

# **Evaluation of the Ecological State Of Water Reservoirs Using the *rbcl* Protein of Phytoplanktons.**

**Arthur M Husainov, Ludmila L Frolova\* and Ivan S Aponasevich.**

Kazan Federal University, Department of Genetics, 18 Kremlyovskaya St., 420008 Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation.

## **ABSTRACT**

Как известно фитопланктон [1], так же как зоопланктон и зообентос [2,3], активно используются при биоиндикации для оценки экологического состояния водоемов. Анализ 85 белков *rbcl* индикаторных фитопланктонных организмов из списка В.Сладечека (1973) показал наличие 45 уникальных участков аминокислотных последовательностей хлоропластного гена *rbcl* для 21 вида фитопланктонных организмов. Уникальные варибельные участки расположены на поверхности белка *rbcl* фитопланктонных организмов и могут специфически распознаваться антителами в одной пробе воды с использованием ИФА-метода. Исследования по использованию белка *rbcl* в качестве маркерного для идентификации фитопланктона в совокупности с идентификацией по маркерному белку CO1 зоопланктона и зообентоса в пробе воды дают более достоверную оценку экологического состояния водоемов.

Ключевые слова: белок *rbcl*, фитопланктон, индикаторные виды.

## **INTRODUCTION**

В настоящее время оценка экологического состояния водных объектов определяется по коэффициенту сапробности индикаторных видов организмов в пробе воды [4]. Как известно, в одной пробе воды содержатся множество животных и растительных организмов разных таксонов, часть из которых являются индикаторами экологического состояния водоема. Согласно международным требованиям к видам-индикаторам трудно найти отдельную систематическую группу организмов, с помощью которых можно полноценно провести мониторинг водоемов.

Распространенные методы биоиндикации пресноводных водоемов основываются на идентификации биологических индикаторов. Одним из распространенных объектов гидробиологического исследования пресноводных водоемов служат фитопланктонные организмы [1] наряду с зоопланктоном и зообентосом [5].

Как правило, идентификацию видов организмов в пробе воды проводят высококвалифицированные специалисты – зоологи и ботаники, визуально с помощью

определителей [6]. В то же время современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют инструментально определять организмы с точностью до вида. Так, например, в этих целях используется метод ДНК-штрихкодирования [7,8]. ДНК-штрихкоды различных организмов аккумулируются в международной базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank, а их белковые последовательности накапливаются в базе данных GenPept [9]. В основе метода ДНК-штрихкодирования лежит последовательность нуклеотидов ДНК-штрихкода, одинаковая у особей внутри одного вида, например, для растений используется фрагмент хлоропластного гена *rbcL* [10,11].

В данной работе показаны результаты исследования по использованию продукта гена *rbcL* в качестве маркерного для идентификации фитопланктона, которые позволяют в совокупности с использованием маркерного белка CO1 для идентификации зоопланктона и зообентоса [2,3] в пробе воды дают более достоверную оценку экологического состояния водоемов.

## **MATERIALS AND METHODS**

В работе использованы списки индикаторных видов фитопланктона по В.Сладечку [4]. Аминокислотные последовательности хлоропластного белка *rbcL* индикаторных видов фитопланктона получены из международной базы данных GenPept на сайте NCBI [9].

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка *rbcL* индикаторных видов фитопланктонных организмов выполнено в режиме он-лайн в программе «Clustal Omega» [12]. Выравненные аминокислотные последовательности белка *rbcL* фитопланктона проанализированы в программе Jalview 2.8.0b1 [13].

3D моделирование белков *rbcL* индикаторных видов фитопланктонных организмов проведено в программе «SWISS-MODEL» [14] и анализ этих моделей в формате PDB проведен в программе Jalview.

## **RESULTS AND DISCUSSIONS**

### **Разработка эколого-генетической база данных фитопланктонных организмов**

В работе проведен анализ 540 индикаторных видов фитопланктона. Из них для 85 видов размещена информация по аминокислотным последовательностям белка ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*, RuBisCO) в международной базе данных аминокислотных последовательностей GenPept (табл. 1).

**Table 1: Ecological and genetic database of indicator phytoplanktons species**

No	Species	Saprobity	Indicator weight	Accession number in the database GenPept
<b>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria, Order Chromatiales, Family Chromatiaceae</b>				
1	<i>Chromatium vinosum</i>	p-m	5.3	BAA14229
2	<i>Allochromatium vinosum</i>	p-m	5.3	BAA14229
<b>Phylum Cyanobacteria, Class Cyanophyceae, Order Nostocales, Family Nostocaceae</b>				
3	<i>Anabaena affinis</i>	b	2.0	ADR79686
4	<i>Anabaena flos-aquae</i>	b	2.0	ACO50080
5	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	b	2.0	ACO50080
<b>Order Chroococcales, Family Microcystaceae</b>				
6	<i>Microcystis aeruginosa</i>	b	1.75	CAB08265
<b>Order Oscillatoriales, Family Oscillatoriaceae</b>				
7	<i>Oscillatoria agardhii</i>	b	2.2	AAT38204
8	<i>Oscillatoria limnetica</i>	o-b	1.4	AIG20534
9	<i>Oscillatoria tenuis</i>	a	2.85	CBL80839
<b>Phylum Chrysophyta, Class Chrysophyceae, Order Pyrenomonadales, Family Chroomonadaceae</b>				
10	<i>Cryptomonas ovata</i>	a	3.0	BAF80668
<b>Order Synurales, Family Mallomonadaceae</b>				
11	<i>Synura uvella</i>	b	1.85	AAC02925
<b>Phylum Ochrophyta, Class Bacillariophyceae, Order Achnanthales, Family Achnanthaceae</b>				
12	<i>Achnanthes coarctata</i>	x	0.1	AEB91214
13	<i>Achnanthes minutissima</i>	o-b	1.45	CAM97957
14	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	o-b	1.45	CAM97957
<b>Family Cocconeidaceae</b>				
15	<i>Cocconeis pediculus</i>	b	1.75	AIT92091
16	<i>Cocconeis placentula</i>	b	1.35	AGG86630
<b>Order Bacillariales, Family Bacillariaceae</b>				
17	<i>hantzschia amphioxys</i>	a	2,9	AEB39371
18	<i>Nitzschia palea</i>	a	2,75	CBH19906
19	<i>Nitzschia sigmoidea</i>	b	2	CBH19911

