

## ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.526.325.2

**ОБНАРУЖЕНИЕ МИКРОЦИСТИНОВ В ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБРАСТАНИЯХ РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ****О.И. Белых<sup>\*</sup>, Г.А. Фёдорова, А.В. Кузьмин,  
И.В. Тихонова, О.А. Тимошкин, Е.Г. Сороковикова***Лимнологический институт СО РАН, Россия,  
664033, г. Иркутск, Улан-Баторская, д. 3  
<sup>\*</sup>e-mail: belykh@lin.irk.ru*

Некоторые виды цианобактерий способны продуцировать токсины, концентрация которых в период цветения воды может достигать величины, опасной для жизни человека и животных. Планктонные цианобактерии являются наиболее распространенными и изученными продуцентами микроцистинов – циклических гептапептидов, вызывающих поражения печени, менее известны микроцистин-синтезирующие бентосные цианобактерии. В озере Байкал в последние годы зарегистрировано массовое развитие бентосных цианобактерий, формирующих обширные обрастания на различных субстратах. В обрастаниях природных и искусственных субстратов, отобранных в прибрежной зоне озера Байкал, в том числе на больных и погибших эндемичных губках *Lubomirskia baicalensis* и *Baikalospongia* spp., выявлены микроцистины, продуцируемые бентосными цианобактериями. С применением микроскопии показано, что в составе обрастаний преобладают ностоковые и осцилляториевые цианобактерии с доминированием *Tolypothrix distorta* – потенциального продуцента микроцистинов. Концентрация микроцистинов в биопленках по данным иммуноферментного анализа составила 29,8–3050 мкг/кг сухого веса. Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF идентифицировано восемь вариантов микроцистинов, из которых наиболее часто встречался вариант [Dha<sup>7</sup>]MC-YR. В биопленках, образованных на искусственном субстрате видом *Phormidium autumnale*, также выявлено присутствие микроцистинов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости регулярного мониторинга потенциально токсичных видов и содержания цианотоксинов в планктоне и бентосе прибрежной зоны озера Байкал, особенно в районах активной туристско-рекреационной деятельности.

**Ключевые слова:** озеро Байкал, цианобактерии, *Tolypothrix distorta*, микроцистины, губки, MALDI-TOF/TOF, иммуноферментный анализ

Цианобактерии (сине-зеленые водоросли) являются постоянным компонентом пресноводных и морских экосистем, они обитают в толще воды, на дне водоемов, на поверхности водных растений и других объектов. В условиях повышенной температуры и освещенности, при избытке биогенов, в отсутствие интенсивного перемешивания цианобактерии в водоемах начинают быстро развиваться, приводя к цветению воды [1–4]. Примерно в 60% случаев цветение вызвано токсичными видами цианобактерий, представляющими серьезную угрозу для здоровья человека и животных [1].

Наиболее распространенными цианотоксинами пресных вод являются микроцистины (microcystins, MC) – циклические пептиды, состоящие из семи аминокислотных остатков. В настоящее время выявлено около 90 вариантов MC, среди них наиболее часто встречаются MC-LR, MC-RR и MC-YR [1, 2]. MC – химически стабильные соединения, они сохраняют свои токсические свойства в воде в течение нескольких недель, устойчивы к нагре-

ванию и расщеплению пищеварительными ферментами. MC обладают выраженным гепатотоксичным действием: ингибируя активность серин-треониновых фосфатаз в печени, вызывают разрушение цитоскелета гепатоцитов [1, 2]. При отравлении MC в высокой концентрации наблюдаются клинические признаки острой интоксикации, в тяжелых случаях – обширные кровоизлияния в печени. Длительное воздействие MC в низких дозах приводит к образованию опухолей. Согласно рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) концентрация MC-LR в питьевой воде не должна превышать 1 мкг/л, а в воде для купания и рекреационного использования – 2–4 мкг/л [1].

Долгое время продуцентами MC считались планктонные цианобактерии, однако в последние годы при исследовании случаев гибели животных нередко их источником оказываются бентосные виды [3]. Первое сообщение об отравлении животных MC из цианобактериальных матов альпийских озер, приведшее к гибели более сотни особей круп-

ного рогатого скота, зарегистрировано в 1994–1995 гг. в Швейцарии [5]. В течение ряда лет в Африке, Северной Америке, Европе, Австралии, Новой Зеландии отмечались множественные отравления диких и домашних птиц в период массового развития бентосных цианобактерий [3].

Для многих водных животных установлена токсичность МС [2]. Известно, что причиной болезни и гибели кораллов вследствие некроза тканей могут быть нитчатые МС-продуцирующие цианобактерии в комплексе с гетеротрофными бактериями [6]. Во время летальных заболеваний морских губок в их телах обнаруживали большое количество нитчатых цианобактерий, однако сведений о присутствии цианотоксинов в них нет [7].

