зачастую ненамеренное, множества химических веществ в экосистемы, иногда с разрушительными последствиями. Антропогенное загрязнение окружающей среды

пластиковыми отходами представляет собой одну из наиболее серьезных глобальных экологических проблем. Особую опасность представляют нанопластики (НП) — частицы размером менее 1000 нм, образующиеся при фрагментации макро- и микропластиков и присутствующие уже во всех природных средах. Из-за своих малых размеров и высокой удельной поверхности нанопластики демонстрируют повышенную биодоступность и токсичность

*Автор для переписки. Адрес e-mail: PVA666@lin.irk.ru (В.А. Пальшин)

Поступила: 21 ноября 2025;

Принята после доработки: 12 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



для широкого круга гидробионтов, включая одноклеточных гидробионтов, способных к гетеротрофному питанию (Annenkov et al., 2023) и фотосинтезирующих диатомовых водорослей (Sendra et al., 2019; Palshin et al., 2020; Baudrimont et al., 2020). В этой связи поиск эффективных методов нейтрализации микропластиков является актуальной научной задачей.

Биоремедиация является одним из способов борьбы с химическими загрязнениями, она включает биологически опосредованные процессы, в ходе которых нежелательные соединения трансформируются, деградируют, связываются и удаляются из экосистемы. Грибы являются многообещающими кандидатами для этих целей, поскольку они обладают метаболическими возможностями для расщепления сложных молекул, включая химически стабильные макромолекулы промышленных пластиков, пестициды, фармацевтические и косметические препараты. Обнаружена способность ряда грибов (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* spp.) разлагать полиэтилен, полипропилен, поливинилхлорид, и другие синтетические пластики (Sánchez, 2020; Saeed et al., 2022; Khatua et al., 2024; Ibrahim et al., 2024).

Использование грибов и других организмов в целях биоремедиации должно сочетаться с соблюдением норм биобезопасности, используемые организмы не должны вызывать отрицательных эффектов в случае контакта с человеком. Грибы в этом плане представляют большой интерес, так как существуют в окружающей человека среде, что предопределяет их безвредность. Представители рода *Lecanicillium* известны как агенты биоконтроля (энтомопатогены и микопаразиты) (Goettel et al., 2008; Meng et al., 2022), а также своей биотехнологической активностью. Грибы рода *Lecanicillium* рассматриваются в качестве средств защиты растений (биоинсектицидов), благодаря способности поражать насекомых, нематод и опасных грибов (Goettel et al., 2008; Meng et al., 2022). Недавно показана способность *L. coprophilum* синтезировать наночастицы оксида цинка, обладающие антимикробным эффектом против патогенных для растений бактерий и грибов (Anuar et al., 2025). Данное исследование было инициировано многократными наблюдениями спонтанного роста мицелиальной биомассы в лабораторных дисперсиях наночастиц поливинилхлорида (ПВХ). Выделенный и идентифицированный микромицет принадлежал к виду *Lecanicillium coprophilum*. В период подготовки к публикации данной статьи в литературе появились данные о способности *L. coprophilum* к деградации полиэтилена (Kheswa et al., 2025). Тем не менее способность этого вида грибов к использованию в качестве субстрата других типов пластиков, особенно в наноформе, ранее не изучалась.

Целью данной работы стало исследование способности гриба *L. coprophilum* использовать микропластики – поливинилхлорид (ПВХ), полистирол (ПС) и полиметилметакрилат (ПММА) в качестве субстрата для роста.

2. Материалы и методы

Для синтеза наночастиц использовали ПВХ (Россия, Усолжье-Сибирское) с молекулярной массой 1600 кДа, ПС (Merk, 192 кДа) и ПММА из однофазных спектрофотометрических кювет (BRAND GMBH + CO KG). Додецилсульфат натрия (SDS) использовали без предварительной подготовки. Тетрагидрофуран (ТГФ) кипятили с натрием в атмосфере аргона, фильтровали и перегоняли над LiAlH₄ в атмосфере аргона. Ацетон очищали перегонкой.

Дисперсии наночастиц пластиков получали в соответствии с ранее разработанными методиками (Palshin et al., 2020; Annenkov et al., 2021). Для окраски наночастиц применяли дибензилфлуоресцеин (ДФБ), для которого характерна флуоресценция в зелёной области. Раствор полимера и флуоресцентного красителя в тетрагидрофуране (ацетон для ПММА) добавляли по каплям к интенсивно перемешиваемому водному раствору SDS, после чего оставляли перемешивание на 1 час для испарения органического растворителя. Избыток SDS удаляли центрифугированием дисперсий с последующим повторным суспендированием наночастиц в воде и фильтрованием через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Размеры частиц измеряли методом динамического светорассеяния на приборе Photocor Complex. Концентрацию полимера в полученных дисперсиях определяли с помощью УФ-спектроскопии для ПС (спектрофлуориметр CM-2203), ИК-спектроскопии для ПВХ согласно (Annenkov et al., 2021). Размеры частиц и исходные концентрации дисперсий указаны в Таблице 1.

Выделение чистой культуры микромицета проводили на картофельно-глюкозном агаре. Видовую идентификацию проводили по молекулярно-генетическому маркеру ITS1-2 (общепринятому для грибов ДНК-баркоду). ДНК экстрагировали из чистой культуры гриба по модифицированной методике Дойла и Диксон (Doyle and Dickson, 1987). Фрагмент ITS 1-2 амплифицировали с помощью праймеров ITS1 F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3' и ITS4 R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990). Параметры при 35 циклах амплификации следующие: денатурация ДНК при 94°C – 4 мин., денатурация при 94°C – 1 мин, отжиг праймеров при 55°C – 1 мин, элонгация при 72 °C – 1 мин (5 минут на последнем цикле). Секвенирование по Сэнгеру выполняли на базе ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск).

Таблица 1. Характеристики дисперсий микропластиков.

Полимер	Концентрации, мг/л		Диаметр, нм
	Стоковый раствор	Рабочий раствор	
ПВХ	1856	100	94
ПММА	311	100	170
ПС	859	100	208

Определение оптимальной модели нуклеотидных замен и построение филогенетического дерева алгоритмом Maximum Likelihood проводили в программе IQ-TREE (Nguyen et al., 2015; Kalyaanamoorthy et al., 2017).

В качестве наилучшей модели нуклеотидных замен на основании минимального значения байесовского информационного критерия (BIC) была выбрана модель TIM2+F+G4. Парные генетические дистанции рассчитывали с помощью MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

Световая и флуоресцентная микроскопия проводилась на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Для возбуждения зеленой и желтой эмиссии использовали светофильтр 470 нм (испускание от 525 нм).

Морфологию гриба изучали на сканирующем электронном микроскопе FEI Quanta 200. Для этого мицелий гриба отделяли в эппендорфы, отдельно центральную верхнюю часть колонии, периферические гифы и центральную внутреннюю часть. Эппендорфы замораживали в жидком азоте и сушили лиофильно. Высушенные образцы размещали на алюминиевом столике при помощи двухстороннего скотча. Сверху на образец напыляли слой золота 20 нм (Desktop Sputter and Carbon Coater DSCR).

Культивирование гриба при разных температурах

Для изучения влияния типа нанопластика и температуры готовили дисперсии нанопластиков с одинаковой концентрацией полимеров 100 мг/л. Подготовленные дисперсии стерилизовали автоклавированием. В дисперсии помещали гифы *L. coprophilum* и культивировали при 4, 10 и 25 °С. После 76 дней культивирования в дисперсиях нанопластиков мицелий отделяли фильтрованием. Осадок на фильтре промывали 10 мл дистиллированной воды и высушивали вместе с предварительно взвешенной фильтровальной бумагой для определения сухой массы. Для статистического анализа применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса (для сравнения трёх и более групп) с последующим пост-хок анализом по Данну с поправкой Холма-Бонферрони.

Ферментативная активность

Ферментативную активность гриба оценивали при температуре 4°C, 10°C и 25°C на чашках Петри с селективными средами: активность амилазы на среде с крахмалом (Gopinath et al., 2005), целлюлазы – на среде с карбокси-метилцеллюлозой (Sunitha et al., 2013), активность лакказы определяли на среде с ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylthiazoline-6-sulfonate) (Ramírez et al., 2012), активность липазы на среде с Tween-20 (Gopinath et al., 2005). Для определения активности протеаз использовали среду с обезжиренным молоком (Ramírez et al., 2012).

3. Результаты и обсуждение

При хранении нестерильных дисперсий наночастиц ПВХ, ПС и ПММА (без фунгицидных или бак-

терицидных добавок) при 10-11°C через 1-2 месяца в образцах ПВХ была визуальна обнаружена масса, по морфологии сходная с грибным мицелием (Рис. 1). В дисперсиях других пластиков подобное явление не было отмечено.

На филогенетическом древе, построенном на основе последовательностей ITS1-2, полученных от исследованного гриба и последовательностей других видов рода *Lecanicillium*, доступных в базе данных GenBank, видно, что исследуемый гриб достоверно относится к виду *L. coprophilum* (Рис. 2), будучи идентичным другим представителям этого вида, изолированным из различных источников (PP106253, MN177616). Представители *L. coprophilum* образуют совместную кладу с видами *L. calimantanense* и *L. wallacei*. Парные генетические дистанции между видами *L. coprophilum* и *L. calimantanense* и *L. wallacei* составляют 0,053 и 0,011 соответственно. В целом, генетические дистанции между разными видами рода *Lecanicillium* варьируют в пределах от 0,004 до 0,146.

Результаты сканирующей электронной микроскопии представлены на Рисунке 3. Оптимизация методики пробоподготовки позволила избежать коллапсирования спор. Мы наблюдали гладкостенный мицелий и конидиофоры с веретеновидными конидиями (неподвижными спорами бесполого размножения), что соответствует морфологическому описанию вида. Также мы наблюдали вздутые гифы, которые являются одним из отличительных морфологических видовых признаков *L. coprophilum* от *L. calimantanense* и *L. wallacei* (Su et al., 2019).

При посеве мицелия *L. coprophilum* в свежеприготовленные и стерилизованные дисперсии полимеров (Рис. 4) формирование видимой грибной массы через 76 дней отмечено для всех исследуемых типов пластика – ПС, ПВХ и ПММА. Анализ образцов с помощью флуоресцентной микроскопии (Рис. 5) позволил визуализировать взаимодействие наночастиц пластика с мицелием *L. coprophilum*. На изображениях чётко видно зеленое свечение, соответствующее нанопластику, который равномерно распределён как снаружи, так и во внутренних областях (Рис. 5-г). Когда же гриб формируется в нестерильных условиях с высокой концентрацией наночастиц ПВХ, в добавление на внешней поверхности гиф наблюдаются области яркой флуорес-



Рис.1. Внешний вид мицелий-подобной массы, образующейся в водных дисперсиях наночастиц ПВХ при 10-11°C (Концентрация ПВХ 328 мг/л, диаметр частиц 96 нм).

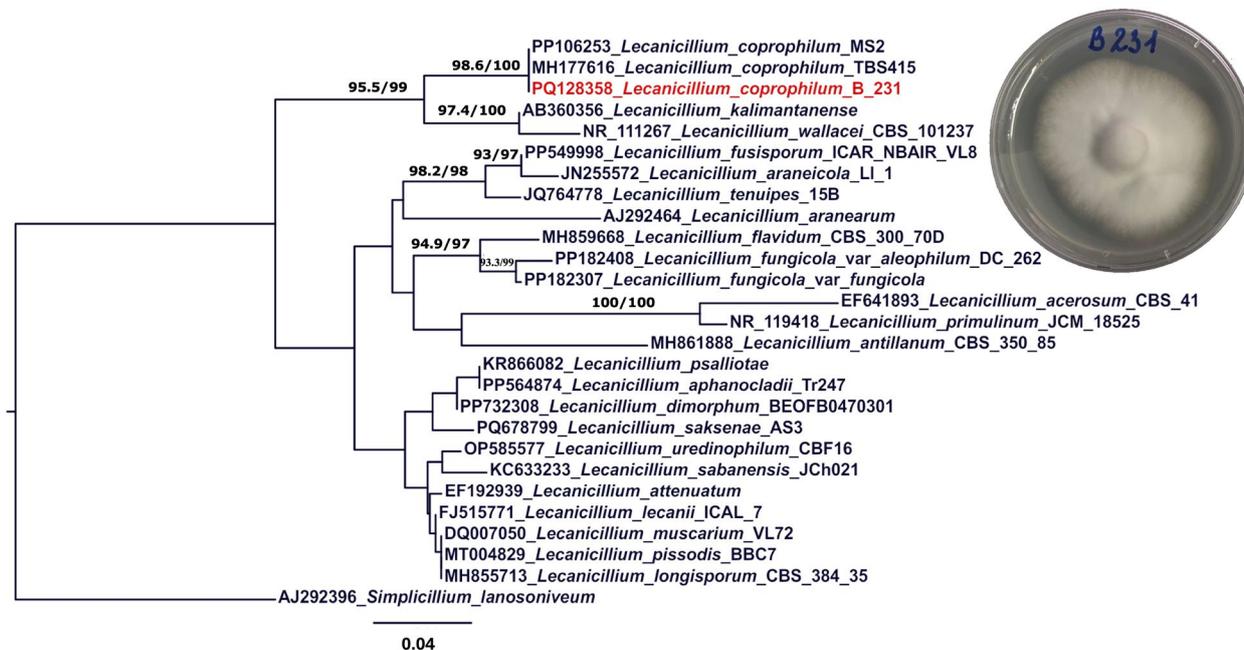


Рис.2. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей ITS1-2 в программе IQTree и фотография культуры *L. coprophilum*. Исследуемый вид выделен на древе красным цветом. Значения статистической поддержки < 50% не показаны.

ценции, что может свидетельствовать о локальной адсорбции наночастиц. (Рис. 5-6). Важно отметить, что флуоресцентный краситель (дибензилфлуоресцеин) распределен в массе наночастиц на стадии их получения, а не на их поверхности и не вымывается в водную фазу (Анненков et al., 2021). Поэтому для такого равномерного распределения свечения, как показано на Рис. 5-г, необходимо распределить наночастицы внутри гиф и/или подвергнуть их разложению с последующим распределением флуоресцентной гидрофобной метки внутри организма. Таким образом, наблюдаемое распределение красителя позволяет предположить, что помимо пассивной адсорбции, имеет место активный процесс поглощения наночастиц. Это наблюдение служит морфологическим свидетельством способности гриба не просто колонизировать поверхность нанопластиков, но и вовлекать их в свой метаболизм.

Культивирование *L. coprophilum* в дисперсиях нанопластиков сопровождалось подкислением среды (снижение pH на 0,3-0,5 единиц) по сравнению с контрольными измерениями (pH дисперсий ПММА - 6,82, ПВХ - 7,18 и ПС - 7,12). Наиболее выраженное изменение проявлялось в случае дисперсий ПС при 4°C (pH 6,71), это указывает на активный метаболизм гриба. Наблюдаемое подкисление

может быть следствием экскреции органических кислот, характерной для грибов при утилизации сложных субстратов.

Определение остаточной концентрации пластика в дисперсиях показало её уменьшение на 10,7, 17,3 и 10,4% для ПС, ПВХ и ПММА соответственно. Эти данные согласуются с результатами флуоресцентной микроскопии и косвенно указывают на активную биохимическую деградацию полимеров грибом. При этом контрольный эксперимент показал, что рост гриба также наблюдался и в растворе SDS, который использовался в качестве стабилизатора дисперсии. Однако концентрация SDS в дисперсиях на порядок ниже (примерно в 30 раз меньше), чем концентрация нанопластика, и он был преимущественно сосредоточен на поверхности частиц для обеспечения их устойчивости. Данные флуоресцентной микроскопии, демонстрирующие внутриклеточную равномерную локализацию флуоресценции, позволяют предположить, что несмотря на возможность метаболизма стабилизатора, наночастицы пластика также служат субстратом для роста грибного мицелия. Для однозначного разграничения вклада стабилизатора и полимерных частиц в метаболизм гриба требуются дополнительные исследования.

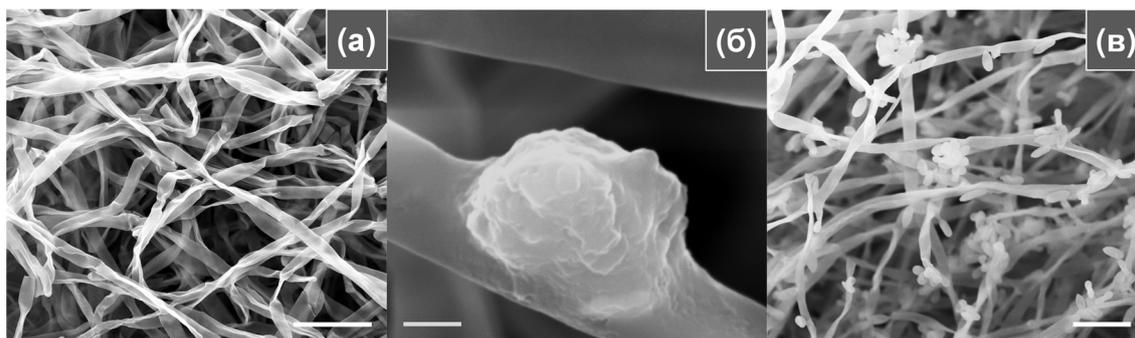


Рис.3. Микрофотографии СЭМ гладкостенного мицелия *L. coprophilum* (а), вздутых гиф и конидиофор с веретеновидными конидиями (б и в). Масштаб: (а) и (в) – 10 мкм, (б) – 1 мкм.

Критерий Краскела-Уоллиса показал, что тип полимера оказывает влияние на накопление биомассы мицелия *L. coprophilum* (Рис. 6). При температуре 10°C различия были статистически значимыми ($H=7,20$, $p=0,027$). При 4°C и 25°C наблюдалась выраженная тенденция к различиям ($p=0,058$ и $p=0,066$ соответственно), что, вероятно, связано с ограниченным объемом выборки ($n=3$). Во всех температурных режимах ПС способствовал наибольшему накоплению биомассы, за ним следовали ПММА и ПВХ. Полученные результаты указывают на то, что ПС является наиболее благоприятным субстратом для роста исследуемого микромицета. Это может объясняться различиями в гидрофобности и/или химической структуре полимеров, что влияет на адгезию и последующую колонизацию и поглощение мицелием. Пост-хок анализ с поправкой Холма-Бонферрони (критерий Данна) выявил, что при 10°C статистически значимое различие в накоплении биомассы наблюдается только между ПВХ и ПС ($Z = -2,683$, $p = 0,022$). Различия между парами ПММА-ПС ($Z = -1,342$, $p = 0,180$) и ПММА-ПВХ ($Z = 1,342$, $p = 0,180$) не достигли уровня статистической значимости, что скорее всего объясняется малым объемом выборки.

Изучение ферментативной активности гриба *L. coprophilum* показало (Таблица 2) наличие активности ферментов из группы гидролаз (амилазы, липазы и протеазы), среди которых особое значение в контексте данного исследования имеет липаза. Активность этого фермента, наряду с протеазой и амилазой, косвенно свидетельствует о способности гриба к гидролизу сложноэфирных связей, что является фундаментальным механизмом для атаки на синтетические полимеры, близкие по структуре к природным субстратам этих ферментов. Достаточно высокая активность внеклеточных липазы и протеазы при 4°C, наблюдаемая на фоне отсутствия или низкого прироста биомассы, свидетельствует об адаптивной направленности метаболизма *L. coprophilum* в данных условиях, так как колония в большей степени секретирует экзоферменты, а не растет. В целом, высокая внеклеточная липазная активность позволяет предположить, что данный фермент может играть ключевую роль в деградации ПММА, содержащего сложноэфирные группы.

Хотя ряд других грибов при использовании той же методики, что и в данной работе, показали положительную реакцию на лакказы (Полякова и др., 2025), исследуемый *L. coprophilum* не показал активности лакказ. В тоже время лакказы и близкие окислительные ферменты в ряде работ рассматриваются в качестве ключевых, исходных катализаторов биodeградации ПВХ (Kirbas et al., 1999; Zhang et al., 2022; Temporiti et al., 2022). Возможно, *L. coprophilum* свойственен принципиально иной, не-оксидативный механизм деструкции пластика.

4. Выводы

В результате проведенного исследования впервые экспериментально изучена способность микромицета *L. coprophilum* использовать наноча-



Рис.4. Фотографии дисперсий синтетических полимеров до (вверху) и после (внизу) посева гриба *L. coprophilum* и выдерживания в течение 76 дней при 10-11°C. Начальная концентрация наночастиц – 100 мг/л.

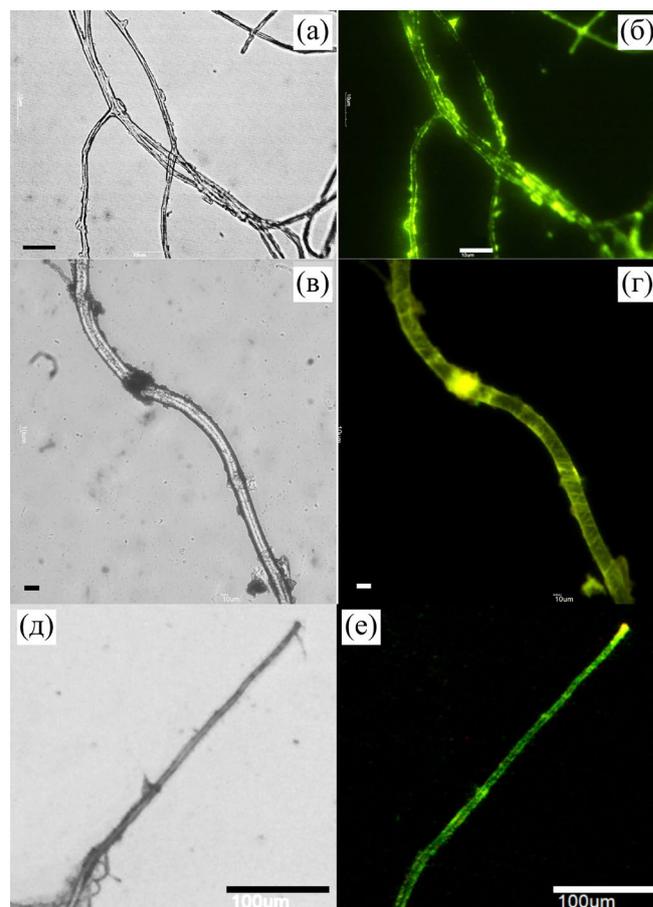


Рис.5. Световые и флуоресцентные микрофотографии гиф *L. coprophilum* после роста в среде с окрашенным флуоресцентным красителем нанопластиком: (а-б) – нестерильная дисперсия ПВХ, (в-г) – стерильная дисперсия ПВХ, (д-е) – стерильная дисперсия ПС. Зелёное свечение – флуоресценция частиц нанопластика. Масштаб: (а-б) – 10 мкм, (в-г) – 20 мкм, (д-е) – 100 мкм.

стицы синтетических полимеров — поливинилхлорида (ПВХ), полистирола (ПС) и полиметилметакрилата (ПММА) — в качестве субстрата для роста. Установлено, что данный вид гриба способен не только адсорбировать нанопластики на поверхности гиф, но и вовлекать их в свой метаболизм, что подтверждается данными флуоресцентной микроскопии, демонстрирующей внутриклеточную локализацию частиц, а также снижением концентрации полимеров в среде.

Показана зависимость накопления биомассы мицелия и от типа полимера, и от температуры. В частности, достоверная разница при 10°C в количестве биомассы наблюдалась между ПС и ПВХ. При этом ПС поддерживал стабильно высокий рост гриба при всех исследованных температурах (от 4 до 25°C). Для двух других пластиков — ПВХ и ПММА визуальный анализ данных показывает тенденцию к максимальному накоплению биомассы при 10°C. Медианные значения биомассы мицелия демонстрируют устойчивое ранжирование полимеров по степени благоприятности: ПС > ПММА > ПВХ, сохраняющееся при всех температурах культивирования. Однако для подтверждения оптимальной температуры роста на этих субстратах требуются дополнительные эксперименты с увеличенным количеством повторностей.

Достаточно высокая внеклеточная активность у *L. coprophilum* ферментов из класса гидролаз, в особенности липаз, свидетельствует о потенциальной способности к расщеплению сложноэфирных и других химических связей в полимерах. Отсутствие активности лакказ, часто рассматриваемых в качестве возможных агентов окислительной биодеструкции пластиков, у *L. coprophilum* указывает на возможность иного, не-оксидативного механизма деструкции. На сегодняшний день, механизм биодеструкции пластиков различными организмами мало изучен и наши данные также указывают, что он может протекать по нескольким траекториям.

Таблица 2. Ферментативная активность гриба *L. coprophilum*

Тип фермента	Субстрат	Температура, °C	Диаметр, мм	
			колонии	зоны реакции
Амилазы	Крахмал	4	0	0
		10	10.3 ± 0.4	16.7 ± 0.5
		25	30.3 ± 1.4	32.3 ± 1.4
Целлюлазы	Карбокси-метилцеллюлоза	4	0	0
		10	0	0
		25	0	0
Лакказы	ABTS	4	0	0
		10	0	0
		25	0	0
Липазы	Tween 20	4	0	30.3 ± 1.5
		10	13.8 ± 0.4	33.7 ± 1.2
		25	26.6 ± 0.5	47.3 ± 0.8
Протеазы	Обезжиренное молоко	4	8.3 ± 0.5	22.7 ± 1.0
		10	14.8 ± 1.0	30.0 ± 0.9
		25	37.3 ± 0.5	54.5 ± 0.6

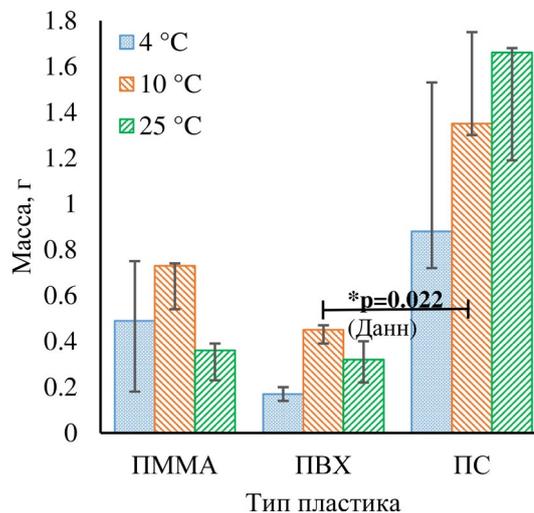


Рис.6. Сравнительный анализ накопления биомассы мицелия *L. coprophilum* в дисперсиях наночастиц ПВХ, ПММА и ПС при 4, 10 и 25°C. Представлены медианные значения. * – при температуре 10°C различия статистически значимы (пост-хок анализ с поправкой Холма-Бонферрони (критерий Данна), $p = 0,022$).

Таким образом, работа демонстрирует, что *L. coprophilum* — широко распространённый и биотехнологически значимый гриб — обладает способностью использовать в качестве субстрата различные типы нанопластиков. Это открывает перспективы для его рассмотрения в качестве потенциального агента для биоремедиации пластиковых загрязнений. Для подтверждения прямого процесса биодegradации, установления биохимических механизмов и оценки эффективности в реальных условиях необходимы дальнейшие исследования с увеличенным объёмом выборки. Полученные данные вносят вклад в понимание экологической роли микромицетов в биогеохимическом цикле пластиков и расширяют список организмов-кандидатов для разработки технологий экологической очистки.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9.

Авторы выражают благодарность Марселю Кабилову (ИХБФМ СО РАН, ЦКП «Геномика») за экспертные комментарии и всестороннее обсуждение результатов, которые способствовали улучшению данной работы, а также ЦКП «Ультрамикрoанализ» за предоставленное оборудование.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Полякова М.С., Пудовкина Т.А., Бедошвили Е.Д. и др. 2025. Новая экологическая ниша *Paraphaeosphaeria sporulosa*: таксономия, филогения и ферментативная активность. В: Тезисы докладов VIII Международной Верецагинской Байкальской конференции 8-14 сентября 2025. Иркутск: Издательство ИГУ, 469–470.

Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2021. Submicro- and nanoplastics: how much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution* 278: 116910. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116910](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910)

Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Annenkova N.V. et al. 2023. Uptake and effects of nanoplastics on the dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(5):1124–1133. DOI: [10.1002/etc.5604](https://doi.org/10.1002/etc.5604)

Anuar M.S.K., Khairuddin N.H., Zainal Z.S. et al. 2025. *Lecanicillium coprophilum*-mediated green synthesis of zinc oxide nanoparticles displaying antimicrobial activity against important rice pathogens. *Mycologia* 117(5): 801–817. DOI: [10.1080/00275514.2025.2525718](https://doi.org/10.1080/00275514.2025.2525718)

Baudrimont M., Arini A., Guégan C. et al. 2020. Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environmental Science and Pollution Research* 27: 3746–3755. DOI: [10.1007/s11356-019-04668-3](https://doi.org/10.1007/s11356-019-04668-3)

Doyle J.J., Dickson E.E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36: 715–722. DOI: [10.2307/1221122](https://doi.org/10.2307/1221122)

Goettel M.S., Koike M., Kim J.J. et al. 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology* 98(3): 256–261. DOI: [10.1016/j.jip.2008.01.009](https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009)

Gopinath S.C.B., Hilda A., Anbu P. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* 46(2): 119–126. DOI: [10.1007/S10267-004-0221-9](https://doi.org/10.1007/S10267-004-0221-9)

Ibrahim S.S., Ionescu D., Grossart H.-P. 2024. Tapping into fungal potential: Biodegradation of plastic and rubber by potent Fungi. *Science of The Total Environment* 934: 173188. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2024.173188](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173188)

Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K. et al. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods* 14(6): 587–589. DOI: [10.1038/nmeth.4285](https://doi.org/10.1038/nmeth.4285)

Khatua S., Simal-Gandara J., Acharya K. 2024. Myco-remediation of plastic pollution: current knowledge and future prospects. *Biodegradation* 35(3): 249–279. DOI: [10.1007/s10532-023-10053-2](https://doi.org/10.1007/s10532-023-10053-2)

Kheswa N., Gokul A., Dube N. 2025. Identification of novel polyethylene-degrading fungi from South African landfill soils: *Arthrographis kalrae*, *Lecanicillium coprophilum*, and *Didymosphaeria variabile*. *Biodegradation* 36(4): 71. DOI: [10.1007/s10532-025-10170-0](https://doi.org/10.1007/s10532-025-10170-0)

Kirbas Z., Keskin N., Güner A. 1999. Biodegradation of Polyvinylchloride (PVC) by White Rot Fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 63: 335–342. DOI: [10.1007/s001289900985](https://doi.org/10.1007/s001289900985)

Meng Y., Wellabada Hewage Don P.I.D., Wang D. 2022. A new strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from Tibetan Plateau and its insecticidal activity. *Microorganisms* 10(9): 1832. DOI: [10.3390/microorganisms10091832](https://doi.org/10.3390/microorganisms10091832)

Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A. et al. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution* 32(1): 268–274. DOI: [10.1093/molbev/msu300](https://doi.org/10.1093/molbev/msu300)

Palshin V.A., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2020. Fluorescent nanoplastic particles: synthesis and influence on diatoms. *Limnology and Freshwater Biology* 5: 1067–1072. DOI: [10.31951/2658-3518-2020-A-5-1067](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-5-1067)

Ramírez M.G.C., Rivera-Ríos J.M., Téllez-Jurado A. et al. 2012. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management* 95: S256-S259. DOI: [10.1016/j.jenvman.2010.10.045](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.045)

Saeed S., Iqbal A., Deeba F. 2022. Biodegradation study of Polyethylene and PVC using naturally occurring plastic degrading microbes. *Archives of Microbiology* 204: 497. DOI: [10.1007/s00203-022-03081-8](https://doi.org/10.1007/s00203-022-03081-8)

Sánchez C. 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances* 40: 107501. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2019.107501](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501)

Sendra M., Staffieri E., Yeste M.P. et al. 2019. Are the primary characteristics of polystyrene nanoplastics responsible for toxicity and ad/absorption in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*? *Environmental Pollution* 249: 610–619. DOI: [10.1016/j.envpol.2019.03.047](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.047)

Su L., Zhu H., Guo Y. et al. 2019. *Lecanicillium coprophilum* (Cordycipitaceae, Hypocreales), a new species of fungus from the feces of Marmota monax in China. *Phytotaxa* 387(1): 55–62. DOI: [10.11646/PHYTOTAXA.387.1.4](https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.387.1.4)

Sunitha V.H., Devi D.N., Srinivas C. 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences* 9(1): 01–09. DOI: [10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148](https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148)

Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725–2729. DOI: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197)

Temporiti M.E.E., Nicola L., Nielsen E. et al. 2022. Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms* 10(6): 1180. DOI: [10.3390/microorganisms10061180](https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180)

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18(1): 315–322.

Zhang Z., Peng H., Yang D. et al. 2022. Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae. *Nature Communications* 13:5360. DOI: [10.1038/s41467-022-32903-y](https://doi.org/10.1038/s41467-022-32903-y)

Coumarin-based dye for vital staining of cell cultures

Annenkov V.V.¹, Pal'shin V.A.*¹, Danilovtseva E.N.¹, Zelinskiy S.N.¹

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Fluorescent dyes are widely used in modern biochemical and biological research to assess, in particular, the functional state of cells, cellular components, tissues, and organisms. Blue fluorescent dyes offer the advantage of not interfering with the autofluorescence of biological media in the green-red spectrum. This study aims to design a new affordable blue fluorescent dye capable of penetrating living cells. The structure of prepared dye (ZS-833) combines the blue fluorophore 7-(diethylamino)coumarin with the dimethyl-2-butenedioate moiety. The utility potential of ZS-833 was tested with staining heterotrophic as well as naturally pigmented cells (the *Saccharomyces cerevisiae* yeast and *Gymnodinium corollarium* dinoflagellate). ZS-833 penetrates readily both types of living cells, making them bright fluorescent in the blue and green spectral ranges but leaving dead cells unstained. These data suggest ZS-833 as a promising agent for intravital cell culture staining and visualization of cellular components, especially nonpolar ones.

Keywords: coumarin, fluorescent dye, vital staining, *Gymnodinium corollarium*, *Saccharomyces cerevisiae*

For citation: Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. Coumarin-based dye for vital staining of cell cultures // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1343-1354. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1343

1. Introduction

Fluorescent dyes are widely used in biological and biochemical research for cell imaging and identification, flow cytometry, environmental monitoring, assessment of cell health and physiology, structure, and organelles. Fluorescein diacetate combined with ethidium bromide is conventional for differentiating living and dead cells. (Jarnagin and Luchsinger, 1980; Adams et al., 2014). Non-fluorescent fluorescein diacetate can penetrate living cells, where, affected by esterases, it turns into fluorescein of a bright yellow-green fluorescence. At the same time, the intact cell membrane is impenetrable to ethidium bromide; it stains dead species red-orange by binding to nucleic acids. Some fluorochromes of different colors were used to identify various cellular components, including plasma membrane, theca plates, trichocysts, nucleus, lipid bodies, and vacuoles in two dinoflagellates, *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans*, as well as the green algae *Dunaliella tertiolecta* (Klut et al., 1988). The cell polarity distribution was quantitatively measured with a spiropyran-based fluorescent probe RPS-1 (Park et al., 2020). Trypan blue, Evans blue and neutral red dyes are used to assess microalgae viability (Kim et al., 2024).

Nowadays, fluorescent dyes coming from fluorescein (green fluorescence) and rhodamine (yellow-red fluorescence) derivatives are the most popular (Lavis, 2017; Rajasekar, 2021). However, dyes emitting blue light are of special interest for biological research, since autofluorescence of biological objects usually lies in green or red spectral regions. Coumarin-based compounds are noteworthy among blue fluorochromes. Reactive derivatives of AMCA (aminomethyl coumarin acetic acid), such as the activated ester AMCA-sulfo-NHS, are used for covalent labeling of antibodies and proteins (Grünfelder et al., 2003). Non-fluorescent peptide derivatives of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) release highly fluorescent free AMC upon enzymatic cleavage that can be used to detect proteases (Gray and Sullivan, 1989). Coumarin 35 is applicable as a molecular probe for serum albumin and DNA, since in their presence, the dye fluorescence intensity increases by 30 and 8.5 times, respectively (Bayraktutan and Onganer, 2017). Hydrophobic coumarin-6 encapsulated in polymer nanoparticles was proposed for optical imaging of cancer (Gregoriou et al., 2023).

*Corresponding author. E-mail address: PVA666@lin.irk.ru (V.A. Pal'shin)

Received: November 24, 2025;

Accepted after revised: December 15, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



This study reports the synthesis of ZS-833, a dye based on coumarin and dimethyl 2-butenedioate moieties, which exhibits blue-green luminescence. The hydrophobic and weakly basic nature of the dye allows it to readily penetrate cell membranes to stain living cells. We tested it on cultures of the *Gymnodinium corollarium* dinoflagellate and the *Saccharomyces cerevisiae* yeast.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ethyl acetate (Vekton JSC, Petersburg, Russia) was washed with an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride, and distilled. Dichloromethane and hexane (Vekton JSC, Petersburg, Russia) were stirred with concentrated sulfuric acid for four hours, separated from the bottom acid layer, successively washed with distilled water, an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, followed by drying over anhydrous calcium chloride and distillation. Ethanol was refluxed with KOH and distilled. Acetonitrile was of HPLC grade "0" (Cryochrom LLC, St. Petersburg, Russia). 4-(Diethylamino)salicylaldehyde was 98% pure (Acros Organics). Trimethyl aconitate was synthesized according to (Kar and Argade, 2003). Piperidinium acetate was prepared by mixing equimolar amounts of glacial acetic acid and piperidine upon cooling, followed by grinding the resulting solid mass under dry nitrogen. Ethidium bromide (BioChemica) was used without prior purification. Deionized water (18.2 M Ω cm) was used to prepare aqueous solutions.

2.2. Synthesis of 1,4-dimethyl (2E/Z)-2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl)-2-butenedioate (ZS-833)

A mixture of 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde (1.17 g, 6.05 mmol), trimethyl aconitate (1.31 g, 6.06 mmol), piperidinium acetate (0.0513 g, 0.353 mmol) in 12 mL of acetonitrile was refluxed under nitrogen during 11.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was stirred with 45 mL of distilled water and left to separate. The dark brown oily bottom layer was separated, mixed with 20 mL of dichloromethane, washed with 20 mL of distilled water, and dried over potassium carbonate. Then, the solution was diluted with dichloromethane and mixed with flash chromatography grade silica gel (40-63 μ m). The solvent was evaporated on a rotary evaporator, and the loaded silica gel was used for flash chromatographic separation (silica gel 40-63 μ m, CH₂Cl₂: acetone = 10: 0.25, R_f = 0.49). Recrystallization from toluene yielded 0.56 g of the product (26%, Scheme 1). Its HPLC chromatogram contained two peaks of almost equal areas from the E- and Z-isomers with the identical ESI-MS spectra: 360.1367 ([M+H]⁺ calcd 360.1442), 382.1193 ([M+Na]⁺ calcd 382.1261), 719.2670 ([2M+H]⁺ calcd 719.2811), 741.2483 ([2M+Na]⁺ calcd 741.2630).

2.3. Instrumentation

HRMS analysis was performed on an Agilent 6210 TOF (time-of-flight) LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) System. A sample was dissolved in acetonitrile. Water and acetonitrile with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid were used as eluting solvents A and B, respectively. The initial mobile phase contained 15% (v/v) of solvent B and was changed linearly to 100% (35 minutes), then held for 25 minutes. The flow rate of the mobile phase was set at 0.1 mL/min. The mobile phase was varied linearly from 15% (v/v) of solvent B at the start to 100% over 35 minutes, then elution was held for 25 minutes more. The mobile phase flow rate was 0.1 mL/min. The conditions for TOF MS were as follows: the mass range was m/z 100 to 500, and scan time was 1 s with an interscan delay of 0.1 s; mass spectra were recorded under electrospray ionization (ESI)⁺, V mode, centroid, normal dynamic range, capillary voltage of 3500 V, desolvation temperature of 325 °C, and nitrogen flow of 5 L/min.

Absorption, excitation, and emission spectra were measured with a SM-2203 spectrofluorimeter (CJSC Spectroscopy, Optics and Lasers-Modern Developments, Republic of Belarus, Minsk) in 10 mm quartz cuvettes. A pulsed xenon lamp was used as an excitation source in the device.

The relative quantum yield of fluorescence was calculated using the equation (Levitus, 2020):

$$Q_S = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1-10^{-A_R}}{1-10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

where the subscripts S and R denote the sample and reference, respectively. Q_R is the known quantum yield of the reference standard; Int is the integrated fluorescence spectrum intensity; A is the absorbance of the solution at the excitation wavelength (λ_{ex}); and n is the refractive index of the solution solvent. Fluorescein disodium salt in 0.1 M NaOH was used as the reference standard.

Vital staining was traced with light and fluorescent microscopy performed on a MOTIC AE-31T inverted microscope with an HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for red, green and yellow emission, and 365 nm—for blue emission. A Moticam Pro 205A camera was used to record images.

2.4. Staining living organisms with ZS-833 dye

Strain *G. corollarium* SCCAP K-0983 was isolated from the northern part of the Baltic Sea, Sweden (Sundström et al., 2009). The monoculture was grown on the f/2-Si medium (Guillard and Ryther, 1962) based on artificial seawater (salinity 11%). Cultivation was carried out in 25–50 mL plastic flasks at a temperature of 4 °C and illumination of 13–21 μ mol·m⁻²·s⁻¹ with a day: night interval of 12: 12 h. To study dye uptake into cells, 0.5–1.25 μ L of a 1 mM solution of the dye was added to 0.5 mL of the medium with dinoflagellates, followed by observation using a fluorescence micro-

scope. During the observation, the dye concentration in the medium with cells was 1-2.5 μM .

The *S. cerevisiae* yeast, parent-type strain W303-1B (*MAT α ade2-1 his3-11 and 15 trp1-1 leu2-3112 ura3-1 [rho⁺]*) was procured from the collection of Siberian Institute of plant Physiology and Biochemistry (SIPPB SB RAS). The cells of *S. cerevisiae* were maintained at 30 °C on YEPD medium (0.5% yeast extract, 1% peptone, and 2% glucose). The cells were grown at 30 °C in 10 mL plastic vials with 2 mL of liquid YEPD. The experiments were carried out similarly to those described above for the dinoflagellate.

To confirm that ZS-833 dye enters only living cells, ethidium bromide was additionally used (Nikolova et al., 2002; Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014). Solutions of ZS-833 dye (1 μL , 1 mM) and ethidium bromide (0.5 μL and 2.5 mg/L) were added to 0.5 mL of the medium 20 minutes before the observation.

3. Results and discussion

ZS-833 dye was synthesized by the Knoevenagel reaction between 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde and trimethyl aconitate in the presence of piperidinium acetate (Scheme 1).

The absorption spectra of ZS-833 solutions demonstrate the main maximum in the range of 440-460 nm. In the case of an aqueous solution, the absorption maximum is shifted to a longer wavelength region relative to 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid (7-DCCA) and QA2 (Chatterjee and Seth, 2013; Zelinskiy et al., 2023) that may be attributed to a longer conjugation system (Fig. 1). When moving to less polar solvents in the water-ethanol-hexane series, a slight shift of the maximum to the shortwave region occurs (Fig. 2). In the case of a hexane solution, the absorption spectrum contains several peaks. For the excitation and emission spectra, a shift to the shortwave region is also observed in the water-ethanol-hexane sequence (Fig. 3). The excitation and emission spectra of an aqueous solution have relatively weak intensities. It may be explained by the poor solubility of the dye in water and its low quantum yield (the solubility limit is $\sim 2.5 \mu\text{M}$ versus $>10 \mu\text{M}$ for solutions in ethanol or hexane). The fluorescence quantum yield increases upon moving to less polar solvents and reaches 2.3% and 88.8% in water and hexane, respectively (Table 1). We observed a similar solvatochromic effect for other coumarin derivatives (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023).

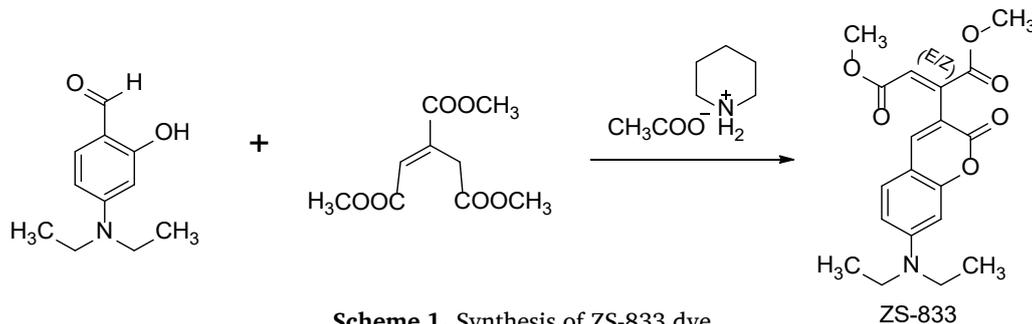


Table 1. Spectral characteristics and relative fluorescence quantum yield (Q) for ZS-833 in different solvents.

Solvent	λ_{ex} , nm	ε^*	Q, %
water	425	20.7	2.3
ethanol	450	25.9	23.8
n-hexane	408	28.1	88.8

Note: * – ε ($\times 10^{-3} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) is the extinction coefficient for the excitation wavelength.

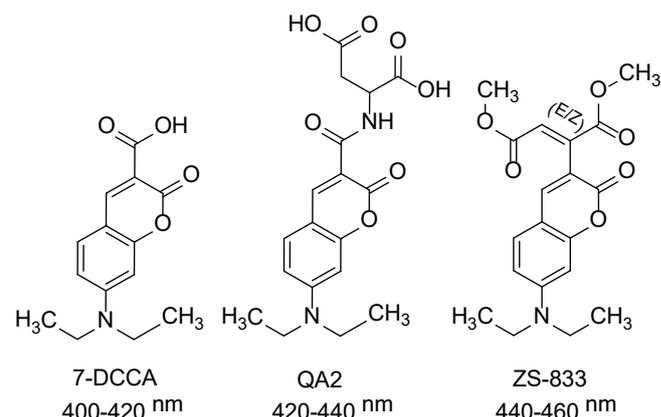


Fig. 1. Structures of 7-DCCA, QA2 and ZS-833 with their absorption maxima for an aqueous medium.