<b>Order Cymbellales, Family Cymbellaceae</b>				
20	<i>Cymbella affinis</i>	o-b	1.1	AIY31907
21	<i>Cymbella aspera</i>	b	2.2	AIY31910
22	<i>Cymbella cystula</i>	b	1.8	AIY31913
23	<i>Cymbella Helvetica</i>	x-o	0.5	AIY31915
24	<i>Cymbella lanceolata</i>	b	1,9	AIY31917
25	<i>Cymbella naviculiformis</i>	b	2.0	AIY31926
<b>Family Gomphonemataceae</b>				
26	<i>Didymosphenia geminata</i>	x	0.1	AIY31931
27	<i>Gomphonema acuminatum</i>	b	1,7	AIY31964
28	<i>Gomphonema acuminatum</i> v. <i>coronatum</i>	b	2,2	AIY31964
29	<i>Gomphonema angustatum</i>	o	1,15	AIY31946
30	<i>Gomphonema angustatum</i> v. <i>productum</i>	b-a	2,4	AIY31946
31	<i>Gomphonema capitatum</i>	b	2.0	AAT78574
32	<i>Gomphonema clevei</i>	x	0.3	AFV95053
33	<i>Gomphonema intricatum</i> v. <i>intricatum</i>	o	0,7	AIY31951
34	<i>Gomphonema intricatum</i> v. <i>pumilum</i>	o	1,15	AIY31951
<b>Order Eunotiales, Family Eunotiaceae</b>				
35	<i>Eunotia pectinalis</i>	x	0.2	AEB91256
36	<i>Eunotia pectinalis</i> v. <i>minor</i>	o-x	0.6	AEB91256
<b>Order Melosirales, Family Melosiraceae</b>				
37	<i>Melosira varians</i>	b	1,85	AGN91098
<b>Order Naviculales, Family Naviculaceae</b>				
38	<i>Caloneis amphisbaena</i>	b-a	2.35	AIT92083
39	<i>Caloneis silicula</i>	o-b	1.5	AIT92048
40	<i>Navicula cryptocephala</i>	a	2,7	AGG86640
41	<i>Navicula cryptocephala</i> v. <i>intermedia</i>	b	2,3	AGG86640
42	<i>Navicula cryptocephala</i> v. <i>veneta</i>	a	2,7	AGG86640
43	<i>Navicula pupula</i>	b	2,2	AGT21406
44	<i>Navicula radiosa</i>	o-b	1,6	AIT92055
45	<i>Navicula radiosa</i> v. <i>tenella</i>	x-o	0,4	AIT92055
46	<i>Navicula rhynchocephala</i>	a	2,7	AEZ56384

<b>Family Pleurosigmataceae</b>				
47	<i>Gyrosigma acuminatum</i>	b	2,2	AEB91218
48	<i>Gyrosigma acuminatum</i>	b	2.2	AEB91218
<b>Family Pinnulariaceae</b>				
49	<i>Pinnularia borealis</i>	x-o	0,4	AER42043
50	<i>Pinnularia mesolepta</i>	o	1,15	CAM97949
51	<i>Pinnularia microstauron v. brebiconi</i>	b	2,2	CAM97910
52	<i>Pinnularia microstauron microstauron</i>	o	0,8	CAM97910
53	<i>pinnularia subcapitata</i>	o	1	CAM97905
54	<i>pinnularia viridis</i>	b	2,1	CAM97948
<b>Family Stauroneidaceae</b>				
55	<i>stauroneis anceps</i>	b	2	CAM97934
56	<i>stauroneis phoenicenteron</i>	b	1,7	CAM97956
<b>Order Rhopalodiales, Family Rhopalodiaceae</b>				
57	<i>Epithemia turgida</i>	b	2.0	AEB39377
58	<i>Rhopalodia gibba</i>	o	1	AEX92015
59	<i>Cymatopleura elliptica</i>	b	2.2	AGE34637
60	<i>Cymatopleura solea</i>	b-a	2.35	AGE34638
61	<i>Surirella biseriata</i>	b	2	AGE34629
62	<i>Surirella capronii</i>	b	2	AGE34586
63	<i>surirella linearis</i>	b	2,2	AGE34603
64	<i>Surirella ovata</i>	b	1,85	AEB91278
65	<i>Surirella spiralis</i>	o	1	AGE34584
66	<i>Surirella tenera</i>	b	2,1	AGE34623
<b>Order Thalassiophysales, Family Catenulaceae</b>				
67	<i>Amphora normanii</i>	x	0.1	CAM97884
68	<i>Amphora ovalis</i>	o-p	1.65	AIT92093
<b>Class Coscinodiscophyceae, Order Thalassiosirales, Family Stephanodiscaceae</b>				
69	<i>Cyclotella bodanica</i>	o	1.0	ABF60387
70	<i>Cyclotella comensis</i>	o	1.0	AIG62899
71	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	a-b	2.0	AHE78130
72	<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	a	2,7	AFO84271
<b>Class Fragilariophyceae, Order Fragilariales, Family Fragilariaceae</b>				