В озере Байкал с 2011 г. наблюдаются крупномасштабные изменения в литоральной зоне, среди которых особое место занимает массовая гибель губок, сопровождаемая интенсивным развитием нитчатых цианобактерий на их поверхности [8]. Доля пораженных эндемичных губок *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), которые до описываемых событий покрывали около 47% поверхности дна озера, составляет от 30% до 100% в отдельных районах озера. “Экологический кризис” на Байкале – крупнейшем озере мира и объекте всемирного природного наследия ЮНЕСКО, содержащем более 80% пресных вод России и около 20% мировых запасов, привлек внимание многих исследователей, однако причины происходящих перемен остаются неизвестными до настоящего времени [8, 9].

Цель настоящей работы – изучить видовой состав цианобактерий в обрастаниях различных субстратов литоральной зоны озера Байкал, определить концентрацию МС с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и идентифицировать их структурные варианты методом масс-спектрометрии.

### Материалы и методы

Пробы отобраны в мае, июле и сентябре 2015 г. в прибрежной зоне Южного Байкала у поселков Листвянка и Большие Коты водолазами-исследователями с глубин 3–15 м. Взяты 14 проб с различных субстратов: № 11, 16–19, 23 – с *Lubomirskia baicalensis*, № 13, 22 – с *Baikalospongia* sp.; № 12, 14, 15, 24 – с камней, № 21 – со скального участка, № 25 – с подводной части деревянного пирса (таблица). Одна проба воды отобрана шприцем у поверхности губки № 11. Обрастания с больных и мертвых губок отбирали вместе с кусочками тел животных. Для микроскопического изучения пробы были зафиксированы 4%-ным формалином, для генетического исследования, ИФА и масс-спектрометрического анализа образцы замораживали.

Видовую идентификацию цианобактерий проводили, используя световой микроскоп Axio Imager (Zeiss, Германия), снабженный ртутной лампой НВО 100W и камерой AxioCam, согласно определителям

[10–12]. Частоту встречаемости видов определяли по шкале Стармаха.

ИФА проводили с помощью набора Abraxis Microcystins-ADDA ELISA (Abraxis LLC, США) согласно протоколу производителя. Результаты обрабатывали с использованием программы RIDA®SOFT Win. Анализ включал два этапа: первый – скрининг проб непосредственно на борту научно-исследовательского судна на наличие МС; второй – определение концентрации МС в лаборатории (предварительно образцы высушивали при температуре +60°C и взвешивали).

Для масс-спектрометрического определения МС сухую биомассу обрастаний дважды экстрагировали 75%-ным метанолом в течение 60 мин при воздействии ультразвука. Полученные экстракты объединяли и упаривали досуха на роторном испарителе при температуре водяной бани  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  и снова растворяли в метаноле [13]. Идентификацию МС выполняли на тандемном времяпролетном масс-спектрометре с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF) (Bruker Daltonics, Германия), используя в качестве матрицы  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов (рабочая длина волны лазера 355 нм). Диапазон регистрируемых масс 500–3500 Да.

### Результаты и обсуждение

**Визуальное наблюдение.** При внешнем осмотре фрагментов трех ветвистых губок *L. baicalensis*, отобранных с глубин 10–15 м, наблюдали ветви с деструктивными изменениями, лишенные характерной зеленой окраски и покрытые сине-зелеными или буро-фиолетовыми кустистыми обрастаниями и коричневыми пленками. При этом у двух губок (№ 11 и 16) выявили очаги поражения красно-коричневого цвета, у одной губки (№ 23) отмечали обширные участки обесцвечивания. Три экземпляра *L. baicalensis* (№ 17–19), отобранные с глубин 3–7 м, отличались разрушенными буро-зелеными ветвями и обрастаниями бурого и темно-зеленого цвета. Две корковые губки *Baikalospongia* sp. со значительными разрушениями тела были, очевидно, погибшими: образец № 13 характеризовался буро-коричневой окраской тела, красно-коричневыми очагами некроза и сходного цвета обрастаниями; образец № 22 был полностью обесцвечен, поверхность покрыта розовым налетом. Пробы с камней и со скалы представлены кустистыми обрастаниями от буро-зеленого до красно-коричневого цвета; образец, взятый с камня (проба № 24), состоял из полушаровидных сине-зеленых колоний; соскоб с поверхности пирса имел вид кожистых пленок темно-зеленого цвета.