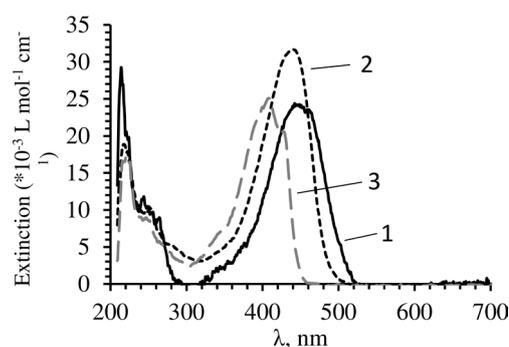


Fig. 2. Absorption spectra of ZS-833 in different solvents. 1–water; 2–ethyl alcohol (95%); and 3–n-hexane. C = 10 μM for ethyl alcohol and hexane, 2.5 μM for an aqueous solution.

The ability of the ZS-833 fluorescent dye to penetrate living cells was demonstrated using the dinoflagellates *G. corollarium* (Fig. 4d) and the *S. cerevisiae* yeast (Fig. 5a). In a culture medium containing ZS-833, the cells became luminous in blue and green colors characteristic of coumarin dyes (Zelinskiy et al., 2023; Annenkov et al., 2024). The QE2 coumarin-containing dye, which we previously synthesized, imparted only blue fluorescence to *G. corollarium* cells (Zelinskiy et al., 2025). However, in the case of the new dye, ZS-833, green fluorescence persisted during the initial moments of observation, then faded, giving way to the fluorescence of the cell's natural pigments (Fig. 4a-c). At the same time, the blue fluorescence of ZS-833 persisted throughout the observation period, revealing the intracellular structures of the dinoflagellate (Fig. 4e, f). During staining *S. cerevisiae* cells lacking their own pigments, the observed fluorescence was blue and green equally with no fading during the observation (Fig. 5b-d). Since the green fluorescence fading was absent for the yeast, it may be associated with an interaction between the dye and dinoflagellate cell pigments. This phenomenon requires further study.

Both species demonstrated uneven staining of intracellular structures (Figs. 4 and 5), which may result from uneven distribution of the dye within the cell as well as from a brighter fluorescence of its non-polar regions, as the fluorescence quantum yield of ZS-833 is higher for non-polar media (Table 1). It should be emphasized that the dye that we synthesized stains only living cells: when *S. cerevisiae* was stained both with ZS-833 and ethidium bromide, dead cells were stained only red by ethidium bromide that entered them (Fig. 5d).

4. Conclusion

We synthesized a new fluorescent, hydrophobic, and weakly basic dye, ZS-833, based on coumarin and dimethyl-2-butenedioate moieties. The dye effectively

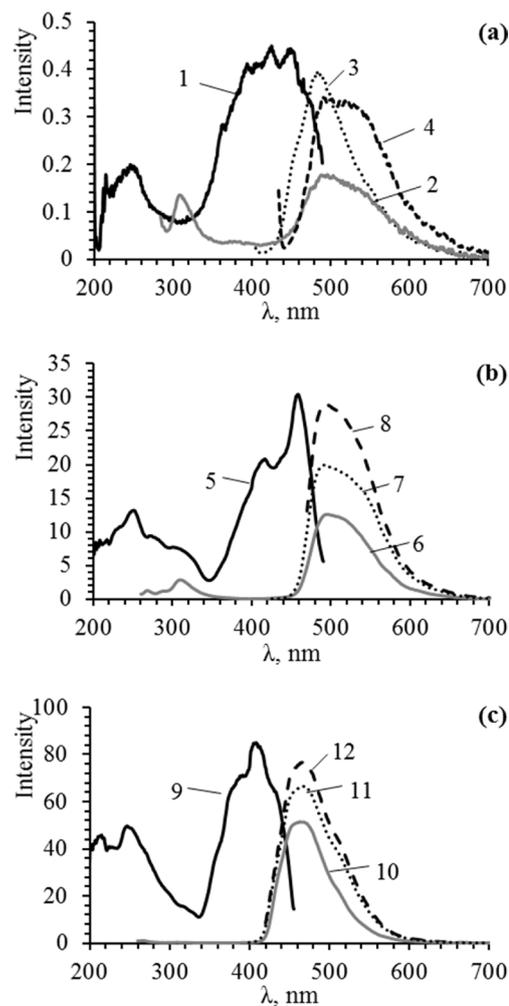


Fig. 3. Excitation (1, 5, and 9) and fluorescence spectra of ZS-833 in water (a), ethanol (b), and hexane (c). Emission wavelengths for the excitation spectra: 1 and 5–500 nm, and 9–465 nm. Excitation wavelengths: 2, 6, and 10–250 nm; 3–395 nm; 4–425 nm; 7–416 nm; 8–458 nm; 11–390 nm; and 12–408 nm. $C = 10 \mu\text{M}$ for ethyl alcohol and hexane, and $C = 2.5 \mu\text{M}$ for an aqueous solution. Monochromator slits are 10 nm for both input and output.

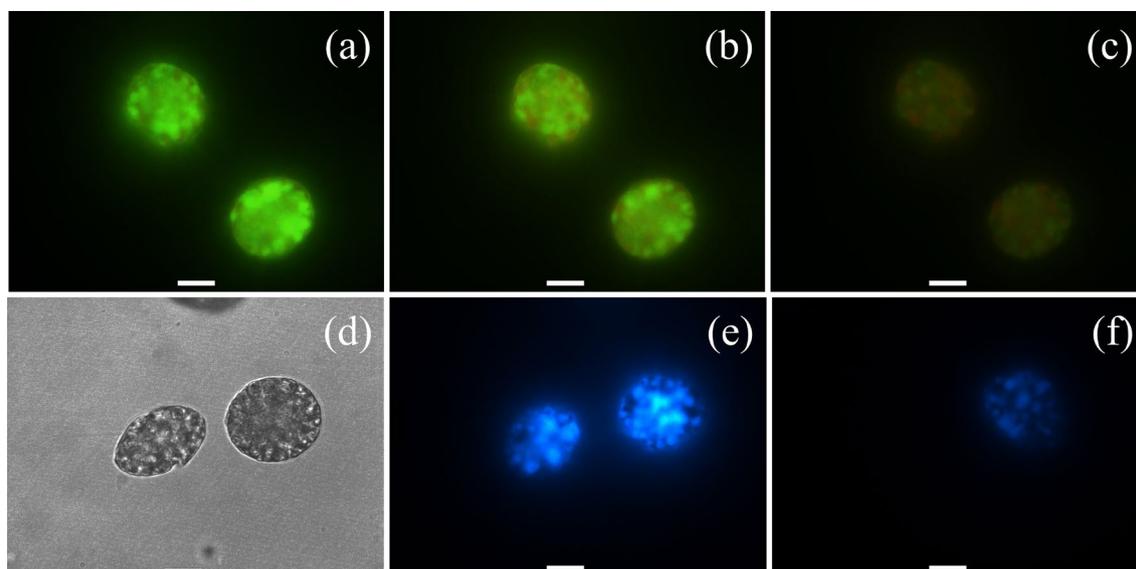


Fig. 4. Micrographs of the *G. corollarium* dinoflagellate after the addition of ZS-833: (a)–(c)–green fluorescence decreasing in brightness over time: (a)–the observation beginning; (b) and (c)–different time points within 30 s; (d)–visible light; (e) and (f)–blue fluorescence at the dye concentrations of 1 μM and 0.1 μM , respectively. Scale is 10 μm .

penetrates living cells with a rigid cell wall, such as the heterotrophic yeast, *S. cerevisiae*, and the photosynthetic dinoflagellate, *G. corollarium*. The bright fluorescence in the blue and green spectral regions visualizes this process. Blue fluorescence is optimal for observation of photosynthetic organisms, while green and blue emittances are equally effective for heterotrophic cells. The concentration range of the new dye from 0.01 to 0.1 μM is optimal to ensure high-quality images. The fluorescence of ZS-833 is enhanced in a non-polar environment, which may be helpful for selective staining of non-polar cell regions.

The obtained data allow us to consider ZS-833 a promising agent for intravital staining of cell cultures and visualization of cellular components in the study of their viability, structure and functions.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project No. 122012600070-9. The authors thank N.V. Annenkova for the assistance in the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adams J.K., Briski E., Ram J.L. et al. 2014. Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Management of Biological Invasions* 5(3): 197-208. DOI: [10.3391/mbi.2014.5.3.02](https://doi.org/10.3391/mbi.2014.5.3.02)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336-343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Annenkov V., Zelinskiy S., Pal'shin V. et al. 2024. Fluorescein-based vital dye for silicifying organisms. *Dyes and Pigments* 222: 111838. DOI: [10.1016/j.dyepig.2023.111838](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111838)
- Bayraktutan T., Onganer Y. 2017. Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent "light-up" probe for BSA and DNA monitoring. *Dyes and Pigments* 142: 62-68. DOI: [10.1016/j.dyepig.2017.03.019](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.03.019)
- Chatterjee A., Seth D. 2013. Photophysical Properties of 7- (diethylamino)Coumarin-3-carboxylic Acid in the Nanocage of Cyclodextrins and in Different Solvents and Solvent Mixtures. *Photochemistry and Photobiology* 89: 280-293. DOI: [10.1111/php.12000](https://doi.org/10.1111/php.12000)
- Gray C.J., Sullivan J.M. 1989. Synthesis of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) derivatives and their hydrolysis by plant cysteine proteinases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 46: 11-26. DOI: [10.1002/jctb.280460103](https://doi.org/10.1002/jctb.280460103)
- Gregoriou Y., Gregoriou G., Manoli A. et al. 2023. Photophysical and biological assessment of coumarin-6 loaded polymeric nanoparticles as a cancer imaging agent. *Sensors & Diagnostics* 2(3): 1277-1285. DOI: [10.1039/D3SD00065F](https://doi.org/10.1039/D3SD00065F)
- Grünfelder C.G., Engstler M., Weise F. et al. 2003. Endocytosis of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein via Clathrin-coated Vesicles, Sorting by Default in Endosomes, and Exocytosis via RAB11-positive Carriers. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2029 – 2040. DOI: [10.1091/mbc.e02-10-0640](https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0640)

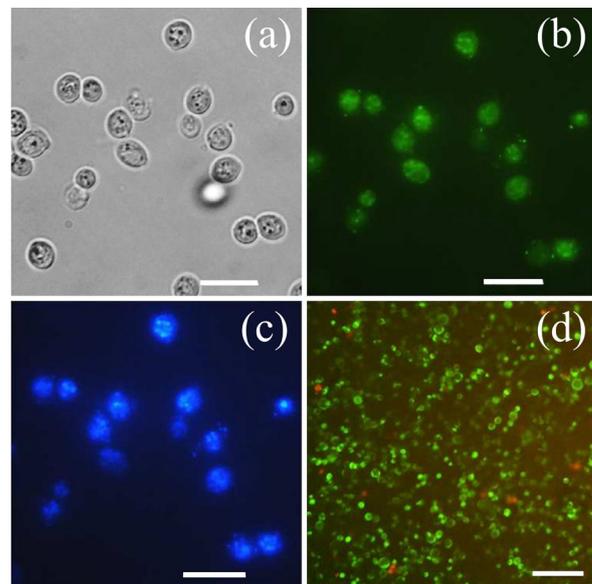


Fig.5. Visible (a) and fluorescent (b-d) micrographs of the *S. cerevisiae* yeast in 5 (a-c) and 20 minutes (d) after the addition of ZS-833, $C = 1 \mu\text{M}$. Green fluorescence (d) corresponds to the living cells with ZS-833; red fluorescence—the dead ones with ethidium bromide. Scale: (a-c) = 10 μm ; and (d) = 20 μm .

Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)

Jarnagin J.L., Luchsinger D.W. 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 55(4): 253-258. DOI: [10.3109/10520298009067249](https://doi.org/10.3109/10520298009067249)

Kar A., Argade N.P. 2003. A facile access to natural and unnatural dialkylsubstituted maleic anhydrides. *Tetrahedron* 59: 2991-2998. DOI: [10.1016/S0040-4020\(03\)00410-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00410-1)

Kim T., Pradhan B., Ki J.-S. 2024. Staining to machine learning: An emerging technology for determination of microalgal cell viability. *Journal of Applied Phycology* 36: 2573–2592. DOI: [10.1007/s10811-024-03274-2](https://doi.org/10.1007/s10811-024-03274-2)

Klut M.E., Bisputra T., Anita N.J. 1988. The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochemical Journal* 20: 35-40. DOI: [10.1007/bf01745967](https://doi.org/10.1007/bf01745967)

Kwolek-Mirek M., Zdrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* 14(7): 1068–1079. DOI: [10.1111/1567-1364.12202](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202)

Lavis L.D. 2017. Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. *Annual Review of Biochemistry* 86: 825–43. DOI: [10.1146/annurev-biochem-061516-044839](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839)

Levitus M. 2020. Tutorial: Measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)

Nikolova M., Savova I., Marinov M. 2002. An optimised method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. *Journal of Culture Collections* 3: 66-71. URL: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/1187/1/cc02010.pdf>

Park S.J., Juvekar V., Jo J.H. et al. 2020. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity. *Chemical Science* 11: 596-601. DOI: [10.1039/C9SC04859F](https://doi.org/10.1039/C9SC04859F)

Rajasekar M. 2021. Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications. *Journal of Molecular Structure* 1235: 130232. DOI: [10.1016/j.molstruc.2021.130232](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130232)

Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium Corollarium* sp. nov. (Dinophyceae)— A new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation

events in the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 952: 938-952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244-252. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-244](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-244)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu. et al. 2025. Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 1289–1304. DOI: [10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289)

Краситель на основе кумарина для прижизненного окрашивания клеточных культур

Анненков В.В.¹, Пальшин В.А.*¹, Даниловцева Е.Н.¹, Зелинский С.Н.¹

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 3 ул. Улан-Баторская, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Флуоресцентные красители находят широкое применение в современных биохимических и биологических исследованиях, позволяя, в частности, оценивать функциональное состояние клеток, клеточных компонентов, тканей и организмов. Красители с синей флуоресценцией обладают преимуществом, поскольку их свечение не перекрывается с автофлуоресценцией биологических сред в зелёно-красной области спектра. Целью данного исследования было создание нового доступного синего флуоресцентного красителя, способного проникать в живые клетки. Полученный краситель ZS-833 сочетает в своей структуре синий флуорофор 7-(диэтиламино)кумарин с диметил-2-бутендиоатом. Для оценки возможностей ZS-833 им окрашивали и гетеротрофные, и содержащие собственные пигменты клетки (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и динофлагелляты *Gymnodinium corollarium*). Показано, что ZS-833 способен быстро проникать в оба варианта живых клеток, придавая им яркое свечение в синей и зелёной области спектра. При этом мертвые клетки не окрашивались. Полученные данные позволяют рассматривать ZS-833 в качестве перспективного агента для прижизненного окрашивания клеточных культур и, визуализации клеточных компонентов, в особенности неполярно заряженных.

Ключевые слова: кумарин, флуоресцентный краситель, прижизненная окраска, *Gymnodinium corollarium*, *Saccharomyces cerevisiae*

Для цитирования: Анненков В.В., Пальшин В.А., Даниловцева Е.Н., Зелинский С.Н. Краситель на основе кумарина для прижизненного окрашивания клеточных культур // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1343-1354. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1343

1. Введение

Флуоресцентные красители находят обширное применение в биологических и биохимических исследованиях для визуализации и идентификации клеток, проточной цитометрии, мониторинга в экологических исследованиях, оценки здоровья и физиологии клеток, их структуры и органелл. Сочетание диацетата флуоресцеина и бромистого этидия является классическим для дифференциации живых и мертвых клеток (Jarnagin and Luchsinger, 1980; Adams et al., 2014). Нефлуоресцентный диацетат флуоресцеина способен проникать в живую клетку и под воздействием эстераз превращаться во флуоресцеин, обладающий яркой жёлто-зелёной флуоресценцией, то время как для бромистого этидия неповреждённая клеточная мембрана непреодолима, он окрашивает мертвые организмы в красно-оранжевый цвет, связываясь с нуклеиновыми

кислотами. С помощью ряда флуорохромов разных цветов у двух динофлагеллят (*Amphidinium carterae* и *Prorocentrum micans*) и зелёной водоросли *Dunaliella tertiolecta* удалось выявить различные клеточные компоненты, включая плазматическую мембрану, пластинки теки, трихоцисты, ядро, липидные тельца и вакуоли (Klut et al., 1988). Флуоресцентный зонд RPS-1 на основе спиропирановой системы позволил количественно измерить распределение клеточной полярности (Park et al., 2020). Для оценки жизнеспособности микроводорослей используются такие красители, как трипановый синий, синий Эванса и нейтральный красный (Kim et al., 2024).

В целом, на данный момент среди популярных флуоресцентных красителей доминируют производные флуоресцеина, обладающие зелёным свечением, и родамина, флуоресцирующие в жёлто-красной области спектра (Lavis, 2017; Rajasekar, 2021). Однако для биологических исследований

*Автор для переписки. Адрес e-mail: PVA666@lin.irk.ru (В.А. Пальшин)

Поступила: 24 ноября 2025;

Принята после доработки: 15 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



особый интерес представляют красители, испускающие синий свет, поскольку автофлуоресценция биологических объектов лежит, как правило, в зелёной, либо красной областях спектра. Среди синих флуорохромов можно отметить соединения на основе кумарина. Реакционноспособные производные АМСА (аминометилкумаринуксусная кислота), например, активированный эфир АМСА-sulfo-NHS применяют для ковалентного мечения антител и белков (Grünfelder et al., 2003). Нефлуоресцентные пептидные производные 7-амино-4-метилкумарина (АМС) при расщеплении ферментами высвобождают высокофлуоресцентный свободный АМС, что можно использовать для обнаружения протеиназ (Gray and Sullivan, 1989). Кумарин 35 может быть использован как молекулярный зонд чувствительный к сывороточному альбумину и ДНК, поскольку в их присутствии интенсивность свечения кумарина 35 увеличивалась в 30 и 8,5 раз соответственно (Bayraktutan and Onganer, 2017). Гидрофобный кумарин-6, инкапсулированный в полимерные наночастицы, был предложен для оптической визуализации рака (Gregoriou et al., 2023).

Настоящее исследование представляет синтез красителя ZS-833 на основе кумарина и диметил-2-бутендиоата, обладающего люминесценцией в сине-зелёной области спектра. Гидрофобный слабоосновный характер красителя позволил ему легко проникать сквозь клеточные мембраны, окрашивая живые клетки, что было протестировано на культурах динофлагеллят *Gymnodinium corollarium* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Материалы и методы

2.1. Реагенты

Этилацетат (АО «Вектон», Санкт-Петербург) промывали раствором гидрокарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция с последующей перегонкой. Дихлорметан (АО «Вектон», Санкт-Петербург) перемешивали с концентрированной серной кислотой в течение 4 часов, отделяли от нижнего кислотного слоя, последовательно промывали дистиллированной водой, водным раствором гидрокарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция и перегоняли. Гексан (АО «Вектон», Санкт-Петербург) очищали перемешиванием с серной кислотой, после этого промывали раствором соды и водой, осушали над хлоридом кальция и перегоняли. Этанол кипятили с КОН и перегоняли. Ацетонитрил был сорта 0 (ООО «Криохром», Санкт-Петербург). 4-(Диэтиламино)салицилальдегид был 98% чистоты (Acros Organics). Триметилаконитат синтезировали согласно (Kar and Argade, 2003). Ацетат пиперидиния получали смешением эквимолярных количеств ледяной уксусной кислоты и пиперидина при охлаждении с последующим перетиранием образовавшейся твёрдой массы в атмосфере сухого азота. Бромистый этидий (BioChemica) использовали без предварительной очистки. Для приготовления водных рас-

творов использовали деионизованную воду (18,2 МОм·см).

2.2. Синтез 1,4-диметил (2E/Z)-2-(7-(диэтиламино)-2-оксо-2H-1-бензопиран-3-ил)-2-бутендиоата (ZS-833)

Смесь 1,17 г (6,05 ммоль) 4-(диэтиламино)-2-гидроксibenзальдегида, 1,31 г (6,06 ммоль) триметилаконитата, 0,0513 г (0,353 ммоль) ацетата пиперидиния в 12 мл ацетонитрила кипятили с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 11,5 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакцию смесь перемешивали с 45 мл дистиллированной воды и оставляли для разделения фаз. Темно-коричневый маслянистый нижний слой отделяли, смешивали с 20 мл дихлорметана, промывали 20 мл дистиллированной воды и высушивали над карбонатом калия. Затем раствор разбавляли дихлорметаном и смешивали с силикагелем для флэш-хроматографии (40-63 мкм). Растворитель выпаривали на роторном испарителе, а силикагель с нанесённым образцом использовали для флэш-хроматографического разделения (силикагель 40-63 мкм, CH_2Cl_2 :ацетон = 10:0,25, $R_f = 0,49$). После перекристаллизации из толуола получили 0,56 г продукта (26%, схема 1). Его ВЭЖХ хроматограмма содержала два практически одинаковых по площади пика E- и Z-изомеров с одинаковыми спектрами ESI-MS: 360,1367 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ расч. 360,1442), 382,1193 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$ расч. 382,1261), 719,2670 ($[\text{2M} + \text{H}]^+$ расч. 719,2811), 741,2483 ($[\text{2M} + \text{Na}]^+$ расч. 741,2630).

2.3. Приборы

Анализ HRMS проводили при помощи системы Agilent 6210 TOF (времяпролетная) LC/MS (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия). Образец растворяли в ацетонитриле. В качестве элюирующих растворителей А и В использовали воду и ацетонитрил с 0,1% добавкой по объему трифторуксусной кислоты. Состав подвижной фазы линейно менялся от 15% растворителя В до 100% за 35 минут, затем элюирование продолжалось ещё в течение 25 минут. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,1 мл/мин. Условия проведения TOF MS: диапазон масс m/z от 60 до 3200, время сканирования 1 секунда с задержкой между сканированиями 0,1 с; масс-спектры записывали при ионизации электрораспылением (ESI)⁺, режим V, центроид, нормальный динамический диапазон, капиллярное напряжение 3500 В, температура десольватации 325 °С и поток азота 5 л/мин.

Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции измеряли в 1 см кварцевых кюветах на спектрофлуориметре CM-2203 (ЗАО «Спектроскопия, Оптика и Лазеры – Авангардные Разработки», Республика Беларусь, г. Минск). В качестве источника возбуждения в устройстве использовалась импульсная ксеноновая лампа.

Относительный квантовый выход флуоресценции рассчитывали по формуле (Levitus, 2020):

$$Q_S = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

где подстрочные индексы *S* и *R* обозначают краситель и стандарт сравнения. Q_R - известный квантовый выход стандарта сравнения, *Int* – интеграл спектра флуоресценции, *A* – поглощение при длине волны возбуждения флуоресценции (λ_{ex}), *n* – коэффициент преломления растворителя. В качестве стандарта сравнения использовали динариевую соль флуоресцеина в 0,1 М NaOH.

Изучения прижизненной окраски наблюдали при помощи световой и флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Длина волны возбуждения 470 нм для красной, зелёной и жёлтой эмиссии и 365 нм для синей эмиссии. Запись изображений осуществляли на камеру Moticam Pro 205A.

2.4. Окрашивание живых организмов красителем ZS-833

Штамм динофлагеллят *G. corollarium* SCCAP K-0983 выделен из северной части Балтийского моря, Швеция (Sundström et al., 2009). Монокультуру выращивали на среде f/2-Si (Guillard and Ryther, 1962) на основе искусственной морской воды (солёность 11%). Культивирование проводили в пластиковых колбах объёмом 25–50 мл при температуре 4 °С и освещённости 13–21 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ с режимом день: ночь 12: 12 ч. Для изучения вхождения красителя в клетку к 0,5 мл среды с динофлагеллятами добавляли 0,5 - 1,25 мкл красителя концентрацией 1 мМ и наблюдали вхождение красителя в клетки с помощью флуоресцентного микроскопа. Концентрация красителя в среде с клетками при наблюдении 1-2,5 мМ.

Дрожжи *S. cerevisiae*, штамм W303-1B (*MATa ade2-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3112 ura3-1 [rho⁺]*), получены из коллекции Сибирского института физиологии и биохимии растений (СИФИБР СО РАН). Клетки *S. cerevisiae* содержали при температуре 30 °С на среде YEPD (0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % пептона, 2 % глюкозы). Культуру клеток выращивали при температуре 30 °С в пластиковых флаконах объёмом 10 мл с 2 мл жидкой среды YEPD. Эксперименты проводили аналогично вышеописанному для динофлагеллят.

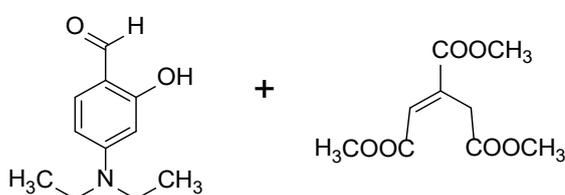


Схема 1. Синтез красителя ZS-833.

Для подтверждения того, что краситель ZS-833 входит только в живые клетки, дополнительно использовали бромистый этидий (Nikolova et al., 2002; Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014). К 0,5 мл среды добавляли 1 мкл красителя ZS-833 (1 мМ) и 0,5 мкл бромистого этидия (2,5 мг/л) за 20 минут до наблюдения.

3. Результаты и обсуждение

Краситель ZS-833 синтезировали по реакции Кневенагеля между 4-(диэтиламино)-2-гидроксипензальдегидом и триметилаконитатом в присутствии ацетата пиперидиния (Схема 1).

Основной максимум в спектрах поглощения растворов ZS-833 находится в диапазоне 440-460 нм. В случае водного раствора максимум поглощения смещен в более длинноволновую область относительно 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты (7-DCCA) и QA2 (Chatterjee and Seth, 2013; Zelinskiy et al., 2023), что связано с более длинной системой сопряжения (Рис. 1). При переходе к менее полярным растворителям в ряду вода – этанол – гексан происходит небольшое смещение максимума в коротковолновую область (Рис. 2). В случае раствора в гексане в спектре поглощения наблюдается несколько пиков. Для спектров возбуждения и испускания при переходе вода – этанол - гексан также наблюдается смещение в коротковолновую область (Рис. 3). Спектры возбуждения и испускания для водного раствора имеют довольно слабые интенсивности, что, связано с плохой растворимостью красителя в воде и маленьким квантовым выходом (предел растворимости около 2,5 мМ

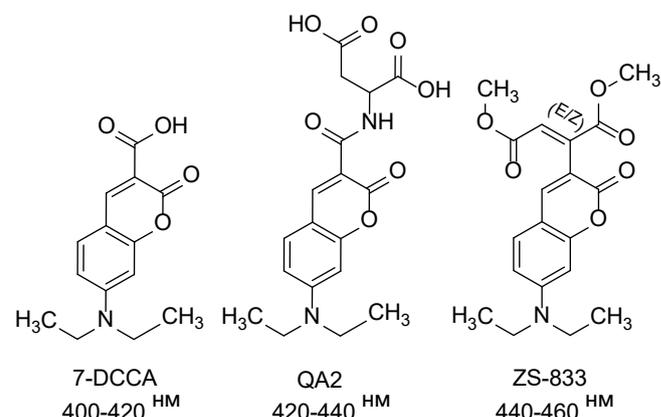
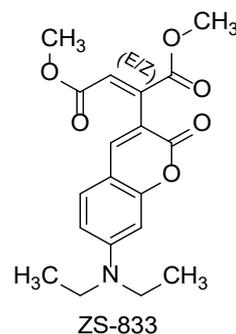


Рис.1. Структурные формулы 7-DCCA, QA2 и ZS-833 с максимумами поглощения в воде.



против более чем 10 μM для растворов в этаноле или гексане). Квантовый выход флуоресценции повышается при переходе к менее полярным растворителям и достигает 2,3 % и 88,8 % в воде и гексане соответственно (Таблица 1). Аналогичный сольватохромный эффект мы наблюдали для других производных кумарина (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023).

Способность флуоресцентного красителя ZS-833 проникать в живые клетки продемонстрирована на примере динофлагеллят *G. corollarium* (Рис. 4г) и дрожжей *S. cerevisiae* (Рис. 5а). В культуральной среде, содержащей ZS-833, клетки приобретали синее и зеленое свечения, характерные для кумариновых красителей (Zelinskiy et al., 2023; Annenkov et al., 2024). Синтезированный нами ранее кумарин-содержащий краситель QE2 придавал клеткам *G. corollarium* лишь синее свечение (Zelinskiy et al., 2025). Однако, в случае с новым красителем ZS-833 в первые моменты наблюдения сохранялась зеленая флуоресценция, затем затухая и уступая свечению пигментов самой клетки (Рис. 4а-в). В тоже время синяя флуоресценция ZS-833 сохранялась на протяжении всего времени наблюдений, выявляя внутриклеточные структуры динофлагеллят (Рис. 4д, е). При окрашивании клеток *S. cerevisiae*, лишенных собственных пигментов, в равной степени наблюдалось синие и зеленое свечения, не затухающие в процессе наблюдения (Рис. 5б-г). Поскольку эффект затухания зеленого свечения не наблюдался при окрашивании дрожжей, возможно, он обусловлен взаимодействием красителя с пигментами клеток динофлагеллят, этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Для обоих организмов показано неравномерное окрашивание внутриклеточных структур (Рис. 4 и 5), что может быть связано как с неравномерным распределением красителя внутри клетки, так и с более ярким свечением ее неполярных участков, поскольку в неполярной среде повышается квантовый выход флуоресценции ZS-833 (Таблица 1). Следует подчеркнуть, что синтезированный нами краситель окрашивает только живые клетки: при совместном окрашивании *S. cerevisiae* красителем ZS-833 и бромистым этидием мертвые клетки окрашивались лишь красным от вошедшего в них бромистого этидия (Рис. 5г).

4. Выводы

Синтезирован новый флуоресцентный гидрофобный слабоосновный краситель ZS-833 на основе кумарина и диметил-2-бутендиоата. Показано, что краситель способен эффективно проникать внутрь живых клеток, окруженных жесткой клеточной стенкой, таких как гетеротрофные дрожжи *S. cerevisiae* и фотосинтезирующие динофлагелляты *G. corollarium*. При этом визуализируется яркое свечение в синей и зелёной области спектра. Для фотосинтезирующих организмов оптимальнее использование синего свечения, в то время как для гетеротрофных клеток равно эффективно наблюдение в зеленом и синем свете. Оптимальный диапазон concentra-

Таблица 1. Спектральные свойства и квантовый выход люминесценции (Q) красителя ZS-833 в разных растворителях.

Растворитель	λ_{ex} , нм	ϵ^*	Q, %
вода	425	20,7	2,3
этанол	450	25,9	23,8
н-гексан	408	28,1	88,8

Примечание: * – $\epsilon \cdot 10^{-3}$ л моль⁻¹ см⁻¹ молярный коэффициент экстинкции на длине волны возбуждения.

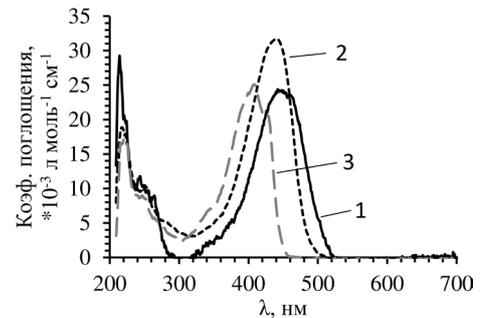


Рис.2. Спектры поглощения красителя ZS-833 в разных растворителях. 1 – в воде, 2 – в этиловом спирте (95%), 3 – в н-гексане. Концентрация 10 μM (2,5 μM для водного раствора).

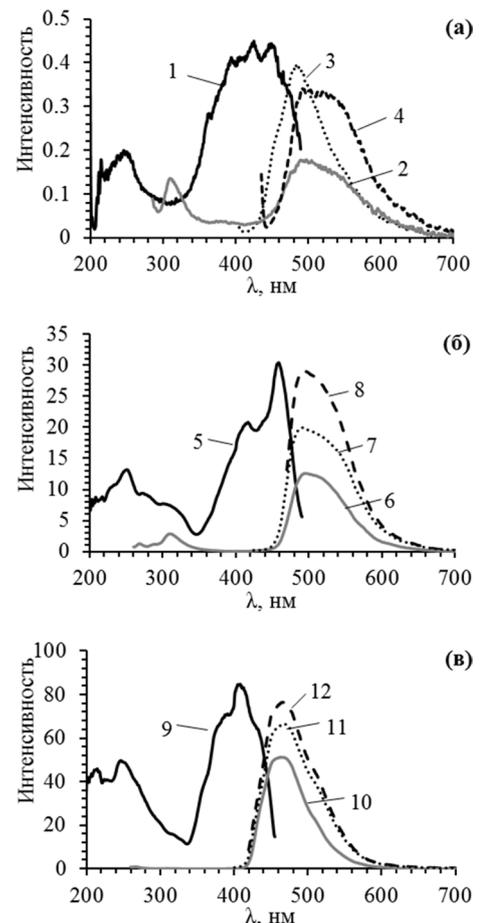


Рис.3. Спектры возбуждения (1, 5, 9) и флуоресценции красителя ZS-833 в воде (а), этаноле (б) и гексане (в). Длины волн испускания для спектров возбуждения: 1 и 5- 500, 9- 465 нм. Длины волн возбуждения: 2, 6, 10- 250, 3- 395, 4- 425, 7- 416, 8- 458, 11- 390, 12- 408 нм. Концентрация 10 μM (2,5 μM для водного раствора). Спектральные ширины щелей на возбуждение и испускание – 10 нм.

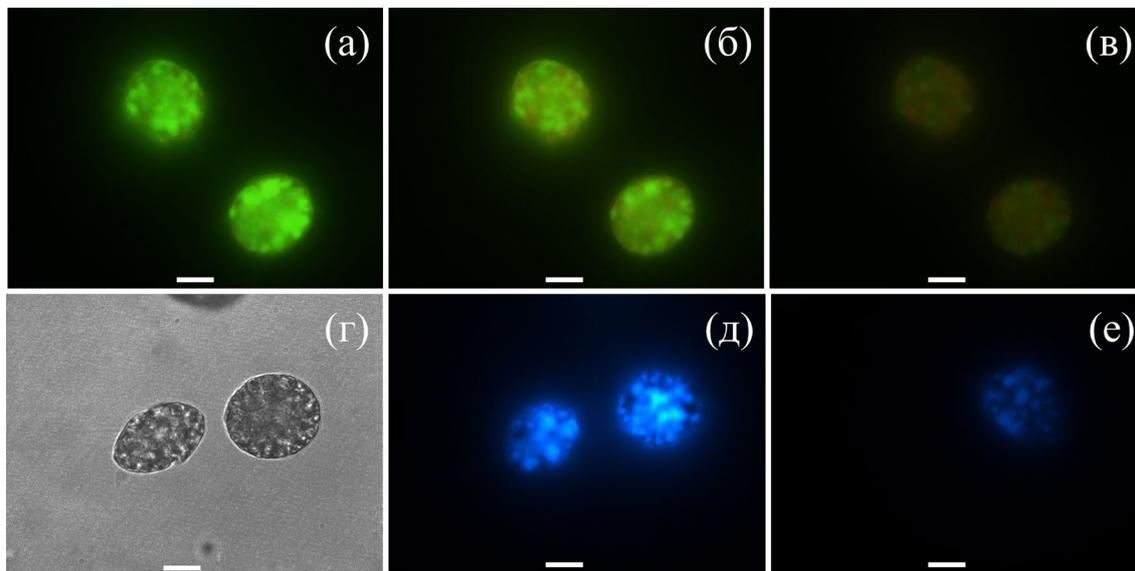


Рис.4. Микрофотографии динофлагеллят *G. corollarium* с добавлением красителя ZS-833: (а) – (в) – зеленая флуоресценция, с течением времени уменьшающая яркость: а) начало наблюдений, (б) и (в) – в разные моменты времени на масштабе 30 секунд. (г) – видимый свет, (д) и (е) – синяя флуоресценция при концентрациях красителя 1 μM и 0,1 μM соответственно. Масштаб 10 мкм.

ций нового красителя, обеспечивающий получение качественных изображений, составляет 0,01–0,1 мкМ. Флуоресценция ZS-833 усиливается в неполярном окружении, что может помочь избирательному окрашиванию неполярных областей в клетке.

Полученные данные позволяют рассматривать ZS-833 в качестве перспективного агента для прижизненного окрашивания клеточных культур и визуализации клеточных компонентов, изучения их жизнеспособности, строения и функций.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9. Авторы выражают благодарность Н. В. Анненковой за помощь в работе над финальным текстом публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Adams J.K., Briski E., Ram J.L. et al. 2014. Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Management of Biological Invasions* 5(3): 197-208. DOI: [10.3391/mbi.2014.5.3.02](https://doi.org/10.3391/mbi.2014.5.3.02)

Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336-343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)

Annenkov V., Zelinskiy S., Pal'shin V. et al. 2024. Fluorescein-based vital dye for silicifying organisms. *Dyes and Pigments* 222: 111838. DOI: [10.1016/j.dyepig.2023.111838](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111838)

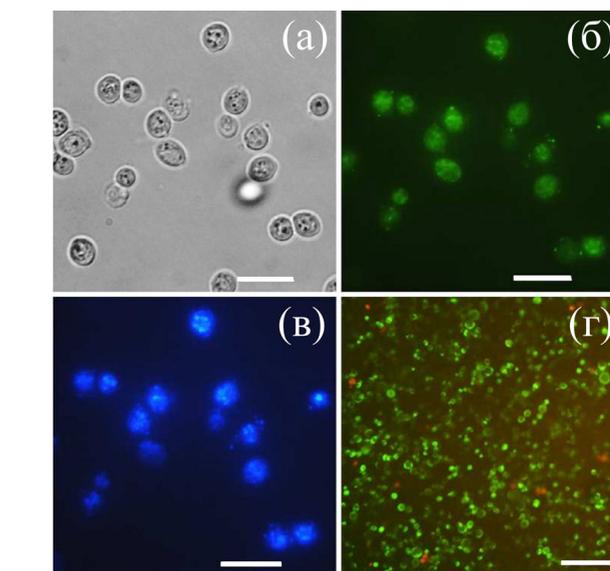


Рис.5. Видимая (а) и флуоресцентные (б-г) микрофотографии дрожжей *S. cerevisiae* через 5 мин (а-в) и 20 мин (г) после добавления красителя ZS-833-3 в концентрации 1 μM . Зеленая флуоресценция (г) соответствует живым клеткам с красителем ZS-833, красная – мертвым с бромистым этидием. Масштаб: (а – в) 10 мкм, (г) – 20 мкм.

Bayraktutan T., Onganer Y. 2017. Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent “light-up” probe for BSA and DNA monitoring. *Dyes and Pigments* 142: 62-68. DOI: [10.1016/j.dyepig.2017.03.019](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.03.019)

Chatterjee A., Seth D. 2013. Photophysical Properties of 7- (diethylamino)Coumarin-3-carboxylic Acid in the Nanocage of Cyclodextrins and in Different Solvents and Solvent Mixtures. *Photochemistry and Photobiology* 89: 280-293. DOI: [10.1111/php.12000](https://doi.org/10.1111/php.12000)

Gray C.J., Sullivan J.M. 1989. Synthesis of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) derivatives and their hydrolysis

by plant cysteine proteinases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 46: 11-26. DOI: [10.1002/jctb.280460103](https://doi.org/10.1002/jctb.280460103)

Gregoriou Y., Gregoriou G., Manoli A. et al. 2023. Photophysical and biological assessment of coumarin-6 loaded polymeric nanoparticles as a cancer imaging agent. *Sensors & Diagnostics* 2(3): 1277-1285. DOI: [10.1039/D3SD00065F](https://doi.org/10.1039/D3SD00065F)

Grünfelder C.G., Engstler M., Weise F. et al. 2003. Endocytosis of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein via Clathrin-coated Vesicles, Sorting by Default in Endosomes, and Exocytosis via RAB11-positive Carriers. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2029 – 2040. DOI: [10.1091/mbc.e02-10-0640](https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0640)

Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)

Jarnagin J.L., Luchsinger D.W. 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 55(4): 253-258. DOI: [10.3109/10520298009067249](https://doi.org/10.3109/10520298009067249)

Kar A., Argade N.P. 2003. A facile access to natural and unnatural dialkylsubstituted maleic anhydrides. *Tetrahedron* 59: 2991-2998. DOI: [10.1016/S0040-4020\(03\)00410-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00410-1)

Kim T., Pradhan B., Ki J.-S. 2024. Staining to machine learning: An emerging technology for determination of microalgal cell viability. *Journal of Applied Phycology* 36: 2573–2592. DOI: [10.1007/s10811-024-03274-2](https://doi.org/10.1007/s10811-024-03274-2)

Klut M.E., Bislputra T., Anita N.J. 1988. The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochemical Journal* 20: 35-40. DOI: [10.1007/bf01745967](https://doi.org/10.1007/bf01745967)

Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* 14(7): 1068–1079. DOI: [10.1111/1567-1364.12202](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202)

Lavis L.D. 2017. Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. *Annual Review of Biochemistry* 86: 825–43. DOI: [10.1146/annurev-biochem-061516-044839](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839)

Levitus M. 2020. Tutorial: Measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)

Nikolova M., Savova I., Marinov M. 2002. An optimised method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. *Journal of Culture Collections* 3: 66-71. URL: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/1187/1/cc02010.pdf>

Park S.J., Juvekar V., Jo J.H. et al. 2020. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity. *Chemical Science* 11: 596-601. DOI: [10.1039/C9SC04859F](https://doi.org/10.1039/C9SC04859F)

Rajasekar M. 2021. Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications. *Journal of Molecular Structure* 1235: 130232. DOI: [10.1016/j.molstruc.2021.130232](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130232)

Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium Corollarium* sp. nov. (Dinophyceae)— A new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 952: 938-952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244-252. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-244](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-244)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu. et al. 2025. Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 1289–1304. DOI: [10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289)

Unification of geological and geophysical characteristics of gas hydrate-bearing structures in Lake Baikal

Khabuev A.V.*^{ORCID}, Khlystov O.M.^{ID}

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. We carried out the unification of the geological and geophysical characteristics of the gas hydrate-bearing structures of Lake Baikal. For this purpose, we conducted a comprehensive compilation and analysis of all currently available primary and processed data. The study included a detailed examination of >400 seismic and acoustic profiles, 50 sonograms of side-view sonar, 60 bathymetric schemes of multipath echo sounder, and >1,000 primary descriptions of sediment cores. This resulted in the identification of six reference (model and typical) gas hydrate-bearing structures (two mud volcanoes, two hydrate mounds, and two seeps), which most fully characterize each of the listed types. Unification of characteristics of hydrate-bearing structures of Lake Baikal and allocation of supporting structures facilitates the research of already known ones and will help in the search for new places with near-surface gas hydrates in bottom sediments.

Keywords: unification, mud volcano, seep, hydrate mound

For citation: Khabuev A.V., Khlystov O.M. Unification of geological and geophysical characteristics of gas hydrate-bearing structures in Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1355-1366. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1355

1. Introduction

Research on gas hydrates in the World Ocean encompasses investigations of mud volcanoes, oil seeps, fault zones, methane emissions, and hydrocarbon reserves. To date, some studies have been conducted to synthesize a significant volume of information on this topic. Such works are primarily presented as catalogues and atlases (e.g., Yakubov et al., 1971; Aliyev et al., 2002; 2015) or as databases of specific measurements or phenomena (e.g., Etiope, 2009; Ershov and Bondarenko, 2020). Matveeva (2024) created a comprehensive database to assess the hydrocarbon resources of gas hydrates in the seas of Russia. Lake Baikal can also be classified as an aquatic area with hydrocarbon potential, a portion of which exists in the form of gas hydrates (Kontorovich et al., 2007). For the Baikal region, several databases exist, including a database of seismic faults (Lunina, 2016), a spatial database of ecosystems (Bazha et al., 2022), and a catalogue of data on regional earthquake epicenters since 1960 (<https://www.seis-bykl.ru/index.php>).

With the discovery of near-surface gas hydrates in Lake Baikal in 2000, geological and geophysical data

were collected throughout the lake in order to study the geology of their accumulations in the upper five-meter layers of bottom sediments. Over the 25 years of studies that were carried out throughout Lake Baikal, a large amount of data has been accumulated on the structure of the surface layer of the lake's sediments and the geology of gas hydrates in different geological settings. Multi-channel seismic surveys, which were conducted in 1989 and 1992, revealed that the sedimentary layer of the southern and central basins reaches a thickness of up to 10 km, and its age is estimated as the Oligocene-Miocene period (Hutchinson et al., 1992; Golmshtok et al., 1997). Numerous faults visible on the seismic profiles, which are a consequence of the high seismicity of the region, indicate the presence of effective migration pathways that allow deep-seated gas-saturated fluids to reach the bottom surface. Under suitable thermobaric conditions, below a certain depth (360-380 m for Lake Baikal), methane can form gas hydrates near the lake bottom (De Batist et al., 2002; Klerkx et al., 2003). Long-term geological, geophysical, and hydrological studies of the lake bottom have led to the discovery of >60 sites with near-surface gas hydrates. Some of these objects were studied in detail in De Batist et al. (2002),

*Corresponding author. E-mail address: shock@lin.irk.ru (A.V. Khabuev)

Received: November 07, 2025;

Accepted after revised: December 15, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Poort et al. (2012), Khabuev et al. (2016), Khlystov et al. (2017; 2019; 2022), Khlystov and Kalmychkov (2020), as well as Khlystov and Khabuev (2024). All the gas hydrate-bearing structures of the lake are divided into four types (mud volcanoes, hydrate mounds, seeps, and one pockmark). Their prospecting geological and geophysical features were substantiated in (Khlystov et al., 2018; Khlystov and Kalmychkov, 2020; Khlystov et al., 2022). The Novosibirsk mud volcano was identified as a reference (model) volcano containing all the features of mud volcanism (Khlystov and Khabuev, 2024).

Currently, combined information on individual structures or types of structures is difficult to find, since there is no single database on the gas hydrate-bearing structures in Lake Baikal, and information about each of them is scattered across different articles, where it is not fully presented. In this study, based on the analysis of all geological and geophysical data and the unification of the characteristics of each type of hydrate-bearing structures, we optimized their classification and identified several reference structures. A local database was created to facilitate work with diverse data on each of the support structures.