73	<i>Asterionella formosa</i>	o-b	1.4	AEB91253
74	<i>Fragilaria capucina</i>	o-b	1,6	AGG86633
75	<i>Fragilaria crotonensis</i>	o-b	1,4	AHE78119
76	<i>Synedra parasitica</i>	b-a	2,5	AEB91231
77	<i>Synedra tabulata</i>	a	2,7	AEB91210
78	<i>Tabellaria fenestrata</i>	o-b	1,4	AEB91204
<b>Class Xanthophyceae, Order Mischococcales, Family Ophiocytaceae</b>				
79	<i>ophiocytium capitatum</i>	o	1.0	ABS20265
<b>Order Tribonematales, Family Tribonemataceae</b>				
80	<i>Tribonema elegans</i>	x	0.1	AAV85106
81	<i>Tribonema minus</i>	x-b	1.0	CAI43964
82	<i>Tribonema viride</i>	o-a	2.0	CAI43961
83	<i>Tribonema vulgare</i>	x-o	0.5	CAI43960
84	<i>Tribonema ulotrichoides</i>	o	1.0	CAI43962
<b>Order Vaucheriales, Family Vaucheriaceae</b>				
85	<i>Vaucheria geminata</i>	b	2.0	AAN86809

Как видно из вышеприведенной таблицы, 85 видов фитопланктона являются индикаторами разных зон сапробности водоемов от «чистых» (ксеносапробных с весом 0.1) до «грязных» (поли-мезо-сапробных с весом 5.3).

Мы полагаем, что фитопланктонные индикаторные организмы могут быть идентифицированы при помощи продуктов маркерных генов *gbcL*. Таким образом, идентификация видов фитопланктона по маркерному белку *gbcL*, наряду с зоопланктоном и зообентосом по маркерному белку CO1 в пробе воды, повысит достоверность оценки экологического состояния водоемов.

#### **Выявление уникальных участков белков *gbcL* фитопланктонных организмов**

Для выявления уникальных участков белков *gbcL* фитопланктонных организмов проведено множественное выравнивание 85 аминокислотных последовательностей белка *gbcL* индикаторных фитопланктонных организмов (Рис 1).



Рисунок 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка *rbcL* индикаторных фитопланктонных организмов.

Анализ множественного выравнивания аминокислотных последовательностей белка *rbcL* фитопланктонных организмов показал наличие 45 уникальных участков, в том числе 28 гидрофильных, для 21 вида фитопланктона длиной от 4 до 30 аминокислотных остатков (а.о.) при оптимальной длине от 6 до 20 а.о. для распознавания антителами (табл. 2).

**Table 2: Unique variable sequences of the *rbcL* protein of indicator phytoplanktons species**

Species, Accession number in database GenPept	Saprobity*	Indicator weight	Unique fragments of amino acid sequences of the protein <i>rbcL</i> of phytoplanktons with the positions in the alignment
<i>Synura uvella</i> AAC02925	b	1.85	VYRAKAYFVEEVPNKPDEFFAFIAYEC 52-78 XSQPXXRRRERFLYVMEGINKAVAKTGQ 180-207 KSDMILHLHRAGH 258-270 NSVKGFDYDLLLLTSLKEDRSL 312-332
<i>Cryptomonas ovata</i> BAF80668	a	3.0	MFRMTPQK 14-21 LYRAKAYRVDPVPGAADQYFAYIAYE 54-79 GKRKY 149-153 AGEVKGH 207-213 NNSMILHLHRAGNSTYSRQKT 260-280

			AKVDVNLQPQLFFAQDWASLA 326-346
<i>Vaucheria geminata</i> AAN86809	b	2.0	ETKLDINLPQGLFFEMDWAA 354-373
<i>Tribonema elegans</i> AAV85106	x	0.1	XYNVLLTTSNEINLAQGLFFEMEWAQLRKTVPVASGGI HX 324-363
<i>Tribonema vulgare</i> CAI43960	x-o	0.5	QTNLEINLPQGIFFA 335-349
<i>Achnantheidium minutissimum</i> CAM97957	o-b	1.45	IQQINLHLSHTR 1-12
<i>Rhizosolenia curvata</i> AGC59927	b	1.85	MTAGTMDECIKRG 177-189
<i>Gomphonema capitatum</i> AAT78574	o	1.0	XLGFKXVSALRLEN 128-141
<i>Caloneis amphisbaena</i> AIT92083	b-a	2.35	QVYERAN 234-240
<i>Nitzschia sigmoidea</i> CBH19911	b	2	APDQY 82-86
<i>Nitzschia palea</i> CBH19906	a	2.75	GATMEDVYERS 243-253 IALWARK 278-284
<i>Melosira varians</i> AGN91098	b	1.85	TLLATELKVNLPGIFFDMD 338-358 LDIFSNEVGPR 426-436
<i>Pinnularia viridis</i> CAM97948	b	2.1	KPDHYFAFT 2-10
<i>Eunotia pectinalis</i> AEB91256	x	0.2	SFIAYEGD 103-110 QDEIFKRAEFAKE 251-263 QFFEMG 365-370
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	a-b	2.0	ATDQYFAFIAYECDLFEES 72-90