**Видовой состав цианобактерий.** Микроскопическое наблюдение показало, что во всех пробах основную биомассу обрастаний составляют цианобактерии. В биопленках выявлено 23 вида цианобактерий, относящихся к порядкам Synechococcales,

Таблица

Видовой состав бентосных цианобактерий в озере Байкал в 2015 г. и относительное обилие видов по шкале Стармаха («-» – отсутствует; «+» – очень редко; 1 – 1–6 экземпляров в препарате; 2 – 7–16 экземпляров; 3 – 17–30 экземпляров; 4 – 31–50 экземпляров; 5 – абсолютное преобладание, более 50 экземпляров)

Порядок. Вид	Станции отбора проб	Пос. Листвянка (51°51.58' N, 104°51.84' E)									Пос. Большие Коты (51°54.29' N, 105°4.47' E)				
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	23	24	25
<b>Synechococcales</b>															
<i>Chamaesiphon fuscus</i> (Rostafinski) Hansgirg		2	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	5	-	-
<i>Heteroleibleinia kuetzingii</i> (Schmidle) Compère		2	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	4	-	-
<i>Leibleinia epiphytica</i> (Hieronymus) Compère		2	2	1	3	3	1	1	-	-	2	-	2	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	+
<i>L. margaritata</i> (Kufferath) Anagnostidis		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher		3	-	4	4	3	2	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>P. mucicola</i> (Naumann et Huber-Pestalozzi) Schwabe		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Synechococcus/Cyanobium</i> spp.		4	4	4	4	4	5	-	-	-	-	5	5	-	-
<b>Chroococcales</b>															
<i>Aphanocapsa parasitica</i> (Kützing) Komárek et Anagnostidis		1	1	2	3	3	2	1	-	5	+	-	+	-	-
<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. minor</i> (Kützing) Nägeli		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. wesenbergii</i> (Komárek) Komárek ex Komárek		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Oscillatoriales</b>															
<i>Kamptonema formosum</i> (Bory ex Gomont) Strunecký, Komárek et J.Smarda		5	2	3	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microcoleus paludosus</i> Gomont		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oscillatoria curviceps</i> C.Agardh ex Gomont		1	1	-	1	1	5	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Phormidium autumnale</i> Gomont		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Symplocastrum</i> sp.		-	-	-	5	5	1	-	-	-	5	-	2	-	-
<i>Tychonema</i> sp.		3	3	2	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nostocales</b>															
<i>Rivularia borealis</i> P. Richter		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tolypothrix distorta</i> Kützing ex Bornet et Flahault		5	5	5	+	2	5	5	5	5	5	-	5	5	-
<i>Calothrix</i> sp.		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Всего видов		13	10	8	9	9	9	3	2	5	8	1	10	1	2

Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales (таблица). Из восьми наиболее часто встречающихся видов цианобактерий пять представлены нитчатыми формами. Обесцвеченная *Baikalospongia* sp. единственная не содержала нитчатых цианобактерий, в розовом налете и поверхностном слое ее тела в массе обнаружены клетки, соответствующие морфотипам родов *Synechococcus* C. Nägeli и *Cyanobium* R. Rippka et G. Cohen-Bazire. По морфологическим признакам виды этих родов весьма сходны и их часто объединяют в совместный кластер пикопланктонных цианобактерий. Пикоцианобактерии, в большом количестве развиваясь в планктоне Байкала (до 3 млн клеток/мл), попадают в тело губки с током воды при фильтрации и составляют значительную часть микробиомов здоровых губок [14]. Вероятно, некоторые представители родов *Synechococcus* и *Cyanobium* также являются симбионтами байкальских губок. У морских губок обнаружен внутриклеточный *Synechococcus spongiarum* Usher, Toze, Fromont, Kuo & Sutton [7], однако близкородственных ему филотипов у байкальских представителей не найдено [14]. К настоящему времени достоверных сведений о продукции токсинов цианобактериями родов *Synechococcus* и *Cyanobium* нет.

Среди порядка Synechococcales к многочисленным в биопленках видам также можно отнести *Chamaesiphon fuscus* и *Leptolyngbya margaritata*. *Ch. fuscus*, как правило, встречался на спикулах в некротизированных участках тела губок, а *L. margaritata* формировала коричневые пленки на поверхности *L. baicalensis*.

Из представителей порядка Chroococcales в большинстве биопленок выявлена *Aphanocapsa parasitica*. Известные продуценты МС – планктонные хроококковые *Microcystis aeruginosa* и *M. wesenbergii* – отмечены в малом количестве и только в двух пробах.