2. Materials and methods

Direct geological investigation of bottom sediments was conducted using a straight-flow gravity steel pipe with an outer diameter of 127 mm from the research vessel (R/V) “G.Yu. Vereshchagin” (The Center for Collective Use “Research vessels Center of LIN SB RAS on Lake Baikal”) and from the ice using a mobile winching system towed by “GAZ-66” vehicles. Gravity corers with lengths of 3.5 m and 5 m were employed, each equipped with a core catcher and an upper valve to prevent washout and loss of sediment and gas hydrates during retrieval. A plastic liner was inserted into the pipe to collect the bottom sediments and gas hydrates. Upon retrieval, the liner was extracted, cut longitudinally into two halves, producing a continuous geological section of bottom sediments up to 5 m long. The core was photographed, and a primary lithological description was carried out using the Munsell “Standard Soil Color Chart”. Intervals containing oxidized layers, carbonates, mud volcanic breccia, gas hydrates, and oil were identified. In total, >1000 sediment cores were collected in the gas hydrate-bearing structure areas, of which >360 cores contained gas hydrates.

Prior to core sampling across the lake’s water area, remote sensing of the sedimentary cover of Lake Baikal was conducted using different methods and equipment. Studies of the internal structure of the upper part of the geological section were carried out using continuous seismic profiling methods: the common depth point (CDP) reflection method (multichannel seismic survey), continuous seismic-acoustic profiling (CSAP) (single-channel), and profiling using a profiler. Each method had its own penetration depth into the bottom sediments and resolution. Essentially, they complemented each other in the search and study of gas hydrate-bearing structures. Geophysical surveys using the CDP method were conducted before the dis-

covery of gas hydrates. However, they suggested the presence of gas hydrates in Lake Baikal, and the first near-surface areas for their exploration were identified. Seismic surveys were carried out in 1989 and 1992, covering the eastern part of the southern basin of Lake Baikal, the majority of the central basin, and the southern part of the northern basin. An air gun with a volume of 27.3 liters was used as the signal source. The shot interval was four seconds. The receiver allowed recording from 96 channels with 24 common depth points. This equipment provided data with a vertical resolution of 10 m and a horizontal resolution of up to 300 m, as well as a penetration depth exceeding 3 km. The total length of the 60 profiles amounted to more than 2200 km (1992).

The non-linear signal processing (NSP) method was employed during geophysical exploration surveys between 1999 and 2008. A network of seismic lines covered unevenly most of the Lake Baikal water area. Elastic waves were generated using both the “Ship” and “Impulse-1” air guns, and the “Sparker” electro-spark source. A single-channel streamer was utilized as a receiver. This configuration enabled data acquisition with vertical and horizontal resolutions of 1-3 m and 80-170 m, respectively. Signal penetration into sediments ranged from 400 m (sparker) to 700 m (air gun). More than 200 seismic profiles, with a total length exceeding 3000 km, were analyzed.

The seismoacoustic profiler, which operates within a frequency range of 1 kHz to 8 kHz (typically 6 kHz), is based on the principle of emitting acoustic pulses vertically downward and recording echo signals reflected from the bottom surface and acoustic reflectors within the sub-bottom sedimentary sequence. This profiler could penetrate the bottom sediment section to depths down to 30 m. Over the past 25 years, >1500 line-kilometers of profiles have been acquired, with the majority conducted specifically in areas containing gas hydrate-related structures. Overall, >140 profiles intersecting hydrate-bearing structures have been analyzed.

For detailed investigation of the lake floor morphology and the search for gas hydrate-related features, surveys were carried out using side-scan sonar (SSS), single-beam, and multibeam echosounder. In 2009, the SEABEAM 1050 multibeam echosounder was deployed for the first time in Lake Baikal. This system operated at an acoustic frequency of 50 kHz, with 96 beams and a total swath width of 120°. The achievable horizontal resolution depended on water depth and varied from 5 to 40 m, representing at least a fourfold accuracy compared to previous bathymetric data. This resolution was sufficient for identifying negative and positive anomalies in the bottom relief associated with gas discharge and the accumulation of gas hydrates within sediments. The total length of survey lines amounted to 12,600 line-kilometers, covering an area of >15,000 km².

A single-beam echosounder was employed not only for tracking bottom irregularities and monitoring sampling operations but also for detecting gas seeps in bubble form (“gas flares”) above geological structures. The surveys utilized a Furuno FCV-1100 (Japan)

dual-frequency shipboard echosounder equipped with transducers configured for dual-frequency operation at 28 and 200 kHz, with a pulse duration of 1 ms. The single-beam transducers had beam widths of 21° at 28 kHz and 6° at 200 kHz.

The “SONIK-3” side-scan sonar (SSS) operated at a frequency of 30 kHz and recorded bathymetric anomalies at depths ranging from 5 to 1600 m with an accuracy of 0.5% or more of the depth value. Sonograms generated by the SSS displayed the morphology of the bottom topography, while the backscatter signal allowed for the identification of lithological features within the upper few meters of bottom sediments. Overall, the SSS surveys covered an area of 2,300 km² across the southern and central basins of Lake Baikal.

3. Results

Since the initial discovery of near-surface gas hydrate accumulations in Lake Baikal, >60 geological structures containing gas hydrates have been identified. These structures are classified into four main types: mud volcanoes, hydrate mounds, seeps, and a pockmark (Khlystov et al., 2018; Khlystov and Kalmychkov, 2020; Khlystov et al., 2022). With the growing number of new gas hydrate sites discovered annually, it has become necessary to standardize all prospecting indicators and geological and geophysical characteristics for sites having each of the four types. The unification required the identification of several reference (model) structures for each type, which collectively exhibit all the characteristic features of that type.

To standardize the characteristics of each structure, all available geological and geophysical information was compiled into tables. Analysis of these tables enabled the identification of two reference structures for each type, except for the pockmark type, as it currently has only a single representative. The standardized characteristics of these six reference hydrate-bearing structures and their locations on the floor of Lake Baikal are presented below (Fig. 1).

Gas hydrate-bearing mud volcanoes in Lake Baikal show positive topographic features, with lateral dimensions ranging from 300 to 1500 m and heights reaching up to 150 m. Their seismic records are characterized by a feeder conduit distinguished by chaotic seismic signal patterns. Gas emissions in bubble form (flares) are sometimes observed as acoustic anomalies in echograms above these volcanoes. A distinctive feature of mud volcanoes is mud breccia within their sedimentary sections—a matrix-supported deposit containing older, denser clay clasts that range in size from 1 mm upwards. Analysis of all available data indicates two subtypes of mud volcanoes in Lake Baikal: solitary and clustered complexes.

The Novosibirsk and AkademKhrebet mud volcanoes can be designated as reference structures for the solitary and clustered subtypes, respectively, as they embody the complete set of the aforementioned characteristics.

Previously, Khlystov and Khabuev (2024) described the Novosibirsk mud volcano in detail and

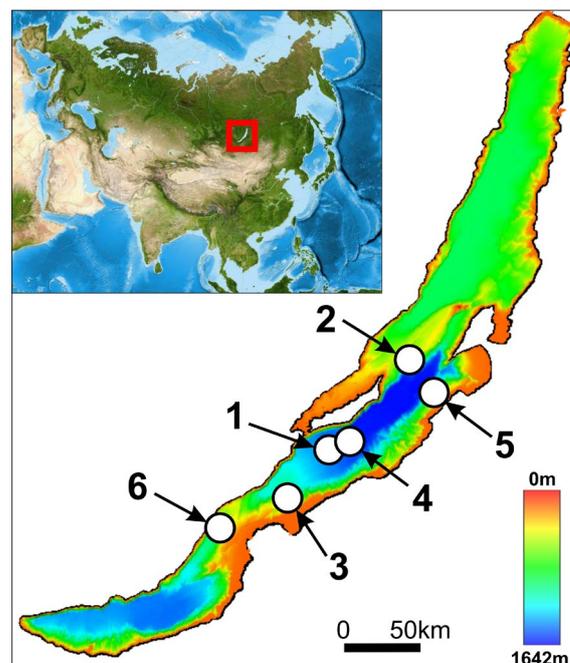


Fig.1. Location map of reference hydrate-bearing structures in Lake Baikal. 1–Novosibirsk; 2–AkademKhrebet; 3–K-11; 4–Novosibirsk-2; 5–Gorevoy Utes; 6–Krasny Yar.

defined it as a reference structure. It incorporates all the typical features of Baikal mud volcanoes and is the site for the most extensive geological and geophysical investigations. It is a positive topographic structure at a depth of 1400 m, with a height of 15-20 m and a diameter of 700-750 m, featuring a vertical gas channel that can be clearly identified on all types of seismic records. Over 10 profiles from various remote geophysical surveys intersect it. Episodic gas flares are visible in echograms above the volcano. Mud breccia was first discovered in this structure in 2005, followed by gas hydrates in 2010. Thirty cores were retrieved from the Novosibirsk mud volcano, the bulk of which contained breccia and five contained gas hydrates. Currently, it is the only mud volcano where mud breccia is found practically at the water-bottom interface; in others, it is buried beneath bottom sediments.

Khlystov et al. (2019) described the Akadem mud volcanic complex (AMVC) in detail. Located at depths of 500-800 m, this 6-km-long complex consists of a linear series of mud volcanoes, whose bases are interconnected. It was discovered in 2009 during a multibeam echosounder survey and is intersected by 10 seismic profiles. The seismic signal beneath the entire complex becomes chaotic, indicating a gas-saturated feeder zone; although individual volcanic conduits cannot be resolved. A persistent gas discharge in the form of flares is observed. Since 2014, geological sampling has yielded 38 cores, with 14 cores containing mud breccia and 15 cores containing gas hydrates. This complex provided the first material evidence in Lake Baikal for the shallow roots of mud volcanism, substantiating the concept of a “Baikal-type” mud volcanism (Khlystov et al., 2019).

Gas hydrate mounds are classified as a separate type of mud volcanoes for several reasons. One of them is the absence of mud breccia in core samples obtained

from these structures. However, breccia may be present at greater depths, as hydrate mounds share strong geophysical and geomorphological similarities with mud volcanoes. They form positive topographic features on the lake floor; seismic records often demonstrate underlying feeder channels, and gas flares are sometimes found above them. Their lateral dimensions range from 60 to 1000 m, with heights up to 80 m. The Novosibirsk-2 and K-11 gas hydrate mounds in the central basin are designated as reference structures. While hydrate mounds are among the least studied gas hydrate objects in the lake, these two possess a standardized set of characteristics for this type of structure.

The K-11 gas hydrate mound was discovered during side-scan sonar surveys in 2002 and 2005, as well as during a multibeam echosounder survey in 2009. It is a 20-m-high elevation with an area of 600 by 500 m at a depth of 430 m. Geological sampling retrieved five cores, two of which contained gas hydrates. Seismic records indicate an acoustically transparent channel beneath the mound. In recent years, gas discharge in the form of a flare has been recorded in echograms above this object (Fig. 2). This structure is clearly defined in the topography and is one of the few where a distinct gas channel is traceable, and episodic gas venting occurs, thus possessing the complete suite of standardized characteristics for hydrate mounds.

The Novosibirsk-2 gas hydrate mound was discovered in 2002 based on data from side-scan sonar (SSS) and seismoacoustic profiling. Due to its great depth (1510 m) and low relief (15 m), this structure is scarcely discernible in the bathymetry derived from multibeam echosounder surveys. However, on the SSS mosaic, it is identified in the relief by shadowing effects and by its distinct backscatter signal compared to the surrounding sediment types. A seismic profile runs directly through the structure, revealing an underlying zone with a chaotic signal pattern, interpreted as a potential gas conduit (Fig. 3). Gas discharge was not observed at this site. The presence of gas hydrates was confirmed in 2015. Four cores were retrieved from this structure, three of which contained gas hydrates. This structure is designated as a reference site, being the deepest known hydrate-bearing structure and one that exhibits the full set of diagnostic features identifiable using side-scan sonar.

The third type of hydrate-bearing structures—seeps—is distinguished by a limited number of characteristic features, which were only observed in specific individual structures. Seeps are not morphologically expressed in the bottom relief, making their detection via seafloor morphology challenging. The discovery of most seeps is primarily associated with the presence of active gas discharge recorded by echosounder.

Prior to the discovery of gas hydrates, these features were identified by the color of surface sediments, which were observed visually in cores or from submersibles. These two characteristics constitute the main prospecting indicators. Beneath each seep, an acoustically defined gas-saturated channel is observed on seismic records, even in the absence of active gas discharge during the survey. Only one seep—Krasny Yar—exhibited

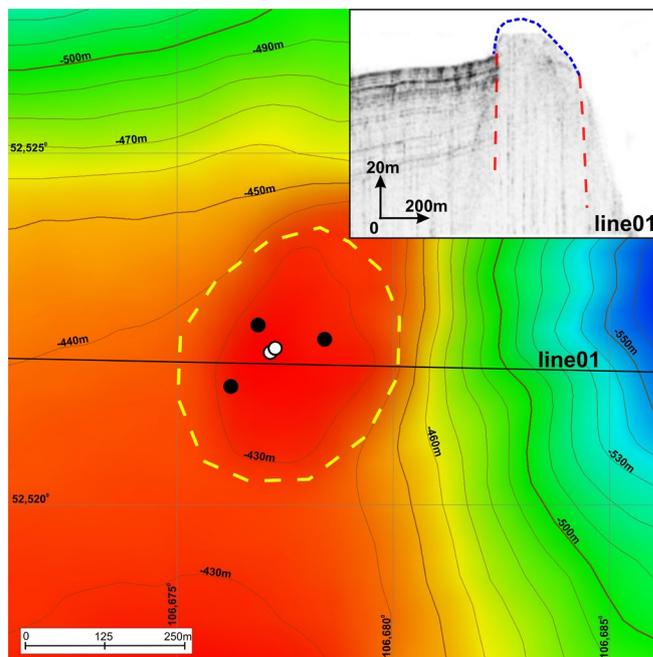


Fig.2. Bathymetric map of the area of the K-11 hydrate mound. The yellow dashed line marks the boundaries of the structure; the white dots indicate cores with hydrates, and the black dots—cores without hydrates. Inset: seismic profile where the blue dashed line marks the surface of the structure, and the red dashed line indicates the gas-saturated channel.

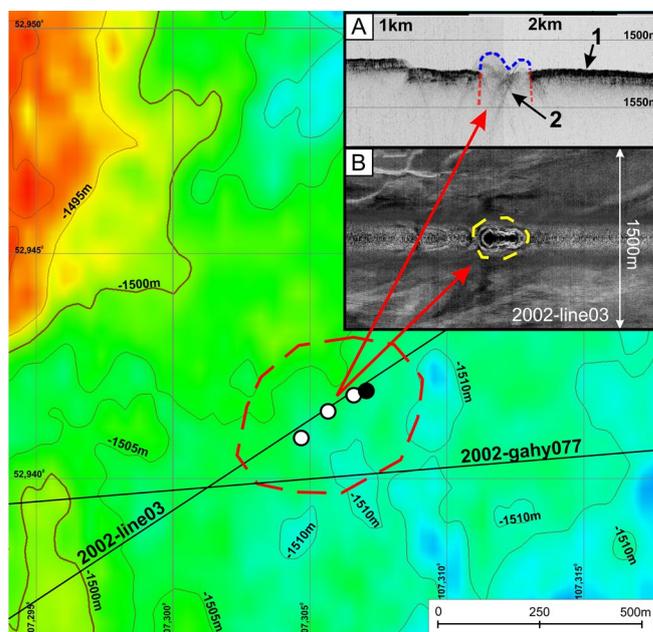


Fig.3. Bathymetric map of the area of the Novosibirsk-2 gas hydrate mound. The red dashed line marks the structure boundaries; the white dots indicate cores with hydrates, and the black dot—a core without gas hydrates. **Inset A:** Seismic profile 2002-line03: 1 – bottom and 2 – Novosibirsk-2 structure. The blue dashed line marks the structure surface, and the red dashed line—the gas-saturated channel. **Inset B:** side-scan sonar record of profile 2002-line03; the yellow dashed line outlines the Novosibirsk-2 structure.

an anomalous spot (530 by 490 m) on side-scan sonar records in 2007. This acoustic signature, similar to features in marine sediments, indicated near-surface gas hydrates (Khabuev et al., 2016). Above this structure, there is an acoustic gas flare on echograms, rising from a depth of 720 m and nearly reaching the lake surface. A total of 19 cores were retrieved from this site, 9 of which contained gas hydrates, with the surface sediment being unoxidized and having a brown color. Thus, this structure possesses all other standardized features (channel, flare, and surface sediment color), establishing it as a reference hydrate-bearing structure of this type. This structure, a typical marine-type seep but with Baikal-specific geochemical characteristics, is the subject of numerous publications (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020; Zemskaya et al., 2024).

In Lake Baikal, not only gas-bearing but also oil and gas hydrate-bearing seeps (sites with oil discharge/accumulation associated with gas venting) were discovered. The Gorevoy Utes structure was designated as a reference structure for this subtype. It was discovered through the analysis of satellite images from 2003 to 2005, which indicated a dark spot in the ice cover. Concurrent echosounder surveys detected an acoustic flare, and oil droplets were observed on the water surface. In 2006, the first cores containing both oil and gas hydrates in Lake Baikal were retrieved here (Khlystov et al., 2007). Overall, 50 cores were collected, with 10 containing gas hydrates and 17 containing oil. Furthermore, this area was studied in detail using the MIR submersibles, which revealed patches of grey and yellow sediments on the floor at the seep site, contrasting sharply with the surrounding brown silt. Within this seep area, gas hydrate-bitumen mounds (discharging both oil and gas) and bitumen mounds (discharging only oil) were also discovered. Seismic profiles delineated a narrow gas conduit beneath the site (Khlystov et al., 2007).

As a result of the unification of geological and geophysical information on all gas hydrate-bearing structures and the allocation of reference structures from them, we created the database “Reference hydrate-bearing structures of Lake Baikal”, which is visualized on the LIN SB RAS website (<http://lin.irk.ru/oporniki>), representing a set of tables and images linked together by hyperlinks. This facilitated the complex analysis of structures among themselves within each type and allowed us to optimize their classification according to the specified characteristics of the geological section. This will further help in the search for new hydrate-bearing structures at the bottom of Lake Baikal.

4. Conclusion

We unified the geological and geophysical characteristics of gas hydrate-bearing structures in Lake Baikal. This work enabled the identification of reference hydrate-bearing structures among mud volcanoes (Novosibirsk and AkademKhrebet), hydrate mounds (Novosibirsk-2 and K-11), and seeps (Krasny Yar and Gorevoy Utes).

We defined unique diagnostic features for each type of structure, which were exemplified by the selected reference sites. All the information used for this purpose was compiled into a database, facilitating further work with geological and geophysical data and helping in the search for new gas hydrate accumulations.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the Project of Limnological Institute Siberian Branch of Russian Academy of Sciences No. 0279-2021-0006.

The authors thank the crews of the research vessels “Titov” and “Vereshchagin” (Center for Collective Use “Research vessels Center of LIN SB RAS on Lake Baikal”) for assistance in conducting geological and geophysical work.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J. et al. 2019. Biogeochemical processes at the Krasny Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps. *Geo-Marine Letters* 39(1): 59–75.
- Aliyev Ad.A., Guliyev I.S., Belov I.S. 2002. Catalogue of recorded eruptions of mud volcanoes in Azerbaijan (1810–2001). Baku: Nafta-Press. (in Russian)
- Aliyev Ad.A., Guliyev I.S., Dadashev F.G. et al. 2015. Atlas of mud volcanoes of the world. Baku: Nafta-Press. (in Russian)
- Bazha S.N., Andreev A.V., Bogdanov E.A. et al. 2022. Spatial database of ecosystems of the Lake Baikal basin. *Aridnye ekosystemy [Arid ecosystems]* 28, 3(92): 14–22. DOI: [10.24412/1993-3916-2022-3-14-22](https://doi.org/10.24412/1993-3916-2022-3-14-22) (in Russian)
- De Batist M., Klerkx J., Van Rensbergen P. et al. 2002. Active Hydrate Destabilization in Lake Baikal, Siberia? *Terra Nova* 14(6): 436–442.
- Ershov V.V., Bondarenko D.D. 2020. Characteristics of the isotopic and chemical composition of gases emitted by mud volcanoes from different regions of the world. *Geocology. Engineering geology, hydrogeology, geocryology [Geoekologiya. Inzhenernaya geologiya, gidrogeologiya, geokriologiya]* 3: 23–35. DOI: [10.31857/S0869780920030029](https://doi.org/10.31857/S0869780920030029) (in Russian)
- Etiopie G. 2009. A global dataset of onshore gas and oil seeps: a new tool for hydrocarbon exploration. *Oil and Gas business [Neftegazovoe delo]* 2: 14. (in Russian)
- Golmshtok A.Y., Duchkov A.D., Hutchinson D.R. et al. 1997. Estimation of the heat flow on Lake Baikal based on seismic data of gas hydrate lower boundary. *Russian Geology and Geophysics* 38(10): 1677–1691.
- Hutchinson D.R., Golmshtok A.J., Zonenshain L.P. et al. 1992. Depositional and tectonic framework of the rift basins of Lake Baikal from multichannel seismic data. *Geology* 20(7): 589–592. DOI: [10.1130/0091-7613\(1992\)020](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1992)020)
- Khabuev A.V., Chenskiy D.A., Solovieva M.A. et al. 2016. Gas hydrate resources estimation by geophysical methods in “Krasny Yar” underwater gas seep of Lake Baikal. *Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Natural Sciences. Geology, prospecting and exploration of ore depos-*

its [Geologiya, poiski i razvedka rudnykh mestorozhdenii] 1(54): 67–74. (in Russian)

Khlystov O.M., Gorshkov A.G., Egorov A.V. et al. 2007. Oil in the Lake of World Heritage. *Doklady Earth Sciences* [Doklady Akademii Nauk] 414(5): 656–659. (in Russian)

Khlystov O.M., Minami H., Hachikubo A. et al. 2017. Age of mud breccia from mud volcanoes in Academician Ridge, Lake Baikal. *Geodynamics & Tectonophysics* [Geodinamika i tektonofizika] 8(4): 923–932. DOI: [10.5800/GT-2017-8-4-0324](https://doi.org/10.5800/GT-2017-8-4-0324). (in Russian)

Khlystov O.M., Khlabuev A.V., Minami H. et al. 2018. Gas hydrates in Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 66–70. DOI: [10.31951/2658-3518-2018-A-1-66](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2018-A-1-66)

Khlystov O.M., Poort J., Mazzini A. et al. 2019. Shallow-rooted mud volcanism in Lake Baikal. *Marine and Petroleum Geology* 102: 580–589. DOI: [10.1016/j.marpetgeo.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2019.01.005)

Khlystov O.M., Kalmychkov G.V. 2020. Baikal gas hydrates: history of discovery and main results. In: Kuzmin M.I. (Ed.), 30 years of the Baikal Drilling Program. Novosibirsk, pp. 278–294.

Khlystov O.M., Batist M., Minami H. et al. 2022. The position of gas hydrates in the sedimentary strata and in the geological structure of Lake Baikal. In: Jürgen Mienert (Ed.) *World Atlas of Submarine Gas Hydrates in Continental Margins*. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, pp. 465–515.

Khlystov O.M., Khlabuev A.V. 2024. «Novosibirsk» Mud Volcano and Evidence of Its Activations (Lake Baikal). *Geodynamics & Tectonophysics* [Geodinamika i tektonofizika] 15 (1): 1–8. DOI: [10.5800/GT-2024-15-1-0739](https://doi.org/10.5800/GT-2024-15-1-0739) (in Russian)

Klerkx Ya., Zemskaya T.I., Matveeva T.V. et al. 2003. Methane hydrates in the surface layer of deep-sea sediments of Lake Baikal. *Doklady Earth Sciences* 393(9): 1342–1346.

Kontorovich A.E., Kashirtsev V.A., Moskvina V.I. et al. 2007. Petroleum potential of Baikal deposits. *Russian Geology and Geophysics* 48(12): 1346–1356.

Lunina O.V. 2016. Digital map of faults for the Pliocene-Quaternary stage of the earth's crust development in the south of Eastern Siberia and the adjacent territory of Northern Mongolia. *Geodynamics & Tectonophysics* [Geodinamika i tektonofizika] 7(3): 407–434. DOI: [10.5800/GT-2016-7-3-0215](https://doi.org/10.5800/GT-2016-7-3-0215) (in Russian)

Matveeva T.V. 2024. Gas hydrates of Russian waters: geological features, resource base and study prospects. In: *Proceedings of the First Russian Gas Hydrate Conference*, pp. 181–186. DOI: [10.24412/cl-37274-2024-1-181-186](https://doi.org/10.24412/cl-37274-2024-1-181-186) (in Russian)

Pogodaeva T.V., Poort J., Aloisi G. et al. 2020. Fluid migrations at the Krasny Yar methane seep of Lake Baikal according to geochemical data. *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 123–131. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.08.003)

Poort J., Khlystov O.M., Naudts L. et al. 2012. Thermal anomalies associated with shallow gas hydrates in the K-2 mud volcano, Lake Baikal. *Geo-Marine Letters* 32(5): 407–417.

Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V. et al. 2024. Microbial communities in the fluid migration zone in the sediments of the Krasny Yar methane seep (South Baikal) *Limnology and Freshwater Biology* 4: 1155–1179. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-1155](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-1155)

Yakubov A.A., Alizade A.A., Zeynalov M.M. 1971. *Mud volcanoes of the Azerbaijan SSR*. Baku: Elm. (in Russian)

Унификация геолого-геофизических характеристик гидратоносных структур оз. Байкал

Хабуев А.В.*^{ORCID}, Хлыстов О.М.^{ORCID}

Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Проведена унификация геолого-геофизических характеристик гидратоносных структур озера Байкал. Для этого были собраны и проанализированы все имеющиеся на данный момент времени первичные и обработанные данные. Детально изучено более 400 сейсмоакустических профилей, 50 сонограмм гидролокатора бокового обзора, 60 участков рельефа дна данных многолучевого эхолота и более 1000 первичных описаний кернов донных отложений. В результате определены 6 опорных (модельных, образцовых) гидратоносных структур (2 грязевых вулкана, 2 гидратных холма и 2 сипа), которые наиболее полно характеризуют каждый из перечисленных их типов. Унификация характеристик гидратоносных структур озера Байкал и выделение опорных структур упростит исследования уже известных и поиск новых мест с содержанием в донных осадках приповерхностных газовых гидратов.

Ключевые слова: унификация, грязевой вулкан, сип, гидратный холм

Для цитирования: Хабуев А.В., Хлыстов О.М. Унификация геолого-геофизических характеристик гидратоносных структур оз. Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1355-1366. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1355

1. Введение

Изучение газовых гидратов в Мировом океане затрагивает исследования грязевых вулканов, нефтепроявлений, зоны разломов, эмиссии метана, запасов углеводородов. К настоящему времени проведен ряд работ по обобщению значительного объема информации в данной тематике. Такие работы представлены в основном в виде каталогов и атласов (Якубов и др., 1971; Алиев и др., 2002; 2015), либо баз данных конкретных измерений или явлений (Etiope, 2009; Ершов и Бондаренко, 2020). Для оценки ресурсов углеводородов газовых гидратов в акватории морей России создана обобщающая база данных (Матвеева, 2024). Озеро Байкал также можно отнести к акватории с углеводородным потенциалом, часть которого содержится в виде газовых гидратов (Конторович и др., 2007). Для Байкальского региона существуют базы данных, среди которых можно выделить базу данных сейсмических разломов (Лунина, 2016), пространственную базу данных экосистем (Бажа и др., 2022), каталог данных об эпицентрах региональных землетрясений с 1960 года (<https://www.seis-bykl.ru/index.php>).

С открытием приповерхностных газовых гидратов на Байкале в 2000 г. шло накопление геолого-геофизической информации на озере для поиска и изучения геологии их скоплений в первых 5 м донных отложений. За 25 лет работ, проведенных по всей акватории озера Байкал, накоплен достаточно большой массив данных о поверхностном строении донных отложений озера и скоплениях газовых гидратов в разных геологических обстановках. Многоканальные сейсмические исследования 1989-1992 гг. показали, что осадочная толща южной и средней котловин озера имеет мощность до 10 км, и ее возраст оценивается олигоцен-миоценовым временем. (Hutchinson et al., 1992; Golmshtok et al., 1997). Многочисленные разломы на сейсмических профилях, обусловленные высокой сейсмичностью региона, позволяют делать выводы о хороших коллекторах, по которым глубинные газонасыщенные флюиды достигают поверхности дна. При достаточных термобарических условиях, ниже определенной глубины воды (для Байкала это 360-380 м), метан может образовывать газовые гидраты вблизи поверхности дна (De Batist et al., 2002; Клеркс и др., 2003). Многолетние геолого-геофизические и гидрологические исследования дна позво-

*Автор для переписки. Адрес e-mail: shock@lin.irk.ru (А.В Хабуев)

Поступила: 07 ноября 2025;

Принята после доработки: 15 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



лили открыть более 60 мест с приповерхностными газовыми гидратами. Отдельные из них подробно рассмотрены в работах (De Batist et al., 2002; Poort et al., 2012; Хабуев и др., 2016, Хлыстов и др., 2017; Khlystov et al., 2019; 2022; Хлыстов и Калмычков, 2020; Хлыстов и Хабуев, 2024). Благодаря чему были выделены 4 типа гидратоносных структур (грязевые вулканы, гидратные холмы, сипы и пок-марки) и обоснованы их поисковые признаки по геолого-геофизическим данным (Khlystov et al., 2018, Хлыстов и Калмычков, 2020; Khlystov et al., 2022). Один из них, грязевой вулкан «Новосибирск», был определен как опорный (модельный), содержащие в себе все признаки грязевого вулканизма (Хлыстов и Хабуев, 2024).

Поиск объединенной информации по отдельным структурам или типам структур в настоящее время затруднен, так как нет единой базы данных по гидратоносным структурам озера, и информация о каждом из них разбросана по различным литературным источникам и представлена там в не полном объеме. В данной работе на основе анализа всех геолого-геофизических данных и унификации характеристик каждого типа гидратоносных структур, выполнена оптимизация их классификации и выделено несколько опорных структур. Для удобства работы с разнопрофильными данными по каждой из опорных структур создана локальная база данных.

2. Материалы и методы

Прямое геологическое исследование донных отложений осуществлялось с помощью прямооточной гравитационной стальной трубы наружным диаметром 127 мм с борта НИС «Г.Ю. Верещагин» (ЦКП «Центр комплексных судовых исследований Байкала») и со льда с помощью передвижного спускоподъемного комплекса, буксируемого автомобилями ГАЗ-66. Использовались гравитационные трубы длиной 3,5 и 5 м, каждая из которых оборудована кернорвателем и верхним клапаном, что препятствовало размыву и выпадению грунта и газовых гидратов при подъеме. Внутри трубы вставлялся пластиковый вкладыш, в который отбирались донные отложения и газовые гидраты. При подъеме вкладыш вынимался и разрезался вдоль на две половинки и получался непрерывный геологический разрез донных отложений до 5 м. Керн фотографировался, и проводилось первичное литологическое описание с использованием шкалы определения цвета почв «Standard soil color chart» системы Манселла. При этом выделялись интервалы, содержащие окисленный слой, карбонаты, грязевулканическую брекчию, газовые гидраты и нефть. Всего в районах гидратоносных структур было отобрано более 1000 кернов донных отложений, из которых более 360 содержали газовые гидраты.

До отбора кернов по акватории озера проводилось дистанционное зондирование осадочного чехла озера Байкал разными методами и оборудованием. Работы по изучению внутреннего строения верхней части геологического разреза проводились

методами непрерывного сейсмопрофилирования: методом обратных волн общей глубинной точки (МОВ-ОГТ) (многоканальная сейсмосьемка), методом непрерывного сейсмоакустического профилирования (НСП) (одноканальная) и профилированием с помощью профилографа. Каждый из методов имел свою глубину проникновения вглубь донных отложений и разрешение. По сути, они дополняли друг друга при поиске и изучении гидратоносных структур. Геофизические работы методом МОВ-ОГТ выполнялись до открытия газовых гидратов, но именно на их основе был сделан вывод о наличии гидратов в Байкале и определены первые районы их поиска вблизи поверхности. Сейсмические съемки проводились в 1989 и 1992 гг. и охватывали восточную часть южной, большую часть средней, и южную часть северной котловин. В качестве источника сигнала использовалась воздушная пушка объемом 27,3 л. Интервал между выстрелами составлял 4 мсек. Приемник позволял вести запись с 96 каналов, при этом количество общих глубинных точек составляло 24. Такое оборудование выдавало данные с разрешением 10 м по вертикали и до 300 м по горизонтали, глубина проникновения составляла более 3 км. Общая протяженность 60 профилей составила более 2200 км (1992 г).

Метод НСП применялся при поисковых геофизических работах 1999-2008 гг. Сеть профилей неравномерно покрывало практически всю акваторию озера Байкал. Источником упругих волн служили как воздушная пушка «Шип» и «Импульс-1», так и электроискровой источник «Спаркер». В качестве приемника использовалась одноканальная коса. Это позволяло получать данные с разрешением по вертикали и горизонтали – 1-3 м и 80-170 м, соответственно. Проникновение сигнала в осадки составляло от 400 (электроискровой источник) до 700 (воздушная пушка) метров. Проанализировано более 200 профилей общей протяженностью более 3000 км.

Сейсмоакустический профилограф, работающий на частоте от 1 кГц до 8 кГц (обычно 6кГц), реализован на принципе излучения акустических импульсов вертикально вниз и приеме эхо-сигналов, отраженных от поверхности дна и отражающих горизонтов поддонной осадочной толщи. Профилограф позволял зондировать разрез донных отложений мощностью до 30 м. За последние 25 лет получено более 1500 погонных километров профилей, большая часть из которых выполнялась именно в районах гидратоносных структур. Всего проанализировано более 140 профилей, секущих гидратоносные структуры.

Для детального изучения рельефа дна озера и поиска гидратоносных объектов выполнены съемки дна гидролокатором бокового обзора (ГБО), однолучевым и многолучевым эхолотами. В 2009 году впервые на озере Байкал применен многолучевой эхолот SEABEAM 1050. Он имел частоту излучения акустического сигнала 50 кГц, 96 лучей, общая полоса обзора составляет 120°. Разрешающая горизонтальная способность зависела от глубины воды и составляла от 5 до 40 метров, что минимум в 4

раза точнее предыдущих батиметрических данных. Этого было достаточно для поиска на дне отрицательных и положительных аномалий в рельефе, связанных с разгрузкой газа и накопления в донных отложениях газовых гидратов. Общая протяженность профилей составила 12600 погонных километров, а площадь съемки более 15000 км².

Одноручевой эхолот позволял не только отслеживать неровности дна и контролировать пробоотбор, но и вести поиск выхода газа в пузырьковой форме («факел») над структурами. Для работ использовался судовой двухчастотный эхолот Furuno FCV-1100 (Япония), оснащенный антеннами, настроенные на двухчастотный режим 28 и 200 кГц, длительность импульса составляла 1 мс. Одноручевые антенны имели диаграмму направленности 21° для 28 кГц и 6° для 200 кГц излучения.

ГБО «СОНИК-3» работал на частоте 30 кГц и регистрировал аномалии в рельефе дна на глубинах от 5 до 1600 м с точностью не хуже 0,5 % от значения глубины. На сонограммах ГБО отображались формы рельефа дна, а сигнал обратного рассеивания позволял отследить литологические особенности строения дна на глубину первых метров. Всего по Южному и Среднему Байкалу съемки ГБО выполнены площади равной 2300 км².

3. Результаты / Обсуждение

С момента обнаружения первых скоплений приповерхностных газогидратов на озере Байкал открыто свыше 60 геологических структур, содержащие газовые гидраты. Эти структуры разделены на 4 типа: грязевые вулканы, гидратные холмы, сипы и покмарк (Khlystov et al., 2018, Хлыстов и Калмычков, 2020; Khlystov et al., 2022). С ростом количества ежегодно открываемых новых мест с газовыми гидратами, стало очевидным, что требуется унификация всех поисковых признаков и геолого-геофизических характеристик этих мест по каждому из 4 типов. Для наглядности требовалось выделение в каждой из них нескольких опорных (модельных) структур, сочетающиеся в себе все признаки данного типа. Для унифицирования всех характеристик каждой структуры вся геолого-геофизическая информация по ним была сведена в таблицы, анализ которых позволил выделить по 2 структуры в каждом типе, за исключением покмарка, так как он пока является единственным представителем этого типа. Ниже приведены унифицированные характеристики 6 опорных гидратоносных структур и их положение на дне озера Байкал (Рис. 1).

Гидратоносные грязевые вулканы на озере Байкал имеют положительную форму рельефа с поперечными размерами от 300 до 1500 м и высотой до 150 м. На сейсмических записях у них имеется подводный канал, выделяющийся по хаотичному рисунку сейсмосигнала. Иногда в районе грязевого вулкана фиксируются выходы газа в пузырьковой форме в виде акустической аномалии скорости звука на эхограммах – «факел». Отличительной чертой грязевых вулканов является наличие в осадочном разрезе вулкана грязевулканической брекчия

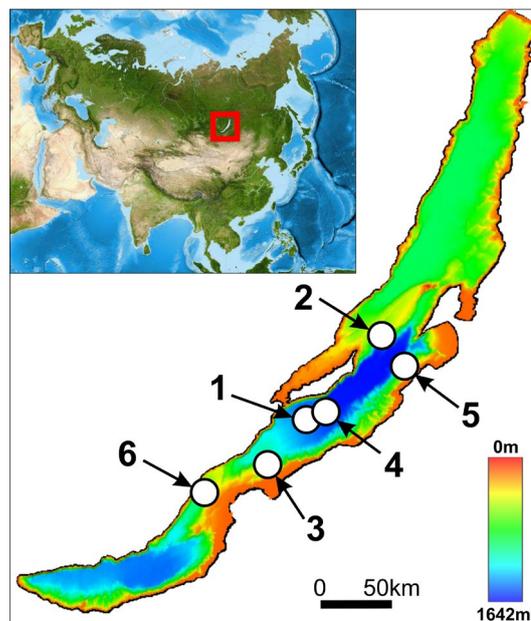


Рис.1. Карта-схема расположения опорных гидратоносных структур оз.Байкал. 1- «Новосибирск», 2- «АкадемХребет», 3- «К-11», 4- «Новосибирск-2», 5- «Горевой Утес», 6- «Красный яр».

– включения в глинистой матрице более древних и плотных обломков глин размерами от 1 мм. Как показал анализ всех данных о грязевых вулканах, на Байкале выделяются два подтипа – одиночные и групповые. Полным набором вышеперечисленных характеристик по каждому из подтипов можно выделить в качестве опорных грязевых вулканов - «Новосибирск» и «АкадемХребет».

Ранее грязевой вулкан «Новосибирск» был детально описан и определен нами, как опорный в работе Хлыстова и Хабуева (2024). Этот вулкан включает в себя все признаки и характеристики грязевых вулканов озера и обладает наибольшим количеством выполненных в его районе геолого-геофизических исследований. Он является положительной топоструктурой на глубине 1400 м. высотой 15-20 м и диаметром 700-750 м, с подводным вертикальным газовым каналом, хорошо фиксируемый на всех типах сейсмических записей. Всего его пересекает более 10 профилей разных типов дистанционного геофизического зондирования. Периодически над вулканом на эхограммах виден «факел». Впервые в данной структуре грязевулканическая брекчия была обнаружена в 2005 году, а газовые гидраты в 2010. Из грязевого вулкана «Новосибирск» было отобрано 30 кернов, большинство из которых содержали в себе брекчию, а 5 из них и газовые гидраты. Это пока единственный грязевой вулкан, где грязевулканическая брекчия практически выходит на раздел «вода-дно». В других вулканах она погребена донными отложениями.

Групповой комплекс грязевых вулканов «АкадемХребет» детально описан в работе (Khlystov et al., 2019). Этот комплекс на интервале глубин 500-800 м состоит из вытянутых в ряд грязевых вулканов, кратеры которых соединены между собой в основании на протяжении 6 км. Он был открыт по результатам съемки многоручевым эхолотом

в 2009 г. Этот комплекс пересекает 10 различных сейсмопрофилей. В этих местах сигнал становится хаотичным, т.е. вся зона под этим комплексом вулканов представляет собой газонасыщенный канал поступления материала с глубины, при этом выделить отдельные вулканические каналы не удалось. Газовая разгрузка в виде «факела» в районе данной структуры наблюдается постоянно. Начиная с 2014 года, в ходе геологических работ были отобраны 38 кернов, из них 14 с грязевулканической брекчией, а 15 с газовыми гидратами. Этот комплекс является первым местом на Байкале, где вещественно доказана малоглубинность корней грязевого вулканизма, что позволило обосновать существование Байкальского типа грязевого вулканизма (Khlystov et al., 2019).

Гидратные холмы выделены в отдельный тип от грязевых вулканов по ряду причин, одна из которых – это отсутствие грязевулканической брекчии в разрезе кернов, полученных с этих структур. Возможно, она есть на более глубоких горизонтах, так как гидратные холмы по геофизическим и геоморфологическим признакам они очень похожи на грязевые вулканы. Они имеют положительную форму в рельефе дна, и на сейсмических записях можно увидеть подводный канал, иногда над ними есть «факел». Их размеры в поперечных разрезах варьируются от 60 м до 1000 м и высотой до 80 м. К опорным структурам отнесены гидратные холмы «Новосибирск-2» и «К-11», расположенные в средней котловине озера. Гидратные холмы наименее изучены гидратоносные объекты на озере, но эти два обладают унифицированным набором характеристик данного типа гидратоносных структур.

Гидратный холм «К-11» обнаружен в ходе работ с ГБО в 2002 и 2005 гг. и многолучевым эхолотом в 2009 г. Он представляет собой возвышенность размерами 600 на 500 м и высотой 20 м на глубине 430 м. При геологическом опробовании было отобрано 5 кернов, в 2-х из которых находились газогидраты. Под возвышенностью имеется акустически прозрачный канал на сейсмических записях. Над этим объектом в последние годы на эхограммах отмечается разгрузка газа в виде «факела» (Рис. 2). Данная структура отчетливо видна в рельефе и одна из немногих, где отчетливо прослежен газовый канал и имеется эпизодический выход газа, т.е. обладает всем комплексом унифицированных характеристик гидратных холмов.

Гидратный холм «Новосибирск-2» открыт в 2002 году по результатам работ ГБО и сейсмоакустического профилографа. Из-за большой глубины (1510 м) и небольшой высоты (15 м) на данных съемки многолучевого эхолота эта структура практически не выражена в рельефе. Однако на мозаике ГБО она выделяется в рельефе по полутеням и по сигналу обратного рассеивания от окружающих типов осадка. Сейсмопрофиль проходит непосредственно через структуру, что позволило проследить на нем область с хаотичным рисунком сигнала под структурой, подобие газового канала (Рис. 3). Разгрузка газа здесь не отмечалась.

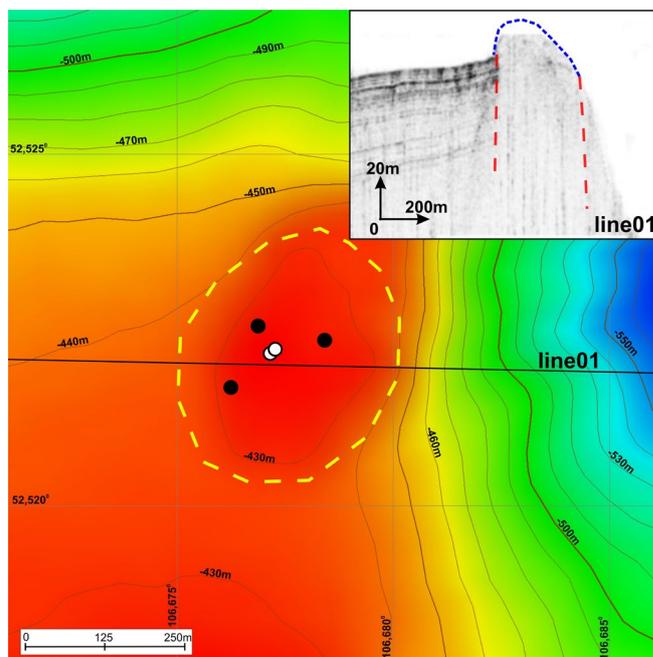


Рис.2. Батиметрическая схема района грязевого холма «К-11». Желтый пунктир – границы структуры, белые точки – керны с гидратами, черные точки – без гидрата. На врезке: сейсмический профиль, синий пунктир – поверхность структуры, красный – газонасыщенный канал.

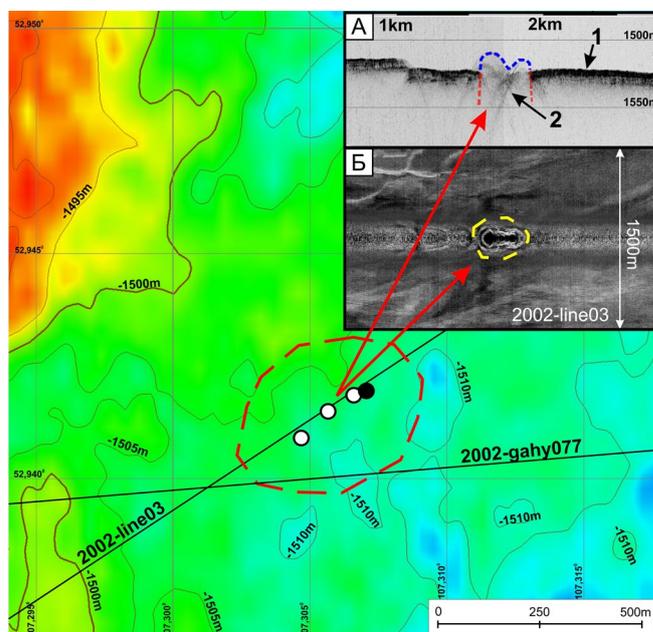


Рис.3. Батиметрическая схема района грязевого холма «Новосибирск-2». Красный пунктир – границы структуры, белые точки – керны с гидратами, черная точка – без гидрата. На врезке А: сейсмический профиль 2002-line03, 1 – дно, 2- структура «Новосибирск-2», синий пунктир – поверхность структуры, красный – газонасыщенный канал. На врезке Б: сонограмма ГБО профиля 2002-line03, желтым пунктиром – структура «Новосибирск-2».