AHE78130			
<i>Stauroneis phoenicenteron</i> CAM97956	b	1.7	QXDS 2-5
<i>Gomphonema clevei</i> AFV95053	x	0.3	AINRASAATGETK 215-227
<i>Gyrosigma acuminatum</i> AEB91218	b	2.2	ILRKPTLAVNLS 351-362
<i>Allochromatium vinosum</i> BAA14229	p-m	5.3	KVSREEAAAAVAESSTG 40-57 DLDYKGRAYRIEDVPGDKES 69-89 HYVKTCGGPRNGIQVERDRMD 136-156 QNRFEFVSEAVRKAREETGER 208-228 APIIMHDFLTGGFTANTSLAN 255-275 HPKHGIH 297-303 QSTLGFVDQLRESFIPEDRSRGLFFDQDWG 333-362 QGHPWGNAAGAAANRVAT 400-417 KARNEGVEIEKH-AREVLSDAARHSPELAVAMET 422-454
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> ACO50080	b	2.0	QRWRDRFLFVSDAIS 3-17 LKRAEYAKELNQPIIMHDYLTAGFTANTTLAR 42-73
<i>Oscillatoria tenuis</i> CBL80839	a	2.85	DDLDRYKGRICYDIEPVPGED 2-21 RALRLEDLRVPIAYLKTQGPFGIT 58-83 KTPIIMHDYLTGGFTANTTLAKWCRR 188-213 KGITMGFVDLMREDHIEQDRAR 266-287

\* x-xenosaprobity; o-oligosaprobity; b – beta-mesosaprobity; a – alpha-mesosaprobity; p – polysaprobity

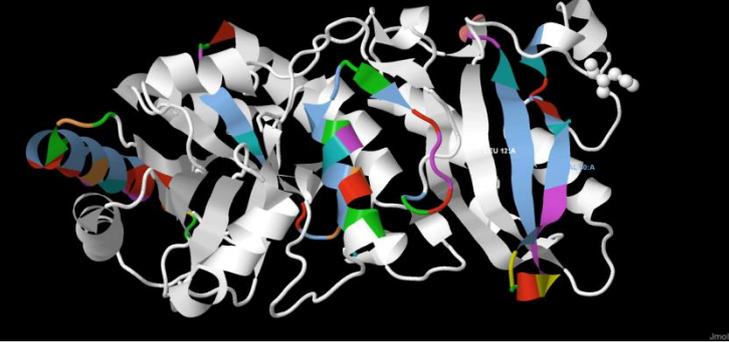
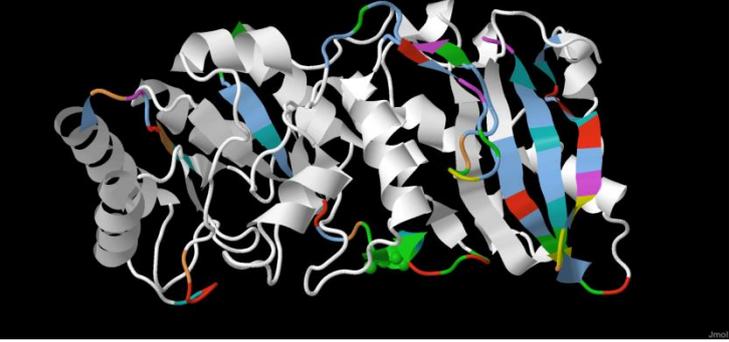
Из таблицы 2 видно, что разные виды фитопланктонных организмов имеют от одного до девяти уникальных переменных участков аминокислотных последовательностей rbcL. Например, белок rbcL *Gyrosigma acuminatum* длиной 490 а.о. имеет один участок длиной 12 а.о., а белок CO1 *Allochromatium vinosum* длиной 471 а.о. имеет девять участков длиной соответственно 18 а.о., 21 а.о., 21 а.о., 21 а.о., 21 а.о., 7 а.о.,