В 72% образцов преобладал *Tolypothrix distorta*, порядок Nostocales (рис. 1, А). Его трихомы синезеленого и красно-коричневого цвета, частью уже отмершие, встречались во всех обрастаниях, кроме обесцвеченной губки и биопленки с пирса. Обрастания, покрывающие камень (проба № 24), представляли собой многочисленные колонии *T. distorta*. Согласно многолетним наблюдениям, *T. distorta* ранее встречался вдоль всего побережья Байкала на камнях и макрофитах преимущественно на глубинах от 1,5 до 6 м, его биомасса в среднем достигала 0,25 г/м<sup>2</sup> [15]. С 2015 г. вид стали отмечать на глубинах 0–1,5 м, в первом растительном поясе, при этом биомасса *T. distorta* увеличилась в сотни раз [8]. В этот период *T. distorta* впервые найден на губках, причины колонизации видом губок и его роль в болезни и последующей гибели эндемичных животных не установлены [9]. На основе данных генетического анализа и масс-спектрометрии высказано предположение о способности *T. distorta* продуцировать паралитические токсины моллюсков, включая самый токсичный вариант – сакситоксин

[9]. Другие виды ностоковых присутствовали на камнях и губках очень редко. Следует отметить, что ранее нитчатые цианобактерии на губках не обнаруживали даже при изучении их метагеномных сообществ [14].

Многочисленным видом в исследованных образцах являлся представитель осцилляториевых – *Symplocastrum* sp. (рис. 1, Б). Его кустистые дерновинки с трихомами буро-коричневого цвета в большом количестве обнаружены на твердых субстратах и, изредка, на ветвистых губках. Другие часто встречающиеся осцилляториевые цианобактерии – *Kamptonema formosum* и *Tychonema* sp. – образовывали красно-коричневые пленки в очагах некроза на поверхности губок (рис. 1, В). Присутствие *Oscillatoria curviceps* зарегистрировано в шести пробах. *Phormidium autumnale* преобладал в биопленках, сформированных на подводной части пирса.

Изучение видового состава цианобактериальных обрастаний озера Байкал показало присутствие видов, известных в других водоемах в качестве продуцентов МС. Прежде всего, это виды *Pseudanabaena mucicola*, *P. galeata*, *K. formosum*; их токсичность установлена методами химического анализа и биотестирования на животных, а в одном случае подтверждена наличием генов, кодирующих синтез МС [2, 16, 17]. Достоверно определена продукция МС в колониях *T. distorta*, отобранных из бен-

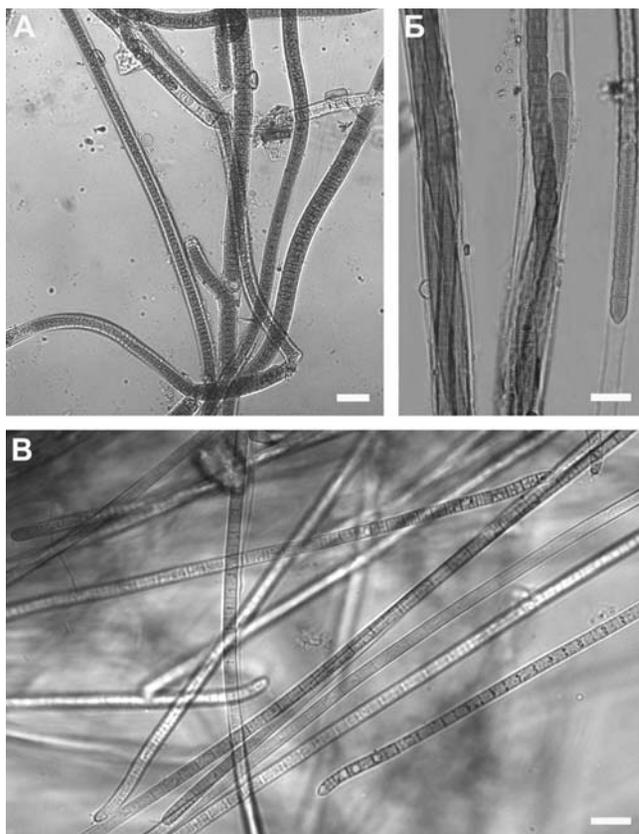


Рисунок 1. Цианобактерии из обрастаний различных субстратов. А – *Tolypothrix distorta*, Б – *Symplocastrum* sp., В – *Tychonema* sp. Масштабная линейка 20 мкм

тосных сообществ реки Аларабэ, Испания [18]. Анализируя родовой состав бентосных цианобактерий озера Байкал, можно отметить, что в других водоемах среди родов *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komárek и *Rivularia* C. Agardh ex Bornet et Flahault найдены МС-продуцирующие виды [3, 16].