Гидратоносность холма была доказана в 2015 г. На данной структуре отобрано 4 керна, 3 из которых содержат газовые гидраты. Эту структуру отнесли к опорным, как представителя самой глубоководной гидратоносной структуры и имеющей весь набор признаков, которые можно получить с помощью ГБО.

Третий тип гидратоносных структур – сипы, выделяется по немногочисленным признакам, которые встречались только в той или иной структуре. Сипы никак не выражены в рельефе, что затрудняет их поиск по морфологии дна. Их обнаружение у большинства связано с наличием разгрузки газа, фиксирующиеся на эхолоте. До находок газовых гидратов их идентифицировали по цвету поверхностного осадка, визуально наблюдаемого в кернах или с помощью подводных аппаратов. Это два основных поисковых признака. Под каждым из сипов на сейсмических записях отмечался акустический газонасыщенный канал, даже если разгрузка газа в момент съемки отсутствовала. Только у одного сипа – «Красный Яр», на сонограммах ГБО в 2007 г. отмечалось аномальное пятно в сигнале бокового отражения размером 530 на 490 м, которое, как и в морских осадках, характеризовало наличие в нем приповерхностных газовых гидратов (Хабуев и др., 2016). Над структурой на эхограммах присутствует «факел», почти достигающий поверхности озера с глубины 720 м. Количество отобранных кернов составляет 19 шт., из которых 9 с содержанием газовых гидратов, поверхностный осадок которых не был окисленным и имел коричневый цвет. Таким образом, у этой структуры присутствовали все остальные унифицированные признаки (канал, факел, цвет поверхностного осадка), поэтому данный сип был отнесен к опорным гидратоносным структурам данного типа. Именно этой структуре, как типичного морского сипа, но с байкальскими геохимическими особенностями, посвящены многие публикации (Aloisi et al., 2019; Pogodaeva et al., 2020; Земская и др., 2024).

На Байкале обнаружены не только газовые, но и нефтегазовые гидратоносные сипы (разгрузка/скопления нефти в месте разгрузки газа). К опорным нами была отнесена структура «Горевой Утес». Она открыта благодаря анализу спутниковых снимков 2003-2005 гг., на которых во льду было видно темное пятно, на эхограммах выявлен «факел», а на водной поверхности всплывающие капли нефти. В 2006 году впервые на Байкале здесь отобраны керны, которые одновременно содержали нефть и газовые гидраты (Хлыстов и др., 2007). Всего было отобрано 50 кернов, из которых 10 содержали газовые гидраты, а 17 нефть. Кроме того, этот район детально был исследован с помощью ГОА «МИР», что позволило обнаружить на месте сипа участки дна серого и желтого цветов, которые контрастно отличались от коричневого ила вокруг них. В районе этого сипа также открыты гидрато-битумные постройки, где шла разгрузка нефти одновременно с газом, и битумные постройки, где разгружалась только нефть. На сейсмопрофилях выделялся узкий газовый канал (Хлыстов и др., 2007).

В результате унификации геолого-геофизической информации по всем гидратоносным структурам и выделения из них опорных, была создана база данных «Опорные гидратоносные структуры оз. Байкал», которая визуализирована на сайте ЛИН СО РАН (<http://lin.irk.ru/oporniki>) и представляет собой набор таблиц и изображений, связанных между собой посредством гиперссылок.

4. Заключение

Проведена унификация геолого-геофизических признаков гидратоносных структур озера Байкал, которая позволила выделить опорные гидратосодержащие структуры среди грязевых вулканов («Новосибирск» и «АкадемХребет»), гидратных холмов («Новосибирск-2» и «К-11») и сипов («Красный Яр» и «Горевой Утес»). Для каждого типа структур выделены характерные только для него признаки и характеристики, которые нашли свое отражение в опорных структурах. Вся использованная для этого информация сведена в базу данных, которая упростит дальнейшую работу с геолого-геофизическими данными, и поможет в поисках и исследованиях новых гидратоносных объектов озера.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках темы государственного задания Лимнологического института СО РАН (0279–2021–0006).

Авторы выражают благодарность командам НИС «Титов» и НИС «Верещагин» (ЦКП «Центр комплексных судовых исследований Байкала») за помощь в проведении геолого-геофизических работ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Алиев Ад.А., Гулиев И.С., Белов И.С. 2002. Каталог зафиксированных извержений грязевых вулканов Азербайджана (1810–2001 гг.). Баку: Nafta-Press.
- Алиев Ад.А., Гулиев И.С., Дадашев Ф.Г. и др. 2015. Атлас грязевых вулканов мира. Баку: Nafta-Press.
- Бажа С.Н., Андреев А.В., Богданов Е.А. и др. 2022. Пространственная база данных экосистем бассейна оз. Байкал. Аридные экосистемы 28, 3(92): 14–22. DOI: [10.24412/1993-3916-2022-3-14-22](https://doi.org/10.24412/1993-3916-2022-3-14-22)
- Ершов В.В., Бондаренко Д.Д. 2020. Характеристика изотопного и химического состава газов, выбрасываемых грязевыми вулканами из разных регионов мира. Геоэкология. Инженерная геология, гидрогеология, геоэкология 3: 23–35. DOI: [10.31857/S0869780920030029](https://doi.org/10.31857/S0869780920030029)
- Земская Т.И., Ломакина А.В., Погодаева Т.В. и др. 2024. Микробные сообщества в зоне миграции флюидопотоков в донных отложениях метанового сипа Красный Яр (Южный Байкал). *Limnology and Freshwater Biology* 4: 1155–1179. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-1155](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-1155)

- Клеркс Я., Земская Т.И., Матвеева Т.В. и др. 2003. Гидраты метана в поверхностном слое глубоководных осадков озера Байкал. Доклады Академии Наук 393(6): 822–826.
- Конторович А.Э., Каширцев В.А., Москвин В.И. и др. 2007. Нефтегазонасность отложений оз. Байкал. Геология и геофизика 48(12): 1346–1356.
- Лунина О.В. 2016. Цифровая карта разломов для плейстоцен-четвертичного этапа развития земной коры Юга Восточной Сибири и сопредельной территории Северной Монголии. Геодинамика и тектонофизика 7(3): 407–434. DOI: [10.5800/GT-2016-7-3-0215](https://doi.org/10.5800/GT-2016-7-3-0215)
- Матвеева Т.В. 2024. Газовые гидраты российских акваторий: геологические особенности, ресурсная база и перспективы изучения. В: Материалы первой Российской газогидратной конференции, пос. Листвянка, С. 181–186. DOI: [10.24412/cl-37274-2024-1-181-186](https://doi.org/10.24412/cl-37274-2024-1-181-186)
- Хабуев А.В., Ченский Д.А., Соловьева М.А. и др. 2016. Оценка ресурсов газовых гидратов геофизическими методами в зоне подводной разгрузки газа на сипе «Красный Яр» озера Байкал. Известия Сибирского отделения РАН. Геология, поиски и разведка рудных месторождений 1(54): 67–74.
- Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В. и др. 2007. Нефть в озере мирового наследия. Доклады Академии Наук 414(5): 656–659.
- Хлыстов О.М., Минами Х., Хачикубо А. и др. 2017. Возраст грязевой брекчии грязевых вулканов Академического хребта озера Байкал. Геодинамика и тектонофизика 8(4): 923–932. DOI: [10.5800/GT-2017-8-4-0324](https://doi.org/10.5800/GT-2017-8-4-0324)
- Хлыстов О.М., Калмычков Г.В. 2020. Байкальские газовые гидраты: история открытия и основные результаты. В: Кузьмин М.И. (ред.), 30 лет программе «Байкал-бурение». Новосибирск, С. 278–294.
- Хлыстов О.М., Хабуев А.В. 2024. Грязевой вулкан «Новосибирск» и свидетельства его активизаций (оз. Байкал). Геодинамика и тектонофизика 15 (1): 1–8. DOI: [10.5800/GT-2024-15-1-0739](https://doi.org/10.5800/GT-2024-15-1-0739)
- Якубов А.А., Ализаде А.А., Зейналов М.М. 1971. Грязевые вулканы Азербайджанской ССР. Баку: Элм.
- Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J. et al. 2019. Biogeochemical processes at the Krasny Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps. *Geo-Marine Letters* 39(1): 59–75.
- De Batist M., Klerck J., Van Rensbergen P. et al. 2002. Active Hydrate Destabilization in Lake Baikal, Siberia? *Terra Nova* 14(6): 436–442.
- Etioppe G. 2009. A global dataset of onshore gas and oil seeps: a new tool for hydrocarbon exploration. *Электронный научный журнал Нефтегазовое дело* 2: 14.
- Golmshtok A.Y., Duchkov A.D., Hutchinson D.R. et al. 1997. Estimation of the heat flow on Lake Baikal based on seismic data of gas hydrate lower boundary. *Russian Geology and Geophysics* 38(10): 1677–1691.
- Hutchinson D.R., Golmshtok A.J., Zonenshain L.P. et al. 1992. Depositional and tectonic framework of the rift basins of Lake Baikal from multichannel seismic data. *Geology* 20 (7): 589–592. DOI: [10.1130/0091-7613\(1992\)020](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1992)020)
- Khlystov O.M., Khabuev A.V., Minami H. et al. 2018. Gas hydrates in Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 66–70. DOI: [10.31951/2658-3518-2018-A-1-66](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2018-A-1-66)
- Khlystov O.M., Poort J., Mazzini A. et al. 2019. Shallow-rooted mud volcanism in Lake Baikal. *Marine and Petroleum Geology* 102: 580–589. DOI: [10.1016/j.marpetgeo.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2019.01.005)
- Khlystov O.M., Batist M., Minami H. et al. 2022. The position of gas hydrates in the sedimentary strata and in the geological structure of Lake Baikal. In: Jürgen Mienert (Ed.), *World Atlas of Submarine Gas Hydrates in Continental Margins*. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, pp. 465–515.
- Pogodaeva T.V., Poort J., Aloisi G. et al. 2020. Fluid migrations at the Krasny Yar methane seep of Lake Baikal according to geochemical data. *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 123–131. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.08.003)
- Poort J., Khlystov O.M., Naudts L. et al. 2012. Thermal anomalies associated with shallow gas hydrates in the K-2 mud volcano, Lake Baikal. *Geo-Marine Letters* 32(5): 407–417.

Methodological aspects of estimating natural mortality coefficients for Baikal omul: a case study of the Selenga population

Anoshko P.N.[✉], Makarov M.M.*[✉]

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. This article presents a critical analysis of methods for estimating the instantaneous natural mortality coefficient (M) of Baikal omul, *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775), in the context of managing its commercial stock. The von Bertalanffy growth equation was parameterized based on growth and age structure data. A comparative analysis of existing M estimates in the Total Allowable Catch (TAC) materials for 2017–2025 revealed their significant variability, leading to threefold discrepancies in the calculated population biomass under equal recruitment. An important factor that determines the dynamics of cohort abundance and biomass is the extremely high post-spawning mortality (>90%) in the Selenga population. We substantiate the applicability of theoretical models based on life history invariants for calculating average M values (Jensen, 1996) using the maximum age concept (Shibaev, 2023). The resulting estimate based on maximum age, $\bar{M} = 0.19 \text{ yr}^{-1}$, and the ratio $M/K \approx 1.5$ yield more realistic projections consistent with historical fishery data. Consistency with key population indicators, taking into account the spatial heterogeneity of the stock, should represent the reliability criterion for any M estimation method.

Keywords: Baikal omul, mortality coefficients, population dynamics

For citation: Anoshko P.N., Makarov M.M. Methodological aspects of estimating natural mortality coefficients for Baikal omul: a case study of the Selenga population // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1367-1379. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1367

1. Introduction

The relevance of reliable assessment of commercial aquatic species populations is driven by increasing anthropogenic impact and the need to ensure sustainable resource reproduction. This task is particularly significant for Lake Baikal—a UNESCO World Heritage Site—where a balanced approach is required between conserving the unique ecosystem and the socio-economic needs of coastal regions, such as the development of fisheries and increasing employment (Anoshko et al., 2020; Sukhodolov et al., 2020; Sukhodolov et al., 2023).

Research demonstrates that the population of Baikal omul, a key commercial species, has experienced significant stock fluctuations for decades. After the fishing ban, which was introduced in 1969, and its subsequent lifting, catches stabilized at 2–3 thousand tons. Another decline in catches followed after 2003 (Sokolov and Peterfeld, 2011), which was predicted based on trawl-acoustic survey data and analysis of the

age structure of the feeding stock (Melnik et al., 2009). The subsequent increase in catches in 2009–2013 and a drop to 0.6 thousand tons in 2016 were officially attributed to changes in migration routes and stock reduction.

In the decade preceding the 2017 ban, virtual population analysis (VPA) was used to calculate total allowable catches (TAC). However, the lack of reliable fishery statistics and their complete absence after the industrial fishing ban make traditional biostatistical methods unsuitable for current conditions (Degtev, 2002). As an alternative, hydroacoustic surveys have been conducted since 2020, covering the entire lake area since 2024 (Bulatov et al., 2024). It is critically important for omul accounting, which inhabits depths down to 350 meters.

Because of the transition to new monitoring methods and the need for reliable forecasts, estimating the instantaneous natural mortality coefficient (M), which determines population dynamics, age structure,

*Corresponding author. E-mail address: mmsoft@hlsrver.lin.irk.ru (M.M. Makarov)

Received: November 10, 2025;

Accepted after revised: December 18, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



and productivity (Beverton and Holt, 1957; Nikolsky, 1966), becomes a key task. Despite an extensive arsenal of methods based on age structure analysis and life history invariants (Pauly, 1980; Jensen, 1996; Shibaev, 2015; 2023), their applicability to specific populations with unique habitat conditions requires separate justification.

Three morpho-ecological groups (MEGs) are distinguished for Baikal omul: pelagic, coastal, and benthic-deepwater. The Selenga population is primarily composed of the pelagic MEG characterized by an extremely high level of post-spawning mortality (exceeding 90%) due to extensive spawning migrations (up to 580 km) (Bazov et al., 2022; 2024), as well as efficient utilization of the mesozooplankton stock in the lake's pelagic zone during its mass development. Unlike other MEGs, the pelagic group primarily spawns only in one river, the Selenga, and is the main stock component in the southern and central parts of the lake, making it an optimal object for this study.

The aim of this study is to conduct a comparative analysis of existing M estimates for Baikal omul and to assess the possibility of applying theoretical models based on life history invariants for subsequent use in stock forecasts.

2. Materials and methods

This study is based on literature sources and the personal materials of the authors. The fundamental equation by F.I. Baranov was the theoretical basis for mortality estimation, describing the exponential decline of a cohort over time: $N_t = N_0 e^{-Mt}$, where N_t is the number of fish at age t ; N_0 is the initial number; and M is the instantaneous natural mortality coefficient (Shibaev, 2015).

Data on the growth of Baikal omul were used to parameterize the models. Growth was described by the von Bertalanffy limited exponential growth equation: $L_t = L_\infty (1 - e^{-K(t-t_0)})$, where L_t is the length of an individual at age t ; L_∞ is the asymptotic length; K is the growth coefficient; and t_0 is the theoretical age at zero length. The equation coefficients were calculated based on the analysis of length frequency peaks for the first four age classes (Anoshko et al., 2024), as well as by synthesizing literature data (Smirnov and Shumilov, 1974; Volerman and Kontorin, 1983) and TAC justification materials on the age-length relationship determined from scales (Materials..., 2017; 2023; 2024).

The structure of the spawning stock was assessed from the long-term average age composition of the Selenga population (Bazov and Bazova, 2016). The

relationship between standard length (SL) and calculated M coefficients was taken from official TAC materials for 2016, 2023, and 2025.

Taking into account the significant diversity of indirect M estimation methods based on available biological parameters (Tyurin, 1972; Rikhter and Efanov, 1977; Pauly, 1980; Zykov and Slepokurov, 1982; Jensen, 1996), leading to variable results, the simplest and most theoretically substantiated formulas were applied at the first stage of analysis. As a basic approach, the ratios proposed by Jensen based on Beverton–Holt life history invariants were used. These formulas allow obtaining average M estimates through constants C_1 and C_2 , where $M_{t_m} = C_1$ and $M/K \approx C_2$:

$$\bar{M} = 1.65/t_m, \text{ where } t_m \text{ is the mean age at sexual maturity, and}$$

$$\bar{M} = 1.5K, \text{ where } K \text{ is the von Bertalanffy growth coefficient (Jensen, 1996).}$$

3. Results

We calculated the parameters of the von Bertalanffy equation based on our personal data from the length frequency peaks for the first four age classes of omul (Anoshko et al., 2024) (Table 1).

Calculations based on our data from the analysis of four age classes (1–4 years) yielded satisfactory results close to the average parameter values compiled from various literature sources. According to the formula in (Jensen, 1996) that relates M to growth, $\bar{M} = 1.5K$, the obtained value is $\bar{M} = 0.19 \text{ yr}^{-1}$.

Baikal omul, like most whitefish, is an autumn-spawning species. The long-term average age of the spawning stock of the Selenga population ranges from 5+ to 13+ years (Bazov and Bazova, 2016) (Fig. 1). We adopted the mean value of 8.8 years as the age at sexual maturity (t_m) due to the predominance

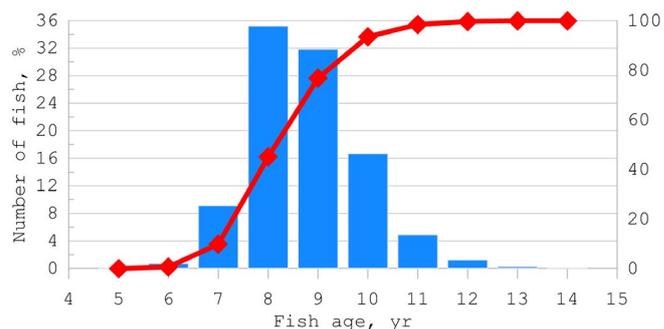


Fig.1. Age composition (a) and cumulative curve (b) of the spawning stock of the Selenga population of Baikal omul based on long-term average data.

Table 1. Von Bertalanffy equation coefficients for Baikal omul.

Coefficients	Data source						
	Our Data	Smirnov, 1974	Volerman, 1983	TAC, 2008	TAC, 2017 (2001-2010)	TAC, 2017 (2011-2016)	Average
L_∞	52	52	76	37	45	47	51
K	0.125	0.120	0.044	0.180	0.130	0.130	0.122
t_0	-1.25	-1.30	-2.90	-1.30	-1.68	-1.15	-1.60

of first-time spawners in the spawning stock; repeat spawners are rare. Calculation using the second formula in (Jensen, 1996), $\bar{M} = 1.65/t_m$, gives a matching value of $\bar{M} = 0.19 \text{ yr}^{-1}$.

Taking into account the correction for high spawning mortality, and given that the proportion of the spawning stock in the population is $\sim 3.8\%$ (Maistrenko and Maistrenko, 2006), we adjusted the M values (Table 2). The obtained data contradict the widespread notion of minimal natural mortality in whitefish during sexual maturation.

4. Discussion

According to G.V. Nikolsky (1966), the main causes of fish mortality are: i) senescence mortality, including post-spawning; ii) mortality due to abiotic environmental conditions; iii) mortality from predators, parasites, and diseases; iv) mortality due to food shortage; v) mortality from fishing. The first four are generally due to natural causes.

The abundance of Baikal omul generations is primarily limited by the carrying capacity of the coastal-sor zone, which constitutes $< 10\%$ of the lake's area.

4.1. Factors of natural mortality and their age specificity

Predation is the leading mortality factor in early ontogeny. First-year juveniles experience the main predation pressure (from perch, roach, dace, Amur sleeper, and coastal sculpins) in the coastal-sor zone. After migrating to the deep-water zone of the lake in the second half of summer, juveniles leave the habitat

of above species. For older age groups, mortality from predators (piscivorous fish and Baikal seal) is insignificant, and typically only diseased or weakened individuals fall victim.

The food base for adults is stable and not a limiting factor. Zooplankton biomass in the pelagic zone can support a significant increase in omul stocks, especially taking into account that juveniles of the abundant pelagic sculpins (Cottidae), whose biomass is up to 80% of the total fish biomass in the lake, are part of the omul's diet.

Abiotic factors, such as oxygen depletion, are not typical for the main Baikal water body due to its stable hydrochemical regime. Their role may increase locally, e.g. for juveniles isolated in floodplain water bodies during downstream migration or, subsequently, in areas of natural gas seepage (Granin et al., 2010).

Diseases and parasitic infestations in Lake Baikal are at a relatively stable level. There are no significant changes in the intensity of these factors depending on fish age.

4.2. Spawning stock structure and level of spawning mortality

The age structure of the spawning stock is formed during the gradual maturation of fish. There are no reliable hypotheses that explain what determines the probability of Baikal omul maturing at a certain age. The feeding stock is largely composed of immature fish, while spawners ready for reproduction are $\sim 3.8\%$ (Maistrenko and Maistrenko, 2006). According to data from 1982 to 2004, the number of the spawning stock was only 1.5–2.0% of the total stock abundance

Table 2. Instantaneous natural mortality coefficients (M , yr^{-1}) for Baikal omul.

Age, year	Our Data	TAC, 2017	TAC, 2023	TAC, 2025*
1	0.18	0.50**	0.50**	2.04**
2	0.18	0.40	0.40	1.20
3	0.18	0.30	0.30	0.87
4	0.18	0.24	0.24	0.67
5	0.18	0.21	0.21	0.54
6	0.18	0.21	0.21	0.45
7	0.22	0.22	0.47	0.34
8	0.36	0.25	0.73	0.26
9	0.34	0.29	0.82	0.17
10	0.26	0.33	0.91	0.21
11	0.20	0.4	0.95	0.24
12	0.18	0.53	1	
13	0.18			
14	0.18			
$\sum M$	3.02	3.88	6.74	7.00
Proportion surviving in cohort, $\exp(-\sum M) \cdot 100\%$	4.9	2.07	0.12	0.09

Note: *Values recalculated from actual mortality coefficients $\varphi = 1 - e^{-M}$ (Table 1.7 TAC (2025)).

**Values calculated based on extrapolation of regression models of M dependence on age using polynomials.

(Sokolov and Peterfeld, 2011). Based on the long-term average data (Bazov and Bazova, 2016), it is primarily composed of individuals aged 8+ to 9+ years (Fig. 1).

Spawning mortality. Spawning occurs in tributaries, where the Selenga River is key for the Selenga population. Post-spawning mortality in this population exceeds 90%. Extensive migrations lead to profound exhaustion of spawners. Most individuals cannot recover and die, while survivors enter a state of “reproductive death”, transitioning to a “senescent” stage. Such large individuals (over 1 kg) with gonads at early developmental stages (II–III) may occur in catches but are not part of the spawning stock, which consists of fish 28–41 cm long, weighing up to 900 g (Bazov and Bazova, 2016).

4.3. Senescence mortality and the concept of maximum age

Senescence death is a species-specific, genetically determined adaptive process where the probability of an individual’s death approaches 100% upon reaching the limiting age. From a biological perspective, the death of old and reproductively senescent individuals frees up resources for subsequent generations.

The classic von Bertalanffy growth and Baranov mortality equations do not contain an explicit age limit. Therefore, Pauly (1980) proposed determining the maximum age T of a fish as the age at which its length reaches 95% of the asymptotic length L_∞ :

$$T = t_0 - \ln(1 - 0.95)/K.$$

For Baikal omul, according to the calculated growth parameters (Table 1), $T \approx 23$ years. A similar approach was applied to abundance (Shibaev, 2015). Assuming that $\sim 1\%$ of the cohort survives to age T , the average mortality coefficient \bar{M} for the period from age 1 to T can be estimated as:

$$\bar{M} = -\ln(0.01)/(T - 1).$$

We suggest that the maximum age determines the \bar{M} value with the limitation of cohort survival to 1%. If the mortality rate changes significantly during life, then $\sum M \approx \ln(0.01)$. The relationship between M and K can be considered a consequence of fundamental ecological links between life history parameters (Jensen, 1996) only through the prism of maximum age. Thus, the ratio $\bar{M} = 1.5K$ is a consequence of $\bar{M}/K \approx \ln(0.01)/\ln(0.05)$. Notably, the age at sexual maturity t_m , which was calculated by the formula in (Jensen, 1996), $t_m = \ln(3)/K \approx 8.8$ years, coincides with

the long-term average age composition of the spawning stock. It should also be noted that in the first years of life, mortality from predators is directly dependent on fish size, while in terminal life stages, the probability of senescence death increases with age.

Thus, for Baikal omul, significant changes in M throughout life are not sufficiently justified from an ecological perspective. The exception is the increase in mortality during the spawning period. Given that individuals older than 13 years practically do not participate in reproduction, and the proportion of surviving individuals to the theoretical limit of 23 years is negligible, incorporating special estimates of senescence mortality into population models for this species is not advisable.

4.4. Comparative analysis of population indicators based on alternative M estimates

To assess the practical consequences of applying different M values, the dynamics of a conditional cohort were modeled with an initial recruitment of 9 million individuals, calculated using dependencies presented in TAC materials (Materials..., 2024).

When stabilization conditions are met, the Baranov equation describes not only the dynamics of a single cohort (Fig. 2) (survivorship curve) but also the age structure of a stable population (age pyramid) (Shibaev, 2015).

Cohort biomass change curves (Fig. 3) more clearly demonstrate the results of choosing alternative M estimates. Population indicators (Table 3) are equally informative. Adjusting mortality coefficients leads to significant changes in them. With identical recruitment

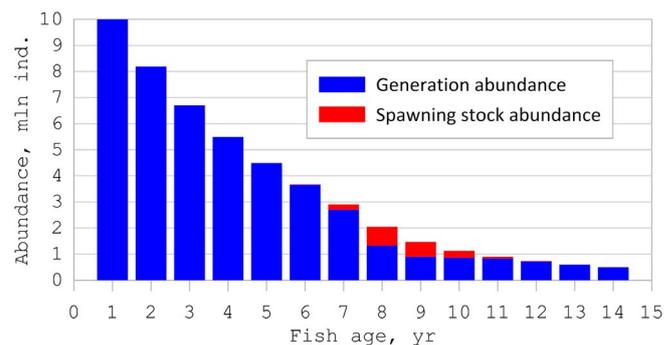


Fig.2. Change in cohort abundance calculated based on our M data with a recruitment of 10 million individuals.

Table 3. Comparison of key population indicators calculated from different M estimates.

Indicator	Our Data	TAC, 2017	TAC, 2023	TAC, 2025
Population abundance, million ind.*	57.3	48.9	45.7	83.7
Population biomass, thousand tons*	10.3	6.3	4.8	2.5
Average individual weight (\bar{W}), g	180	129	105	30
Spawning stock abundance, million ind. **	2.2	1.9	1.7	0.6
Proportion of spawning stock biomass, % **	8.2	10.5	13.2	7.9

Note: *Calculation based on recruitment of 9 million ind. at the age of two years.

**Calculation based on 3.8% spawning stock abundance relative to population abundance.

indicators using different M estimates leads to a two-fold difference in abundance and a threefold difference in biomass.

Our theoretical M estimates yield population indicators that are more consistent with historical fishery data. For example, between 1938 and 1944, the catch in the Selenga region reached 3.8–5.7 thousand tons without catastrophic consequences for the stock. The high M estimates used in recent TAC materials result in unrealistically low biomass indicators that require additional ecological justification.

An important limitation is that with our M estimates, the proportion of the spawning stock cannot exceed 11% of the population abundance; otherwise, spawning mortality would exceed the number of individuals in the corresponding age groups.

4.5. Accounting for population spatial structure

The migration of some individuals to the deep-water basins of Lake Baikal complicates direct M estimation from the age structure of catches in the Selenga Shallows. Research in 2003 revealed that up to 40% of omul biomass can concentrate in the deep-water area (Melnik et al., 2007). Consequently, the dynamics of the size-age composition in the coastal zone are determined not only by mortality M but also by the migration coefficient I , which must be taken into account in future models (Anoshko et al., 2023).

5. Conclusion

Adequate management of aquatic biological resources, including the Baikal omul population, should be based on comprehensive ecological and socio-economic analysis. This is particularly important for the Lake Baikal areas, where fisheries are a key source of employment. Modeling results (Anoshko et al., 2020) demonstrate that at low recruitment levels, introducing bans on industrial and recreational fishing is ineffective for restoring commercial stocks. Accurate M estimation is a central task of fisheries research, determining the quality of forecasts for population dynamics and allowable catches. Analysis of recent TAC materials (Materials..., 2023; 2024) revealed significant discrepancies in M values for fish of different ages, resulting in a threefold difference in calculated population biomass under equal recruitment. This indicates high uncertainty in modern estimates and the need to revise assessment approaches.

The high post-spawning mortality, exceeding 90% is a key factor in the dynamics of cohort abundance for the Selenga omul population. The extreme exhaustion of spawners during extensive spawning migrations is the primary cause of death of mature fish independent of fishing and the main reason for the low proportion of the spawning stock. Taking into account this factor is a mandatory condition for correct modeling of stock change forecasts.

From an ecological perspective, significant fluctuations in M throughout the life of Baikal omul are

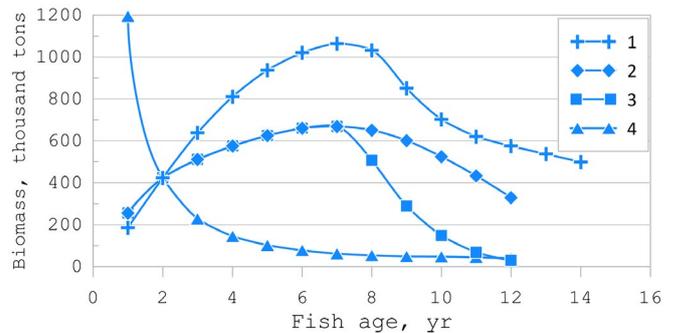


Fig.3. Change in cohort biomass calculated from M (1—our data; 2—TAC 2016; 3—TAC 2023; and 4—TAC 2025) and average weight per age class with a recruitment of 10 million individuals.

not justified. The main predation pressure occurs in the coastal zone during the first months of life. The absence of predators and food limitations for older individuals results in a stable mortality level. This confirms the feasibility of using theoretical M estimates based on life history invariants as benchmarks.

Applying the concept of maximum age T and the assumption of $\sim 1\%$ cohort survival to this age allows obtaining a theoretical average M value corresponding to the ratio $M/K \approx 1.5$ (Jensen, 1996). The theoretical mean age at sexual maturity ($t_m \approx 8.8$ years) coincides with long-term average estimates of the spawning stock age composition. The application of theoretical M estimates yields more realistic population dynamics projections that do not contradict historical fishery data, compared to the unreasonably high values presented in TAC materials.

The main difficulty in direct assessments of the age composition of Baikal omul populations is their spatial heterogeneity. Calculating M from the age structure of catches from the Selenga Shallows cannot be correct without taking into account the migration coefficient I , as up to 40% of the biomass may be fed in the deep-water areas of the lake.

Thus, the applicability of any theoretical M estimation method directly depends on its connection to the maximum age. Assessments based on age structure dynamics must account for the spatial distribution and migrations of individuals of different ages. The consistency with key population indicators, such as biomass, production, spawning stock abundance, and historical catch dynamics, should represent the reliability criterion for M estimates.

Acknowledgements

The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project No. 0279-2022-0004 (in the Unified State Information System for Research and Development, registration No. 122012600083-9).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Anoshko P.N., Makarov M.M., Zorkaltsev V.I. et al. 2020. Harvest restrictions for the Baikal omul *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) and probable ecological consequences. South of Russia: Ecology, Development [Yug Rossii: ekologiya, razvitie] 15(3): 132–143. DOI: [10.18470/1992-1098-2020-3-132-143](https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-3-132-143) (in Russian)
- Anoshko P.N., Dzyuba E.V., Kucher K.M. et al. 2023. Acoustic-trawl studies of *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) in the Selenga shallow water zone of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 4: 126–136. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-4-126](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-4-126)
- Anoshko P.N., Dzyuba E.V., Khanaev I.V. et al. 2024. Hydroacoustic studies of the structure of the Baikal omul feeding stock in the Selenga shallows of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 5: 1302–1317. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-5-1302](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-5-1302)
- Bazov A.V., Bazova N.V. 2016. The Selenga Population of the Baikal Omul: Past, Present, Future. Ulan-Ude: Buryat Scientific Center. (in Russian)
- Bazov A.V., Bazova N.V., Frolova N.L. 2022. Influence of water discharge on the extent of spawning migration of the Baikal omul *Coregonus migratorius* (Coregonidae) in the Selenga River based on long-term data. Proceedings of Irkutsk State University. Series: Biology. Ecology 41: 66–84. DOI: [10.26516/2073-3372.2022.41.66](https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.41.66) (in Russian)
- Bazov A.V., Bazova N.V., Frolova N.L. 2024. The extent of spawning migration of the Baikal omul *Coregonus migratorius* (Salmonidae: Coregoninae) in the Selenga River (Lake Baikal basin). *Journal of Ichthyology* 64(3): 294–311. DOI: [10.31857/S0042875224030044](https://doi.org/10.31857/S0042875224030044) (in Russian)
- Beverton R.J.H., Holt S.J. 1957. On the Dynamics of Exploited Fish Populations. Fisheries Investigations, Series II, Vol. 19. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Bulatov O.A., Goncharov S.M., Popov S.B. et al. 2024. State of the stocks of omul *Coregonus migratorius* in Lake Baikal and forecast until 2030. Questions of Modern Science and Practice. Vernadsky University 5: 74–86. DOI: [10.36038/0131-6184-2024-5-74-86](https://doi.org/10.36038/0131-6184-2024-5-74-86) (in Russian)
- Degtev A.I. 2002. Results of hydroacoustic research on quantitative assessment of fish resources in Lake Baikal using the ASKOR-2 complex. In: Second International Symposium “Ecologically Equivalent and Exotic Species of Aquatic Organisms in the Great and Large Lakes of the World”, pp. 3–6. (in Russian)
- Granin N.G., Makarov M.M., Kucher K.M. et al. 2010. Gas seeps in Lake Baikal—detection, distribution, and implications for water column mixing. *Geo-Marine Letters* 30(3-4): 399–409. DOI: [10.1007/s00367-009-0179-x](https://doi.org/10.1007/s00367-009-0179-x)
- Jensen A.L. 1996. Beverton and Holt life history invariants result from optimal trade-off of reproduction and survival. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(4): 820–822. DOI: [10.1139/f95-233](https://doi.org/10.1139/f95-233)
- Maistrenko S.G., Maistrenko M.A. 2006. Biology and structural features of the artificially reproduced Posolsk omul stock. *Fisheries [Rybnoe khozyaistvo]* 5: 94–99. (in Russian)
- Materials Substantiating the Total Allowable Catch (TAC) of Aquatic Biological Resources in Lake Baikal (with its Inflowing Rivers) for 2018 (with Environmental Impact Assessment) (for Public Hearings). 2017. URL: <http://ольхонский-район.рф/tinybrowser/files/novosti/oduna-2018-god-dlya-obschestvennyhslushaniy.pdf> (accessed: 19.12.2025) (in Russian)
- Materials Substantiating the Total Allowable Catch (TAC) of Aquatic Biological Resources in Lake Baikal (with its Inflowing Rivers) for 2024 (with Environmental Impact Assessment) (for Public Hearings). 2023. URL: http://baikal.vniro.ru/images/байкал_оду_2024_для_ос.pdf (accessed: 19.12.2025) (in Russian)
- Materials Substantiating the Total Allowable Catch (TAC) of Aquatic Biological Resources in Lake Baikal (with its Inflowing Rivers) for 2025 (with Environmental Impact Assessment) (for Public Hearings). 2024. URL: http://baikal.vniro.ru/images/байкал_оду_2024_для_ос.pdf (accessed: 29.09.2023) (in Russian)
- Melnik N.G., Degtyarev V.A., Dzyuba E.V. et al. 2007. Distribution of Baikal omul (*Coregonus autumnalis migratorius*) during the 2003 acoustic survey. *Advances in Limnology* 60: 231–236.
- Melnik N.G., Smirnova-Zalumi N.S., Smirnov V.V. et al. 2009. Hydroacoustic Assessment of Baikal Omul Resources. Novosibirsk. (in Russian)
- Nikolsky G.V. 1966. Theory of Fish Population Dynamics as a Biological Basis for Rational Exploitation and Reproduction of Fish Resources. Moscow: Nauka. (in Russian)
- Pauly D. 1980. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 39(2): 175–192. DOI: [10.1093/icesjms/39.2.175](https://doi.org/10.1093/icesjms/39.2.175)
- Rikhter V.A., Efanov V.N. 1977. On one approach to estimating natural mortality in fish populations. Proceedings of AtlantNIRO LXXIII: 77–85. (in Russian)
- Shibaev S.V. 2015. F.I. Baranov's formal theory of fish life and its significance in the development of fishery science. Proceedings of VNIRO 157: 127–142. (in Russian)
- Shibaev S.V. 2023. On the adequacy of using von Bertalanffy equation parameters for estimating natural mortality in fish. Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences 327(3): 490–495. DOI: [10.31610/trudyzin/2023.327.3.490](https://doi.org/10.31610/trudyzin/2023.327.3.490) (in Russian)
- Smirnov V.V., Shumilov I.P. 1974. Omuls of Baikal. Novosibirsk: Nauka. (in Russian)
- Sokolov A.V., Peterfeld V.A. 2011. Methodological aspects of fishery monitoring of the state of Baikal omul stocks. *Izvestiya of Kaliningrad State Technical University* 22: 182–189. (in Russian)
- Sukhodolov A.P., Fedotov A.P., Makarov M.M. et al. 2020. Prospects for fishery use of the Maloye More fishing area: economic assessment and justification. *Bulletin of Baikal State University* 30(2): 233–244. DOI: [10.17150/2500-2759.2020.30\(2\).233-244](https://doi.org/10.17150/2500-2759.2020.30(2).233-244) (in Russian)
- Sukhodolov A., Anoshko P., Sukhodolov Ya. et al. 2023. Fishing industry in the Irkutsk Region: resource potential, development, current situation. *Ural Environmental Science Forum “Sustainable Development of Industrial Region” (UESF-2023)*. E3S Web of Conferences 389: 03028. DOI: [10.1051/e3sconf/202338903028](https://doi.org/10.1051/e3sconf/202338903028)
- Tyurin P.V. 1972. “Normal” survival curves and rates of natural mortality in fish as a theoretical basis for fisheries regulation. *Izvestiya of GosNIORKh* 71: 71–128. (in Russian)
- Volerman I.B., Kontorin V.V. 1983. Biological Communities of Fish and the Seal in Lake Baikal. Novosibirsk: Nauka. 248 p. (in Russian)
- Zykov L.A., Slepokurov V.A. 1982. An equation for estimating natural mortality in fish (using the example of Lake Yendyr) *Fisheries [Rybnoe khozyaistvo]* 3: 36–37. (in Russian)

Методические аспекты оценки коэффициентов естественной смертности байкальского омуля: на примере селенгинской популяции

Аношко П.Н.¹, Макаров М.М.*¹

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Научная статья посвящена критическому анализу методов оценки мгновенного коэффициента естественной смертности (МКЕС) байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) в контексте управления его промысловым запасом. На основе данных по росту и возрастной структуре была проведена параметризация уравнения Берталанфи. Сравнительный анализ существующих оценок МКЕС, используемых в материалах ОДУ за 2017–2025 гг., выявил их значительную вариативность, приводящую к расхождениям в расчётной биомассе популяции в три раза при равном пополнении. Важным фактором, определяющим динамику численности и биомассы поколений, является экстремально высокая посленерестовая смертность (> 90%) у селенгинской популяции. Обоснована применимость теоретических моделей, основанных на инвариантах жизненного цикла в расчетах средних значений МКЕС (Jensen, 1996) исходя из концепции максимального возраста (Шибяев, 2023). Полученная на базе максимального возраста оценка $\bar{M} = 0.19 \text{ год}^{-1}$ и соотношение $M/K \approx 1.5$ дают более реалистичные прогнозы, согласующиеся с историческими данными промысла. Критерием достоверности любых методов оценки МКЕС должна выступать их согласованность с ключевыми популяционными показателями с учётом пространственной гетерогенности стада.

Ключевые слова: Байкальский омуль, коэффициенты смертности, динамика популяций

Для цитирования: Аношко П.Н., Макаров М.М. Методические аспекты оценки коэффициентов естественной смертности байкальского омуля: на примере селенгинской популяции // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1367-1379. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1367

1. Введение

Актуальность достоверной оценки состояния популяций промысловых гидробионтов обусловлена растущим антропогенным воздействием и необходимостью обеспечения устойчивого воспроизводства биоресурсов. Особую значимость эта задача приобретает в отношении озера Байкал – Объекта Всемирного Наследия, где требуется сбалансированный подход между сохранением уникальной экосистемы и социально-экономическими потребностями прибрежных регионов, такими как развитие рыбохозяйственной деятельности и повышение занятости населения (Аношко и др., 2020; Суходолов и др., 2020; Sukhodolov et al., 2023).

Исследования показывают, что популяция байкальского омуля, ключевого промыслового вида, на протяжении десятилетий испытывает

значительные колебания запасов. После введения запрета на вылов в 1969 г. и последующей его отмены, уловы стабилизировались на уровне 2–3 тыс. тонн. Очередное снижение уловов последовало после 2003 года (Соколов и Петерфельд, 2011), которое было спрогнозировано на основе данных тралово-акустической съемки и анализа возрастной структуры нагульного стада (Мельник и др., 2009). Последующий рост уловов в 2009–2013 гг. и падение до 0,6 тыс. тонн в 2016 году, в официальных материалах связывалась с изменением путей миграций и сокращением запасов.

В последнее десятилетие перед запретом 2017 г. для расчётов общих допустимых уловов (ОДУ) применялся виртуально-популяционный анализ (ВПА). Однако отсутствие достоверной промысловой статистики и её полное отсутствие после введения запрета на промышленный лов делают

*Автор для переписки. Адрес e-mail: mmmsoft@hlserver.lin.irk.ru (М.М. Макаров)

Поступила: 10 ноября 2025;

Принята после доработки: 18 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



традиционные биостатистические методы мало пригодными для современных условий (Дегтев, 2002). В качестве альтернативы с 2020 года проводятся гидроакустические съёмки, которые с 2024 года охватывают всю акваторию озера (Булатов и др., 2024), что критически важно для учёта омуля, обитающего на глубинах до 350 метров.

В связи с переходом на новые методы мониторинга и необходимостью формирования надёжных прогнозов, оценка мгновенного коэффициента естественной смертности (МКЕС), определяющего динамику численности, возрастную структуру и продуктивность популяции (Beverton and Holt, 1957; Никольский, 1966), становится ключевой задачей. Несмотря на обширный арсенал методов, основанных на анализе возрастной структуры и инвариантах жизненного цикла (Pauly, 1980; Jensen, 1996; Шибяев, 2015; 2023), их применимость к конкретным популяциям с уникальными условиями обитания требует отдельного обоснования.

У байкальского омуля выделяют пелагическую, прибрежную и придонно-глубоководную морфо-экологические группы (МЭГ). Основу Селенгинской популяции составляет пелагическая МЭГ, которая характеризуется экстремально высоким уровнем посленерестовой смертности (превышающим 90%), обусловленным протяжёнными нерестовыми миграциями (до 580 км) (Базов и др., 2022; 2024), а также эффективным освоением запасы мезозoopлankтона в пелагиали озера в период его массового развития. В отличие от других МЭГ пелагическая в массе заходит на нерест только в одну нерестовую реку Селенгу и является основным компонент запаса в южно и средней частях озера, что делает её оптимальным объектом для исследования.

Цель работы – провести сравнительный анализ существующих оценок МКЕС для байкальского омуля и оценить возможность применения теоретических моделей на основе инвариантов жизненного цикла для последующего использования в прогнозах запаса.

2. Материалы и методы

В основу работы легли литературные и собственные материалы авторов. Теоретической основой для оценки смертности послужило фундаментальное уравнение Ф.И. Баранова, описывающее экспоненциальное снижение численности когорты во времени: $N_t = N_0 e^{-Mt}$, где N_t — численность рыб

в возрасте t , N_0 — начальная численность, а M — мгновенный коэффициент естественной смертности (Шибяев, 2015).

Для параметризации моделей использовались данные по росту байкальского омуля. Рост описывался уравнением ограниченного экспоненциального роста Бергаланфи: $L_t = L_\infty (1 - e^{-K(t-t_0)})$, где L_t — длина особи в возрасте t , L_∞ — асимптотическая длина, то есть теоретическая максимальная длина особи в данной популяции, K — коэффициент роста, t_0 — теоретический возраст при нулевой длине. Коэффициент уравнения были рассчитаны на основе анализа пиков численности по длине для первых четырёх возрастных классов (Anoshko et al., 2024), а также путём обобщения литературных данных (Смирнов и Шумилов, 1974; Волерман и Конторин, 1983) и материалов, обосновывающих общие допустимые уловы, по зависимости длины от возраста, определяемого по чешуе (Материалы..., 2017; 2023; 2024).

Структура нерестового стада оценивалась по среднемноголетнему возрастному составу Селенгинской популяции (Базов и Базова, 2016). Соотношение между стандартной длиной (SL) и расчётными коэффициентами M взято из официальных материалов ОДУ за 2016, 2023 и 2025 годы.

Учитывая значительное разнообразие косвенных методов оценки M , основанных на доступных биологических параметрах (Тюрин, 1972; Рихтер и Ефанов, 1977; Pauly, 1980; Зыков и Слепокуров, 1982; Jensen, 1996) и приводящих к вариативным результатам, на первом этапе анализа были применены наиболее простые и теоретически обоснованные формулы. В качестве базового подхода использованы соотношения, предложенные Jensen на основе инвариантов жизненного цикла Бевертона–Холта.: Данные формулы позволяют получить усреднённые оценки МКЕС через константы C_1 и C_2 , где $Mt_m = C_1$ и $M/K \approx C_2$:

$\bar{M} = 1,65/t_m$, где t_m — средний возраст достижения половой зрелости и

$M/K \approx 1,5$, где K — коэффициент роста фон Бергаланфи (Jensen, 1996).