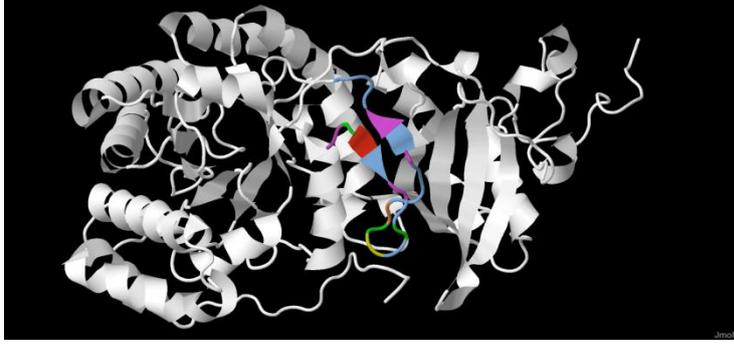
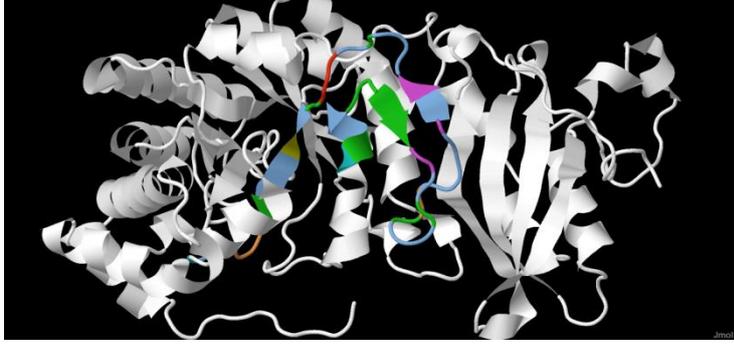
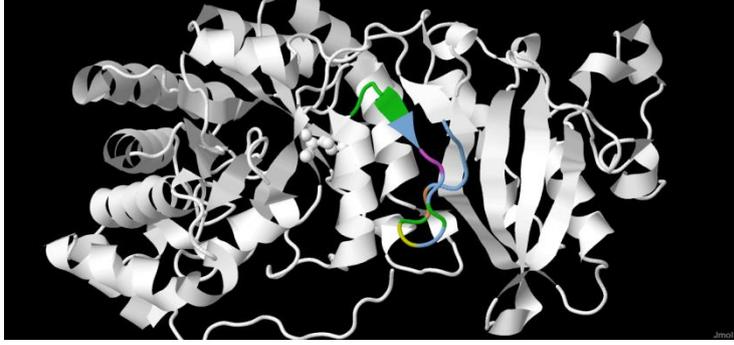
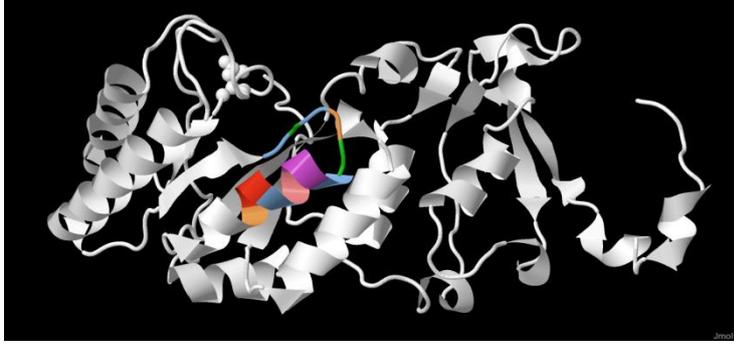
30 а.о., 18 а.о. и 34 а.о. Наличие более одного уникального варибельного участка аминокислотной последовательности *rbcL* расширяет возможности идентификации данного организма.

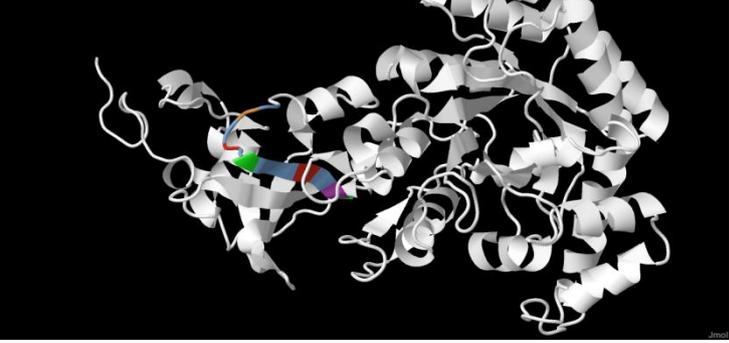
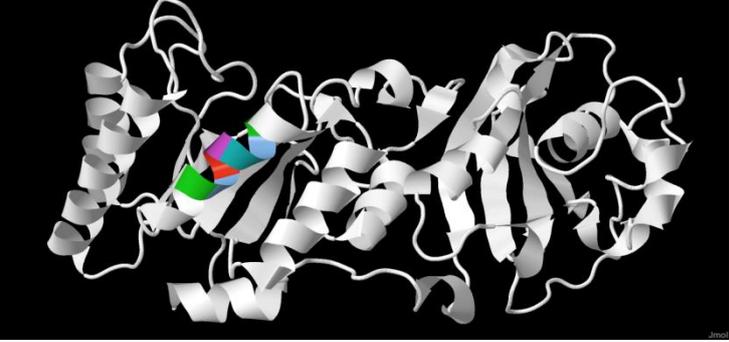
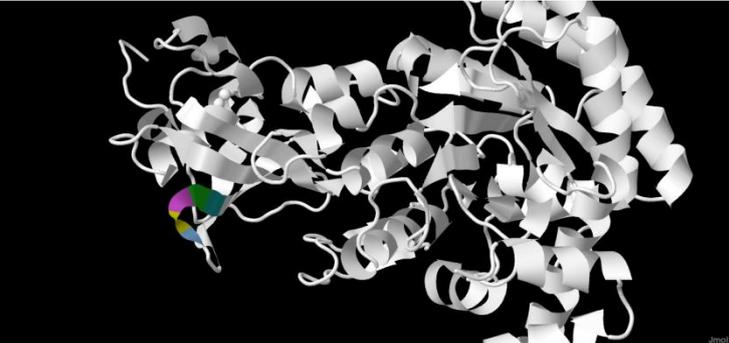
### Верификация доступности эпитопов к антителам