**Иммуноферментный и масс-спектрометрический анализ.** Методом ИФА МС выявлены во всех исследованных образцах: в 14 пробах обрастаний (рис. 2) и в воде, взятой в непосредственной близости от ветвистой губки (№ 11). В воде концентрация МС составила 0,1 мкг/л, что в десять раз ниже нормативов ВОЗ для питьевой воды. В биопленках концентрация МС варьировала от 29,8 до 3050 мкг/кг сухого веса. Наибольшее содержание МС выявлено в обрастаниях губок и колониях *T. distorta*. Минимальная концентрация МС отмечена в биопленке, образованной *P. autumnale*: в этой пробе детектировано четыре варианта МС, три из которых в других образцах не обнаружены. Всего в биопленках озера Байкал методом MALDI-TOF идентифицировано восемь вариантов МС (рис. 2). Профили токсинов в исследованных пробах в основном сходны, самым частым вариантом был деметилированный вариант МС-YR – [Dha<sup>7</sup>]МС-YR (замена остатка аминокислоты N-метилдегидроаланин на дегидроаланин), обнаруженный в обрастаниях губок (№ 11, 13) и камней (№ 12, 14), а также в колониях *T. distorta* (№ 24) и пленках из *P. autumnale* (№ 25).

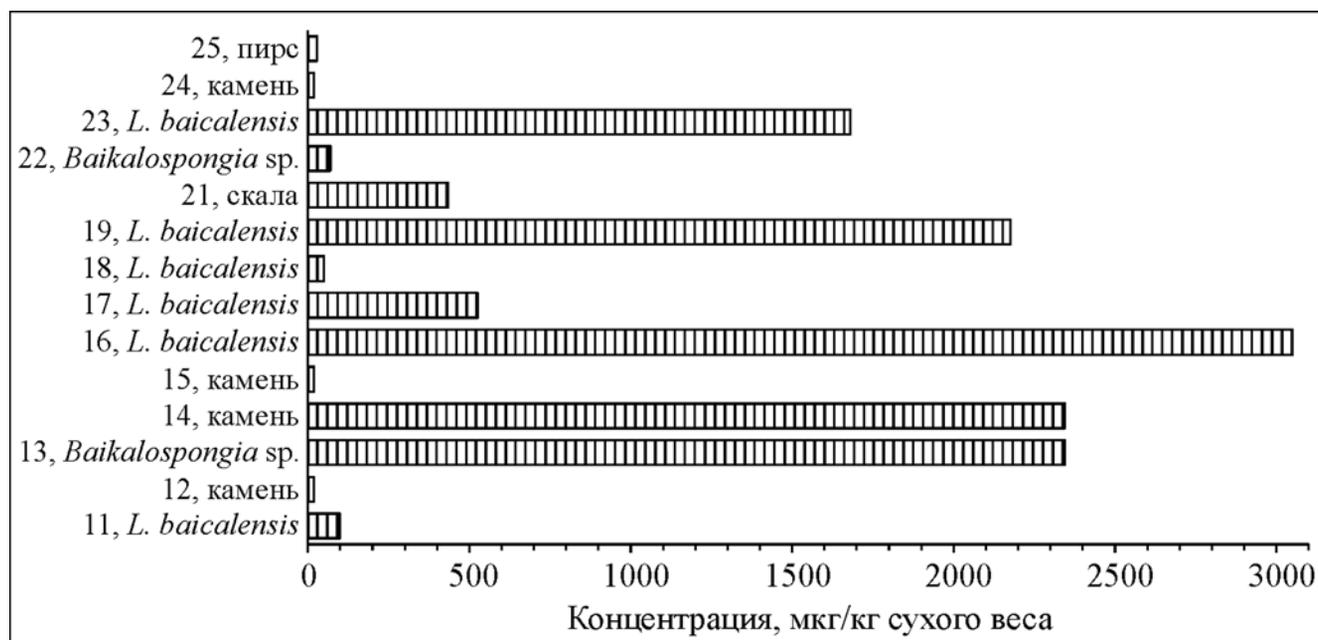
Таким образом, в обрастаниях, развивающихся на различных субстратах в озере Байкал, присутствуют МС-продуцирующие цианобактерии. Принимая во внимание, что практически во всех пробах

наблюдалось абсолютное преобладание *T. distorta*, способного синтезировать МС, скорее всего этот вид и является продуцентом данных токсинов в озере Байкал.

Среди байкальских цианобактерий имеются виды, производящие другие группы токсинов. Для *K. formosum*, *Tychonema bourellyi*, *P. autumnale* показан синтез анатоксинов – нейротоксичных алкалоидов [2, 3, 19, 20]. *P. autumnale* известен как один из самых распространенных продуцентов анатоксинов, в Новой Зеландии он стал причиной многочисленных отравлений и гибели собак [20]. При этом авторы не выявили синтез МС у *P. autumnale*.

Возможная находка в озере Байкал МС-продуцирующего *P. autumnale*, как и *T. distorta*, требует дальнейших исследований, в первую очередь для того, чтобы определить потенциальный риск для человека и животных.