3. Результаты

Нами были рассчитаны параметры уравнения Бергаланфи на основе собственных данных, полученных по пикам численности стандартной длины омуля для первых четырёх возрастных классов (Anoshko et al., 2024) (Таблица 1).

Таблица 1. Коэффициенты уравнения Бергаланфи для байкальского омуля

Коэффициенты уравнения	Источник данных						
	Наши данные	Смирнов, 1974	Волерман, 1983	ОДУ, 2008	ОДУ, 2017 (2001-2010)	ОДУ, 2017 (2011-2016)	Среднее
L_∞	52	52	76	37	45	47	51
K	0,125	0,120	0,044	0,180	0,130	0,130	0,122
t_0	-1,25	-1,30	-2,90	-1,30	-1,68	-1,15	-1,60

Расчёты по нашим данным, основанным на анализе четырёх возрастных классов (1–4 года), дали удовлетворительные результаты, близкие к средним значениям параметров, обобщённым из различных литературных источников. В соответствии с формулой (Jensen, 1996), связывающей МКЕС с ростом $\bar{M} = 1,5K$, получено значение $\bar{M} = 0,19 \text{ год}^{-1}$.

Байкальский омуль, как и большинство сиговых, является осеннерестующим видом. Среднемноголетний возраст нерестового стада Селенгинской популяции варьирует от 5+ до 13+ лет (Базов и Базова, 2016) (Рис. 1). В качестве возраста достижения половой зрелости t_m нами принято среднее значение — 8,8 лет, что обусловлено преобладанием в нерестовом стаде впервые созревающих особей; повторнонерестующие встречаются единично. Расчёт по второй формуле (Jensen, 1996) $\bar{M} = 1,65/t_m$ даёт совпадающее значение $\bar{M} = 0,19 \text{ год}^{-1}$.

С учётом поправки на высокую нерестовую смертность, учитывая, что доля нерестового стада от численности популяции составляет ~3,8% (Майстренко и Майстренко, 2006) значения МКЕС были откорректированы (Таблица 2). Полученные данные противоречат распространённому представлению о минимальных значениях естественной смертности у сиговых рыб в период полового созревания.

4. Обсуждение

В основе анализа причин смертности рыб согласно взглядам Г.В. Никольского (1966) выделяются следующие: 1) смертность от старости, вклю-

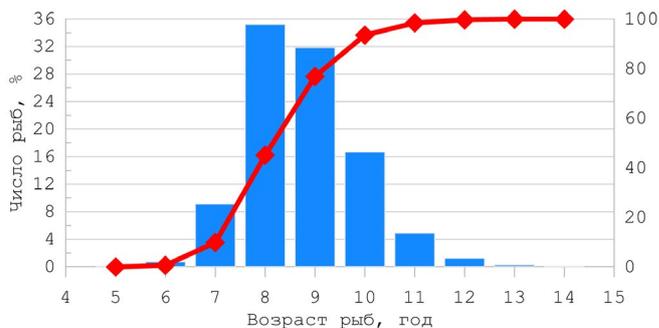


Рис.1. Возрастной состав (а) и кумулятивная кривая (б) нерестового стада селенгинской популяции байкальского омуля по среднемноголетним данным.

чая посленерестовую; 2) гибель под воздействием абиотических условий среды; 3) смертность от хищников, паразитов и болезней; 4) гибель из-за нарушения обеспеченности пищей; 5) смертность в результате промысла (вылова). Первые четыре, как правило, обусловлены естественными причинами.

Численность поколений байкальского омуля лимитируется преимущественно приемной емкостью прибрежно-соровой зоны, площадь которой составляет менее 10% акватории озера.

4.1. Факторы естественной смертности и их возрастная специфика

Хищничество является ведущим фактором смертности на ранних этапах онтогенеза. Основной пресс хищников (окунь, плотва, елец, ротан, прибрежные виды керчаковых) испытывает молодь первого года жизни в прибрежно-соровой зоне. После миграции во второй половине лета в глубоководную часть озера молодь выходит из зоны обитания этих

Таблица 2. МКЕС (M , год^{-1}) байкальского омуля

Возраст, год	Наши данные	ОДУ, 2017	ОДУ, 2023	ОДУ, 2025*
1	0.18	0.50**	0.50**	2.04**
2	0.18	0.40	0.40	1.20
3	0.18	0.30	0.30	0.87
4	0.18	0.24	0.24	0.67
5	0.18	0.21	0.21	0.54
6	0.18	0.21	0.21	0.45
7	0.22	0.22	0.47	0.34
8	0.36	0.25	0.73	0.26
9	0.34	0.29	0.82	0.17
10	0.26	0.33	0.91	0.21
11	0.20	0.4	0.95	0.24
12	0.18	0.53	1	
13	0.18			
14	0.18			
$\sum M$	3.02	3.88	6.74	7.00
Доля выживших в поколении $\exp(-\sum M) \cdot 100\%$	4.9	2.07	0.12	0.09

Примечание:

* - значения пересчитанные из коэффициентов действительной смертности $\varphi = 1 - e^{-M}$ (Табл. 1.7 ОДУ (2025));

** - значения, рассчитанные на основании экстраполяции регрессионных моделей зависимости МКЕС от возраста с использованием полиномов.

видов. Для старших возрастных групп смертность от хищников (рыбоядные рыбы, байкальская нерпа) незначительна и, как правило, жертвой становятся больные или ослабленные особи.

Кормовая база для взрослых особей стабильна и не является лимитирующим фактором. Биомасса зоопланктона в пелагиали может обеспечить значительное увеличение запасов байкальского омуля, особенно с учётом того, что молодь массовых пелагических керчаковых рыб *Cottidae*, чья биомасса составляет до 80% от общей ихтиомассы озера, входит в рацион омуля.

Абиотические факторы, такие как заморные явления, для основной акватории Байкала не характерны из-за стабильного гидрохимического режима. Их роль может возрастать локально, например, для молоди, изолированной в пойменных водоёмах в период ската или, в последующем, в местах выхода природных газов (Granin et al., 2010).

Заболевания и паразитарные инвазии в условиях Байкала имеют относительно стабильный уровень. Существенных изменений в интенсивности этих факторов в зависимости от возраста рыб не выявлено.

4.2. Структура нерестового стада и уровень нерестовой смертности

Возрастная структура нерестового стада формируется в процессе постепенного созревания рыб. Достоверных гипотез о том, чем обусловлена вероятность созревания байкальского омуля в определенном возрасте нет. Нагульное стадо в значительной степени сформировано неполовозрелыми рыбами, тогда как, готовые к нересту особи составляют около 3,8% (Майстренко и Майстренко, 2006). По данным за 1982–2004 гг., численность нерестового стада оценивалась всего в 1,5–2,0 % от общей численности запаса (Соколов и Петерфельд, 2011). По среднемноголетним данным (Базов и Базова, 2016) его основу представляют особи в возрасте 8 + - 9+ лет (Рис. 1)

Нерестовая смертность. Нерест происходит в притоках, причём для селенгинской популяции ключевым является русло реки Селенга. Посленерестовая смертность у этой популяции превышает 90%. Протяжённые миграции приводят к глубокому истощению производителей. Большинство особей не способны к восстановлению и погибают, а выжившие в состоянии «репродуктивной смерти» переходят к стадии «дожития». Такие крупные особи (более 1 кг) с гонадами на ранних стадиях развития (II–III) могут встречаться в уловах, но не входят в состав нерестового стада, который представлен рыбами длиной 28–41 см и массой до 900 г (Базов и Базова, 2016).

4.3. Смертность от старости и концепция максимального возраста

Смерть от старости — видоспецифичный, генетически обусловленный адаптивный процесс, при котором вероятность гибели особи стремится к

100% по достижении предельного возраста. С биологической точки зрения гибель старых, утративших репродуктивную функцию особей освобождает ресурсы для следующих поколений.

Классические уравнения роста Бергаланфи и смертности Ф.И. Баранова не содержат явного ограничения по возрасту. В связи с чем, Pauly (1980) было предложено определять максимальный возраст жизни T рыбы как возраст, при котором длина рыбы составляет 95% от асимптотической длины L_{∞} :

$$T = t_0 - \ln(1 - 0,95)/K.$$

Для байкальского омуля, согласно рассчитанным параметрам роста (Таблица 1), $T \approx 23$ года. Аналогичный подход был применён для численности (Шибяев, 2015). Если принять, что к возрасту T выживает около 1% поколения, то средний коэффициент смертности \bar{M} за период от 1 года до T может быть оценён как:

$$\bar{M} = -\ln(0,01)/(T - 1).$$

Именно максимальный возраст, по нашему мнению, определяет значение M_{cr} при его ограничении численностью поколения в 1 %. Если уровень смертности значительно меняется в течение жизни то $\sum M \approx \ln(0,01)$. Соотношение между M и K можно считать следствием фундаментальных экологических связей между параметрами жизненного цикла (Jensen, 1996) только через призму максимального возраста. Таким образом, соотношение $\bar{M} = 1,5K$ является следствием того, что $\bar{M}/K \approx \ln(0,01)/\ln(0,05)$. Следует отметить, что возраст достижения половой зрелости t_m , рассчитанный по формуле (Jensen, 1996) $t_m = \ln(3)/K \approx 8,8$ года, совпадает со среднемноголетним значением возрастного состава нерестового стада. Следует отметить, что в первые годы жизни смертность от хищников напрямую зависит от размеров рыб, а на терминальных стадиях жизни вероятность смерти от старости повышается с возрастом.

Таким образом, для байкальского омуля значительные изменения МКЕС на протяжении жизни, с экологической точки зрения, не имеют достаточных оснований. Исключение составляет рост смертности в период нереста. Учитывая, что особи старше 13 лет практически не участвуют в воспроизводстве, а доля доживающих до теоретического предела 23 лет ничтожна, включение специальных оценок смертности от старости в популяционные модели для данного вида нецелесообразно.

4.4. Сравнительный анализ популяционных показателей на основе альтернативных оценок M

Для оценки практических последствий применения различных значений МКЕС была смоделирована динамика условного поколения при начальном пополнении в 9 млн экз., рассчитанном по зависимостям, представленным в материалах ОДУ (Материалы..., 2024).

В том случае, когда соблюдаются условия стабилизации, уравнение Баранова опишет не только

динамику численности одного поколения (Рис. 2) (кривую выживания), но и возрастную структуру стабильной популяции (кривую населения) (Шибяев, 2015).

Кривые изменения биомассы (Рис. 3) поколений более наглядно демонстрируют результаты выбора альтернативных оценок *M*. Не менее информативными являются популяционные показатели (Таблица 3). Корректировка коэффициентов смертности приводит к их значительным изменениям. При одинаковых показателях пополнения использование разных оценок МКЕС приводит к разнице численности в 2 раза, а биомассы в 3 раза.

Полученные нами теоретические оценки МКЕС дают популяционные показатели, более согласующуюся с историческими данными о промысле. Например, в период 1938–1944 гг. в Селенгинском районе вылов достигал 3,8–5,7 тыс. т без катастрофических последствий для запаса. Высокие оценки МКЕС, используемые в последних материалах ОДУ, приводят к нереалистично низким показателям биомассы, которые требуют дополнительного экологического обоснования.

Важным ограничением является то, что при наших оценках МКЕС доля нерестового стада не может превышать 11% от численности популяции, иначе нерестовая смертность превысит численность особей в соответствующих возрастных группах.

4.5. Учёт пространственной структуры популяции

Прямая оценка МКЕС по возрастной структуре уловов на Селенгинском мелководье затруднена из-за миграций части особей в глубоководные котловины Байкала. Исследования 2003 г. показали, что на глубоководной акватории может концентрироваться до 40% биомассы омуля (Melnik et al., 2007). Следовательно, динамика размерно-возрастного состава в прибрежной зоне определяется не только смертностью *M*, но и коэффициентом миграции *I*, что необходимо учитывать в будущих моделях (Anoshko et al., 2023).

5. Заключение

Рациональное управление водными биоресурсами, включая популяцию байкальского омуля, должно основываться на комплексном экологиче-

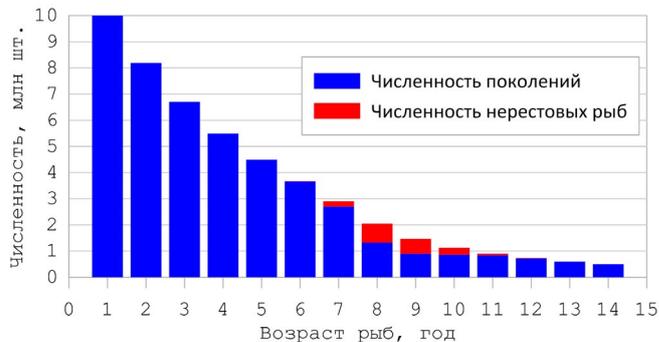


Рис.2. Изменение численности поколения, рассчитанной на основании МКЕС (наши данные) исходя из пополнения 10 млн шт.

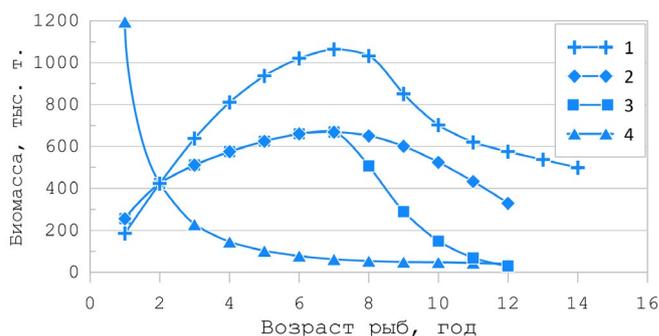


Рис.3. Изменение биомассы поколения, рассчитанной на основании *M* (1-наши данные; 2 – ОДУ 2016; 3 – ОДУ 2023; 4 - ОДУ, 2025) и средней навески в возрастном классе, исходя из пополнения 10 млн шт.

ском и социально-экономическом анализе. Особую важность это приобретает для районов озера Байкал, где рыбное хозяйство ключевым источником занятости. Результаты моделирования (Аношко и др., 2020) показывают, что при низком уровне пополнения введение запретов на промышленный и любительский лов мало эффективно для восстановления промысловых запасов. Точная оценка МКЕС является центральной задачей рыбохозяйственных исследований, определяющей качество прогнозов динамики численности и допустимых уловов. Анализ последних материалов ОДУ (Материалы..., 2023; 2024) выявил значительные расхождения в значениях МКЕС для рыб разного возраста, которые при равном пополнении приводят к трёхкратному расхождению в расчётной биомассе популяции. Это свидетельствует о высокой неопределённости современных оценок и необходимости пересмотра подходов их оценки.

Таблица 3. Сравнение ключевых популяционных показателей, рассчитанных на основе различных оценок МКЕС

Расчетные показатели	Наши данные	ОДУ, 2017	ОДУ, 2023	ОДУ, 2025
Численность популяции, млн. шт.*	57.3	48.9	45.7	83.7
Биомасса популяции, тыс. тонн*	10.3	6.3	4.8	2.5
Средняя масса особи (\bar{W}), г	180	129	105	30
Численность нерестового стада, млн. шт.**	2.2	1.9	1.7	0.6
Доля биомассы нерестового стада, %**	8.2	10.5	13.2	7.9

Примечание: * - расчет на пополнение в 9 млн экз. в возрасте 2 лет.

** - расчет на 3.8 % численности нерестового стада от численности популяции

Ключевым фактором динамики численности поколений для Селенгинской популяции омуля является высокая посленерестовая смертность, превышающая 90%. Экстремальное истощение производителей в ходе протяжённых нерестовой миграций является основной причиной гибели половозрелых рыб без учёта вылова и главной причиной низкой доли нерестового стада. Учёт этого фактора — обязательное условие корректного моделирования прогнозов изменения запасов. С экологической точки зрения, значительные колебания МКЕС на протяжении жизни байкальского омуля не обоснованы. Основной пресс хищников реализуется в прибрежной зоне в первые месяцы жизни. Отсутствие хищников и ограничений по кормовой базе для старших особей обуславливает стабильный уровень смертности. Это подтверждает целесообразность использования теоретических оценок M , основанных на инвариантах жизненного цикла в качестве ориентиров. Применение концепции максимального возраста T и допущения о выживании $\sim 1\%$ поколения к этому возрасту, позволяет получить теоретическое среднее значение \bar{M} , соответствующее соотношению $M/K \approx 1,5$ (Jensen, 1996). Теоретический средний возраст полового созревания ($t_m \approx 8,8$ года) совпадает со среднепогодными фактическими оценками возрастного состава нерестового стада. Применение теоретических оценок МКЕС даёт более реалистичные и, не противоречащие историческим данным промысла, прогнозам динамики популяции, чем необосновано высокие значения, представленные в материалах ОДУ. Основная сложность прямых оценок возрастного состава популяций байкальского омуля является пространственная неоднородность популяции. Расчёт МКЕС по возрастной структуре уловов с Селенгинского мелководья не может быть корректен без учёта коэффициента миграции I , так как до 40% биомассы может нагуливаться в глубоководных районах озера.

Таким образом, применимость любого теоретического метода оценки МКЕС напрямую зависит от его связи с максимальным возрастом. Оценки на базе динамики возрастной структуры должны учитывать пространственное распределение и миграции особей разного возраста. Критерием достоверности оценок МКЕС должна служить их согласованность с ключевыми популяционными показателями: биомассой, продукцией, численностью нерестового стада и исторической динамикой вылова.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта № 0279-2022-0004 (в Единой государственной информационной системе учёта научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения, регистрационный № 122012600083-9).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Аношко П.Н., Макаров М.М., Зоркальцев В.И. и др. 2020. Ограничение на вылов байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) и вероятные экологические последствия. Юг России: экология, развитие 15(3): 132–143. DOI: [10.18470/1992-1098-2020-3-132-143](https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-3-132-143)
- Базов А.В., Базова Н.В. 2016. Селенгинская популяция байкальского омуля: прошлое, настоящее, будущее. Улан-Удэ: Бурятский научный центр.
- Базов А.В., Базовы Н.В., Фролова Н.Л. 2022. Исследования влияния расхода воды на протяжённость нерестовой миграции байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Coregonidae) в реке Селенге на базе многолетних данных. Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология 41: 66–84. DOI: [10.26516/2073-3372.2022.41.66](https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.41.66)
- Базов А.В., Базовы Н.В., Фролова Н.Л. 2024. Протяжённость нерестовой миграции Байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Salmonidae: Coregoninae) в реке Селенга (бассейн озера Байкал). Вопросы ихтиологии 64(3): 294–311. DOI: [10.31857/S0042875224030044](https://doi.org/10.31857/S0042875224030044)
- Булатов О.А., Гончаров С.М., Попов С.Б. и др. 2024. Состояние запасов омуля *Coregonus migratorius* озера Байкал и прогноз до 2030 года. Рыбное хозяйство 5: 74–86. DOI: [10.36038/0131-6184-2024-5-74-86](https://doi.org/10.36038/0131-6184-2024-5-74-86)
- Волерман И.Б., Конторин В.В. 1983. Биологические сообщения рыб и нерпы в Байкале. Новосибирск: Наука.
- Детев А.И. 2002. Результаты гидроакустических исследований, по количественной оценке, рыбных ресурсов озера Байкал с использованием комплекса АСКОР-2. В: Второй международный симпозиум «Экологически эквивалентные и экзотические виды гидробионтов великих и больших озёр мира», С. 3–6.
- Зыков Л.А., Слепокуров В.А. 1982. Уравнение для оценки естественной смертности рыб (на примере оз. Ендырь). Рыбное хозяйство 3: 36–37.
- Мельник Н.Г., Смирнова-Залуми Н.С., Смирнов В.В. и др. 2009. Гидроакустический учёт ресурсов байкальского омуля. Новосибирск.
- Материалы, обосновывающие общие допустимые уловы водных биологических ресурсов в озере Байкал (с впадающими в него реками) на 2018 г. (с оценкой воздействия на окружающую среду) (для общественных слушаний). 2017. URL: <http://ольхонский-район.пф/tinybrowser/files/novosti/odu-na-2018-god-dlya-obshchestvennyhslushaniy.pdf> (дата обращения: 19.12.2025)
- Материалы, обосновывающие общие допустимые уловы водных биологических ресурсов в озере Байкал (с впадающими в него реками) на 2024 г. (с оценкой воздействия на окружающую среду) (для общественных слушаний). 2023. URL: http://baikal.vniro.ru/images/байкал_оду_2024_для_ос.pdf (дата обращения: 19.12.2025).
- Материалы, обосновывающие общие допустимые уловы водных биологических ресурсов в озере Байкал (с впадающими в него реками) на 2025г. (с оценкой воздействия на окружающую среду) (для общественных слушаний). 2024. URL: http://baikal.vniro.ru/images/байкал_оду_2024_для_ос.pdf (дата обращения: 29.09.2023).
- Майстренко С.Г., Майстренко М.А. 2006. Биология и структурные особенности искусственно воспроизводимого стада посольского омуля. Рыбное хозяйство 5: 94–99.
- Никольский Г.В. 1966. Теория динамики стада рыб как биологическая основа рациональной эксплуатации и воспроизводства рыбных ресурсов. Москва: Наука.

Рихтер В.А., Ефанов В.Н. 1977. Об одном из подходов к оценке естественной смертности рыбных популяций. Труды АтлантНИРО LXXIII: 77–85.

Соколов А.В., Петерфельд В.А. 2011. Методические аспекты рыбохозяйственного мониторинга состояния запасов омуля озера Байкал. Известия КТГУ 22: 182–189.

Суходолов А.П., Федотов А.П., Макаров М.М. и др. 2020. Перспективы рыбохозяйственного использования Маломорского рыбопромыслового района: экономическая оценка и обоснование. Известия байкальского государственного университета 30(2): 233–244. DOI: [10.17150/2500-2759.2020.30\(2\).233-244](https://doi.org/10.17150/2500-2759.2020.30(2).233-244)

Смирнов В.В., Шумилов И.П. 1974. Омупы Байкала. Новосибирск: Наука.

Тюрин П.В. 1972. «Нормальные» кривые переживания и темпов естественной смертности рыб как теоретическая основа регулирования рыболовства. Изв. ГосНИОРХ 71: 71–128.

Шибяев С.В. 2015. Формальная теория жизни рыб Ф.И. Баранова и её значение в развитии рыбохозяйственной науки. Труды ВНИРО 157: 127–142.

Шибяев С.В. 2023. К вопросу об адекватности использования параметров уравнения Берталанфи для оценки естественной смертности рыб. Труды Зоологического института РАН 327(3): 490–495. DOI: [10.31610/trudyzin/2023.327.3.490](https://doi.org/10.31610/trudyzin/2023.327.3.490)

Anoshko P.N., Dzyuba E.V., Khanaev I.V. et al. 2024. Hydroacoustic studies of the structure of the Baikal omul feeding stock in the Selenga shallows of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 5: 1302–1317. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-5-1302](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-5-1302)

Anoshko P.N., Dzyuba E.V., Kucher K.M. et al. 2023. Acoustic-trawl studies of the *Coregonus migratorius* (Georgi,1775) in the Selenga shallow water zone of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 4: 126–136. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-4-126](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-4-126)

Beverton R.J.H., Holt S.J. 1957. On the dynamics of exploited fish populations. *Fisheries Investigations* 19: 1–533.

Granin N.G., Makarov M.M., Kucher K.M. et al. 2010. Gas seeps in Lake Baikal-detection, distribution, and implications for water column mixing. *Geo-marine letters* 30(3-4): 399–409.

Jensen A. 1996. Beverton and Holt Life History Invariants Result from Optimal Trade-Off of Reproduction and Survival. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 820–822.

Melnik N.G., Degtyarev V.A., Dzyuba E.V. et al. 2007. Distribution of Baikal omul (*Coregonus autumnalis migratorius*) during the 2003 acoustic survey. *Advances in Limnology* 60: 231–236.

Pauly D. 1980. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. *Journal of the International Council for the Exploration of the Sea* 39(2): 175–192.

Sukhodolov A., Anoshko P., Sukhodolov Ya.et.al. 2023. Fishing industry in the Irkutsk Region: resource potential, development, current situation. *Ural Environmental Science Forum “Sustainable Development of Industrial Region” (UESF-2023)* 389(3028): 1–17. DOI: [10.1051/e3sconf/202338903028](https://doi.org/10.1051/e3sconf/202338903028)

The complete chloroplast genome of *Chlorella vulgaris* strain BAC9706 isolated from Lake Baikal

Panova Yu.A.^{1,2}, Chernogor L.I.¹, Belikov S.I.^{1*}

¹Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

²Siberian Federal University, Svobodny prosp., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

ABSTRACT. We report here the complete chloroplast genome sequence of the strain BAC9706 of green microalga *Chlorella vulgaris* isolated from Lake Baikal. The chloroplast genome is a circular DNA molecule of 161,721 bp and contains 78 protein-coding genes, 33 tRNA genes, and 3 rRNA genes. Comparative analysis revealed a high level of conservation of gene content and gene order among other *C. vulgaris* strains with minor differences mainly associated with introns and non-coding regions. Phylogenetic analysis based on concatenated chloroplast protein-coding genes showed that strain BAC9706 clusters within the *C. vulgaris* clade with high bootstrap support. These results indicate that strain BAC9706 represents a Baikal ecotype of *C. vulgaris* rather than a new species.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, chloroplast genome, Lake Baikal, Chlorellales

For citation: Panova Yu.A., Chernogor L.I., Belikov S.I. The complete chloroplast genome of *Chlorella vulgaris* strain BAC9706 isolated from Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1380-1389. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1380

1. Introduction

Lake Baikal is a unique ancient oligotrophic freshwater lake characterized by exceptional biodiversity and a high level of endemism. It is the deepest and one of the oldest freshwater lakes in the world, containing about 20% of the global freshwater reserves (Gao et al., 1994; Martens, 1997; Timoshkin, 2011). The long geological history of Lake Baikal, combined with its specific climatic and hydrological conditions, has resulted in the formation of highly specialized aquatic communities.

Autotrophic picoplankton plays a significant role in primary production in Lake Baikal ecosystems. During the summer period, picoplankton contributes up to 60–90% of total primary production in the lake (Votintsev et al., 1975; Bondarenko and Guselnikova, 1989; Nagata et al., 1994). The main contribution to phytoplankton biomass is typically made by diatoms and chrysophytes (Bondarenko et al., 2020), whereas green algae of the phylum Chlorophyta are generally considered rare and are represented by a limited number of taxa.

Chlorella-like green algae in Lake Baikal were first described based on microscopic observations and were reported sporadically, including under-ice phytoplankton development (Kozhova, 1959; Kozhova,

1987; Nagata et al., 1994). More recent studies have demonstrated notable changes in phytoplankton composition in Baikal and adjacent water bodies. In particular, *Chlorella vulgaris* was detected at all investigated stations of the Irkutsk Reservoir, which is indirectly connected to Lake Baikal, and was shown to dominate in under-ice and near-ice phytoplankton communities during certain periods (Bashenkhaeva et al., 2020; Firsova et al., 2023).

These observations raise questions about the origin, persistence, and ecological characteristics of *Chlorella* strains occurring in cold freshwater environments of the Baikal region. It remains unclear whether these strains represent transient populations introduced from surrounding water bodies or locally adapted ecotypes capable of surviving and reproducing under low-temperature conditions.

Previously, a draft nuclear genome sequence of *Chlorella* sp. strain BAC9706 isolated from Lake Baikal was published (Petrushin et al., 2020), followed by a detailed analysis of its mitochondrial genome (Panova et al., 2024). These studies provided important insights into the genomic features and phylogenetic position of this strain, indicating its affiliation with the *C. vulgaris* lineage and suggesting that strain BAC9706 represents a Baikal ecotype of this species.

*Corresponding author. E-mail address: sergeibelikov47@gmail.com (S.I. Belikov)

Received: November 12, 2025;

Accepted after revised: December 20, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



To further expand our understanding of the genomic organization of this Baikal strain and to enable comparative analyses with other representatives of the genus *Chlorella*, we assembled and analyzed the complete chloroplast genome of *C. vulgaris* strain BAC9706 isolated from Lake Baikal.

2. Materials and Methods

2.1. DNA sequencing and genome assembly

The genomic DNA was isolated as previously described (Petrushin et al., 2020), and sequenced using the Illumina MiSeq platform. A draft assembly was built using SPAdes v. 3.15.4 (Bankevich et al., 2012). This draft assembly contained 5,837 contigs with an N50 value of 44,654 bp, and the largest contig was 317,606 bp long.

The obtained whole-genome assembly contigs were aligned against reference chloroplast genomes of *C. vulgaris* available in NCBI using BLASTn to identify chloroplast contigs.

2.2. Genome annotation and visualization

For genome annotation we used the GeSeq tool (Tillich et al., 2017) with default parameters for protein-coding genes, tRNAs, and rRNAs, using the *C. vulgaris* strain NJ-7 (GenBank accession MK948100) chloroplast genome as reference. OGDRAW was used for chloroplast genome map visualization (Greiner et al., 2019), to prepare files for GB2sequin (Lehwark and Greiner, 2019).

2.3. Phylogenetic analysis

The evolutionary analysis was conducted using the Maximum Likelihood method implemented in MEGA11 (Tamura et al., 2021). The best-fit substitution model was selected automatically and branch support was assessed using 1000 bootstrap replicates. All currently available sequences of complete well-annotated chloroplast genomes belonging to the Chlorellales order were selected from NCBI. From these, we extracted all protein-coding sequences, performed alignments, and concatenated them. To improve alignment quality, poorly aligned regions were removed.

The final phylogenetic tree is based on 73 concatenated protein-coding chloroplast genes from 16 taxa (5 of the annotated *ycf* genes were excluded from this analysis).

3. Results

3.1. Chloroplast genome features

The complete chloroplast genome of *C. vulgaris* strain BAC9706 is a circular double-stranded DNA molecule with a length of 161,721 bp. The genome contains a total of 114 genes, including 78 protein-coding genes, 33 tRNA genes, and 3 rRNA genes (Fig. 1).

The protein-coding genes include 1 *accD* gene, 6 genes for ATP synthases (*atpA*, *atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpI*), 1 for cell envelope (*cemA*), 3 protochlorophyllide reductase genes (*chlB*, *chlL*, *chlN*) and 1 Mg-protoporphyrin IX chelatase (*chlI*), 2 genes related to sulfate transport (*cysA* and *cysT*), 2 genes related to cell division and protein quality control (*ftsH*, *minD*), 2 hydrolases (*I-CvuI* and *clpP*), 1 translation initiation factor (*infA*), 6 cytochrome-related genes (*ccsA*, *petA*, *petB*, *petD*, *petG*, *petL*), 22 involved in photosynthesis (*rbcl*, *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaI*, *psaJ*, *psaM*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *psbF*, *psbH*, *psbI*, *psbJ*, *psbK*, *psbL*, *psbM*, *psbN*, *psbT*, *psbZ*), 21 for ribosomal proteins (*rpl12*, *rpl14*, *rpl16*, *rpl19*, *rpl2*, *rpl20*, *rpl23*, *rpl32*, *rpl36*, *rpl5*, *rps11*, *rps12*, *rps14*, *rps18*, *rps19*, *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps9*), 4 for RNA synthesis (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, and *rpoC2*), 1 for elongation factor Tu (*tufA*), 5 *ycf* genes (*ycf3*, *ycf4*, *ycf62*, *ycf12*, *ycf78*). The 33 tRNA genes cover the transfer of all 20 amino acids, in which 3 are tRNA-Gly, 2 tRNA-Ile, 4 tRNA-Leu, 3 tRNA-Arg, 3 tRNA-Ser, 2 tRNA-Thr, 2 tRNA-Val genes.

The complete chloroplast genome sequence of *C. vulgaris* BAC9706 has been deposited in the GenBank database under the accession number PQ037191.1.

3.2. Comparative analysis with other *C. vulgaris* strains

Currently published complete chloroplast genomes of *C. vulgaris* vary in genome size and gene content, reflecting differences in annotation approaches and assembly completeness (Table 1). Differences in the reported numbers of protein-coding genes among

Table 1. General features of currently published chloroplast genomes of *C. vulgaris*

Accession	Strain	Genome size, bp	Protein-coding genes	tRNA/rRNA genes	Reference
PQ037191.1	<i>C. vulgaris</i> BAC9706	161721	78	33/3	Present study
MW900257.1	<i>C. vulgaris</i>	156202	73	32/3	Unpublished
NC_001865.1	<i>C. vulgaris</i> C-27	150613	174	33/3	Wakasugi et al., 1997
CM041649.1	<i>C. vulgaris</i> 211/11P	165504	70	NA	Cecchin et al., 2019
MT577052.1	<i>C. vulgaris</i>	165412	78	33/3	Wen and Wan, 2020
MT920676.1	<i>C. vulgaris</i> ITBBA3-12	168369	111	29/3	Han et al., 2021
MK948102.1	<i>C. vulgaris</i> UTEX259	176851	79	33/3	Unpublished
MK948100.1	<i>C. vulgaris</i> NJ-7	154201	79	33/3	Unpublished

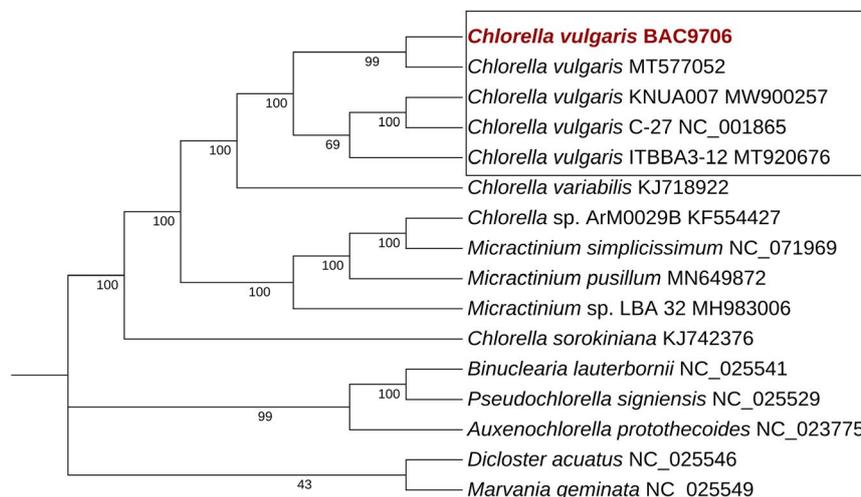


Fig.2. Phylogenetic tree of *C. vulgaris* BAC9706 based on chloroplast concatenated protein-coding genes from Chlorellales taxa.

Most sequence variation was confined to intronic and intergenic regions, whereas protein-coding genes remained highly conserved. In particular, differences observed in the *psbA* intron, including variation in the length of the intron-encoded endonuclease, likely reflect intraspecific variability of mobile introns rather than functional divergence of photosynthetic genes.

Phylogenetic analysis based on complete chloroplast genome sequences placed strain BAC9706 firmly within the *C. vulgaris* clade, consistent with previous mitochondrial genome-based results (Panova et al., 2024). Together, these data indicate that BAC9706 represents a Baikal ecotype of *C. vulgaris* rather than a distinct species and provide an additional organellar reference for future comparative studies.

5. Conclusions

The complete chloroplast genome of *C. vulgaris* strain BAC9706 isolated from Lake Baikal was assembled and analyzed. The genome exhibits a high level of conservation in gene content and organization compared to other *C. vulgaris* strains, with differences mainly confined to intronic and intergenic regions. Phylogenetic analysis confirms that BAC9706 represents a Baikal ecotype of *C. vulgaris* rather than a distinct species. These data provide a genomic basis for future studies of *Chlorella* strains in cold freshwater environments.

Acknowledgements

The State Assignments of Limnological Institute Siberian Branch of Russian Academy of Sciences funded this research No. 0279-2021-0011. This material is based upon work supported by the Russian Science Foundation Project No. 19-14-00088 and the Russian Foundation for Basic Research No. 16-04-00065; 16-54-150007; 18-04-00224.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5):455-77. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Bashenkhaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal of Great Lakes Research* 46(3): 508-518. DOI: [10.1016/j.jglr.2020.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.03.015)
- Bondarenko N.A., Vorobyova S.S., Zhuchenko N.A. et al. 2020. Current state of phytoplankton in the littoral area of lake Baikal, spring 2017. *Journal of Great Lakes Research* 46 (1): 17-28. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.10.001)
- Bondarenko N.A., Gusel'nikova N.E. 1989. Production of phytoplankton of Southern Baikal. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences* 1: 77-80.
- Cecchin M., Marcolungo L., Rossato M. et al. 2019. *Chlorella vulgaris* genome assembly and annotation reveal the molecular basis for metabolic acclimation to high light conditions. *Plant Journal* 100(6): 1289-1305. DOI: [10.1111/tbj.14508](https://doi.org/10.1111/tbj.14508)
- Firsova A., Galachyants Yu., Bessudova A. et al. 2023. Summer phytoplankton species composition and abundance in the southern basin of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 204-228. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-204](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-204)
- Gao S., Davis P., Liu K. et al. 1994. Asymmetric upwarp of the asthenosphere beneath the Baikal rift zone, Siberia. *Journal of Geophysical Research* 99: 15319-15330. DOI: [10.1029/94JB00808](https://doi.org/10.1029/94JB00808)
- Greiner S., Lehwark P., Bock R. 2019. Organellar-GenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research* 47(W1). DOI: [10.1093/nar/gkz238](https://doi.org/10.1093/nar/gkz238)
- Han B., Mu Y., Tan D. 2021. The chloroplast genome of a unicellular green alga strain isolated from the rubber processing wastewater. *Mitochondrial DNA Part B: Resources* 6(1): 15-16. DOI: [10.1080/23802359.2020.1844090](https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1844090)
- Kozhova O.M. 1959. About the subglacial "bloom" of phytoplankton in Lake Baikal. *Botanical Journal* 44(7): 1001.
- Kozhova O.M. 1987. Phytoplankton of Lake Baikal: structural and functional characteristics. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol* 25: 19-37.
- Lehwark P., Greiner S. 2019. GB2sequin - A file converter preparing custom GenBank files for database submission. *Genomics* 111(4): 759-761. DOI: [10.1016/j.ygeno.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.003)

Martens K. 1997. Speciation in ancient lakes. *Trends In Ecology & Evolution* 12(5): 177-82. DOI: [10.1016/S0169-5347\(97\)01039-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01039-2)

Nagata T., Takai K., Kawanobe K. et al. 1994. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: abundance, growth and grazing mortality during summer. *Journal of Plankton Research* 16(8): 945-959.

Panova Y.A., Chernogor L.I., Belikov S.I. 2024. The complete mitochondrial genome of *Chlorella* sp. isolated from Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 2024 (5): 1267-1275. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-5-1267](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-5-1267)

Petrushin I.S., Belikov S.I., Belykh O.I. et al. 2020. Draft Genome Sequence of the Green Microalga *Chlorella* sp. strain BAC9706, Isolated from Lake Baikal, Russia. *Microbiology Resource Announcements* 9(43): e00966-20. DOI: [10.1128/MRA.00966-20](https://doi.org/10.1128/MRA.00966-20)

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

Tillich M., Lehwark P., Pellizzer T. et al. 2017. GeSeq - versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W6-W11. DOI: [10.1093/nar/gkx391](https://doi.org/10.1093/nar/gkx391)

Timoshkin O.A. 2011. Main tendencies in research of ancient Lake biodiversity; most interesting recent discoveries in biodiversity of Lake Baikal. In: Timoshkin O.A.(Ed.) *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Novosibirsk: Nauka. pp. 1423–1428.

Votintsev K.K., Meshcheryakova A.I., Popovskaya G.I. 1975. *Organic matter cycle in Lake Baikal*. USSR Academy of Sciences. SO Limnol.in-t. Novosibirsk: Nauka.

Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M. et al. 1997. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(11): 5967-5972. DOI: [10.1073/pnas.94.11.5967](https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5967)

Wen Y., Wan D. 2020. The complete chloroplast genome sequence of *Chlorella vulgaris* and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B: Resources* 5(3):2713-2715. DOI: [10.1080/23802359.2020.1787896](https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1787896)

Хлоропластный геном штамма ВАС9706 *Chlorella vulgaris*, выделенного из озера Байкал

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Панова Ю.А.^{1,2}, Черногор Л.И.¹, Беликов С.И.^{1*}

¹ Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

² Сибирский федеральный университет, Академгородок, 13а, Красноярск, 660036, Россия

АННОТАЦИЯ. В настоящей работе представлена полная последовательность хлоропластного генома зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* штамма ВАС9706, выделенного из озера Байкал. Хлоропластный геном представляет собой кольцевую молекулу ДНК длиной 161 721 п.н. и содержит 78 белок-кодирующих генов, 33 гена тРНК и 3 гена рРНК. Сравнительный анализ выявил высокий уровень консервативности генного состава и порядка генов по сравнению с другими штаммами *C. vulgaris*, при этом незначительные различия в основном связаны с интронами и некодирующими областями. Филогенетический анализ, основанный на конкатенированных белок-кодирующих генах хлоропластного генома, показал, что штамм ВАС9706 группируется внутри клады *C. vulgaris* с высокой бутстреп-поддержкой. Полученные результаты указывают на то, что ВАС9706 представляет собой байкальский экотип *C. vulgaris*, а не новый вид.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, хлоропластный геном, озеро Байкал, Chlorellales

Для цитирования: Панова Ю.А., Черногор Л.И., Беликов С.И. Хлоропластный геном штамма ВАС9706 *Chlorella vulgaris*, выделенного из озера Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1380-1389. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1380

1. Введение

Озеро Байкал — уникальное древнее олиготрофное пресноводное озеро, характеризующееся исключительным биоразнообразием и высоким уровнем эндемизма. Это самое глубокое и одно из древнейших пресноводных озёр в мире, содержащее около 20 % мировых запасов пресной воды (Gao et al., 1994; Martens, 1997; Timoshkin, 2011). Длительная геологическая история озера Байкал в сочетании со специфическими климатическими и гидрологическими условиями привела к формированию высокоспециализированных водных сообществ.

Автотрофный пикопланктон играет значимую роль в первичной продукции экосистем озера Байкал. В летний период вклад пикопланктона может достигать 60–90 % от общей первичной продукции озера (Votintsev et al., 1975; Bondarenko and Guselnikova, 1989; Nagata et al., 1994). Основной вклад в биомассу фитопланктона, как правило, вносят диатомовые и золотистые водоросли (Bondarenko et al., 2020), тогда как зелёные водоросли отдела

Chlorophyta обычно считаются редкими и представлены ограниченным числом таксонов.

Хлореллоподобные зелёные водоросли в озере Байкал были впервые описаны на основе микроскопических наблюдений и отмечались эпизодически, в том числе в составе подлёдного фитопланктона (Kozhova, 1959; Kozhova, 1987; Nagata et al., 1994). Более поздние исследования показали заметные изменения в составе фитопланктона Байкала и прилегающих водоёмов. В частности, *Chlorella vulgaris* была обнаружена на всех исследованных станциях Иркутского водохранилища, которое опосредованно связано с озером Байкал, и в отдельные периоды доминировала в подлёдных и припайных фитопланктонных сообществах (Bashenkhaeva et al., 2020; Firsova et al., 2023).

Эти наблюдения поднимают вопросы о происхождении, устойчивости и экологических характеристиках штаммов *Chlorella*, обитающих в холодных пресноводных экосистемах Байкальского региона. Остаётся неясным, представляют ли такие штаммы транзиторные популяции, занесённые из окружающих водоёмов, или же локально адаптированные

*Автор для переписки. Адрес e-mail: sergeibelikov47@gmail.com (С.И. Беликов)

Поступила: 12 ноября 2025;

Принята после доработки: 20 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



экоотипы, способные к выживанию и размножению в условиях низких температур.

Ранее была опубликована черновая последовательность ядерного генома *Chlorella* sp. штамма ВАС9706, выделенного из озера Байкал (Petrushin et al., 2020), а затем выполнен детальный анализ его митохондриального генома (Panova et al., 2024). Эти исследования предоставили важную информацию о геномных особенностях и филогенетическом положении данного штамма, указав на его принадлежность к линии *C. vulgaris* и позволив предположить, что ВАС9706 представляет собой байкальский экоотип этого вида.

Для дальнейшего расширения представлений о геномной организации данного байкальского штамма и проведения сравнительного анализа с другими представителями рода *Chlorella* в настоящей работе была выполнена сборка и анализ полного хлоропластного генома *C. vulgaris* штамма ВАС9706, выделенного из озера Байкал.

2. Материалы и методы

2.1. Секвенирование ДНК и сборка генома

Геномная ДНК была выделена ранее описанным методом (Petrushin et al., 2020) и секвенирована с использованием платформы Illumina MiSeq. Черновая сборка была выполнена с помощью программы SPAdes v. 3.15.4 (Bankevich et al., 2012). Полученная сборка включала 5837 контигов со значением N50 44654 п.н., при этом длина наибольшего контига составляла 317606 п.н.

Полученные контиги полногеномной сборки были выровнены по референсным хлоропластным геномам *C. vulgaris*, доступным в базе данных NCBI, с использованием BLASTn для идентификации контигов хлоропластного происхождения.

2.2. Аннотация генома и визуализация

Для аннотации генома использовали инструмент GeSeq (Tillich et al., 2017) с параметрами по умолчанию для белок-кодирующих генов, тРНК и рРНК, используя хлоропластный геном *C. vulgaris* штамма NJ-7 (номер доступа GenBank MK948100) в качестве референса. Визуализацию геномных карт выполняли с помощью OGDRAW (Greiner et al., 2019), а также подготавливали файлы для GB2sequin (Lehwark and Greiner, 2019).

2.3. Филогенетический анализ

Эволюционный анализ был проведён методом максимального правдоподобия с использованием программы MEGA11 (Tamura et al., 2021). Оптимальная модель нуклеотидных замен подбиралась автоматически, надёжность ветвей оценивали на основе 1000 бутстреп-реплик. Из базы данных NCBI были отобраны все доступные на момент исследования полностью аннотированные хлоропластные геномы представителей порядка Chlorellales. Из них были извлечены все белок-ко-

дирующие последовательности, выполнены выравнивания и проведена их конкатенация. Для повышения качества выравнивания плохо выровненные участки были удалены.

Итоговое филогенетическое дерево построено на основе 73 конкатенированных белок-кодирующих генов хлоропластного генома, полученных для 16 таксонов (пять аннотированных генов *ucf* были исключены из анализа).