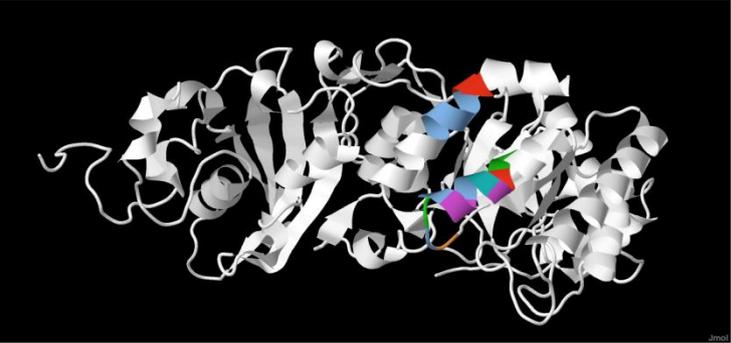
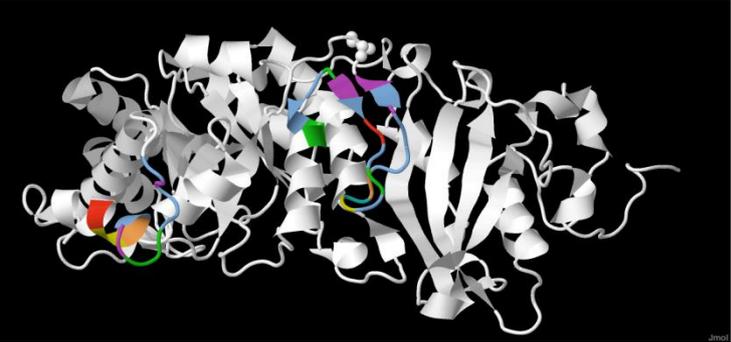
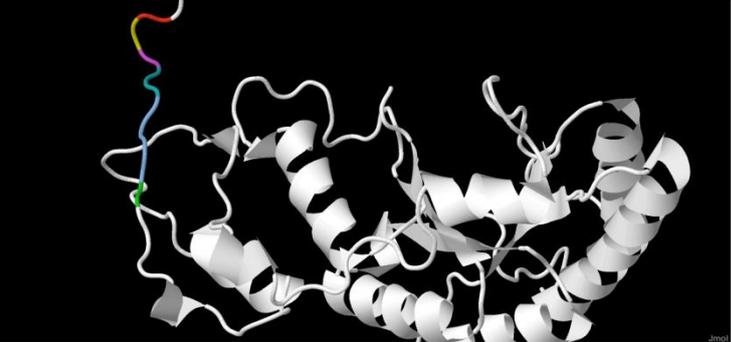
Для верификации доступности 45 уникальных участков белков *rbcL* индикаторных фитопланктонных организмов для распознавания антителами построены 3D-модели (Табл 3).

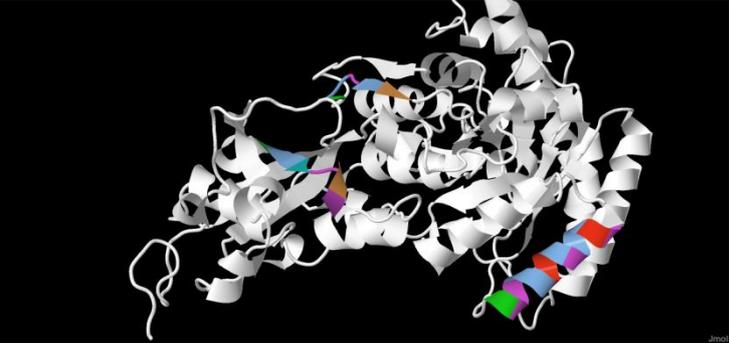
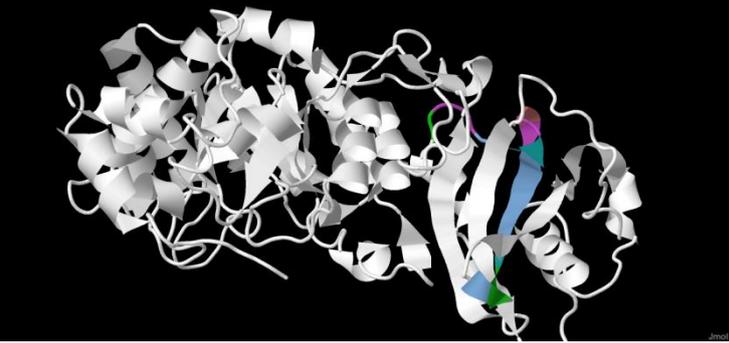
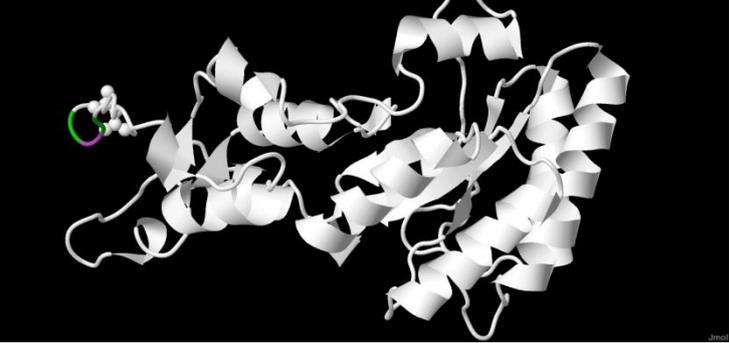
**Table 3: 3D-models of amino acid sequences *rbcL* of some indicator species of phytoplanktons**