Концентрация МС в биопленках озера Байкал значительно ниже, чем в планктоне цветущих водоемов [1, 2], но сопоставима с таковой в цианобактериальных матах водоемов Антарктиды и Арктики [21–23]. В бентосных пробах самое высокое содержание МС определено в реке Нил (до  $4,1 \cdot 10^6$  мкг/кг сухого веса) [3]. В данной работе было затруднительно оценить реальную угрозу развития токсичных цианобактерий в озере Байкал в связи с отсутствием единых, утвержденных ВОЗ, нормативов для бентосных МС-продуцирующих цианобактерий. В странах, где проводится мониторинг численности потенциально токсичных видов и цианотоксинов, используются региональные нормативы для МС [3]. Вместе с тем, несмотря на низкое содержание МС в обрастаниях и воде



**Рисунок 2.** Концентрация МС в цианобактериальных обрастаниях различных субстратов в озере Байкал. Варианты МС в пробах: 11 – МС-YR, [Dha<sup>7</sup>]МС-YR; 12 – [Dha<sup>7</sup>]МС-YR; 13 – МС-LA, [Dha<sup>7</sup>]МС-YR; 14 – [Dha<sup>7</sup>]МС-YR; 17 – МС-LF; 18 – [L-MeSer<sup>7</sup>]МС-LR; 19 – МС-YR; 24 – [Dha<sup>7</sup>]МС-YR; 25 – [D-Asp<sup>3</sup>,Dha<sup>7</sup>]МС-HtyR, МС-RR, МС-HtyR, [Dha<sup>7</sup>]МС-YR; 15, 16, 21–23 – не идентифицированы

озера Байкал, потенциальная опасность отравления в результате употребления питьевой воды все же существует.

Цианобактериальные сообщества озера Байкал, сходные по видовому составу и содержанию МС с матами полярных регионов, характеризуются уникальным профилем МС. В альгобактериальных матах водоемов Арктики и Антарктики идентифицированы, в основном, варианты МС-RR и МС-LR, продуцентом которых являлся *Nostoc* sp., хотя в арктических пробах в массе встречался и *T. distorta* [21–23]. Варианты МС в Байкале, синтезируемые, вероятно, преобладающим видом *T. distorta*, отличаются от таковых у *T. distorta* из реки в Испании, производящего пять вариантов с доминированием МС-YR [18]. В байкальских пробах превалировал деметилированный вариант [Dha<sup>7</sup>]МС-YR, МС-YR найден только в двух образцах, в которых его концентрация достигала 2178 мкг/кг сухого веса, что сопоставимо с содержанием МС у *T. distorta* из субтропических широт [18]. Количество и состав МС значительно варьируют не только между видами, но и между штаммами одного вида и зависят в первую очередь от абиотических факторов среды [1, 2]. Большое число вариантов МС, около 20, характерно для штаммов *Microcystis aeruginosa*, у бентосных цианобактерий такого разнообразия МС не описано [1–3].

Массовое развитие планктонных токсичных цианобактерий является следствием глобальных процессов изменения климата и эвтрофирования водоемов, как установлено многими исследованиями [1–4]. Вместе с тем, причины увеличения частоты и распространенности цветений воды цианобактериями, как и факторы, влияющие на синтез циатоксинов, до конца не ясны. Нередко бентосные цианобактерии могут создавать высокую биомассу в малопродуктивных водоемах, например, в озерах и реках Швейцарии и Новой Зеландии [3, 5, 20]. Подобное явление наблюдается в последние годы на Байкале, цианобактерии в большом количестве развиваются в озере, достигая значений биомассы характерных для эвтрофных водоемов, однако в настоящий период трофический статус озера соответствует олиготрофному по гидрохимическим показателям [24]. С другой стороны, первые признаки эвтрофирования, выраженные в изменении видового состава водорослей и росте биомассы фитопланктона, отмечали в мелководных участках Байкала еще в 70-е гг. XX века [25]. В 80-е гг. в заливах

впервые зарегистрировано цветение воды, вызванное *Anabaena lemmermannii* P.G. Richter. В 2011–2016 гг. на многих участках прибрежной зоны обнаружено появление несвойственных озеру нитчатых водорослей рода *Spirogyra* Link и найдена высокая концентрация термотолерантных колиформных бактерий – показателей антропогенного загрязнения [8]. Ранее мы сообщали о высокой численности цианобактерий и присутствии токсичных видов в планктоне литорали, отмечая возросшую опасность развития токсичных цветений [9, 13]. Очевидно, биота озера (в большей степени – первичные продуценты) является наиболее чутким индикатором эвтрофирования, которое, в первую очередь начинается в прибрежных участках озера.