3. Результаты и обсуждения

3.1. Характеристика хлоропластного генома

Полный хлоропластный геном *C. vulgaris* штамма ВАС9706 представляет собой кольцевую двуцепочечную молекулу ДНК длиной 161721 п.н. Геном содержит в общей сложности 114 генов, включая 78 белок-кодирующих генов, 33 гена тРНК и 3 гена рРНК (Рис. 1).

К числу белок-кодирующих генов относятся: один ген *accD*; шесть генов субъединиц АТФ-синтазы (*atpA*, *atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpI*); один ген, связанный с формированием клеточной оболочки (*cemA*); три гена протохлорофиллидредуктазы (*chlB*, *chlL*, *chlN*) и один ген Mg-протопорфирин IX-хелатазы (*chlI*); два гена, связанные с транспортом сульфатов (*cysA* и *cysT*); два гена, участвующие в клеточном делении и контроле качества белков (*ftsH*, *minD*); две гидролазы (*I-CvuI* и *clpP*); один фактор инициации трансляции (*infA*); шесть генов, связанных с цитохромами (*ccsA*, *petA*, *petB*, *petD*, *petG*, *petL*); 22 гена, участвующие в фотосинтезе (*rbcL*, *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaI*, *psaJ*, *psaM*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *psbF*, *psbH*, *psbI*, *psbJ*, *psbK*, *psbL*, *psbM*, *psbN*, *psbT*, *psbZ*); 21 ген рибосомных белков (*rpl12*, *rpl14*, *rpl16*, *rpl19*, *rpl2*, *rpl20*, *rpl23*, *rpl32*, *rpl36*, *rpl5*, *rps11*, *rps12*, *rps14*, *rps18*, *rps19*, *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps9*); четыре гена, участвующие в синтезе рРНК (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*); один ген фактора элонгации Tu (*tufA*); а также пять генов семейства *ycf* (*ycf3*, *ycf4*, *ycf62*, *ycf12*, *ycf78*).

Тридцать три гена тРНК обеспечивают перенос всех 20 аминокислот; при этом представлены три гена тРНК-Gly, два тРНК-Ile, четыре тРНК-Leu, три тРНК-Arg, три тРНК-Ser, два тРНК-Thr и два тРНК-Val.

Полная последовательность хлоропластного генома *C. vulgaris* ВАС9706 депонирована в базе данных GenBank под номером доступа PQ037191.1.

3.2. Сравнительный анализ с другими штаммами *C. vulgaris*

Опубликованные на настоящий момент полные хлоропластные геномы *C. vulgaris* различаются по размеру генома и геномной насыщенности, что отражает различия в подходах к аннотации и полноте сборок (Таблица 1). Различия в числе аннотированных белок-кодирующих генов в значительной степени обусловлены используемыми стратегиями аннотации и критериями включения генов.

ной вставкой, что приводит к формированию более длинной открытой рамки считывания у ВАС9706.

В целом большинство нуклеотидных замен между ВАС9706 и другими штаммами *C. vulgaris* локализованы в некодирующих межгенных областях, тогда как белок-кодирующие гены отличаются высокой степенью консервативности. В частности, в гене *rbcL* не было выявлено ни одной аминокислотной замены, что указывает на жесткие функциональные ограничения, характерные для ключевых белков фотосинтетического аппарата.

3.3. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ показал, что штамм ВАС9706 группируется с другими штаммами *C. vulgaris*, образуя хорошо поддерживаемую кладу со 100% бутстреп-поддержкой (Рис. 2). Полученный результат согласуется с ранее выполненными анализами на основе митохондриального генома и подтверждает таксономическую принадлежность ВАС9706 к виду *C. vulgaris*.

4. Обсуждение

Полный хлоропластный геном штамма ВАС9706, выделенного из озера Байкал, дополняет ранее опубликованные данные о митохондриальном геноме данного штамма. Сравнительный анализ выявил у *C. vulgaris* высокий уровень консервативности генового состава, порядка генов и общей организации генома по сравнению с другими штаммами, при этом признаков крупномасштабных перестроек обнаружено не было.

Большинство различий в последовательностях было ограничено интронными и межгенными областями, тогда как белок-кодирующие гены оставались высоко консервативными. В частности, различия, выявленные в интроне гена *psbA*, включая вариации длины интрон-кодируемой эндонуклеазы, вероятно, отражают внутривидовую изменчивость мобильных интронов, а не функциональную дивергенцию фотосинтетических генов.

Филогенетический анализ, основанный на полных последовательностях хлоропластных геномов, уверенно помещает штамм ВАС9706 в кладу *C. vulgaris*, что согласуется с ранее полученными результатами на основе митохондриального генома (Panova et al., 2024). В совокупности эти данные указывают на то, что ВАС9706 представляет собой байкальский экотип *C. vulgaris*, а не новый вид, и обеспечивают дополнительный органеллярный референс для будущих сравнительных исследований.

5. Заключение

В настоящей работе был собран и проанализирован полный хлоропластный геном *C. vulgaris* штамма ВАС9706, выделенного из озера Байкал. Геном характеризуется высоким уровнем консервативности генового состава и организации по сравнению с другими штаммами *C. vulgaris*, при этом выявленные различия в основном ограничены интронными и межгенными областями. Филогенетический анализ подтверждает, что ВАС9706 представляет собой байкальский экотип *C. vulgaris*, а не отдельный вид. Полученные данные формируют геномную основу для дальнейших исследований штаммов *Chlorella*, обитающих в холодных пресноводных экосистемах.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук № 0279-2021-0011. Исследование также поддержано Российским научным фондом (проект № 19-14-00088) и Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 16-04-00065, 16-54-150007, 18-04-00224).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

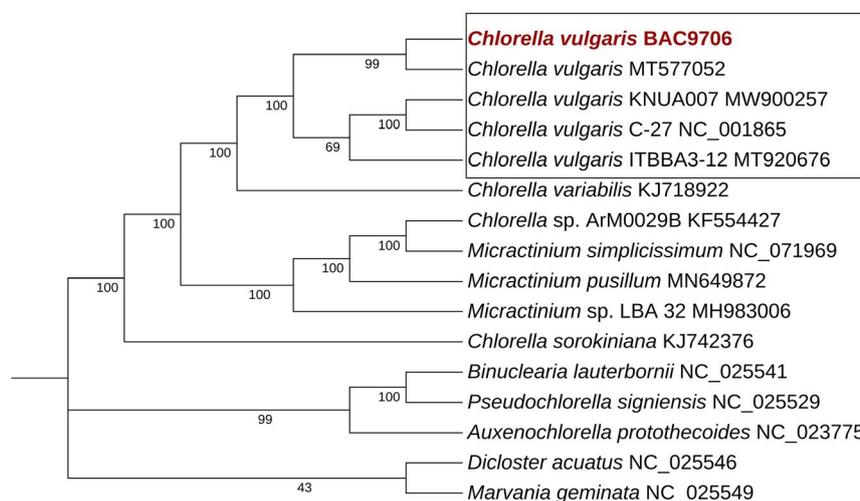


Рис.2. Филогенетическое дерево *C. vulgaris* ВАС9706, построенное на основе конкатенированных белок-кодирующих генов хлоропластного генома представителей порядка Chlorellales.

Список литературы

- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5):455-77. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Bashenkhaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal of Great Lakes Research* 46(3): 508-518. DOI: [10.1016/j.jglr.2020.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.03.015)
- Bondarenko N.A., Vorobyova S.S., Zhuchenko N.A. et al. 2020. Current state of phytoplankton in the littoral area of lake Baikal, spring 2017. *Journal of Great Lakes Research* 46(1): 17-28. DOI: [10.1016/j.jglr.2019.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.10.001)
- Bondarenko N.A., Guseynikova N.E. 1989. Production of phytoplankton of Southern Baikal. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences* 1: 77-80.
- Cecchin M., Marcolungo L., Rossato M. et al. 2019. *Chlorella vulgaris* genome assembly and annotation reveal the molecular basis for metabolic acclimation to high light conditions. *Plant Journal* 100(6): 1289-1305. DOI: [10.1111/tpl.14508](https://doi.org/10.1111/tpl.14508)
- Firsova A., Galachyants Yu., Bessudova A. et al. 2023. Summer phytoplankton species composition and abundance in the southern basin of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 204-228. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-204](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-204)
- Gao S., Davis P., Liu K. et al. 1994. Asymmetric upwarp of the asthenosphere beneath the Baikal rift zone, Siberia. *Journal of Geophysical Research* 99: 15319-15330. DOI: [10.1029/94JB00808](https://doi.org/10.1029/94JB00808)
- Greiner S., Lehwark P., Bock R. 2019. Organellar-GenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research* 47(W1). DOI: [10.1093/nar/gkz238](https://doi.org/10.1093/nar/gkz238)
- Han B., Mu Y., Tan D. 2021. The chloroplast genome of a unicellular green alga strain isolated from the rubber processing wastewater. *Mitochondrial DNA Part B: Resources* 6(1): 15-16. DOI: [10.1080/23802359.2020.1844090](https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1844090)
- Kozhova O.M. 1959. About the subglacial "bloom" of phytoplankton in Lake Baikal. *Botanical Journal* 44(7): 1001.
- Kozhova O.M. 1987. Phytoplankton of Lake Baikal: structural and functional characteristics. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol* 25: 19-37.
- Lehwark P., Greiner S. 2019. GB2sequin - A file converter preparing custom GenBank files for database submission. *Genomics* 111(4): 759-761. DOI: [10.1016/j.ygeno.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.003)
- Martens K. 1997. Speciation in ancient lakes. *Trends In Ecology & Evolution* 12(5): 177-82. DOI: [10.1016/s0169-5347\(97\)01039-2](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(97)01039-2)
- Nagata T., Takai K., Kawanobe K. et al. 1994. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: abundance, growth and grazing mortality during summer. *Journal of Plankton Research* 16(8): 945-959.
- Panova Y.A., Chernogor L.I., Belikov S.I. 2024. The complete mitochondrial genome of *Chlorella* sp. isolated from Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology* 2024 (5): 1267-1275. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-5-1267](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-5-1267)
- Petrushin I.S., Belikov S.I., Belykh O.I. et al. 2020. Draft Genome Sequence of the Green Microalga *Chlorella* sp. strain BAC9706, Isolated from Lake Baikal, Russia. *Microbiology Resource Announcements* 9(43): e00966-20. DOI: [10.1128/MRA.00966-20](https://doi.org/10.1128/MRA.00966-20)
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)
- Tillich M., Lehwark P., Pellizzer T. et al. 2017. GeSeq - versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W6-W11. DOI: [10.1093/nar/gkx391](https://doi.org/10.1093/nar/gkx391)
- Timoshkin O.A. 2011. Main tendencies in research of ancient Lake biodiversity; most interesting recent discoveries in biodiversity of Lake Baikal. In: Timoshkin O.A.(Ed.) *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Novosibirsk: Nauka. pp. 1423-1428.
- Votintsev K.K., Meshcheryakova A.I., Popovskaya G.I. 1975. Organic matter cycle in Lake Baikal. *USSR Academy of Sciences. SO Limnol.in-t. Novosibirsk: Nauka*.
- Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M. et al. 1997. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(11): 5967-5972. DOI: [10.1073/pnas.94.11.5967](https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5967)
- Wen Y., Wan D. 2020. The complete chloroplast genome sequence of *Chlorella vulgaris* and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B: Resources* 5(3):2713-2715. DOI: [10.1080/23802359.2020.1787896](https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1787896)

Vertical distributions of dissolved methane into bottom sediments from background areas of Lake Baikal

Ivanov V.G.*^{ORCID}, Khabuev A.V.^{ORCID}

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Vertical distributions of dissolved methane and this flux into bottom sediments (up to 3 m thickness) from background (undisturbed sedimentation) areas of the Southern, Middle and Northern basins of Lake Baikal were obtained and characterized. Vertical methane profiles at all stations are similar characteristics: low concentrations in the near-surface layers ($\leq 1\text{--}2\ \mu\text{M}$) and a steady increase with depth. The highest concentrations of methane into sedimentary were observed in the Middle basin, followed by somewhat lower levels in the Southern, and concentrations an order of magnitude lower in in the Northern basin. The exponential decrease in methane concentrations toward to the bottom–water interface to equally low values, regardless of its content within the sediment, indicates its significant oxidation and consequently minimal influence on methane concentrations at the near-bottom water interface. The obtained results fill a gap in knowledge concerning the vertical distribution of methane into baikalian bottom sediments and are important for assessing the stability and functioning of hydrocarbon systems in a cold and deep freshwater reservoir.

Keywords: methane concentration, bottom sediments, diffusive flux, headspace equilibration method, Baikal

For citation: Ivanov V.G., Khabuev A.V. Vertical distributions of dissolved methane into bottom sediments from background areas of Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1390-1401. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1390

1. Introduction

In the context of global climate change, quantifying the concentrations and distribution of greenhouse gases in the ocean and inland water bodies is of scientific and applied interest. Since the late 20th century, attention to methane in aquatic ecosystems has increased because of its role in atmospheric chemistry and, in particular, in ozone layer depletion processes (Bazhin, 2003). Studying the conditions of formation and distribution patterns of methane in bottom sediments of various types of water bodies has also traditionally been used as an exploration criterion for petroleum potential areas. Interest has recently grown further due to the demonstrated utility of dissolved methane concentrations as indicators of anthropogenic or natural pollution in aquatic environments.

Gases in the bottom sediments of Lake Baikal have been studied in different time periods (Efremova and Gritchina, 1981; Lebed', 1984; Isaev and Mikheev, 2001). The first detailed studies were conducted

by VNIIGAZ researchers A.G. Efremova and M.V. Andreeva with participation from LIN SB RAS in 1978. In the 1980s, extensive geochemical studies in the Selenga shallow area under the direction of G.G. Lebed' revealed high gas saturation of the upper sediment layer with methane (up to $10\text{--}25\ \text{cm}^3\ \text{kg}^{-1}$), especially in the Proval Bay. The authors noted a direct correlation between hydrogen and methane concentrations and low concentrations of heavy hydrocarbon (HH) gases. Later studies showed the presence of nitrogen and methane gas types, as well as intermediate types, in the bottom sediments (Isaev et al., 2002). Among HH gases, the presence of ethane, propane, ethylene, and propylene was noted (Isaev et al., 2002). Methane concentrations in the near-bottom waters of the Baikal, are very low ($\sim 10\text{--}40\ \text{nl/L}$) that is similar to the World Ocean, (Egorov, 2002; Egorov et al., 2003; Egorov et al., 2005; Mizandrontsev et al., 2020).

The vertical distribution of methane in Lake Baikal's bottom sediments is of particular interest due to the lake's great depth, which results in sedimentation

*Corresponding author. E-mail address: vigo@lin.irk.ru (V.G. Ivanov)

Received: November 24, 2025;

Accepted after revised: December 19, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



conditions approaching those of marine environments. Nevertheless, existing information on the patterns of its vertical distribution in the bottom sediments of different lake basins is very limited, as historically the main focus has been on methane in zones of gas-bearing fluid discharge and in various types of hydrates-bearing geological structures (Kalmychkov et al., 2006). Thus, distribution of methane into bottom sediments of the Academician Ridge (background areas) has been described in detail (Zemskaya et al., 2008). Other studies were limited to measuring methane content only in the uppermost surface sediment layers (Gar'kusha et al., 2019; Och et al., 2012).

Thus, the aim of this work was to measure and analyze the vertical distribution of methane concentrations into bottom sediments from background areas in the three basins of Lake Baikal.

2. Materials and methods

Study Areas

The Baikal depression are clearly distinguished: Southern, Middle, and Northern (Fig. 1). Southern and Middle Baikal are identified as independent deep-water formations, separated by the Buguldeyka saddle. Northern Baikal is distinguished by shallower depths and a number of features in the basement geological structure. It is separated from Middle Baikal by an inter-basin saddle, including subaerial and subaqueous fragments (Mats et al., 2001). These, in turn, are heterogeneous in internal structure and consist of smaller depressions differing in their tectonic development and sedimentation (Levi et al., 1997).

Background areas of Lake Baikal can be defined as areas of the bottom with continuous sedimentation, undisturbed by tectonic activity or fluid discharge, i.e., where there is no displacement or redeposition of bottom sediments. Such areas include leveled central parts of the basins or on inter-basin saddles. For the former, the presence of turbidites is an anomaly in the continuity of sedimentation conditions, which should be considered in the analysis of results.

Sampling and Analysis Methods

Sediment cores were collected during June–July from 2017 to 2023 (Fig. 1, Table 1). Gravity coring with a straight-through steel tube (outer diameter 127 mm) was conducted from the research vessel “G.Yu.

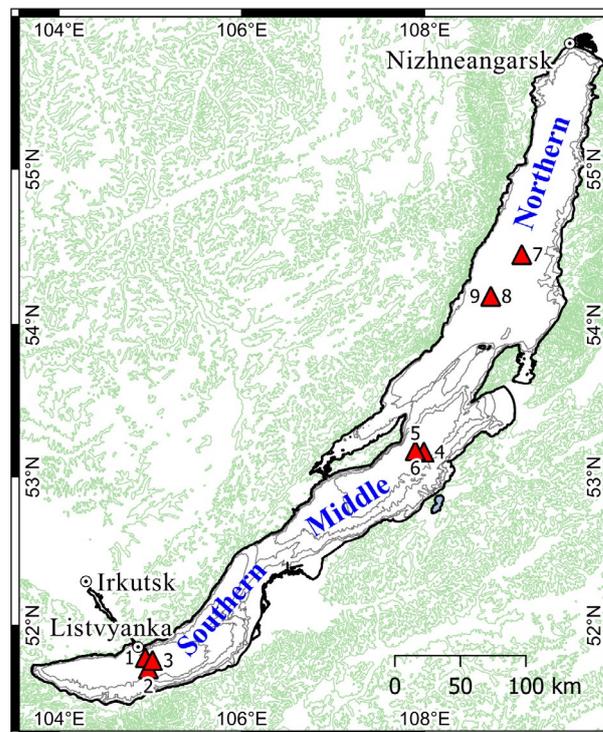


Fig.1. The map of core sampling (Table 1).

Vereshchagin”. A plastic liner (inner diameter 110 mm) was inserted into the corer to retain the recovered sediment. After retrieval on board, the liner was cut to obtain a continuous geological section of bottom sediments up to 3.5 meters long.

Samples for analysis were collected using a truncated 3 ml syringe. Methane content was determined using the headspace phase-equilibrium degassing method (Bolshakov and Egorov, 1987). For this, a 2 ml sediment sample was placed in a 33 ml glass vial filled with 20 ml of distilled water. The vial was sealed with an aluminum cap with a rubber septum, turned over, and mechanically shaken for 30 minutes to disintegrate the sediment and achieve maximum degassing.

A gas aliquot was extracted through the hole by syringe and analysed on board by gas chromatography using an “ECHO-EW-PID” gas chromatograph (Russia) with a flame ionization detector. The chromatograph was calibrated against the “Nitrogen” standard ($N_2 + 1000 \text{ ppm } CH_4$) from LLC “PGS-Service” (Zarechny city, Russia).

Table 1. Sampling dates, coordinates and water depths for the stations in three basins of Lake Baikal.

N	Sampling date	Latitude, deg	Longitude, deg	Basin	Station	Depth, m
1	12.07.2018	51.779882	104.945453	Southern	7 km Listvyanka	1400
2	20.07.2019	51.702595	104.978775		Listvyanka-Tankhoy	1400
3	16.06.2022	51.76009	105.024683		9 km Listvyanka	1400
4	30.06.2017	53.165472	107.993900	Middle	Izhimei	1610
5	13.07.2019	53.17378	107.900228		Izhimei	1610
6	09.07.2023	53.173768	107.900068		Izhimei	1610
7	02.07.2017	54.455308	109.064938	Northern	Elokhin-Davsha	900
8	16.07.2019	54.186112	108.72612		Zavorotny	900
9	16.07.2020	54.186112	108.72612		Zavorotny	900

The relative analytical error in determining methane concentration in the gas sample was $\pm 5\%$; the combined uncertainty, including potential partial degassing during core handling, were assumed to be $\pm 10\%$.

3. Results

Measured methane concentrations in sediments from different basins are shown in Fig. 2. Methane content in different cores varied widely, from fractions to hundreds of $\mu\text{mol/L}$. Methane content profiles in all lake basins show a significant increase with depth. In Southern and Middle Baikal, saturation was reached at core layers deeper than 1.2-2.0 meters, below these depths, concentrations varied around the achieved values (about 300-700 $\mu\text{mol/L}$) down to the deepest sampled horizons. The highest concentrations of methane into sedimentary were observed in the Middle basin, followed by somewhat lower levels in the Southern, and concentrations an order of magnitude lower in the Northern basin.

An exponential decrease in concentrations predominated approaching toward to the sediment surface. Thus, concentrations in the basins did not exceed 1-2 $\mu\text{mol/L}$ at the sediment surface, with uniform methane concentration at stations in the Northern basin. The increase in methane concentration occurred toward to bottom from 25-50 cm (Fig. 2).

4. Discussion

The dissolved methane profiles obtained in Lake Baikal sediments show a vertical distribution typical for its background areas: low methane concentrations in the upper centimeters of sediment, uniform with depth or with an exponential decrease toward the water boundary, and a pronounced, near-linear increase with depth, reaching quasi-homogeneous values at some stations (3, 4, 5, 6) at depths of 1.5–2.0 m (Fig. 2). The profile at station 2 displays a marked inflection at

~1.2 m, beyond which the rate of methane concentration increase accelerates. A similar inflection was also observed in the sediments of the Academic Ridge, but at a depth of 2.4 m (Zemskaya et al., 2008).

It should be noted that methane concentration profiles obtained in the same area in different years coincide quite well both in shape and in absolute values (profile pairs 1, 3; 5, 6 and 7, 9 in Fig. 2). Given the 3-4 year intervals between samplings, it can be concluded that the processes of methane generation and oxidation in bottom sediments of background areas of the different basins are quasi-stationary, not influenced by inter-annual variability in water inflow and, consequently, the water level of Lake Baikal (e.g., 2017 – low water year; 2021, 2023 – extremely high water years).

At sediment depths > 1 m the highest dissolved methane concentrations were observed in the Middle basin, slightly lower values in the Southern and an order of magnitude lower values in the Northern basin, which can be explained by the content of buried organic matter. For example, total organic carbon contents in sediments of Southern and Middle Baikal is estimated at 1.5–2.5%, while in the Northern basin it is noticeably lower – 0.5–1.5% (Vykhristyuk, 1980). An increase in dissolved methane content with increasing total organic carbon in Lake Baikal sediments is also shown in (Gar'kusha et al., 2019).

At the upper part of the cores (0-10(20) cm), the highest dissolved methane concentrations were similarly observed in the Middle and Southern basins, while in Northern Baikal they were significantly lower and practically did not change with sediment depth, remaining at the level of near-surface layers (Fig. 2). This distribution is likely related to the thickness of the oxidized layer, which has small values in Middle and Southern Baikal (on average 3.5 and 5.5 cm respectively), while in Northern Baikal the average oxidized layer thickness increases to 16 cm (Vologina et al., 2003). Such differences in oxidized layer thickness between basins are due to the depth of oxygen penetration into the sediments, confirmed by direct mea-

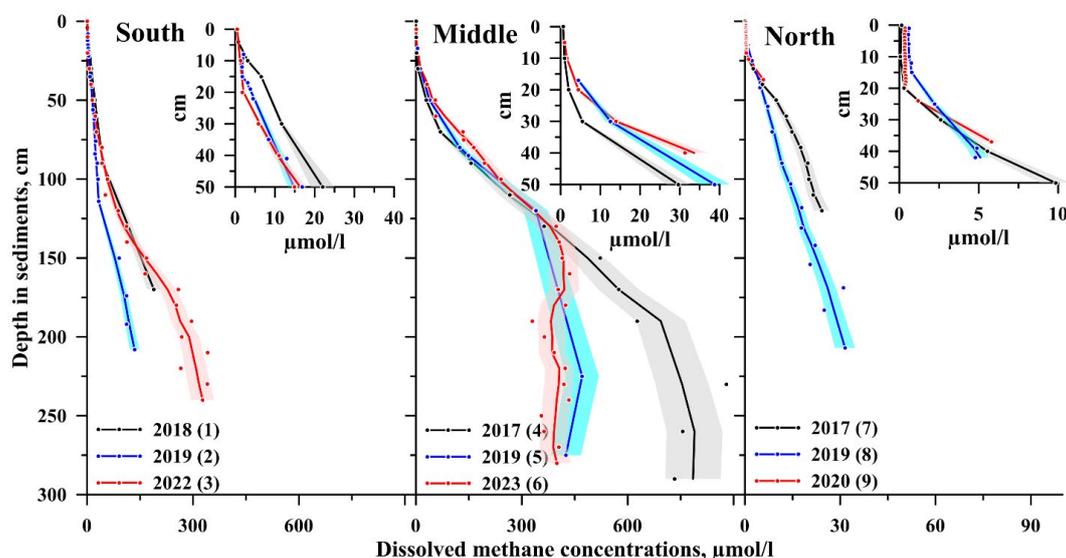


Fig.2. Vertical distribution of methane concentration in bottom sediments of the Southern, Middle, and Northern basins of Lake Baikal. Insets show an enlarged 0.5-meter upper sediment layer. Lines indicate average values. Shaded areas represent the 10% measurement uncertainty.

measurements of oxygen concentration profiles in bottom sediments using microelectrodes (Martin et al., 1998; Och et al., 2012).

In general, the methane contents found in bottom sediments of background areas of Baikal are close to those observed in freshwater systems with low to moderate productivity (Table 2). Methane content in Lake Baikal bottom sediments, both according to our measurements and data from other researchers, varies widely – from 0.1 to 1381 μM (Gar'kusha et al., 2019; Fedorov et al., 2005); the high values of the latter are due to sampling in areas with enhanced sedimentation rates and high terrigenous input (near the mouths of Upper Angara and Selenga rivers, etc.). At the same time, these values are much lower than those noted in places of various geological structures with discharge of gas-bearing mineralized fluids, for example, in the area of the mud volcano Malenky methane concentrations reached 9000 μM (Zemskaya et al., 2008, Zemskaya et al., 2010).

It is important to note that, despite the wide range of methane content within the sediments of studied background areas, in the near-surface layers methane concentrations do not exceed 1-2 μM (Fig. 2). It is also known that in the near-bottom waters of this areas, the concentration of dissolved methane is lower by additional 2-3 orders of magnitude (Mizandroutsev et al., 2020). This difference suggests near complete oxidation of methane supplied from deep layers of bottom sediments in background areas of Lake Baikal, and, accordingly, minimal influence of the methane diffusion flux on its content in near-bottom waters.

Compared to oceanic sediments, whose upper horizons are controlled by sulfate reduction (Bernard, 1979), Baikal sediments exhibit different oxidant relationships: in the lake, due to low concentrations of SO_4^{2-} and NO_3^- , the aerobic oxidation zone is much earlier

replaced by the methanogenesis zone (Namsaraev and Zemskaya, 2000; Aloisi et al., 2019). This determines the characteristic linear profiles of methane increase with depth, confirmed by theoretical calculations (Bazhin, 2003), and later by field measurements in the area of continuous sedimentation on the Academician Ridge (Zemskaya et al., 2008). In the cores we studied, methane concentration profiles also exhibit a close-to-linear increase. In contrast, in marine deep-water background sediments, the upper layers are saturated with sulfates and methanogenesis begins to develop in much deeper layers (Bernard, 1979), therefore dissolved methane concentrations in them are lower than in Lake Baikal sediments.

Finally, it is also worth noting a significant increase in the scatter of measured methane concentrations in each core with depth and, accordingly, with increasing its content (Fig. 2). This is because when the core is retrieved, pressure is released, and zones with high methane content begin to degas and lose part of the dissolved methane, leading to an underestimation of its concentration. The rate of degassing, in turn, depends on sediment lithology: it is high in sands and much lower in clayey deposits. Additional mechanical disturbances to the sediment during sampling only accelerate the process in layers where the concentration is many times higher than the equilibrium with the atmosphere, resulting in greater scatter in the measured values. Therefore, when working with high methane concentrations in sediments, it is advisable to use pressure-conserving coring techniques.

5. Conclusions

As a result of this study, data on the detailed vertical distribution of dissolved methane in bottom sedi-

Table 2. Methane content in bottom sediments of some lakes.

Lake	Rang of methane content in bottom sediments	Reference
Ladoga	1 - 3864 μM	Fedorov et al., 2005
Onega	3.12 – 535 μM	Vedishcheva, 2020
Valday	2 - 4818 μM	Fedorov et al., 2005
Uzhin	163.4 - 468 μM	Fedorov et al., 2005
Tambukan (Pyatigorsk)	1 - 180 μM	Fedorov et al., 2005
Chertovo (Sea of Azov)	2 - 198 μM	Fedorov et al., 2005
Glubokoe	1 - 55.6 μM	Fedorov et al., 2005
Tundra lakes	0.01 - 113 μM	Fedorov et al., 2005
Mendota, USA	1 - 153 μM	Fedorov et al., 2005
Michigan, USA	1 - 9.6 μM	Fedorov et al., 2005
Erie	0.4 - 3658 μM	Adams and Fendinger, 1986
Biwa	40 - 2410 μM	Murase and Sugimoto, 2001
Fryxell	1100 μM	Smith et al., 1993
Loosdrecht	100 - 1500 μM	Sinke et al., 1992
Antarctic freshwater	1.7 – 630 μM	Ellis-Evans, 1984
Geneva	100 – 1100 μM	Sollberger et al., 2014

ments of background areas of the three basins of Lake Baikal have been obtained and summarized for the first time. The vertical distributions are characterized by low methane concentrations in the near-surface sediment layers and a pronounced close-to-linear increase with subbottom depth, reaching quasi-homogeneous values at about 1.5–2.0 m depths. This profile shape reflects the specifics of Baikal sediments, where the aerobic oxidation zone, due to low sulfate and nitrate content, is rapidly replaced by the zone of methanogenesis. This fundamentally distinguishes the bottom sediments of Lake Baikal from background marine sediments. Comparison with other lakes shows that the range of methane concentrations in sediments of background areas of Lake Baikal corresponds to the range typical for freshwater systems with low to moderate productivity.

Significant differences in methane concentrations between the lake basins have been identified: maximum values are characteristic of the Middle basin (up to 880 μM), somewhat lower for the Southern basin (up to 350 μM), and an order of magnitude lower for the Northern basin (up to 32 μM). Despite the significant range in methane concentrations within the sediment column of different basins, in upper part of cores (0–10(20) cm) its content does not exceed 1–2 μM , indicating significant oxidation of methane supplied from deeper horizons and consistent with 2–3 orders of magnitude lower concentrations of dissolved methane in the near-bottom waters of Lake Baikal.

Good reproducibility of methane concentration profiles, obtained in the same areas in different years, both in shape and absolute values, indicates a quasi-stationary nature of the methane generation and oxidation processes in bottom sediments of background areas of Lake Baikal, not affected by interannual variability in lake level.

In the near future, it is planned to conduct more detailed studies of the vertical distribution of dissolved methane concentrations on a broad network of stations across Lake Baikal to assess intra-basin heterogeneities in its content.

Acknowledgements

Sampling for gas chromatographic analysis was conducted from the R/V “G.Yu. Vereshchagin” (The Center for Collective Use «Research vessels Center of LIN SB RAS on Lake Baikal»). The work was carried out within the framework of State Assignments of LIN SB RAS No. 0279-2021-0006 and 0279-2021-0004. The authors express gratitude to T.I. Zemskaya for organizing expedition work and comprehensive support of the research, T.V. Pogodaeva, and A.P. Fedotov for critical and useful discussion of the results, and M.M. Makarov for assistance in preparing cartographic material.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Adams D.D., Fendinger N.J. 1986. Early Diagenesis of Organic Matter in the Recent Sediments of Lake Erie and Hamilton Harbor. In: Sly P.G. (Ed.), *Sediments and Water Interactions*. New York: Springer, pp. 305–318. DOI: [10.1007/978-1-4612-4932-0_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4932-0_25)
- Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J. et al. 2019. Biogeochemical processes at the Krasnyi Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps. *Geo-Marine Letters* 39: 59–75.
- Bazhin N.M. 2003. Methane emission from the active layer. In: Conference “Gas Hydrates in the Earth’s Ecosystem”, pp. 19. (in Russian)
- Bernard B.B. 1979. Methane in marine sediments. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 26(4): 429–443. DOI: [10.1016/0198-0149\(79\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0198-0149(79)90056-6)
- Bolshakov A.M., Egorov A.V. 1987. On the use of the phase-equilibrium degassing technique in gasometric studies. *Oceanology* 27: 861–862. (in Russian)
- Efremova A.G., Gritchina N.D. 1981. Gas hydrates in marine sediments and the problem of their practical use. *Geology of Oil and Gas* 2: 32–35. (in Russian)
- Egorov A.V. 2002. Formation and decomposition of gas hydrates in sediments of the Arctic submarine mud volcano Haakon Mosby. *Experience of System Studies in the Arctic*. Moscow: Nauchny Mir, pp. 511–521.
- Egorov A.V., Zemskaya T.I., Grachev M.A. 2005. First data on patterns of methane distribution in water and sediments of Lake Baikal. In: *The Fourth Vereshchagin Baikal Conference*, pp. 77–78. (in Russian)
- Egorov A.V., Zemskaya T.I., Grachev M.A. 2003. First data on patterns of vertical methane distribution in the water column of Lake Baikal. In: *The XV International School on Marine Geology*, pp. 169–170. (in Russian)
- Ellis-Evans J.C. 1984. Methane in maritime Antarctic freshwater lakes. *Polar Biology* 3: 63–71. DOI: [10.1007/BF00258149](https://doi.org/10.1007/BF00258149)
- Fedorov Yu.A., Tambieva N.S., Gar’kusha D.N. et al. 2005. Methane in aquatic ecosystems. Rostov-on-Don: ZAO “Rostizdat”. (in Russian)
- Gar’kusha D.N., Fedorov Yu.A., Tambieva N.S. et al. 2019. Methane in water and bottom sediments of Lake Baikal. *Water Resources* 46(5): 511–522. (in Russian)
- Isaev V.P., Konovalova N.G., Mikheev P.V. 2002. Natural gases of Baikal. *Geology and Geophysics* 43(7): 638–643. (in Russian)
- Isaev V.P., Mikheev P.V. 2001. Gas clathrate hydrates of Lake Baikal. In: *The IV Regional Scientific-Practical Conference “Intellectual and Material Resources of Siberia*, pp. 213–223. (in Russian)
- Kalmychkov G.V., Egorov A.V., Kuzmin M.I. et al. 2006. Genetic types of methane in Lake Baikal. *Doklady Akademii Nauk* 411(5): 672–675. (in Russian)
- Lebed’ G.G. 1984. Report on the results of regional, area-wide and experimental-methodological geochemical works for 1981–1983. (in Russian)
- Levi K.G., Arzhannikova A.V., Buddo V.Yu. et al. 1997. Modern geodynamics of the Baikal Rift. *Razvedka i Okhrana Nedr* 1: 10–20. (in Russian)
- Martin P., Granina L., Martens K. et al. 1998. Oxygen concentration profiles in sediments of two ancient lakes: Lake Baikal (Siberia, Russia) and Lake Malawi (East Africa). *Hydrobiologia* 367: 163–174. DOI: [10.1023/A:1003280101128](https://doi.org/10.1023/A:1003280101128)
- Mats V.D., Ufimtsev G.F., Mandel’baum M.M. et al. 2001. *Cenozoic of the Baikal Rift Basin: Structure and Geological History*. Novosibirsk: Publishing House of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. (in Russian)

- Mizandronev I.B., Kozlov V.V., Ivanov V.G. et al. 2020. Vertical distribution of methane in the water column of Baikal. *Water Resources* 47(1): 78–85. DOI: [10.31857/S0321059620010101](https://doi.org/10.31857/S0321059620010101) (in Russian)
- Murase J., Sugimoto A. 2001. Spatial distribution of methane in the Lake Biwa sediments and its carbon isotopic compositions. *Geochemical journal* 35(4): 257–263. DOI: [10.2343/geochemj.35.257](https://doi.org/10.2343/geochemj.35.257)
- Namsaraev B.B., Zenskaya T.I. 2000. Microbiological processes of carbon cycling in bottom sediments of Lake Baikal. Novosibirsk: Publishing House of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. (in Russian)
- Och L., Müller B., Voegelin A. et al. 2012. New insights into the formation and burial of Fe/Mn accumulations in Lake Baikal sediments. *Chemical Geology* 330-331: 244–259. DOI: [10.1016/j.chemgeo.2012.09.011](https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.09.011)
- Sinke A.J.C., Cornelese A.A., Cappenberg T.E. et al. 1992. Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic Lake Loosdrecht. The Netherlands. *Biogeochemistry* 16: 43–61. DOI: [10.1007/BF00024252](https://doi.org/10.1007/BF00024252)
- Smith R.L., Miller L.G., Howes B.L. 1993. The geochemistry of methane in Lake Fryxell, an amictic, permanently ice-covered, antarctic lake. *Biogeochemistry* 21: 95–115. DOI: [10.1007/BF00000873](https://doi.org/10.1007/BF00000873)
- Sollberger S., Corella J.P., Girardclos S. et al. 2014. Spatial heterogeneity of benthic methane dynamics in the subaquatic canyons of the Rhone River Delta (Lake Geneva). *Aquatic Science* 76(1): 89–101. DOI: [10.1007/s00027-013-0319-2](https://doi.org/10.1007/s00027-013-0319-2)
- Vedishcheva O.N. 2020. Characteristics of organic matter and gases in bottom sediments of Lake Onega. In: “Proceedings of the International Youth Scientific Forum ‘LOMONOSOV-2020’”. Electronic resource. (in Russian)
- Vologina E.G., Sturm M., Vorob’eva S.S. et al. 2003. Character of sedimentation in lake Baikal in the Holocene. *Geology and Geophysics* 44(5): 407–421. (in Russian)
- Vykhristyuk L.A. 1980. Organic matter in bottom sediments of Baikal. *Proceedings of the Limnological Institute, Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences* 32: 80. (in Russian)
- Zenskaya T.I., Khlystov O.M., Egorov A.V. et al. 2008. Complex studies of gas hydrate manifestations in Lake Baikal sediments. *Environmental and Climate Change* 4: 125–152. (in Russian)
- Zenskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V. et al. 2010. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky Mud Volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3. *Geo-Marine Letters* 30: 411–425. DOI: [10.1007/s00367-010-0199-6](https://doi.org/10.1007/s00367-010-0199-6)

Вертикальное распределение концентрации растворенного метана в осадках фоновых районов озера Байкал

Иванов В.Г.¹, Хабуев А.В.¹

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Впервые получены и обобщены вертикальные распределения концентраций растворенного метана в донных отложениях фоновых районов южной, средней и северной котловин озера Байкал вплоть до 3-х метровых глубин осадочного чехла. Вертикальные профили содержания метана на всех станциях имеют сходные черты и характеризуются низкими концентрациями в приповерхностных слоях (не превышающими 1–2 мкМ) и устойчивым ростом содержания метана с глубиной. Максимальные концентрации метана в толще осадка отмечены в средней котловине, несколько меньшие — в южной и на порядок меньшие — в северной котловине. Экспоненциальное снижение концентрации метана в отложениях при приближении к границе дно–вода к одинаково малым значениям независимо от его содержания в толще осадка свидетельствует о его существенном окислении и, как следствие, минимальном влиянии на концентрации метана в придонной воде. Полученные результаты восполняют пробел в знаниях о вертикальном распределении растворенного метана в осадках озера Байкал, и важны для оценки устойчивости углеводородных систем и механизмов их функционирования в условиях холодноводного глубоководного пресноводного водоёма.

Ключевые слова: концентрация метана, донные отложения, метод парофазного равновесия, Байкал

Для цитирования: Иванов В.Г., Хабуев А.В. Вертикальное распределение концентрации растворенного метана в осадках фоновых районов озера Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1390-1401. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1390

1. Введение

В связи с глобальным изменением климата изучение содержания и распределения парниковых газов в Мировом океане и внутриконтинентальных водоемах представляет научный и практический интерес. В конце прошлого века большое внимание стало уделяться изучению закономерностей распределения метана в различных водных экосистемах в связи со значительной его ролью в атмосферных химических реакциях и, в частности, в процессах разрушения озонового слоя (Бажин, 2003). Изучение условий образования и закономерностей распределения метана в донных отложениях водоемов различного типа также традиционно используется в качестве поискового критерия нефтегазонасности акваторий. В последнее время интерес к этому газу усилился и в связи с подтверждением возможности использования концентрации раство-

ренного метана для оценки уровня загрязненности водоемов.

Газы донных отложений озера Байкал изучались в разные временные периоды (Ефремова и Гритчина, 1981; Лебедь, 1984; Исаев и Михеев, 2001). Первые детальные исследования проводились сотрудниками ВНИИгаз А.Г. Ефремовой и М.В. Андреевой при участии сотрудников ЛИИ СО РАН в 1978 г. В 80-х годах выполнен большой объем геохимических работ в районе Селенгинского мелководья под руководством Г.Г. Лебеда, в ходе которых установлена высокая газонасыщенность верхнего слоя осадков метаном (до 10-25 см³/кг), особенно в заливе Провал. Авторы отметили прямую зависимость между концентрациями водорода и метана и невысокие концентрации тяжелых углеводородных (УВ) газов. Более поздние исследования (Исаев и др., 2002) показали присутствие в донных осадках азотных и метановых типов газа, а также их проме-

*Автор для переписки. Адрес e-mail: vigo@lin.irk.ru (В.Г. Иванов)

Поступила: 24 ноября 2025;

Принята после доработки: 19 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



жуточных типов. Из тяжелых УВ отмечено присутствие этана, пропана, этилена и пропилена (Исаев и др., 2002). Концентрация метана в придонных водах Байкала, так же, как и в придонных водах Мирового океана, очень мала (порядка 10-40 нл/л) (Егоров, 2002; Егоров и др., 2003; Егоров и др., 2005, Мизандронцев и др., 2020).

Вертикальное распределение метана в донных осадках Байкала представляет особый интерес в связи с большой глубиной озера, в результате чего условия осадконакопления приближаются к морским. Несмотря на это, существующие сведения о закономерностях его вертикального распределения в донных отложениях разных котловин озера весьма ограничены, т.к. исторически основное внимание уделялось исследованию распределения и генезиса метана в зонах разгрузки газосодержащих флюидов и в различных типах геологических структур, где обнаруживались газовые гидраты (Калмычков и др., 2006). Для районов непрерывного осадконакопления Байкала в литературе описано лишь поддонное распределение метана на Академическом хребте (Земская и др., 2008). Другие исследования были ограничены измерением содержания метана только в небольших приповерхностных слоях осадка (Гарькуша и др., 2019; Och et al., 2012).

Таким образом, целью настоящей работы являлось измерение и анализ вертикального распределения концентрации растворенного метана в донных отложениях фоновых районов трёх котловин озера Байкал и сравнение полученных результатов с данными по другим водным объектам.

2. Материалы и методы

Районы исследования

Морфологически внутри Байкальской впадины отчетливо выделяются три котловины это южная, средняя и северная (Рис. 1). Южный и Средний Байкал выделяются как самостоятельные глубоководные образования, разделенные Бугульдейской перемычкой. Северный Байкал отличается меньшими глубинами и рядом особенностей геологического строения фундамента. Он отделен от Среднего Байкала межвпадинной перемычкой, включающей наземный и подводный фрагменты

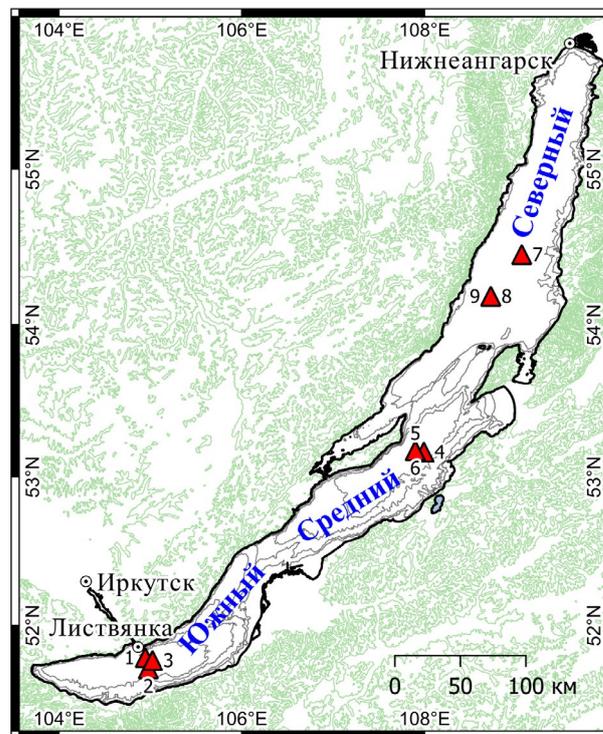


Рис.1. Схема расположения отбора проб, подробная расшифровка номеров станций приведена в Таблице 1.

(Мац и др., 2001). Они, в свою очередь, неоднородны по внутренней структуре и состоят из более мелких депрессий, отличающихся по своему тектоническому развитию и осадконакоплению (Леви и др., 1997).

К фоновым районам озера Байкал можно отнести участки дна с непрерывным осадконакоплением, ненарушенным тектонической активностью или флюидной разгрузкой, т.е. не происходит смещение или переотложение донных отложений. К таким районам относятся выровненные участки в центральных частях котловин или на межвпадинных перемычках. Для первых наличие турбидитов является аномалией в непрерывности условий осадконакопления, что следует учитывать при анализе результатов.

Методы отбора и анализа

Отбор проб для измерения концентрации метана в осадках трех котловин проводился в июне-июле с 2017 по 2023 гг. (Рис. 1, Таблица 1).

Таблица 1. Даты, координаты и глубины отбора проб на станциях в трех котловинах озера Байкал.