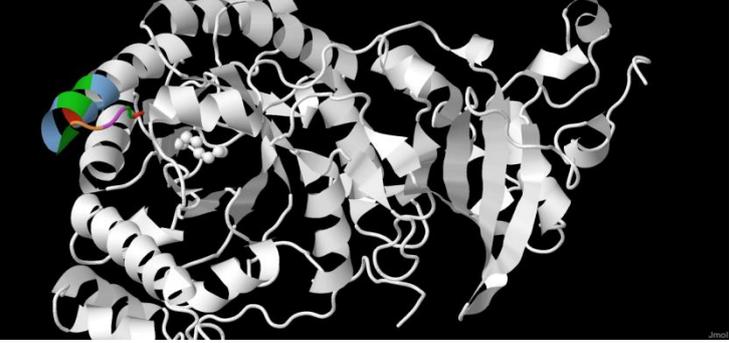
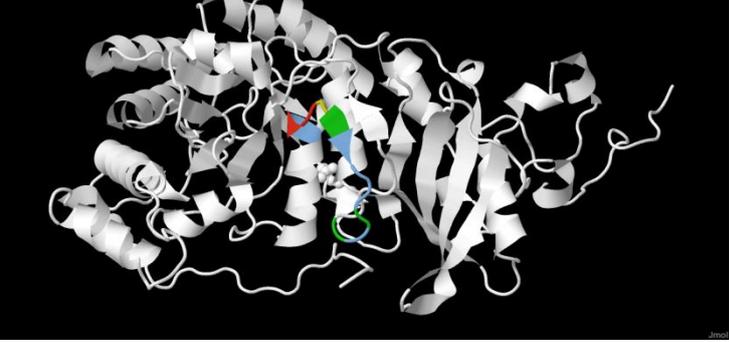
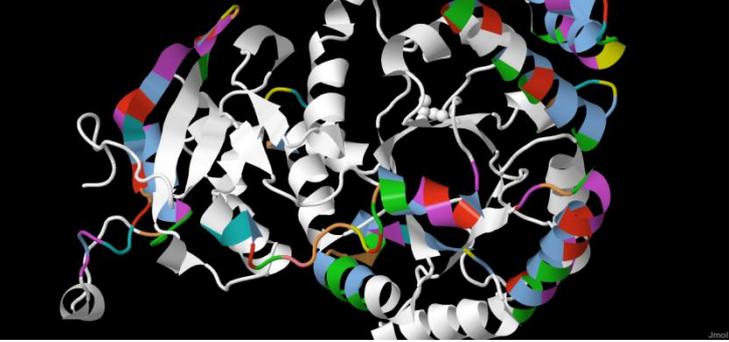
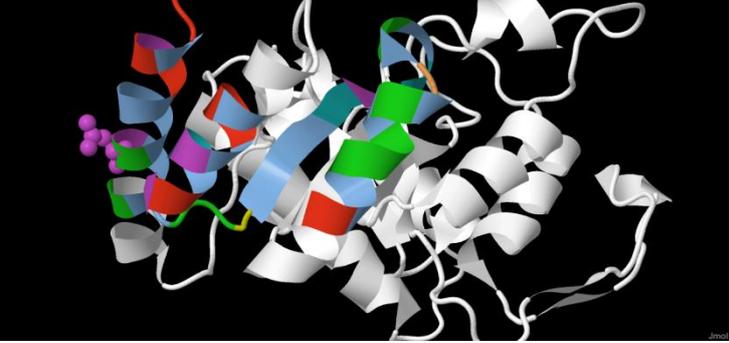
The indicator species of <b>phytoplanktons</b> / Accession number in the databank GenPept / saprobity*/ indicators weigh	3D-models of amino acid sequences <i>rbcL</i>
<p><i>Synura uvella</i> AAC02925 b / 1.85</p>	
<p><i>Cryptomonas ovata</i> BAF80668 a / 3.00</p>	

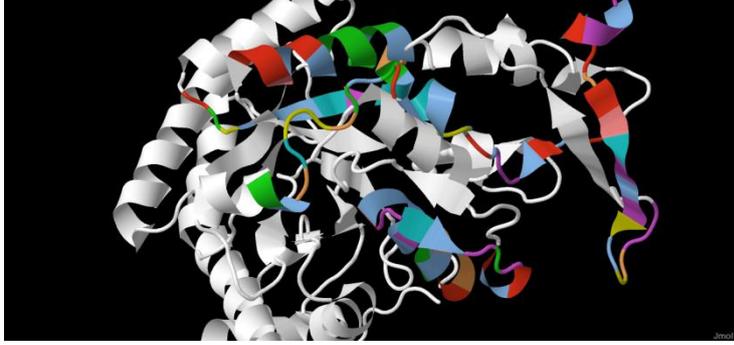
<p>The indicator species of <b>phytoplanktons</b> / Accession number in the databank GenPept / saprobity*/ indicators weigh</p>	<p>3D-models of amino acid sequences rbcL</p>	
<p><i>Vaucheria geminata</i> AAN86809 b / 2.00</p>		
<p><i>Tribonema elegans</i> AAV85106 x / 0.10</p>		
<p><i>Tribonema vulgare</i> CAI43960 b / 2.00</p>		
<p><i>Rhizosolenia curvata</i> AGC59927 b / 2.00</p>		