Исследователи арктических и антарктических альгобактериальных матов определяют температуру как основной фактор, влияющий на видовой состав цианобактерий и продукцию МС: экспериментально доказано, что с повышением температуры концентрация МС многократно возрастает [22, 23]. Продолжающееся изменение климата, по мнению многих авторов, может привести к увеличению продукции токсинов и появлению токсичных штаммов [1, 22, 23]. На озере Байкал с 1896 г. годовая температура воздуха поднималась со средней скоростью 1,2°C/100 лет. За последние 60 лет постепенно возрастает температура верхних слоев воды в теплое время года [24].

Наличие МС в обрастаниях различных подводных субстратов, включая эндемичные губки и искусственные объекты, свидетельствует о масштабном распространении токсичных цианобактерий в литоральной зоне озера Байкал и потенциальной угрозе для человека и животных. В условиях изменения климата и повышения антропогенного воздействия на экосистему озера, особенно в рекреационных зонах, необходимо проводить регулярный мониторинг токсичных цветений на озере Байкал. Учитывая цитотоксическое действие МС на многих гидробионтов, роль МС в возникновении и развитии болезни эндемичных байкальских губок требует отдельного изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-54-44035), в рамках государственных заданий № 0345-2016-0003 и № 0345-2016-0009 с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Ультрамикроанализ” Лимнологического института.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management / Eds. I. Chorus and J. Bartram. WHO. London: Chapman & Hall, 1999. 416 p.
2. Chorus I. Cyanotoxins – occurrence, causes, consequences. Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag, 2001. 357 p.
3. Quiblier C., Wood S., Echenique-Subiabre I., Heath M., Villeneuve A., Humbert J.-F. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – ecology, toxin

production and risk management // Water Res. 2013. Vol. 47. N 15. P. 5464–5479.

4. Paerl H.W., Otten T.G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls // Microb. Ecol. 2013. Vol. 65. N 4. P. 995–1010.

5. Mez K., Beattie K.A., Codd G.A., Hanselmann K., Hauser B., Naegeli H., Preisig H.R. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on al-

- pine pastures in Switzerland // *Eur. J. Phycol.* 1997. Vol. 32. N 2. P. 111–117.
6. Richardson L.L., Miller A.W., Broderick E., Kaczmar-sky L., Gantar M., Stanic D., Sekar R. Sulfide, microcystin, and the etiology of black band disease // *Dis. Aquat. Organ.* 2009. Vol. 87. N 1–2. P. 79–90.
7. Webster N.S., Thomas T. The sponge hologenome // *MBio.* 2016. Vol. 7. N 2. e00135-16.
8. Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // *J. Great Lakes Res.* 2016. Vol. 42. N 3. P. 487–497.
9. Belykh O.I., Tikhonova I.V., Kuzmin A.V., Sorokovi-kova E.G., Fedorova G.A., Khanaev I.V., Sherbakova T.A., Timoshkin O.A. First detection of benthic cyanobacteria in Lake Baikal producing paralytic shellfish toxins // *Toxicol.* 2016. Vol. 121. P. 36–40.
10. Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota – 1. Teil: Chroococcales // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/1 / Eds. H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig, and D. Mol-lenhauer. Gustav Fischer Verlag, 1999. 548 p.
11. Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota – 2. Teil: Oscillatoriales // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Band 19/2 / Eds. B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner, and M. Schagerl. Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. 759 p.
12. Komárek J. Cyanoprokaryota – 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19/3 / Eds. B. Büdel, G. Gärtner, and L. Krienitz. Springer Spektrum, 2013. 1131 p.
13. Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G., Ti-khonova I.V., Potapov S.A., Fedorova G.A. Microcystin-pro-ducting cyanobacteria in water reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine // *Chem. Sustain. Dev.* 2013. Vol. 21. N 4. P. 347–361.
14. Gladkikh A.S., Kalyuzhnaya O.V., Belykh O.I., Ahn T.S., Parfenova V.V. Analysis of bacterial communities of two Lake Baikal endemic sponge species // *Microbiology.* 2014. Vol. 83. N 6. P. 787–797.
15. Ижболдина Л.А. Атлас и определитель водорос-лей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо-и макро-фиты) с краткими очерками по их экологии. Новоси-бирск: Наука, 2007. 248 с.
16. Pineda-Mendoza R.M., Olvera-Ramírez R., Mar-tínez-Jerónimo F. Microcystins produced by filamentous cy-anobacteria in urban lakes. A case study in Mexico City // *Hidrobiológica.* 2012. Vol. 22. N 3. P. 290–298.
17. Teneva I., Mladenov R., Dzhabazov B. Toxic ef-fects of extracts from *Pseudanabaena galeata* (Cyanopro-karyota) in mice and cell cultures *in vitro* // *Nat. Sci. Hum.* 2009. Vol. 12. P. 237–243.
18. Aboal M., Puig M.Á., Asencio A.D. Production of microcystins in calcareous Mediterranean streams: The Al-harabe River, Segura River basin in south-east Spain // *J. Appl. Phycol.* 2005. Vol. 17. N 3. P. 231–243.
19. Shams S., Capelli C., Cerasino L., Ballot A., Dietrich D.R., Sivonen K., Salmaso N. Anatoxin-a producing *Tychonema* (Cyanobacteria) in European waterbodies // *Water Res.* 2015. Vol. 69. P. 68–79.
20. McAllister T.G., Wood S.A., Hawes I. The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity // *Harmful Algae.* 2016. Vol. 55. P. 282–294.
21. Wood S.A., Mountfort D., Selwood A.I., Holland P.T., Puddick J., Cary S.C. Widespread distribution and identifica-tion of eight novel microcystins in Antarctic cyanobacterial mats // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74. N 23. P. 7243–7251.
22. Kleinteich J., Wood S.A., Puddick J., Schleheck D., Kupper F.C., Dietrich D. Potent toxins in Arctic environ-ments – presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems // *Chem. Biol. Interact.* 2013. Vol. 206. N 2. P. 423–431.
23. Kleinteich J., Wood S.A., Kupper F.C., Camacho A., Quesada A., Frickey T., Dietrich D.R. Temperature-related changes in polar cyanobacterial mat diversity and toxin pro-duction // *Nature Clim. Change.* 2012. Vol. 2. P. 356–360.
24. Shimaraev M.N., Domysheva V.M. Trends in hydro-logical and hydrochemical processes in Lake Baikal under conditions of modern climate change // *Climatic change and global warming of inland waters* / Eds. C. Goldman., M. Kumagai, and R. Robarts. NY: Wiley-Blackwell, 2013. P. 43–66.
25. Popovskaya G.I. Ecological monitoring of phyto-plankton in Lake Baikal // *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 2000. Vol. 3. N 2. P. 215–225.