N	Дата отбора	Широта, град	Долгота, град	Котловина	Станция	Глубина, м
1	12.07.2018	51,779882	104,945453	южная	7 км Листвянка	1400
2	20.07.2019	51,702595	104,978775		Листвянка-Танхой	1400
3	16.06.2022	51,76009	105,024683		9 км Листвянка	1400
4	30.06.2017	53,165472	107,993900	средняя	Ижимей	1610
5	13.07.2019	53,17378	107,900228		Ижимей	1610
6	09.07.2023	53,173768	107,900068		Ижимей	1610
7	02.07.2017	54,455308	109,064938	северная	Елохин-Давша	900
8	16.07.2019	54,186112	108,72612		Заворотный	900
9	16.07.2020	54,186112	108,72612		Заворотный	900

Отбор проб грунта осуществлялся прямым геологическим опробованием с помощью пробоотборника гравитационного типа с наружным диаметром 127 мм с борта научно-исследовательского судна «Г.Ю. Верещагин». Внутри пробоотборника вставляется пластиковый вкладыш с внутренним диаметром 110 мм, в который отбираются донные отложения. После подъема на борт судна вкладыш разрезался и получался непрерывный геологический разрез донных отложений длиной до 3,5 метров.

Отбор образцов производился обрезанным 3 мл шприцем. Содержание метана определялось с использованием метода фазово-равновесной дегазации (Большаков и Егоров, 1987), для чего отобранный образец осадка объемом 2 мл помещался в стеклянный пузырек объемом 33 мл, заполненный 20 мл дистиллированной водой. Пузырек закрывался алюминиевой крышечкой с резиновой пробкой, переворачивался и подвергался механической тряске с целью дезинтеграции осадка и его максимальной дегазации в течение 30 минут.

Для хроматографического анализа аликвота газа отбиралась шприцом через отверстие в крышке. Анализ проводился на газовом хроматографе «ЭХО-ЕW-ПИД» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором непосредственно на борту судна. Калибровка хроматографа производилась по стандарту «Азот» ($N_2 + 1000 \text{ ppm } CH_4$) фирмы ООО «ПГС-Сервис» (г. Заречный). Относительная ошибка определения концентрации метана в пробе газа составляет $\pm 5\%$, суммарная ошибка, с учетом возможной частичной дегазации осадка при разделке керна принята равной $\pm 10\%$.

3. Результаты

Измеренные концентрации метана в донных отложениях разных котловин приведены на Рис. 2. Величины концентраций метана в разных кернах

варьировали в широком диапазоне, от долей до сотен мкмоль/л. Профили содержания метана во всех котловинах озера показывают существенный рост с глубиной. В Южном и Среднем Байкале насыщение концентраций достигалось в районе 300-700 мкмоль/л на горизонтах крена более 1,2-2,0 метров, глубже концентрации изменялись вокруг достигнутых значений до самых нижних вскрытых горизонтов. Наибольшие концентрации метана достигались в приповерхностных донных отложениях средней котловины, чуть меньшие - в южной, и на порядок ниже в северной котловине озера.

У поверхности дна концентрации во всех котловинах не превышали 1-2 мкмоль/л, с выделением участков с однородной концентрацией метана на станциях северной котловины. При приближении к поверхности осадка преобладал экспоненциальный спад концентраций. В то время как на глубинах осадка более 25-50 см увеличение концентраций с глубиной становилось близко к линейному (Рис. 2).

4. Обсуждение

Полученные в результате исследования профили растворенного метана в осадках озера Байкал показывают типичное для его фоновых районов вертикальное распределение: низкие концентрации метана в верхних сантиметрах осадка, выровненные по вертикали или с экспоненциальным уменьшением при приближении к границе с водой. И выраженное, преимущественно линейное увеличение концентрации с глубиной, достигающее квазиоднородных значений на отдельных станциях (3, 4, 5, 6) на глубинах 1,5-2,0 м. (Рис. 2). Профиль на станции 2, при этом, имеет заметный перегиб на поддонной глубине 1,2 м, после которого скорость нарастания концентрации метана возрастает. Похожий перегиб наблюдался и в осадках на Академическом хребте, только на глубине 2,4 метра (Земская и др., 2008).

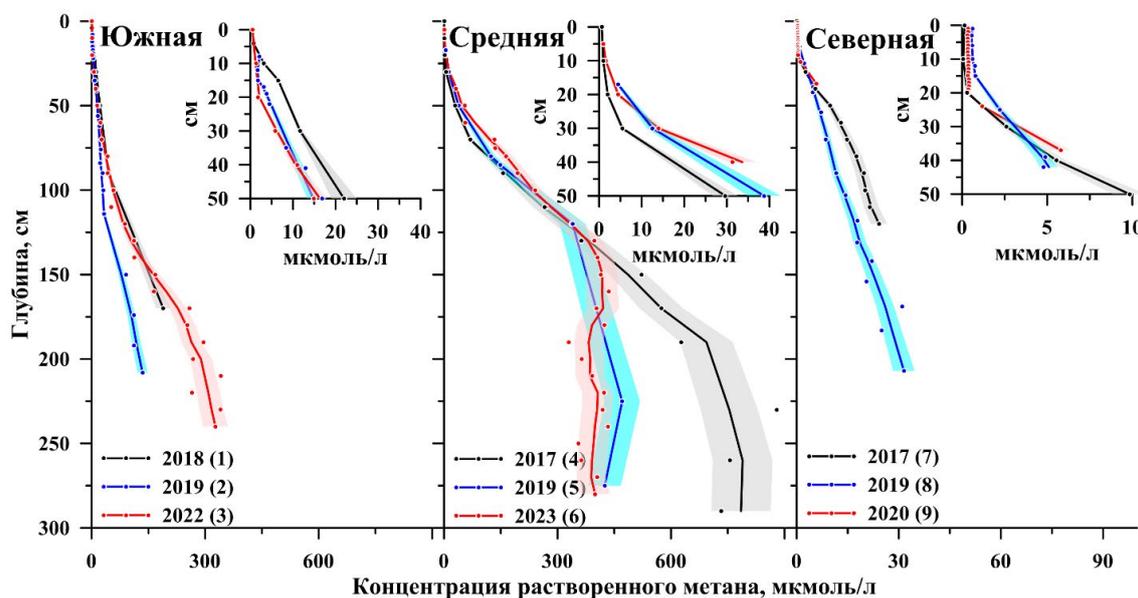


Рис.2. Вертикальное распределение концентрации метана в донных отложениях южной, средней и северной котловин озера Байкал. На врезках показан увеличенный 0,5 метровый верхний слой осадков. Линиями приведены усредненные значения. Закрашенными областями отображена 10% ошибка измерений.

Следует отметить, что профили концентрации метана, полученные в одном и том же районе в разные годы, достаточно хорошо совпадают как по характеру изменений, так и по абсолютным значениям (пары профилей 1, 3; 5, 6 и 7, 9 на Рис. 2). Учитывая 3-4 летние временные промежутки между станциями можно сделать вывод о квазистационарном характере процессов генерации и окисления метана в донных отложениях фоновых районов котловин, на которых не отразилось влияние межгодовой изменчивости водности, и как следствие, уровня озера Байкал (например, 2017 – маловодный; 2021, 2023 – экстремально многоводные годы).

На глубинах осадочного чехла более метра наибольшие концентрации растворенного метана наблюдались в средней котловине, чуть меньшие — в южной и на порядок меньшие — в северной котловине, что может объясняться содержанием захороненного органического вещества. Например, содержания общего органического углерода, в осадках Южного и Среднего Байкала составляют 1,5–2,5%, в то время как в северной котловине заметно меньше – 0,5–1,5% (Выхристюк, 1980). Увеличение содержания растворенного метана с ростом органического вещества в осадках озера Байкал также показано в работе (Гарькуша и др., 2019).

На первых интервалах в разрезе керна (0-10(20) см) наибольшие концентрации растворенного метана аналогично наблюдались в средней и южной котловинах, в то время как в Северном Байкале они были значительно ниже, и практически не изменялись по глубине, оставаясь на уровне приповерхностных слоёв (Рис. 2). Такое распределение вероятно тесно связано с мощностью окисленного слоя, который имеет небольшие величины в Среднем и Южном Байкале (в среднем 3,5 и 5,5 см соответственно), в то время как в Северном Байкале

средняя величина окисленного слоя возрастает до 16 см (Вологина и др., 2003). Такие различия в мощности окисленного слоя между котловинами обусловлены глубиной проникновения кислорода в осадки, что подтверждается непосредственными измерениями в донных отложениях профилей концентрации кислорода с помощью микроэлектродов (Martin et al., 1998; Och et al., 2012).

В целом, обнаруженные содержания метана в донных осадках фоновых районов Байкала близки к наблюдаемым в пресноводных системах с низкой и умеренной продуктивностью (Таблица 2). Содержание метана в донных отложениях озера Байкал, как по нашим измерениям, так и данным других исследователей изменяется в широких пределах - от 0,1 до 1381 мкМ (Гарькуша и др., 2019; Федоров и др., 2005), высокие значения в последних обеспечено за счет отбора проб в районах с высоким осадконакоплением и большим содержанием терригенного материала (в местах впадения Верхней Ангары, Селенги и т.п.). Эти значения гораздо ниже отмечаемых в районах различных геологических структур и разгрузки газосодержащих минерализованных флюидов, например, в районе грязевого вулкана Маленький концентрации метана достигали 9000 мкМ (Земская и др., 2008, Zemskaya et al., 2010).

Важно отметить, что, несмотря на существенный разброс содержания метана в толще осадка разных котловин, в приповерхностных слоях исследованных нами фоновых районов концентрации метана не превышают 1-2 мкМ (Рис. 2). Также известно, что в придонных слоях фоновых районов концентрация растворенного метана в воде ниже этих значений еще на 2-3 порядка (Мизандронцев и др., 2020). Такое различие позволяет говорить о практически полном окислении поступающего

Таблица 2. Содержание метана в донных отложениях некоторых озёр

Озеро	Пределы изменения содержания метана в донных осадках	Литературный источник
Ладожское	1 - 3864 мкМ	Федоров и др., 2005
Онежское	3,12 – 535 мкМ	Ведищева, 2020
Валдай	2 - 4818 мкМ	Федоров и др., 2005
Ужин	163,4 - 468 мкМ	Федоров и др., 2005
Тамбукан (г. Пятигорск)	1 - 180 мкМ	Федоров и др., 2005
Чёртово (Азовское море)	2 - 198 мкМ	Федоров и др., 2005
Глубокое	1 - 55,6 мкМ	Федоров и др., 2005
Тундровые озёра	0,01 - 113 мкМ	Федоров и др., 2005
Мендота, США	1 - 153 мкМ	Федоров и др., 2005
Мичиган, США	1 - 9,6 мкМ	Федоров и др., 2005
Эри	0,4 - 3658 мкМ	Adams and Fendinger, 1986
Бива	40 - 2410 мкМ	Murase and Sugimoto, 2001
Фрайксел	1100 мкМ	Smith et al., 1993
Лусдрехт	100 - 1500 мкМ	Sinke et al., 1992
Антарктические пресноводные	1,7 – 630 мкМ	Ellis-Evans, 1984
Женева	100 – 1100 мкМ	Sollberger et al., 2014

метана из глубоких слоев донных отложений фоновых районов озера Байкал, и, соответственно, минимальном влиянии диффузионного потока метана на его содержание в придонной воде.

По сравнению с фоновыми океаническими осадками, верхние горизонты которых контролируются сульфатредукцией (Bernard, 1979), байкальские осадки проявляют иные соотношения окислителей: в озере, из-за низких концентраций SO_4^{2-} и NO_3^- , зона аэробного окисления обычно гораздо раньше сменяется зоной метаногенеза (Намсараев и Земская, 2000; Aloisi et al., 2019). Это задаёт характерные линейные профили нарастания метана с глубиной, что было подтверждено теоретическими расчетами (Бажин, 2003), а позднее натурными измерениями в районе постоянного осадконакопления Академического хребта (Земская и др., 2008). В исследованных нами кернах профили концентрации метана также имеют близкий к линейному рост концентраций. В морских глубоководных фоновых осадках напротив, верхние слои насыщены сульфатами и метаногенез начинает развиваться в гораздо более глубоких слоях (Bernard, 1979), поэтому концентрации растворённого метана в них ниже, чем в осадках озера Байкал.

В заключении стоит также отметить значительное увеличение разброса измеренных концентраций метана в каждом из кернов по мере углубления и, соответственно, роста его концентрации (Рис. 2). Это связано с тем, что при подъеме керна, сбрасывается давление, и зоны с высоким его содержанием начинают дегазировать и теряют часть растворённого метана, что приводит к занижению оценок его концентрации. Скорость дегазации, при этом, зависит от литологии осадков, она высока в песках и гораздо меньше в глинистых отложениях. Дополнительные механические воздействия на осадок во время отбора проб только ускоряют процесс в слоях, где концентрация оказывается кратно выше равновесной с атмосферой, приводя к большему разбросу измеренных значений. Поэтому, при работе с высокими концентрациями метана в осадках целесообразно использовать методы пробоотбора с сохранением внутрипластового давления.

5. Выводы

В результате выполненного исследования впервые получены и обобщены сведения о подробном вертикальном распределении растворенного метана в донных отложениях фоновых районов трёх котловин озера Байкал. Установлено, что вертикальное распределение характеризуется низкими концентрациями в приповерхностных слоях осадка и выраженным ростом с глубиной, часто близким к линейному, с выходом на квазиоднородные значения на поддонных глубинах порядка 1,5–2,0 м. Такая форма профилей отражает специфику байкальских осадков, где зона аэробного окисления вследствие низкого содержания сульфатов и нитратов довольно быстро сменяется зоной метаногенеза, что принципиально отличает донные отложе-

ния озера Байкал от таковых в морях. Сравнение с другими озёрами показывает, что охват регистрируемых концентраций метана в фоновых отложениях Байкала соответствует диапазону, характерному для пресноводных систем с низкой и умеренной продуктивностью.

Выявлены значимые различия в концентрациях метана между котловинами озера: максимальные значения характерны для средней котловины (до 880 мкМ), несколько меньшие — для южной (до 350 мкМ) и на порядок меньшие — для северной (до 32 мкМ). Несмотря на значительный разброс концентраций метана в толще осадков разных котловин, в приповерхностных слоях (0-10(20) см) его содержание не превышает 1–2 мкМ, что указывает на существенное окисление метана, поступающего из более глубоких горизонтов, и согласуется с на 2-3 порядка меньшими концентрациями растворённого метана в придонных водах озера Байкал.

Хорошая воспроизводимость профилей концентрации метана, полученных в одних и тех же районах в разные годы, как по форме, так и по абсолютным значениям, свидетельствует о квазистационарном характере процессов генерации и окисления метана в донных отложениях фоновых районов озера Байкал, на которых не сказывается межгодовая изменчивость уровня озера.

В дальнейшем планируется провести более подробные исследования вертикального распределения концентрации растворенного метана на широкой сетке станций по всему озеру Байкал, для оценки внутрикотловинных неоднородностей его содержания.

Благодарности

Отбор образцов для газохроматографического анализа проводился с борта НИС «Г.Ю. Верещагин» (ЦКП «Центр комплексных судовых исследований Байкала»). Работа выполнена в рамках Государственных заданий ЛИН СО РАН № 0279-2021-0006 и 0279-2021-0004. Авторы выражают благодарность Земской Т.И. за организацию экспедиционных работ и всестороннюю поддержку исследования, Погодаевой Т.В. и Федотову А.П. за критическое и полезное обсуждение результатов, Макарову М.М. за помощь в оформлении картографического материала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Бажин Н.М. 2003. Эмиссия метана из активного слоя. В: Тезисы конференции «Газовые гидраты в экосистеме Земли». Новосибирск, С. 19.
- Большаков А.М., Егоров А.В. 1987. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях. *Океанология* 27: 861–862.

- Ведищева О.Н. 2020. Характеристика органического вещества и газов донных осадков Онежского озера. «Материалы Международного молодежного научного форума “ЛОМОНОСОВ-2020”». Второе издание: переработанное и дополненное. В: Алешковский И.А., Андриянов А.В., Антипов Е.А. (ред.). Москва: МАКС Пресс. (Электронный ресурс)
- Вологина Е.Г., Штурм М., Воробьева С.С. и др. 2003. Особенности осадконакопления в озере Байкал в голоцене. *Геология и геофизика* 44(5): 407–421.
- Выхристюк Л.А. 1980. Органическое вещество донных осадков Байкала. *Труды ЛИН СО АН СССР* 32: 80.
- Гарькуша Д.Н., Фёдоров Ю.А., Тамбиева Н.С. и др. 2019. Метан в воде и донных отложениях озера Байкал. *Водные ресурсы* 46(5): 511–522.
- Егоров А.В. 2002. Формирование и разложение газовых гидратов в осадках арктического подводного грязевого вулкана Хаакон Мосби. Опыт системных исследований в Арктике, С. 511–521.
- Егоров А.В., Земская Т.И., Грачев М.А. 2005. Первые данные о закономерности распределения метана в воде и осадках оз. Байкал. В: Четвертая Верещагинская Байкальская конференция, С. 77–78.
- Егоров А.В., Земская Т.И., Грачев М.А. 2003. Первые данные о закономерностях вертикального распределения метана в водной толще оз. Байкал. В: Тезисы докладов XV Международной школы морской геологии. Москва: Научный мир, С. 169–170.
- Ефремова А.Г., Гритчина Н.Д. 1981. Газогидраты в морских осадках и проблема их практического использования. *Геология нефти и газа* 2: 32–35.
- Земская Т.И., Хлыстов О.М., Егоров А.В. и др. 2008. Комплексные исследования проявлений газовых гидратов в осадках озера Байкал. Изменение окружающей среды и климата 4: 125–152.
- Исаев В.П., Коновалова Н.Г., Михеев П.В. 2002. Природные газы Байкала. *Геология и геофизика* 43(7): 638–643.
- Исаев В.П., Михеев П.В. 2001. Газовые кристаллогидраты озера Байкал. В: Материалы IV региональной научно-практической конференции «Интеллектуальные и материальные ресурсы Сибири», С. 213–223.
- Калмычков Г.В., Егоров А.В., Кузьмин М.И. и др. 2006. Генетические типы метана озера Байкал. *Доклады академии наук* 411(5): 672–675.
- Лебедь Г.Г. 1984. Отчет о результатах региональных, площадных и опытно-методических геохимических работ за 1981 – 1983. Иркутск: Востсибнефтегазгеология.
- Леви К.Г., Аржанникова А.В., Буддо В.Ю. и др. 1997. Современная геодинамика Байкальского рифта. *Разведка и охрана недр* 1: 10–20.
- Мац В.Д., Уфимцев Г.Ф., Мандельбаум М.М. и др. 2001. Кайнозой Байкальской рифтовой впадины: Строение и геологическая история. Новосибирск: Изд-во СО РАН.
- Мизандронцев И.Б., Козлов В.В., Иванов В.Г. и др. 2020. Вертикальное распределение метана в водной толще Байкала. *Водные ресурсы* 47(1): 78–85. DOI: [10.31857/S0321059620010101](https://doi.org/10.31857/S0321059620010101)
- Намсараев Б.Б., Земская Т.И. 2000. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Изд-во СО РАН.
- Федоров Ю.А., Тамбиева Н.С., Гарькуша Д.Н. и др. 2005. Метан в водных экосистемах. Ростов-на-Дону: ЗАО «Ростиздат».
- Adams D.D., Fendinger N.J. 1986. Early Diagenesis of Organic Matter in the Recent Sediments of Lake Erie and Hamilton Harbor. In: Sly P.G. (Ed.), *Sediments and Water Interactions*. New York: Springer, pp. 305–318. DOI: [10.1007/978-1-4612-4932-0_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4932-0_25)
- Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J. et al. 2019. Biogeochemical processes at the Krasniy Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps. *Geo-Marine Letters* 39: 59–75.
- Bernard B.B. 1979. Methane in marine sediments. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 26(4): 429–443. DOI: [10.1016/0198-0149\(79\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0198-0149(79)90056-6)
- Ellis-Evans J.C. 1984. Methane in maritime Antarctic freshwater lakes. *Polar Biology* 3: 63–71. DOI: [10.1007/BF00258149](https://doi.org/10.1007/BF00258149)
- Martin P., Granina L., Martens K. et al. 1998. Oxygen concentration profiles in sediments of two ancient lakes: Lake Baikal (Siberia, Russia) and Lake Malawi (East Africa). *Hydrobiologia* 367: 163–174. DOI: [10.1023/A:1003280101128](https://doi.org/10.1023/A:1003280101128)
- Murase J., Sugimoto A. 2001. Spatial distribution of methane in the Lake Biwa sediments and its carbon isotopic compositions. *Geochemical journal* 35(4): 257–263. DOI: [10.2343/geochemj.35.257](https://doi.org/10.2343/geochemj.35.257)
- Och L., Müller B., Voegelin A. et al. 2012. New insights into the formation and burial of Fe/Mn accumulations in Lake Baikal sediments. *Chemical Geology* 330-331: 244–259. DOI: [10.1016/j.chemgeo.2012.09.011](https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.09.011)
- Sinke A.J.C., Cornelese A.A., Cappenberg T.E. et al. 1992. Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic Lake Loosdrecht. The Netherlands. *Biogeochemistry* 16: 43–61. DOI: [10.1007/BF00024252](https://doi.org/10.1007/BF00024252)
- Smith R.L., Miller L.G., Howes B.L. 1993. The geochemistry of methane in Lake Fryxell, an amictic, permanently ice-covered, antarctic lake. *Biogeochemistry* 21: 95–115. DOI: [10.1007/BF00000873](https://doi.org/10.1007/BF00000873)
- Sollberger S., Corella J.P., Girardclos S. et al. 2014. Spatial heterogeneity of benthic methane dynamics in the subaquatic canyons of the Rhone River Delta (Lake Geneva). *Aquatic Science* 76(1): 89–101. DOI: [10.1007/s00027-013-0319-2](https://doi.org/10.1007/s00027-013-0319-2)
- Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V. et al. 2010. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky Mud Volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3. *Geo-Marine Letters* 30: 411–425. DOI: [10.1007/s00367-010-0199-6](https://doi.org/10.1007/s00367-010-0199-6)

Features of polychlorinated biphenyls accumulation in Baikal fishes (initial results)

Kustova O.V.*^{ID}, Bogdanov B.E.^{ID}, Anoshko P.N.^{ID}, Gorshkov A.G.^{ID}

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. A detailed systematic analysis of the content of polychlorinated biphenyls (PCBs) in various Baikal fish species was conducted for the first time. Accumulation levels of indicator and dioxin-like PCBs were determined in the muscles of five species of Baikal sculpins of the family Cottidae: *Abyssocottus pallidus*, *Abyssocottus godlewskii*, *Abyssocottus platycephalus*, *Leocottus kesslerii* and *Cottocomephorus come-phoroides*, and of two species of the family Coregonidae: *Coregonus baicalensis* and *Coregonus migratorius*. The features of pollutants accumulation by various fish species depending on habitat specificity and feeding ecology are revealed. The total toxic equivalents of dioxin-like PCBs were calculated despite their extremely low concentrations in the water of Lake Baikal.

Keywords: polychlorinated biphenyls, bioaccumulation, demersal (benthic) and pelagic fish species, Lake Baikal

For citation: Kustova O.V., Bogdanov B.E., Anoshko P.N., Gorshkov A.G. Features of polychlorinated biphenyls accumulation in Baikal fishes (initial results) // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1402-1415. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1402

1. Introduction

One of the important problems for the global community in the context of achieving the Sustainable Development Goals is the entry of persistent organic pollutants (POPs) into surface waters, particularly freshwater ecosystems that serve as drinking water sources. Among POPs, polychlorinated biphenyls (PCBs) are notable for their exceptional physical and chemical properties, which led to their widespread industrial use as dielectric fluids in transformers and capacitors, and as components in paints, inks, pesticides, and other products. Following the discovery high toxicity for a number of compounds of this class, the production and use of PCBs were banned by the Stockholm Convention (Stockholm Convention..., 2001). Currently, sources of PCBs include the dismantling and disposal of old equipment containing these substances as construction materials, as well as various industrial processes where PCBs are formed as by-products. Due to their high stability and long-range transport, PCBs have been detected in air, water, and soil, including remote Arctic and Antarctic regions (Eckhardt et al., 2007; Gioia et al., 2008; Khairy et al., 2021). As a result of bioaccumulation and biomagnification, PCBs accumulate in biota (Knezovich et al., 1987; Norstrom et al., 2009; Wang et

al., 2022), for example, in the endemic amphipod fauna from two of the deepest ocean trenches: the Mariana and the Kermadec (Jamieson et al., 2017). Global atmospheric transport sustains the presence of these pollutants in the surface waters of background regions. The ability of PCBs to bioaccumulate dictates their impact on biota at trace concentration levels and represents a potential threat to the environment, including the unique ecosystem of Lake Baikal.

For the aquatic ecosystem of Lake Baikal, the dominant source of PCBs is considered to be global atmospheric transport, although regional and local sources of pollution are not excluded (Kucklik et al., 1996; Gorshkov et al., 2017; Samsonov et al., 2017). Direct determination of PCBs in the lake's surface water is possible with a limit of quantification (LOQ) of 0.02 ng/L (Kustova et al., 2021). Aquatic organisms that accumulate lipophilic organic pollutants in their tissues, reflecting the pollution level of their ecological zone, serve as reliable indicators of trace PCBs in surface waters.

The fish fauna of Lake Baikal includes about 60 species that have occupied all biotopes of this ancient and ultra-deep lake. In this study two whitefish species (Coregonidae) and five species of endemic sculpins (Cottidae) were analyzed, which differ in their

*Corresponding author. E-mail address: kustova_ov@lin.irk.ru (O.V. Kustova)

Received: November 28, 2025;

Accepted after revised: December 19, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



habitat preferences and feeding ecology (Taliev, 1955; Skryabin, 1979; Sideleva, 2003; Smirnov et al., 2009; Bogdanov and Knizhin, 2022; Bogdanov, 2023).

The Baikal omul *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775), a Baikal endemic, inhabits the pelagic zone down to 300 m depth and spawns in rivers. Individuals reach sexual maturity at a length of 250-300 mm and a weight of 220-270 g. Traditionally three morphological and ecological groups (races) are distinguished based on intraspecific variability: pelagic, coastal, and benthic-deepwater, which differ in a number of diagnostic traits, spawning sites, feeding and growth patterns. The diet of the Baikal omul consists mainly of meso- and macrozooplankton (*Macrohectopus branickii* (Dybowski, 1874) and pelagic juveniles of sculpins. Also benthic amphipods are noted in their diet.

The Baikal lake whitefish *Coregonus baicalensis* (Dybowski, 1874), a Baikal endemic, inhabits the shallows near deltaic areas and mouths of large tributaries, as well as in the Maloye More Strait, on sandy and silty-sandy substrates. The main spawning grounds are located directly in the bays of the lake (Chivyrkuisky, Mukhor, Proval). By the age of 5+, individuals reach a length of 300-350 mm and a weight of 320-400 g, and by 10+ years – 450-550 mm and 1300-1700 g, respectively. Juveniles up to three years old feed primarily on zooplankton. Older fish feed on amphipods, mollusks, and chironomid larvae, depending on their habitat (Matveev et al., 2012).

The Flathead sculpin *Abyssocottus (Asprocottus) platycephalus* (Taliev, 1955) inhabits muddy bottoms at depths from 50 to 800 m, reaches a length of 110 mm and a weight of up to 12 g. Their diet composition has not been studied.

The Godlewski's sculpin *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874) and the Pale sculpin *Abyssocottus (Limnocottus) pallidus* (Taliev, 1955) are species with similar lifestyles. Both species inhabit sandy-silty substrates at depths from 50-100 m to 1000 ± 100 m. *A. godlewskii* reaches a length of up to 165 mm and a weight of up to 45 g, *A. pallidus* – 150 mm and 15 g, respectively. They feed on small amphipods and juveniles of sculpins.

The Smalleye longfin sculpin *Cottocomephorus comephoroides* (Berg, 1900) inhabits the near-bottom layer of the pelagic zone at depths from 50 to 500 m. Males reach a length of up to 200 mm and a weight of up to 100 g, females – up to 170 mm and 50 g. They are similar in diet to omul, which consists of *M. branickii*, other crustacean planktons, and pelagic juveniles of sculpins.

The Sand sculpin *Leocottus kesslerii* (Dybowski, 1874) inhabits sandy and rocky-sandy bottoms from the shoreline to depths of 150-170 m in Baikal. Maximum length and weight vary from 100 to 150 mm and from 10 to 40 g depending on the population. They feed on a wide range of small invertebrates depending on their abundance in a particular biotope, less frequently – on juveniles of sculpins.

Comparative analysis of PCBs accumulation in tissues of taxonomically and ecologically diverse species allows us to solve two tasks, which have funda-

mental importance for understanding patterns of modern environmental processes:

1. Level and nature assessment of pollution in different ecological zones of Baikal;
2. Determination of the relationship between the ecological characteristics of species and the bioconcentration and bioaccumulation processes of persistent pollutants in the organism.

The aim of this work was to obtain current data on PCBs content in the tissues of various Baikal fish species and identify different patterns of contaminant accumulation levels depending on their habitat areas in order to assess the potential ecological risk from the presence of these pollutants in Baikal water at the trace level.

2. Materials and Methods

Fish sampling. Fish samples were collected during expeditions aboard the research vessel “G.Yu. Vereshchagin” in August and October 2024 (Fig. 1). Capture was conducted using a bottom trawl (mesh size in the codend: 10 mm). Two species of whitefish (Coregonidae): *C. baicalensis* and *C. migratorius*, and five species of Baikal scuplins (Cottidae): *A. platycephalus*, *A. pallidus*, *A. godlewskii*, *L. kesslerii* and *C. comephoroides* were studied. After capture, the individuals were packaged in aluminum foil and stored at –20°C until analysis.

Sample preparation. First, individuals were thawed at room temperature in the laboratory. Standard length (SL), weight, sex and age were determined, and morphological and ecological group for the Baikal omul were identified using standard biological analysis (Pravdin, 1996), the results of which are shown in Table 1. The fish samples were prepared according to the technique (FR.1.31.2021.40284), which was adapted for the purposes of this study: head, internal organs, bones and skin were removed. For chemical analysis all muscle tissues was used without dividing into red and white muscles. Homogenization of muscle tissue from small individuals was performed by a blender after preliminary chopping with a laboratory knife; two parallel samples weighing about 0.5 g were taken from each individual.

An internal surrogate standard (a mixture “Marker-7 PCB Mixture” containing isotopically labeled PCB congeners Nos: 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) was added to the weighed samples and homogenized with anhydrous sodium sulfate. PCBs extraction was performed by double ultrasonic extraction (35-40 kHz, 15 min) with a mixture of hexane-acetone solvents (1:1) from the homogenized matrix. The combined extract was concentrated by a rotary evaporator to a volume of 1 mL, dried over anhydrous sodium sulfate, and cleaned using concentrated sulfuric acid. The purified organic layer was washed with distilled water to neutral pH, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated in an argon stream to 0.1 mL. Before a gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS), an internal recovery standard (4,4'-dibromobiphenyl) was added to the prepared extract.

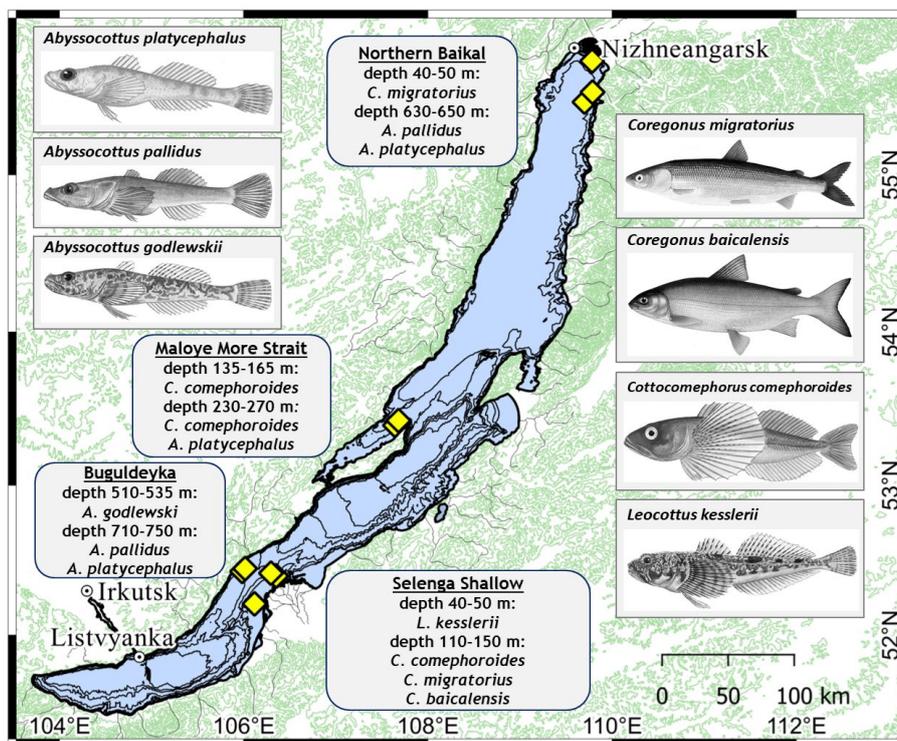


Fig.1. Map of Baikal fish catches.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis. PCBs determination was carried out on a gas chromatograph with a triple quadrupole mass spectrometric detector Agilent Technologies 7890B GC System 7000C GC/MS Triple Quad.

Chromatographic separation was achieved using an OPTIMA®-17 MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Temperature gradient: from 80°C (hold 1 min) to 310°C at a rate of 15°C/min, final

hold at 310°C – 10 min. Injector temperature – 280°C. Injection volume – 2 μL in splitless mode.

Mass spectrometric detection was performed in multiple reactions monitoring (MRM) mode. Ion source temperature – 230°C, quadrupole temperature – 150°C. Two characteristic MRM transitions were monitored for each analyte and internal standard. Identification of PCB congeners was based on the coincidence of retention times in the sample and calibration solution

Table 1. Parameters of the studied Baikal fishes.

Taxon	SL, mm	Body weight, g	Age*, years	Number, ind	Sampling Area and Depth
Family Coregonidae					
<i>Coregonus baicalensis</i>	277-297	255-306	5	2	Selenga Shallow, 110-150 m
<i>Coregonus migratorius</i>	190-274	79-240	3-5	7	Selenga Shallow, 110-150 m
	267-302	234-385	5-6	3	Northern Baikal, Angarsky Sor, 40-50 m
Family Cottidae					
<i>Abyssocottus (Asprocottus) platycephalus</i>	83-93	9.3-13	3-4	4	Transect of Buguldeyka settlement, 710-750 m
	90-100	13-17	2-4	4	Maloye More Strait, 230-270 m
	80-90	11-13	3	4	Northern Baikal, transect of Frolikha Bay, 630-650 m
<i>Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii</i>	93-125	14-34	2-4	4	Transect of Buguldeyka settlement, 510-535 m
<i>Abyssocottus (Limnocottus) pallidus</i>	87-100	7.5-13	2-3	4	Transect of Buguldeyka settlement, 710-750 m
	96-115	15-20	2-3	4	Northern Baikal, transect of Ayaya Bay, 630-650 m
<i>Cottocomephorus comephoroides</i>	107-114	14-18	2	3	Selenga Shallow, 40-50 m
	93-128	10-33	1-2	4	Maloye More Strait, 135-165 m
	113-120	12-24	1-2	2	Maloye More Strait, 230-270 m
<i>Leocottus kesslerii</i>	96-115	7.1-11	2-3	4	Selenga Shallow, 40-50 m

Note: * – Age determined by otolith analysis.

(± 0.1 min), and the ratio of peak areas for the two analytical MRM transitions (acceptable deviation – no more than $\pm 20\%$ from the value obtained for calibration solutions).

Quantification was performed using the internal standard method based on a surrogate standard mixture. Calibration dependences were constructed in the concentration range from 0.005 to 25 ng/mL. PCBs content in samples was calculated as the mean value from two parallel samples, using the ratio of the analyte peak area to the corresponding surrogate standard peak area.

Quality control included reagent-blank experiments to assess laboratory background. Extraction completeness was controlled by the recovery percentage of surrogate standards, which ranged from 78% to 92%. The certified reference material BCR®-350 (mackerel oil) was used to validate the accuracy of method.

Determination of indicator and dioxin-like PCB congeners. Commercial PCB products were manufactured as complex mixtures of variable composition (containing up to 50-70 individual congeners – isomers and homologs with different chlorination degrees) and entered the environment in this form. For this reason, accurate assessment of pollution levels in aquatic ecosystems is often complicated by the use of different POP determination methods; in particular for PCBs, the problem is related to the identification and determination of a varying number of congeners. These issues can be addressed by determining a limited number of compounds – seven indicator congeners (Nos: 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180), which are typically major components in the homologues groups of isomers found in technical PCB mixtures (PCB 28 for trichlorinated biphenyls; PCB 52 – tetrachlorinated; PCB 101 and 118 – pentachlorinated; PCB 138 and 153 – hexachlorinated; PCB 180 - heptachlorinated), that explains their detection in almost any environmental objects. Coplanar, dioxin-like PCB congeners (Nos: 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189) possess

the highest toxicity among PCBs and exhibit additive effects when present together (Walker et al., 2004). Based on the composition of technical PCB mixtures (Kirichenko et al., 2000) and the values of International Toxic Equivalency Factors (I-TEF), a series of priority dioxin-like PCBs was selected: 105 (I-TEF: 0.0001), 114 (0.0005), 118 (0.0001), 123 (0.0001), 126 (0.1), 156 (0.0005).

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were estimated according to IUPAC recommendations (Currie, 1995) as multiplication of the standard deviation of the laboratory background and a coefficient: $k_q = 3$ for LOD and $k_q = 10$ for LOQ. The LOQ for the selected PCB congeners was 0.010 ng/g wet weight. The total determination accuracy was $\leq 35\%$.

The bioaccumulation factor (BAF) was calculated as the ratio of the average mass concentration of indicator or dioxin-like PCB congeners in Baikal fish tissues (ng/kg) to that average concentration in Baikal water (ng/L).

The total toxic equivalent (WHO-TEQ) (Kutz et al., 1990) for n detected dioxin-like PCB congeners was calculated using the formula:

$$TEQ_{PCBs} = \sum_{i=1}^n (C_i \cdot I-TEF_i),$$

where: TEQ_{PCBs} is the total toxic equivalent; C_i is the mass concentration of the i -th PCB congener in the sample (ng/g); $I-TEF_i$ is the International Toxic Equivalency Factor for the i -th PCB congener.

3. Results and Discussion

All seven indicator congeners and four to five of the six selected dioxin-like PCB congeners were identified in Baikal fish tissues (the most toxic PCB 126 was not detected in any sample). The average total content of indicator congeners (ΣPCB_7) and dioxin-like congeners (ΣPCB_{DL}) in the muscles of the studied fish are presented in Table 2.

Table 2. Average total mass concentrations of indicator PCB congeners (ΣPCB_7) and dioxin-like PCB congeners (ΣPCB_{DL}) in Baikal fish muscles, PCBs bioaccumulation factors.

Sampling Area	Spicies	Average PCB content in fish, ng/g wet weight		Bioaccumulation Factor (BAF)
		ΣPCB_7	ΣPCB_{DL}	ΣPCB_7
Buguldeyka	<i>A. pallidus</i>	11.45	4.06	$3.8 \cdot 10^4$
	<i>A. godlewskii</i>	4.34	1.48	$1.4 \cdot 10^4$
	<i>A. platycephalus</i>	6.71	2.57	$2.2 \cdot 10^4$
Selenga Shallow	<i>L. kesslerii</i>	1.37	0.37	$4.6 \cdot 10^3$
	<i>C. comephoroides</i>	0.83	0.36	$2.8 \cdot 10^3$
	<i>C. migratorius</i>	0.86	0.35	$2.9 \cdot 10^3$
	<i>C. baicalensis</i>	0.36	0.14	$1.2 \cdot 10^3$
Maloye More Strait	<i>C. comephoroides</i>	0.87	0.30	$2.9 \cdot 10^3$
	<i>A. platycephalus</i>	1.86	0.51	$6.2 \cdot 10^3$
Northern Baikal	<i>A. pallidus</i>	17.85	5.55	$6.0 \cdot 10^4$
	<i>A. platycephalus</i>	6.49	1.90	$2.2 \cdot 10^4$
	<i>C. migratorius</i>	0.74	0.24	$2.5 \cdot 10^3$

The composition and ratio of PCB congeners in fish muscles differ significantly from their composition and ratio in Baikal water samples, which is explained by differences in accumulation mechanisms and transformation rates of congeners with different chlorination degrees. According to the results of long-term POPs monitoring in the Baikal aquatic ecosystem (Gorshkov et al., 2022) during 2014-2021, a decrease in PCB concentrations in the pelagic water was observed, with reductions in some locations to the limits of quantification ($\Sigma\text{PCB}_7 \leq 0.11 \text{ ng/L}$). The average value and statistically significant range of detected ΣPCB_7 concentrations in the pelagic water of Lake Baikal were estimated at 0.30 and 0.26-0.34 ng/L, respectively. Accumulation of indicator congeners in fish tissues was characterized by a bioaccumulation factor (BAF) range from $1.2 \cdot 10^3$ to $6.0 \cdot 10^4$ (Table 2), with the highest values (10^4) obtained for demersal fish species of the family Cottidae: *A. pallidus*, *A. godlewskii*, *A. platycephalus*. When comparing detected concentrations in different fish species, the ΣPCB_7 content is higher in demersal deep-water (abyssal) species. Differences are observed in the contribution of individual indicator PCB congeners with different chlorination degrees – in deep-water demersal species *A. pallidus*, *A. godlewskii* and *A. platycephalus* hexachlorinated PCBs 153 and 138 contribute the most to ΣPCB_7 (over 60%), while in pelagic species *C. comephoroides*, *C. migratorius*, *C. baicalensis* and demersal shallow-water species *L. kesslerii* their contribution does not exceed 40% and is comparable to the contribution of pentachlorinated PCBs 101 and 118 (Fig. 2). In the pelagic water of the lake, the content of PCB congeners 153 and 138 constitutes less than 20% of the total ΣPCB_7 content (Fig. 3).

The obtained data are consistent with studies on deep-sea organisms, which are characterized by higher POPs accumulation compared to the species, inhabiting surface waters (Knezovich et al., 1987; Froescheis et al., 2000). Differences in congener profiles may be explained by habitat and dietary specificities of deep-water benthic fish species and possibly indicate preferential accumulation of highly chlorinated PCBs, particularly indicator congeners 153 and 138, in bottom sediments, from where they can enter the food chain of aquatic organisms. PCBs can enter bottom sediments with solid particles and biomass remains, which in turn accumulated pollutants during their lifetime, with less chlorinated PCBs potentially having time to biodegrade and transform during their life cycle. The obtained data and proposed assumptions may form the basis for long-term monitoring of PCBs in the deep-water zone of Lake Baikal to identify possible pathways of their input and concentration therein, and their relationship with processes occurring in global atmospheric transport – the dominant source of PCB input into the lake aquatic ecosystem.

PCBs accumulation in pelagic fish species may reflect the pollution level of the water column and provide both an integral characteristic for the entire water body and its separate areas, depending on the type and distance of fish migrations. Thus, the detected PCB concentrations in tissues of *C. migratorius* and *C. comephoroides*, species from different families but characterized by active horizontal and vertical migration, are compa-

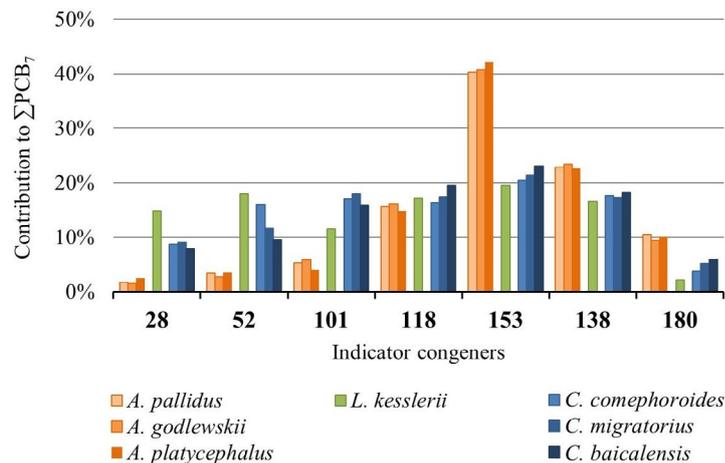


Fig. 2. Profiles of indicator PCB congeners in the muscle tissue of Baikal fishes: demersal deep-water species *A. pallidus*, *A. godlewskii*, *A. platycephalus*; demersal shallow-water *L. kesslerii*; pelagic *C. comephoroides*, *C. migratorius*, *C. baicalensis*.

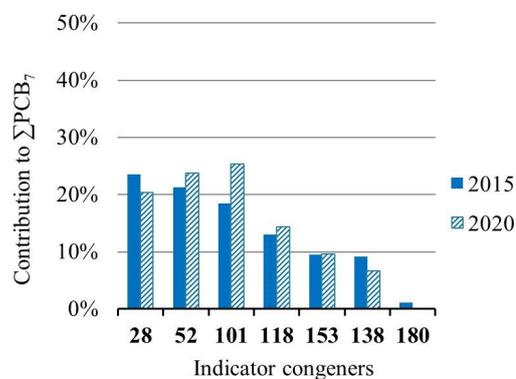


Fig. 3. Profiles of indicator PCB congeners in the pelagic water of Lake Baikal (average values of monitoring results in 2015 and 2020) (Gorshkov et al., 2022).

table (Table 2). Furthermore, according to a report by Typhoon (Report..., 2015), the considered families are roughly comparable in fat content: average values and ranges of lipid content (%) for *C. migratorius* are 2.35 and 1.34 – 3.79, and for the group of sculpin individuals (Cottidae) – 1.88 and 0.41 – 6.25.

Determining the presence of dioxin-like congeners and calculating total toxic equivalents of detected PCB concentrations is an important procedure for ecological risk assessment, including in the context of fisheries and food safety. Due to high accumulation factors, PCB congeners whose concentrations in water (characterized by trace level pollution) are less than the detection limit are determined in fish tissues. This applies particularly to dioxin-like congeners (except for PCB 118). The calculation of total WHO-TEQ for average $\Sigma\text{PCB}_{\text{DL}}$ detected in the studied Baikal fish species is presented in Table 3. *C. migratorius* and *C. baicalensis* are representatives of commercial fish species. The average value and range of total $\Sigma\text{PCB}_{\text{DL}}$ concentrations in the muscle tissue of *C. migratorius* were estimated at 0.32 and 0.18 – 0.83 ng/g wet weight, respectively. The total WHO-TEQ was estimated to range from 0.021 to 0.104 pg/g wet weight, which is two orders of magnitude lower than concentrations detected in brown trout *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758) from Alpine lakes of Western Europe and the Baltic Sea (Table 3).