<p>The indicator species of <b>phytoplanktons</b> /  Accession number in the  databank GenPept /  saprobity*/ indicators  weigh</p>	<p>3D-models of amino acid sequences rbcL</p>
<p><i>Gomphonema capitatum</i>  AAT78574  o / 1.00</p>	
<p><i>Caloneis amphisbaena</i>  AIT92083  b-a / 2.35</p>	
<p><i>Nitzschia sigmoidea</i>  CBH19911  b / 2.00</p>	

<p>The indicator species of <b>phytoplanktons</b> /  Accession number in the databank GenPept /  saprobity*/ indicators  weigh</p>	<p>3D-models of amino acid sequences rbcL</p>
<p><i>Nitzschia palea</i>  CBH19906  a / 2.75</p>	
<p><i>Melosira varians</i>  AGN91098  b / 1.85</p>	
<p><i>Pinnularia viridis</i>  CAM97948  b / 2.10</p>	

<p>The indicator species of <b>phytoplanktons</b> /  Accession number in the  databank GenPept /  saprobity*/ indicators  weigh</p>	<p>3D-models of amino acid sequences rbcL</p>
<p><i>Eunotia pectinalis</i>  AEB91256  x / 0.20</p>	
<p><i>Cyclotella meneghiniana</i>  AHE78130  o-b / 2.00</p>	
<p><i>Stauroneis phoenicenteron</i>  CAM97956  b / 1.70</p>	

<p>The indicator species of <b>phytoplanktons</b> /  Accession number in the  databank GenPept /  saprobity*/ indicators  weigh</p>	<p>3D-models of amino acid sequences rbcL</p>	
<p><i>Gomphonema clevei</i>  AFV95053  x / 0.30</p>		
<p><i>Gyrosigma acuminatum</i>  AEB91218  b / 2.20</p>		
<p><i>Allochromatium vinosum</i>  BAA14229  p-m / 5.30</p>		
<p><i>Dolichospermum flos-aquae</i>  ACO50080  b / 2.00</p>		

<p>The indicator species of <b>phytoplanktons</b> /  Accession number in the databank GenPept /  saprobity*/ indicators weigh</p>	<p>3D-models of amino acid sequences rbcL</p>
<p><i>Oscillatoria tenuis</i>  CBL80839  a / 2.85</p>	

\* x–xenosaprobity; o–oligosaprobity; b – beta-mesosaprobity; a – alpha-mesosaprobity; p – polysaprobity

Анализ 3D-моделей по белку rbcL индикаторных фитопланктонных организмов показал, что все 45 уникальных сайта расположены на поверхности молекул на альфа-спиралях и, следовательно, доступны для распознавания антителами. Таким образом, как и маркерный ген rbcL, продукт этого хлоропластного гена в качестве маркерного белка, также может быть использован для идентификации видов фитопланктона в пробе воды.

Следует отметить, что эти фитопланктонные организмы используются как биоиндикаторы оценки качества воды в широком диапазоне от «очень чистых» водоемов (ксено-сапробная зона с индикаторным весом 0.1), например *Tribonema elegans* до «очень грязных» (поли-мезо-сапробная зона с весом 5.3), например *Allochroematium vinosum*.

## CONCLUSION

Анализ 85 переменных фрагментов белков rbcL индикаторных фитопланктонных организмов из списка В.Сладечека (1973) показал наличие 45 уникальных участков аминокислотных последовательностей белков rbcL для 21 вида фитопланктонных организмов разных зон сапробности водоемов от «очень чистых» до «очень грязных». Эти 45 уникальных участков расположены на поверхности молекул и могут специфически распознаваться антителами с использованием ИФА-метода в одной пробе воды.

Таким образом, по результатам исследования видно, что продукт хлоропластного гена rbcL в качестве маркерного белка может быть использован для идентификации видов фитопланктона в пробе воды.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

## REFERENCES

- [1] Шаров А.Н. (2008) Индикаторная роль фитопланктона в оценке долговременных изменений качества вод больших озер. Водные ресурсы, 35(6): 679-702.
- [2] Frolova LL, Kayumov AR, Husainov AM (2015) Evaluation of the Ecological State Of Water Reservoirs Using the COI Protein of Zooplankton. RJPBCS 6(4): 82-94.
- [3] Frolova LL, Husainov AM (2015) Evaluation of the Water Reservoirs Ecological State Using the COI Protein of Zoobenthos. RJPBCS 6(5): 1636-1649.
- [4] Sladeczek V. (1973) System of water quality from the biological point of view. Arch. Hydrobiol. Ergeb. Limnol 179-191.
- [5] Bakanov AI. The Use of Zoobenthos for Monitoring Freshwater Bodies / Bakanov AI // Quantitative Methods for Ecology and Hydrobiology / Rozenberg GS. – Tolyatti, 2005 – p68.
- [6] Полоскин А., Хаитов В. Полевой определитель пресноводных беспозвоночных – М., 2006. – 16 с.
- [7] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Roy Soc Lond B 270:96– 99; doi: 10.1098/rspb.2003.0025.
- [8] Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar BiolBiotechnol 3:294–299.
- [9] The National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [10] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc Roy Soc Lond B 270:313–321; doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- [11] CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. Proc Natl Acad Sci U S A.106 (31): 12794-12797.
- [12] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology 7:539; doi: 10.1038/msb.2011.75 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
- [13] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M. and Barton G J (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25 (9) 1189-1191; doi: 10.1093/bioinformatics/btp033 (<http://www.jalview.org/>).

[14] Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*; doi: 10.1093/nar/gku340 (<http://swissmodel.expasy.org/>).