Table 3. Results of calculation of total toxic equivalents WHO-TEQ of PCBs detected in Baikal fish species in comparison with the WHO-TEQ ranges of PCBs detected in brown trout *S. trutta* of other aquatic ecosystems.

Object / Species	Dioxin-like PCB congeners, No., I-TEF*						WHO-TEQ, pg/g wet weight
	123	118	114	105	126	156	
	0.0001*	0.0001*	0.0005*	0.0001*	0.1*	0.0005*	
Water	< LOQ	0.06	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.006
<i>C. comephoroides</i>	0.03	0.14	0.01	0.11	< LOQ	0.02	0.045
<i>C. migratorius</i>	0.03	0.15	0.00	0.12	< LOQ	0.02	0.041
<i>C. baicalensis</i>	0.02	0.07	0.00	0.05	< LOQ	0.01	0.018
<i>L. kesslerii</i>	0.03	0.18	0.01	0.13	< LOQ	0.02	0.048
<i>A. pallidus</i>	0.34	2.24	0.14	1.61	< LOQ	0.47	0.72
<i>A. godlewskii</i>	0.11	0.70	0.04	0.50	< LOQ	0.14	0.22
<i>A. platycephalus</i>	0.12	0.78	0.04	0.54	< LOQ	0.17	0.25
<i>S. trutta</i> (Alpine lakes, Western Europe)							6.3 – 13 **
<i>S. trutta</i> (Baltic Sea)							4.2 – 9.0 **

Note: < LOQ – Below the limit of quantification.

* – I-TEF – International Toxic Equivalency Factor.

** – Values for *S. trutta* are presented as ranges (Gorshkov et al., 2022). Concentrations of individual congeners for these data sets are not provided in the source.

4. Conclusion

A detailed systematic analysis of PCBs content in various Baikal fish species was conducted, which identify the features of PCBs accumulation in demersal and pelagic fish species and established the following statements:

1. Determination in demersal species provides information about PCBs accumulation in the deep-water zone, helps to identify different mechanisms of their entry and concentration, followed by an assessment of potential ecological risks;
2. PCBs determination in the pelagic fish species reflects the pollution level of the water column and provides both an integral characteristic for the entire water body and its separate areas depending on the type and distance of fish migrations, and can be used for assessment in the context of food safety of commercial fish.

Acknowledgements

The authors express gratitude to Senior Researcher I.V. Khanaev for providing the samples. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project No. 0279-2022-0004 (in the Unified State Information System for Research and Development, registration No. 122012600083-9). The research was conducted using the research vessel “G.Yu. Vereshchagin” of the Core Facility “Center for Comprehensive Shipboard Studies of Lake Baikal” and equipment of the Core Facility “Ultramicroanalysis”.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bogdanov B.E., Knizhin I.B. 2022. The salmonid fishes of Lake Baikal and its adjacent water systems: annotated checklist with new taxa description. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 1688–1704. DOI: [10.31951/2658-3518-2022-A-6-1688](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1688)
- Bogdanov B.E. 2023. The Sculpins (Perciformes: Cottidae) of Lake Baikal and Baikal region: updated checklist with the description of new taxa. *Limnology and Freshwater Biology* 3: 63–95. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-3-63](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-3-63)
- Currie L.A. 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry* 67(10): 1699–1723. DOI: [10.1351/pac199567101699](https://doi.org/10.1351/pac199567101699)
- Eckhardt S., Breivik K., Mano S. et al. 2007. Record high peaks in PCB concentrations in the Arctic atmosphere due to long-range transport of biomass burning emissions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7(17): 4527–4536. DOI: [10.5194/acp-7-4527-2007](https://doi.org/10.5194/acp-7-4527-2007)
- Froeschis O., Looser R., Cailliet G.M. et al. 2000. The deep-sea as a final global sink of semivolatile persistent organic pollutants? Part I: PCBs in surface and deep-sea dwelling fish of the North and South Atlantic and the Monterey Bay Canyon (California). *Chemosphere* 40: 651–660. DOI: [10.1016/S0045-6535\(99\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00461-0)
- Gioia R., Lohmann R., Dachs J. et al. 2008. Polychlorinated biphenyls in air and water of the North Atlantic and Arctic Ocean. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 113: D19302. DOI: [10.1029/2007JD009750](https://doi.org/10.1029/2007JD009750)
- Gorshkov A.G., Kustova O.V., Dzuba E.V. et al. 2017. Polychlorinated biphenyls in Lake Baikal ecosystem. *Chemistry for Sustainable Development* 25: 255–264.
- Gorshkov A.G., Kustova O.V., Bukin Y.V. 2022. Assessment of PCBs in surface waters at ultratrace levels: Traditional approaches and biomonitoring (Lake Baikal, Russia). *Applied Sciences* 12: 2145. DOI: [10.3390/app12042145](https://doi.org/10.3390/app12042145)
- Jamieson A.J., Malkocs T., Piertney S.B. et al. 2017. Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna. *Nature Ecology & Evolution* 1(3): 0051. DOI: [10.1038/s41559-016-0051](https://doi.org/10.1038/s41559-016-0051)

- Khairy M., Brault E., Dickhut R. et al. 2021. Bioaccumulation of PCBs, OCPs and PBDEs in marine mammals from West Antarctica. *Frontiers in Marine Science* 8: 768715. DOI: [10.3389/fmars.2021.768715](https://doi.org/10.3389/fmars.2021.768715)
- Kirichenko V.E., Pervova M.G., Promyshlennikova E.P. et al. 2000. Identification of isomeric polychlorinated biphenyls in the technical product "Sovol". *Analytics and Control [Analitika i kontrol]* 4(1): 41–44. (in Russian)
- Knezovich J.P., Harrison F.L., Wilhelm R.G. 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water, Air, and Soil Pollution* 32: 233–245.
- Kucklik J.R., Harvey H.R., Ostrom P.H. et al. 1996. Organochlorine dynamics in the pelagic food web of Lake Baikal. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(8): 1388–1400.
- Kustova O.V., Stepanov A.S., Gorshkov A.G. 2021. Determination of indicator congeners of polychlorinated biphenyls in water at ultratrace levels by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 76 (11): 1336–1344. DOI: [10.1134/S106193482111006X](https://doi.org/10.1134/S106193482111006X)
- Kutz F.W., Barnes D.G., Bottimore D.P. et al. 1990. The international toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. *Chemosphere* 20(7-9): 751–757. DOI: [10.1016/0045-6535\(90\)90178-V](https://doi.org/10.1016/0045-6535(90)90178-V)
- Matveev A.N., Samusenok V.P., Vokin A.I. et al. 2012. Commercial fish species of reservoirs of the Irkutsk region. *Baikal Zoological Journal [Baikal'skii zoologicheskii zhurnal]* 2(10): 16–29. (in Russian)
- Norstrom K., Czub G., McLachlan M.S. et al. 2009. External exposure and bioaccumulation of PCBs in humans living in a contaminated urban environment. *Environment International* 36(8): 855–861. DOI: [10.1016/j.envint.2009.03.005](https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.03.005)
- Pravdin I.F. 1996. Guidelines for the study of fish (mainly freshwater). Moscow: Food Industry. (in Russian)
- Samsonov D.P., Kochetkov A.I., Pasyenkova E.M. et al. 2017. Persistent organic pollutants content in components of the unique ecological system of Lake Baikal. *Meteorology and Hydrology [Meteorologiya i gidrologiya]* 5: 105–115. (in Russian)
- Sideleva V.G. 2003. *The Endemic Fishes of Lake Baikal*. Leiden: Backhuys Publishers.
- Skryabin A.G. 1979. *Whitefish of Southern Siberia*. Novosibirsk: Nauka. (in Russian)
- Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S., Sukhanova L.V. 2009. *Microevolution of the Baikal Omul *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi)*. Novosibirsk: Nauka. (in Russian)
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. 2001. URL: <https://www.wipo.int/wipolex/ru/text/194841> (Accessed on 19 December 2025)
- Taliev D.N. 1955. *Baikal Sculpins (Cottoidei)* Moscow-Leningrad: Publishing House of the USSR Academy of Sciences. (in Russian)
- FR.1.31.2021.40284. 2020. Measurement procedure for mass fractions (concentrations) of polychlorinated biphenyl congeners in fish (omul) samples from Lake Baikal using chromatography-mass spectrometry with multiple reaction monitoring detection. Kustova, O.V., Stepanov, A.S., Dzyuba, E.V., Gorshkov, A.G. Certification of Measurement Procedure No. 2 DOI: [22.0156/RA.RU.311866/2020](https://doi.org/22.0156/RA.RU.311866/2020) (in Russian)
- Report. Typhoon Research and Production Association. 2015. Report "Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Baikal Natural Territory". URL: https://www.rpatyphoon.ru/upload/medialibrary/dbc/Baykal_otchet_2015.pdf (accessed 19.12.2025) (in Russian)
- Walker J.N., Crockett P.W., Nyska A. et al. 2004. Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of "Dioxin-like compounds". *Environmental Health Perspectives* 113(1): 43–48. DOI: [10.1289/ehp.7351](https://doi.org/10.1289/ehp.7351)
- Wang Q., Xie C., Long C. et al. 2022. Bioaccumulation and biomagnification of polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyltrichloroethane in biota from Qilianyu Island, South China Sea. *Toxics* 10(6): 324. DOI: [10.3390/toxics10060324](https://doi.org/10.3390/toxics10060324)

Особенности накопления полихлорированных бифенилов в байкальских рыбах (первые результаты)

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Кустова О.В.*^{ORCID}, Богданов Б.Э.^{ORCID}, Аношко П.Н.^{ORCID}, Горшков А.Г.^{ORCID}

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Впервые проведен подробный систематический анализ содержания полихлорированных бифенилов (ПХБ) в различных видах байкальских рыб. Определены уровни накопления индикаторных и диоксиноподобных ПХБ в мышцах пяти видов байкальских коттоидных рыб семейства Cottidae: *Limnocottus pallidus*, *Limnocottus godlewskii*, *Asprocottus platycephalus*, *Leocottus kesslerii* и *Cottocomephorus comephoroides*, и двух видов семейства Coregonidae: *Coregonus baicalensis* и *Coregonus migratorius*. Выявлены особенности аккумуляции загрязнителей различными видами рыб в зависимости от их приуроченности к биотопам и пищевой специализации. Рассчитаны суммарные токсические эквиваленты диоксиноподобных ПХБ, концентрации которых в воде озера Байкал крайне низки.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы, биоаккумуляция, демерсальные и пелагические виды рыб, озеро Байкал

Для цитирования: Кустова О.В., Богданов Б.Э., Аношко П.Н., Горшков А.Г. Особенности накопления полихлорированных бифенилов в байкальских рыбах (первые результаты) // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1402-1415. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1402

1. Введение

Одной из важных проблем мирового сообщества в контексте достижения целей устойчивого развития является поступление стойких органических загрязнителей (СОЗ) в поверхностные воды, в частности, в пресноводные экосистемы, являющиеся источниками питьевой воды. Среди СОЗ полихлорированные бифенилы (ПХБ) отличаются своими исключительными физическими и химическими свойствами, благодаря которым получили широкое применение в промышленности в качестве диэлектрических жидкостей в трансформаторах и конденсаторах, входили в состав красок, чернил, пестицидов и прочее. После выявления высокой токсичности у ряда соединений этого класса, производство и использование ПХБ было запрещено Стокгольмской конвенцией (Стокгольмская конвенция, 2001). На современном этапе к источникам ПХБ отнесены демонтаж и утилизация оборудования, содержащего эти вещества в качестве конструктивных материалов, а также различные виды промышленной деятельности, в процессе которых

ПХБ могут образовываться в качестве побочных продуктов. Вследствие высокой стабильности и переноса на значительные расстояния от источников ПХБ обнаружены в воздухе, воде, почве, включая отдаленные районы Арктики и Антарктики (Eckhardt et al., 2007; Gioia et al., 2008; Khairy et al., 2021). В результате биоаккумуляции и биомагнификации ПХБ накапливаются в биологических объектах (Knezovich et al., 1987; Norstrom et al., 2009; Wang et al., 2022), например, в эндемичных амфиподах, обитающих в двух самых глубоких океанских впадинах: Марианской и Кермадек (Jamieson et al., 2017). Глобальный атмосферный перенос поддерживает присутствие загрязнителей этого класса в поверхностных водах в фоновых районах, способность ПХБ к биоаккумуляции определяет их воздействие на биоту при следовом уровне концентрации и представляет потенциальную угрозу для живой природы, в том числе для уникальной экосистемы озера Байкал.

В водной экосистеме озера Байкал к доминирующему источнику ПХБ отнесен глобальный атмосферный перенос, не исключающий региональ-

*Автор для переписки. Адрес e-mail: kustova_ov@lin.irk.ru (О.В. Кустова)

Поступила: 28 ноября 2025;

Принята после доработки: 19 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



ные и локальные источники загрязнения (Kucklik et al., 1996; Горшков и др., 2017; Самсонов и др., 2017). Прямое определение ПХБ в поверхностных водах озера возможно с пределом определения равным 0.02 нг/л (Кустова и др., 2021). Надежными индикаторами следов ПХБ в поверхностных водах выступают гидробионты, накапливающие в своих тканях липофильные органические загрязнители, отражая уровень загрязнения своей экологической зоны.

Фауна рыб озера Байкал, по разным оценкам, включает около 60 видов рыб, освоивших все биотопы этого древнего и ультраглубоководного озера. В данной работе проанализировано два вида сиговых (семейство Coregonidae) и пять видов эндемичных коттоидных рыб (семейство Cottidae), различающиеся по приуроченности к биотопам и пищевой специализации (Талиев, 1955; Скрыбин, 1979; Sideleva, 2003; Смирнов и др., 2009; Bogdanov and Knizhin, 2022; Богданов, 2023).

Байкальский омуль *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) – эндемик Байкала, населяет пелагиаль озера до глубины 300-350 м, размножается в реках. Половой зрелости особи достигают при длине 250-300 мм и массе 220-270 г. По внутривидовой изменчивости у омуля традиционно выделяют три морфо-экологические группы (расы): пелагическую, прибрежную и придонно-глубоководную, различающиеся по ряду диагностических признаков, местам размножения, особенностям нагула, особенностям роста и питания. Основу питания составляют мезо- и макрозоопланктон (макрогектопус *Macrohectopus branickii* (Dybowski, 1874), пелагическая молодь коттоидных рыб. В рационе отмечены донные представители амфипод.

Байкальский сиг *Coregonus baicalensis* (Dybowski, 1874) – эндемик Байкала. В Байкале обитает в зоне мелководий на придельтовых участках и вблизи устьев крупных притоков, а также в проливе Малое море, на песчаных и илисто-песчаных грунтах. Основные нерестилища расположены непосредственно в заливах озера (Чивыркуйский, Мухор, Провал). К возрасту 5+ рыбы достигают длины 300-350 мм и веса 320-400 г, к 10+ – 450-550 мм и 1300-1700 г соответственно. Молодь сига до трехлетнего возраста питается преимущественно зоопланктоном. Рыбы старшего возраста в зависимости от мест обитания питаются амфиподами, моллюсками, личинками хирономид (Матвеев и др., 2012).

Плоскоголовая широколобка *Abyssocottus (Asprocottus) platycephalus* (Taliev, 1955) обитает на илистом дне, на глубинах от 50 до 800 м, достигает длины 110 мм и массы до 12 г. Состав пищевого рациона не изучался.

Широколобка Годлевского *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874) и узкая широколобка *Abyssocottus (Limnocottus) pallidus* (Taliev, 1955) сходные по образу жизни виды. Оба вида обитают на песчано-илистом грунте на глубине от 50-100 м до 1000 ± 100 м. *A. godlewskii* достигает длины до 165 мм и массы до 45 г, *A. pallidus* - 150 мм

и 15 г. Питаются мелкими амфиподами и молодь коттоидных рыб.

Малоглазая длиннокрылая широколобка *Cottocomephorus comephoroides* (Berg, 1900) обитает в придонном слое пелагиали на глубинах от 50 до 500 м. Самцы достигают длины до 200 мм и массы до 100 г, самки – до 170 мм и 50 г. Пищу, как и у омуля, составляют макрогектопус, рачковый планктон и пелагическая молодь коттоидных рыб.

Песчаная широколобка *Leocottus kesslerii* (Dybowski, 1874) в Байкале обитает на песчаном и каменисто-песчаном дне от уреза до глубины 150-170 м. Максимальные длина и масса в разных популяциях варьируют от 100 до 150 мм и от 10 до 40 г. Питается широким спектром мелких беспозвоночных, в зависимости от их обилия в конкретном биотопе, реже молодь коттоидных рыб.

Сравнительный анализ накопления ПХБ в тканях таксономически и экологически различных видов позволяет решить две задачи, имеющие фундаментальное значение для понимания закономерностей современных экологических процессов:

1. оценить уровень и характер загрязнения различных экологических зон Байкала;
2. определить взаимосвязь экологических особенностей видов с процессами биоконцентрирования и биоаккумуляции стойких загрязнителей в организме.

Цель настоящей работы заключалась в получении современных данных по содержанию ПХБ в тканях различных видов рыб озера Байкал, выявлении особенностей уровней накопления загрязнителей в зависимости от районов их обитания в рамках оценки потенциального экологического риска от присутствия загрязнителей этого класса в байкальской воде на уровне следов.

2. Материалы и методы

Отбор проб рыб. Образцы рыб были отобраны в ходе экспедиций на научно-исследовательском судне «Г.Ю. Верещагин» в августе и октябре 2024 года (Рис. 1). Отлов проводили с использованием донного трала (ячей в кутке 10 мм). Исследовали пять видов байкальских коттоидных рыб сем. Cottidae: *A. pallidus*, *A. godlewskii*, *A. platycephalus*, *L. kesslerii* и *C. comephoroides*, а также два вида сем. Coregonidae: *C. baicalensis* и *C. migratorius*. После отлова рыбу упаковывали в алюминиевую фольгу и хранили при температуре –20°С до анализа.

Подготовка проб. Перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре. Проводили стандартный биологический анализ (Правдин, 1996): определяли стандартную длину (SL) и массу, определяли пол, возраст и морфо-экологическую группу у байкальского омуля (Таблица 1). Подготовку проб проводили согласно методике (ФР.1.31.2021.40284). Для целей настоящего исследования, методика была адаптирована: у рыб удаляли голову, внутренние органы, кости и кожу. Для химического анализа использовали всю мышечную ткань без разделения на красные

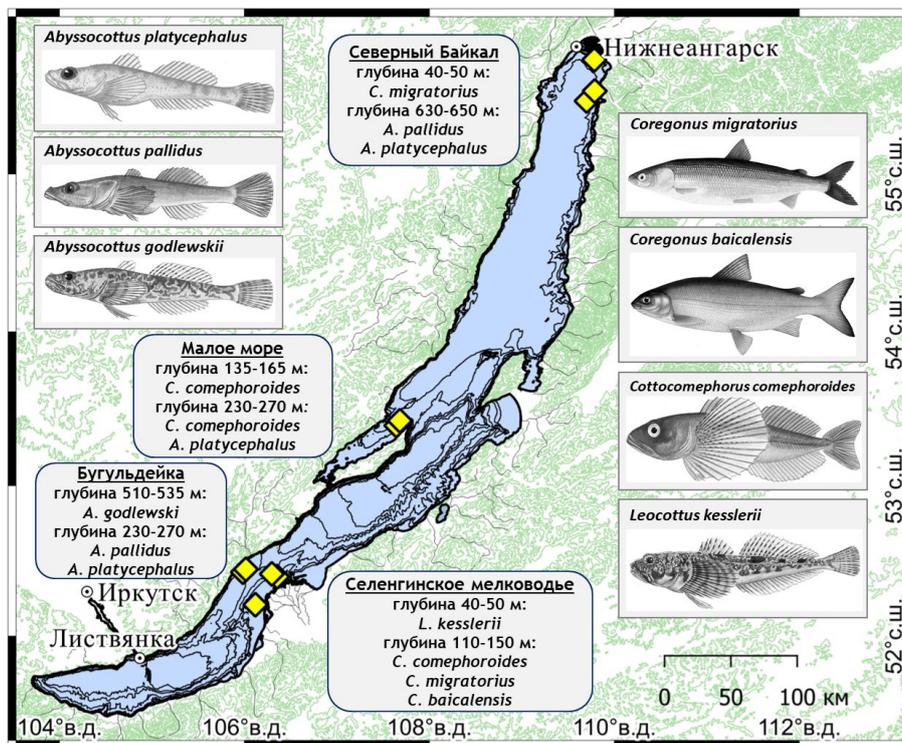


Рис.1. Карта отлова байкальских рыб.

и белые мышцы. Гомогенизацию мышечной ткани мелких особей проводили в блендере, предварительно измельчив лабораторным ножом, для анализа использовали две параллельные навески массой около 0.5 г.

К отобранным навескам вносили внутренний суррогатный стандарт (смесь «Marker-7 PCB Mixture» изотопно меченных конгенов ПХБ №№ 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) и гомогенизировали с безводным сульфатом натрия. Извлечение ПХБ проводили методом двукратной ультразвуковой экстракции (35-40 кГц, 15 мин) смесью раствори-

телей *n*-гексан-ацетон (1:1) из гомогенизированной матрицы. Объединенный экстракт концентрировали на роторном испарителе до объема 1 мл, сушили над безводным сульфатом натрия и проводили очистку при помощи концентрированной серной кислоты. Очищенный органический слой промывали дистиллированной водой до нейтрального pH, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в токе аргона до объема 0.1 мл. Перед хромато-масс-спектрометрическим (ГХ-МС) анализом в очищенный экстракт вводили внутренний стандарт выхода (4,4'-дибромбифенил).

Таблица 1. Параметры исследованных рядов байкальских рыб.

Таксон	SL, мм	Масса тела, г	Возраст*, лет	Кол-во, экз.	Место и глубина отбора
Семейство Coregonidae					
<i>Coregonus baicalensis</i>	277-297	255-306	5	2	Селенгинское мелководье, 110-150 м
<i>Coregonus migratorius</i>	190-274	79-240	3-5	7	Селенгинское мелководье, 110-150 м
	267-302	234-385	5-6	3	Ангарский сор, 40-50 м
Семейство Cottidae					
<i>Abyssocottus (Asprocottus) platycephalus</i>	83-93	9,3-13	3-4	4	Траверс пос. Бугульдейка, 710-750 м
	90-100	13-17	2-4	4	Пролив Большие Ворота, 230-270 м
	80-90	11-13	3	4	Траверс бухты Фролиха, 630-650 м
<i>Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii</i>	93-125	14-34	2-4	4	Траверс пос. Бугульдейка, 510-535 м
<i>Abyssocottus (Limnocottus) pallidus</i>	87-100	7,5-13	2-3	4	Траверс пос. Бугульдейка, 710-750 м
	96-115	15-20	2-3	4	Траверс бухты Аяя, 630-650 м
<i>Cottocomephorus comephoroides</i>	107-114	14-18	2	3	Селенгинское мелководье, 40-50 м
	93-128	10-33	1-2	4	Пролив Большие Ворота, 135-165 м
	113-120	12-24	1-2	2	Пролив Большие Ворота, 230-270 м
<i>Leocottus kesslerii</i>	96-115	7,1-11	2-3	4	Селенгинское мелководье, 40-50 м

Примечание: * – возраст определяли по отолитам

Хромато-масс-спектрометрический анализ. ПХБ определяли на газовом хроматографе с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent Technologies 7890B GC System 7000C GC/MS Triple Quad.

Хроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке OPTIMA®-17 MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Градиент температуры: от 80°C (выдержка 1 мин) до 310°C со скоростью 15°C/мин, финальная выдержка при 310°C – 10 мин. Температура инжектора – 280°C. Объем ввода пробы – 2 мкл в режиме без деления потока (splitless).

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Температура ионного источника – 230°C, температура квадруполей – 150°C. Для каждого аналита и внутренних стандартов отслеживали два характерных MRM-перехода. Идентификацию конгенов ПХБ проводили по совпадению времен удерживания в образце и градуировочном растворе (± 0.1 мин), а также по соотношению площадей пиков двух аналитических MRM-переходов (допустимое отклонение – не более $\pm 20\%$ от значения, полученного для градуировочных растворов).

Количественное определение выполняли методом внутреннего стандарта по смеси суррогатных стандартов. Строили градуировочные зависимости в диапазоне концентраций от 0.005 до 25 нг/мл. Расчет содержания ПХБ в пробах проводили по среднему значению из двух результатов определения в двух параллельных навесках, используя соотношение площадей аналитического и соответствующего суррогатного стандарта.

Контроль качества включал процедурные холостые опыты (реагент-бланк) для оценки лабораторного фона. Качество экстракции контролировали по проценту извлечения суррогатных стандартов, который составлял 78–92%. Для проверки правильности методики использовали стандартный образец BCR®-350 (жир макрели).

Определение индикаторных и диоксиноподобных конгенов ПХБ. Коммерческие продукты ПХБ производились в виде сложных смесей переменного состава (до 50-70 индивидуальных конгенов – изомеров и гомологов разной степени хлорирования) и в таком виде поступали в окружающую среду. В связи с чем корректная оценка уровней загрязнения водных экосистем часто затруднена из-за применения различных методик определения СОЗ, в случае ПХБ проблема связана с идентификацией и определением разного числа конгенов. Эти вопросы решаемы определением ограниченного числа соединений – семи индикаторных конгенов (№№: 28, 52, 101, 118, 138, 153 и 180), которые, как правило, являются мажорными компонентами в гомологических группах изомеров технических смесей ПХБ (ПХБ №28 в группе трихлорированных изомеров; ПХБ №52 – тетрахлорированных; ПХБ №101 и №118 – пентахлорированных; ПХБ №138 и №153 – гексахлорированных; ПХБ №180 - гептахлорированных), что объясняет их обнаружение практически в любых объектах. Копланарные, диоксиноподобные конгены ПХБ (№№: 77, 81, 105, 114, 118, 123,

126, 156, 157, 167, 169, 189), обладают наибольшей токсичностью среди других ПХБ и аддитивными эффектами совместного присутствия (Walker et al., 2004). Исходя из состава технических смесей ПХБ (Кириченко и др., 2000) и значений международных коэффициентов токсических эквивалентов (I-TEF) нами был выбран ряд приоритетных диоксиноподобных ПХБ, №№ (I-TEF): 105 (0.0001), 114 (0.0005), 118 (0.0001), 123 (0.0001), 126 (0.1), 156 (0.0005).

Пределы обнаружения и определения оценены в соответствии с рекомендациями ИЮПАК (Currie, 1995) как произведение стандартного отклонения лабораторного фона и коэффициента: $k_q = 3$ для расчёта предела обнаружения и $k_q = 10$ для расчёта предела определения. Предел определения для выбранных конгенов ПХБ составил 0.010 нг/г сырой массы. Суммарная погрешность определения не превышала 35%.

Коэффициент накопления рассчитывали как отношение средней массовой доли индикаторных или диоксиноподобных ПХБ в тканях байкальских рыб (нг/кг) к их средней концентрации в байкальской воде (нг/л).

Суммарный токсический эквивалент (WHO-TEQ_{ПХБ}) (Kutz et al., 1990) для n обнаруженных диоксиноподобных конгенов ПХБ рассчитывали по формуле:

$$TEQ_{\text{ПХБ}} = \sum_{i=1}^n (C_i \cdot I-TEF_i),$$

где $TEQ_{\text{ПХБ}}$ – суммарный токсический эквивалент; C_i – концентрация i -го конгенера ПХБ в пробе (нг/г); $I-TEF_i$ – международный коэффициент токсической эквивалентности для i -го конгенера ПХБ.

3. Результаты и обсуждение.

В тканях байкальских рыб идентифицированы семь индикаторных конгенов и четыре-пять из шести выбранных диоксиноподобных (наиболее токсичный ПХБ №126 не был обнаружен ни в одной из проб). Средние массовые доли суммарного содержания индикаторных конгенов ($\Sigma\text{ПХБ}_7$) и диоксиноподобных конгенов ($\Sigma\text{ПХБ}_{\text{ДК}}$) в мышечной ткани исследуемых рыб приведены в Таблице 2.

Состав и соотношение конгенов ПХБ в мышечных тканях рыб заметно отличаются от их состава и соотношения в пробах байкальской воды, что объясняется различием механизмов накопления и скоростью трансформации конгенов с разной степенью хлорирования. Согласно результатам многолетнего мониторинга СОЗ в водной экосистеме озера (Gorshkov et al., 2022) в течение 2014-2021 гг. наблюдалось снижение концентраций ПХБ в воде пелагиали, причем в некоторых точках отмечается снижение до пределов определения $\Sigma\text{ПХБ}_7 \leq 0.11$ нг/л. Средняя концентрация и статистически значимый диапазон обнаруженных концентраций $\Sigma\text{ПХБ}_7$ в воде пелагиали озера оценены значениями равными 0.30 и 0.26-0.34 нг/л соответственно. Накопление индикаторных конгенов в мышечных тканях рыб оценено диапазоном коэффициентов $1.2 \cdot 10^3$ до $6.0 \cdot 10^4$ (Таблица 2), при чем наибольшие значения (10^4) были получены для демерсальных глубоководных видов рыб семейства Cottidae: А.

Таблица 2. Средние массовые доли суммарного содержания индикаторных (Σ ПХБ₇) и диоксиноподобных (Σ ПХБ_{дк}) конгенов ПХБ в тканях байкальских рыб, коэффициенты накопления ПХБ.

Район отбора	Вид	Среднее содержание ПХБ в рыбе, нг/г сырой массы		Коэффициенты накопления ПХБ в рыбе
		Σ ПХБ ₇	Σ ПХБ _{дк}	Σ ПХБ ₇
Бугульдейка	<i>A. pallidus</i>	11,45	4,06	$3,8 \cdot 10^4$
	<i>A. godlewskii</i>	4,34	1,48	$1,4 \cdot 10^4$
	<i>A. platycephalus</i>	6,71	2,57	$2,2 \cdot 10^4$
Селенгинское мелководье	<i>L. kesslerii</i>	1,37	0,37	$4,6 \cdot 10^3$
	<i>C. comephoroides</i>	0,83	0,36	$2,8 \cdot 10^3$
	<i>C. migratorius</i>	0,86	0,35	$2,9 \cdot 10^3$
Малое море (пролив Большие ворота)	<i>C. comephoroides</i>	0,87	0,30	$2,9 \cdot 10^3$
	<i>A. platycephalus</i>	1,86	0,51	$6,2 \cdot 10^3$
Северный Байкал (бухты Ая и Фролиха, Ангарский сор)	<i>A. pallidus</i>	17,85	5,55	$6,0 \cdot 10^4$
	<i>A. platycephalus</i>	6,49	1,90	$2,2 \cdot 10^4$
	<i>C. migratorius</i>	0,74	0,24	$2,5 \cdot 10^3$

pallidus, *A. podlewskii*, *A. platycephalus*. При сравнении массовой доли Σ ПХБ₇ в демерсальных и пелагических видах рыб отмечено, что содержание поллютантов в демерсальных глубоководных видах выше. Различия наблюдаются во вкладе отдельных индикаторных конгенов ПХБ разной степени хлорирования – в демерсальных глубоководных видах *A. pallidus*, *A. godlewskii*, *A. platycephalus* наибольшим вкладом (более 60 %) в Σ ПХБ₇ характеризуются шестихлорированные ПХБ №153 и №138, в пелагических видах *C. comephoroides*, *C. migratorius*, *C. baicalensis* и донном мелководном *L. kesslerii* их вклад не более 40 % и сопоставим с вкладом пятихлорированных ПХБ №101 и №118 (Рис. 2). В воде пелагиали озера содержание конгенов ПХБ №153 и №138 составляет менее 20 % суммарного содержания Σ ПХБ₇ (Рис. 3).

Полученные данные согласуются с исследованиями глубоководных организмов, характеризующихся более высоким накоплением СОЗ в сравнении с видами, обитающими в поверхностных водах (Knezovich et al., 1987; Froescheis et al., 2000). Отличие конгенерных профилей может объясняться особенностями среды обитания и рациона демерсальных глубоководных видов рыб, и, возможно, свидетельствовать о преимущественном накоплении высокохлорированных ПХБ, в частности индикаторных конгенов ПХБ №153 и №138, в донных отложениях, откуда они могут поступать по пищевой цепи к гидробионтам. В донные отложения ПХБ могут поступать с твердыми частицами и остатками биомассы, которая в свою очередь при жизни аккумулировала загрязнители, при чем в период её жизненного цикла менее хлорированные ПХБ могли успеть биodeградировать и трансформироваться. Полученные данные и высказанные предположения могут лечь в основу многолетнего мониторинга ПХБ в глубоководной зоне озера Байкал с целью определения возможных путей их поступления и концентрирования в ней, и взаимосвязи с процес-

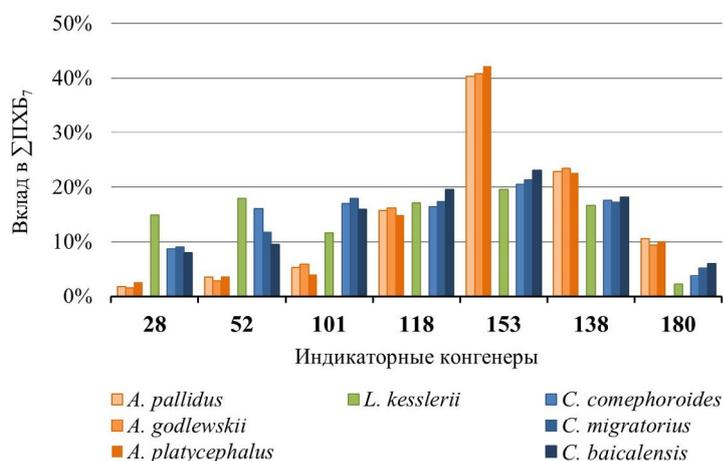


Рис.2. Профили индикаторных конгенов ПХБ в мышечной ткани байкальских рыб: демерсальных глубоководных видов *A. pallidus*, *A. godlewskii*, *A. platycephalus*; демерсальных мелководных *L. kesslerii*; пелагических *C. comephoroides*, *C. migratorius*, *C. baicalensis*.

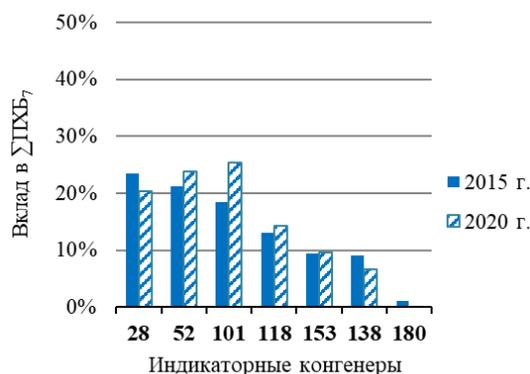


Рис.3. Профили индикаторных конгенов ПХБ в воде пелагиали озера Байкал (усредненные значения результатов мониторинга в 2015 и 2020 гг.) (Gorshkov et al., 2022).

сами, происходящими в глобальном атмосферном переносе – доминирующем источнике поступления ПХБ в водную экосистему озера.

Накопление ПХБ в пелагических видах рыб может отражать уровень загрязнения водной толщи, представляя интегральную характеристику как для всего водного объекта, так и отдельных его районов в зависимости от типа и расстояния миграций рыб. Содержание ПХБ в мышцах *C. migratorius* и *C. comephoroides* – видах разных семейств, характеризующихся активными горизонтальными и вертикальными миграциями, сопоставимы (Таблица 2). Учитывая данные отчета НПО Тайфун (Отчет..., 2015), в грубом приближении рассмотренные семейства сопоставимы и по жирности: средние значения и диапазоны содержания липидов (%) для *C. migratorius* представлены значениями 2.35 и 1.34–3.79, для группы котноидных рыб: 1.88 и 0.41–6.25.

Определение диоксиноподобных конгенов, расчет суммарных токсических эквивалентов обнаруженных ПХБ является обязательной процедурой оценки экологического риска, в том числе в контексте промысла и пищевой безопасности. В тканях рыб обнаружены диоксиноподобные конгены ПХБ, концентрации которых в воде характеризуются ультраследовым уровнем. Расчет суммарных токсических эквивалентов WHO-TEQ для средних ΣПХБ_{дк} обнаруженных в исследуемых байкальских видах рыб, представлен в Таблице 3. Байкальский омуль и байкальский сиг – представители промысловых видов рыб. Среднее значение и диапазон суммарного содержания ΣПХБ_{дк} в мышечной ткани *C. migratorius* оценены значениями 0.32 и 0.18 – 0.83 нг/г сырой массы соответственно. Суммарный токсический эквивалент (WHO-TEQ₂₀₀₅) оценен диапазоном 0.021 – 0.104 пг/г сырой массы, что на два порядка ниже концентраций, обнаруженных в кумже *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758) альпийских озер Западной Европы и Балтийского моря (Таблица 3).

Таблица 3. Содержание обнаруженных ПХБ в байкальских видах рыб и результаты расчета суммарных токсических эквивалентов WHO-TEQ в сравнении с диапазонами WHO-TEQ обнаруженных ПХБ в кумже *Salmo trutta* (*S. Trutta*) других водных экосистем.

Объект	Содержание диоксиноподобных конгенов ПХБ, нг/г (№ ПХБ, I-TEF*)						WHO-TEQ, пг/г сырой массы
	123	118	114	105	126	156	
	0,0001*	0,0001*	0,0005*	0,0001*	0,1*	0,0005*	
Вода	< ПО	0,06	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	0,006
<i>C. comephoroides</i>	0,03	0,14	0,01	0,11	< ПО	0,02	0,045
<i>C. migratorius</i>	0,03	0,15	0,00	0,12	< ПО	0,02	0,041
<i>C. baicalensis</i>	0,02	0,07	0,00	0,05	< ПО	0,01	0,018
<i>L. kesslerii</i>	0,03	0,18	0,01	0,13	< ПО	0,02	0,048
<i>A. pallidus</i>	0,34	2,24	0,14	1,61	< ПО	0,47	0,72
<i>A. godlewskii</i>	0,11	0,70	0,04	0,50	< ПО	0,14	0,22
<i>A. platycephalus</i>	0,12	0,78	0,04	0,54	< ПО	0,17	0,25
<i>S. trutta</i> (альпийские озера Западной Европы)							6,3–13 **
<i>S. trutta</i> (Балтийское море)							4,2–9,0 **

Примечание: < ПО – ниже предела определения;

* – международный коэффициент токсической эквивалентности;

** – Gorshkov et al., 2022.

4. Заключение

Проведен подробный систематический анализ содержания ПХБ в различных видах байкальских рыб; выявлены особенности накопления ПХБ в демерсальных и пелагических видах рыб. Установлено: 1) определение в демерсальных (донных) видах дает возможность получать информацию о накоплении ПХБ в глубоководной зоне, механизмах их поступления, концентрирования с последующей оценкой потенциальных экологических рисков; 2) определение ПХБ в пелагических видах рыб может отражать уровень загрязнения водной толщи, представляя интегральную характеристику как всего водного объекта, так и отдельных его районов в зависимости от типа и расстояния миграций рыб, а также использоваться для оценки в контексте пищевой безопасности промысловых видов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность с.н.с. И.В. Ханаеву за предоставленные образцы. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, тема № 0279-2022-0004 (в ЕГИСУ НИОКТР № 122012600083-9). Исследование проведено с использованием научно-исследовательского судна “Г.Ю. Верещагин” ЦКП “Центр комплексных судовых исследований Байкала” и оборудования ЦКП “Ультрамикрoанализ”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Богданов Б.Э. 2023. Коттоидные рыбы (Perciformes: Cottidae) Байкала и Байкальского региона: обновленный аннотированный список с описанием новых таксонов. *Limnology and Freshwater Biology* 3: 63-95. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-3-63](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-3-63)
- Горшков А.Г., Кустова О.В., Дзюба Е.В. и др. 2017. Полихлорированные бифенилы в водной экосистеме оз. Байкал. *Химия в интересах устойчивого развития* 25: 269-278. DOI: [10.15372/KhUR20170305](https://doi.org/10.15372/KhUR20170305)
- Кустова О.В., Степанов А.С., Горшков А.Г. 2021. Определение индикаторных конгенов полихлорированных бифенилов в воде на ультраследовом уровне концентраций методом газовой хроматографии-гаддемой масс-спектрометрии. *Журнал аналитической химии* 76(11): 1028-1037. DOI: [10.31857/S0044450221110074](https://doi.org/10.31857/S0044450221110074)
- Кириченко В.Е., Первова М.Г., Промышленникова Е.П. и др. 2000. Идентификация изомерных полихлорированных бифенилов в техническом продукте "Совол". *Аналитика и контроль* 4 (1): 41-44.
- Матвеев А.Н., Самусенок В.П., Вокин А.И. и др. 2012. Промысловые виды рыб водоемов Иркутской области. *Байкальский зоологический журнал* 2(10): 16-29.
- Отчет «Стойкие органические загрязнители (СОЗ) на Байкальской природной территории». 2015. URL: https://www.rpatyphoon.ru/upload/medialibrary/dbc/Baykal_otchet_2015.pdf (Дата обращения 19.12.2025)
- Правдин И.Ф. 1996. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). Москва: Пищевая промышленность.
- Самсонов Д.П., Кочетков А.И., Пасынкова Е.М. и др. 2017. Содержание стойких органических загрязнителей в компонентах уникальной экологической системы озера Байкал. *Метеорология и гидрология* 5: 105-115.
- Скрябин А.Г. 1979. Сиговые рыбы юга Сибири. Новосибирск: Наука.
- Смирнов В.В., Смирнова-Залуи Н.С., Суханова Л.В. 2009. Микроэволюция байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi). Новосибирск: Наука.
- Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях. 2001. URL: <https://www.wipo.int/wipolex/ru/text/194844> (Дата обращения 19.12.2025)
- Талиев Д.Н. 1955. Бычки-подкаменщики Байкала (Cottoidei). Москва-Ленинград: Наука.
- ФР.1.31.2021.40284. 2020. Методика измерений массовых долей концентраций конгенов полихлорированных бифенилов в образцах рыбы (омуль) озера Байкал методом хромато-масс-спектрометрии с детектированием в режиме мониторинга заданных реакций / Кустова О.В., Степанов А.С., Дзюба Е.В., Горшков А.Г. 23 с. Свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 2 DOI: [22.0156/RA.RU.311866/2020](https://doi.org/22.0156/RA.RU.311866/2020)
- Bogdanov B.E., Knizhin I.B. 2022. The salmonid fishes of Lake Baikal and its adjacent water systems: annotated checklist with new taxa description. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 1688-1704. DOI: [10.31951/2658-3518-2022-A-6-1688](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1688)
- Currie L.A. 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry* 67(10): 1699-1723. DOI: [10.1351/pac199567101699](https://doi.org/10.1351/pac199567101699)
- Eckhardt S., Breivik K., Mano S. et al. 2007. Record high peaks in PCB concentrations in the Arctic atmosphere due to long-range transport of biomass burning emissions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7(17): 4527-4536. DOI: [10.5194/acp-7-4527-2007](https://doi.org/10.5194/acp-7-4527-2007)
- Froeschis O., Looser R., Cailliet G.M. et al. 2000. The deep-sea as a final global sink of semivolatile persistent organic pollutants? Part I: PCBs in surface and deep-sea dwelling fish of the North and South Atlantic and the Monterey Bay Canyon (California). *Chemosphere* 40: 651-660. DOI: [10.1016/S0045-6535\(99\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00461-0)
- Gioia R., Lohmann R., Dachs J. et al. 2008. Polychlorinated biphenyls in air and water of the North Atlantic and Arctic Ocean. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 113: D19302. DOI: [10.1029/2007JD009750](https://doi.org/10.1029/2007JD009750)
- Gorshkov A.G., Kustova O.V., Bukin Y.V. 2022. Assessment of PCBs in surface waters at ultratrace levels: Traditional approaches and biomonitoring (Lake Baikal, Russia). *Applied Sciences* 12: 2145. DOI: [10.3390/app12042145](https://doi.org/10.3390/app12042145)
- Jamieson A.J., Malkocs T., Piertney S.B. et al. 2017. Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna. *Nature Ecology & Evolution* 1(3): 0051. DOI: [10.1038/s41559-016-0051](https://doi.org/10.1038/s41559-016-0051)
- Khairy M., Brault E., Dickhut R. et al. 2021. Bioaccumulation of PCBs, OCPs and PBDEs in marine mammals from West Antarctica. *Frontiers in Marine Science* 8: 768715. DOI: [10.3389/fmars.2021.768715](https://doi.org/10.3389/fmars.2021.768715)
- Knezovich J.P., Harrison F.L., Wilhelm R.G. 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water, Air, and Soil Pollution* 32: 233-245.
- Kucklik J.R., Harvey H.R., Ostrom P.H. et al. 1996. Organochlorine dynamics in the pelagic food web of Lake Baikal. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(8): 1388-1400.
- Kutz F.W., Barnes D.G., Bottimore D.P. et al. 1990. The international toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. *Chemosphere* 20(7-9): 751-757. DOI: [10.1016/0045-6535\(90\)90178-V](https://doi.org/10.1016/0045-6535(90)90178-V)
- Norstrom K., Czub G., McLachlan M.S. et al. 2009. External exposure and bioaccumulation of PCBs in humans living in a contaminated urban environment. *Environment International* 36(8): 855-861. DOI: [10.1016/j.envint.2009.03.005](https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.03.005)
- Sideleva V.G. 2003. *The Endemic Fishes of Lake Baikal*. Leiden: Backhuys Publishers.
- Walker J.N., Crockett P.W., Nyska A. et al. 2004. Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of "Dioxin-like compounds". *Environmental Health Perspectives* 113(1): 43-48. DOI: [10.1289/ehp.7351](https://doi.org/10.1289/ehp.7351)
- Wang Q., Xie C., Long C. et al. 2022. Bioaccumulation and biomagnification of polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyltrichloroethane in biota from Qilianyu Island, South China Sea. *Toxics* 10(6): 324. DOI: [10.3390/toxics10060324](https://doi.org/10.3390/toxics10060324)