Поступила в редакцию  
03.06.2017

Принята к печати  
07.09.2017

## ECOLOGY

### MICROCYSTIN-PRODUCING CYANOBACTERIA IN BIOFILMS FROM THE LITTORAL ZONE OF LAKE BAIKAL

O.I. Belykh\*, G.A. Fedorova, A.V. Kuzmin, I.V. Tikhonova, O.A. Timoshkin, E.G. Sorokovikova

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

\*e-mail: belykh@lin.irk.ru

Some species of cyanobacteria synthesize toxins, whose concentration during water bloom can reach values dangerous to human and animal health. Planktonic cyanobacteria are the most common and well-studied producers of microcystins – hepatotoxic cyclic heptapeptides, whereas microcystin-producing benthic cyanobacteria are less known. In recent years, the mass develop-ment of benthic cyanobacteria forming extensive fouling on different substrates has been recorded in the littoral zone of Lake Baikal. We found microcystins produced by benthic cyanobacteria in the biofouling inhabiting different substrates, including diseased and dead endemic sponges

*Lubomirskia baicalensis* and *Baikalospongia* spp., collected from the littoral area of Lake Baikal. Microscopic analysis of the biofouling revealed prevalence of Nostocales and Oscillatoriales cyanobacteria with the dominance of *Tolypothrix distorta* that is likely the main microcystin producer in Lake Baikal. According to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), microcystin concentrations in biofouling were 29.8–3050 µg/kg dry weight. We identified eight microcystin variants using MALDI-TOF/TOF; [Dha7]MC-YR being recorded in most samples. The presence of microcystins in biofilms formed on the surface of the artificial substrate by *Phormidium autumnale* was also recorded. The data obtained show the necessity to monitor potentially toxic species and concentrations of cyanotoxins in plankton and benthos in the littoral zone of Lake Baikal, especially in the regions with intense tourist and recreational activities.

**Keywords:** *Lake Baikal, cyanobacteria, Tolypothrix distorta, microcystins, sponges, MALDI-TOF/TOF, ELISA*

#### Сведения об авторах

*Белых Ольга Ивановна* — канд. биол. наук, доц., зав. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-425-415; e-mail: belykh@lin.irk.ru

*Фёдорова Галина Афанасьевна* — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории хроматографии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-424-770; e-mail: fedorova@lin.irk.ru

*Кузьмин Антон Васильевич* — канд. хим. наук, науч. сотр. лаборатории хроматографии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-424-770; e-mail: kuzmin@lin.irk.ru

*Тихонова Ирина Васильевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-425-415; e-mail: iren@lin.irk.ru

*Тимошкин Олег Анатольевич* — докт. биол. наук, проф., зав. лаборатории биологии водных беспозвоночных Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-428-218; e-mail: tim@lin.irk.ru

*Сороковикова Екатерина Георгиевна* — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН. Тел.: 8-3952-425-415; e-mail: katrin@lin.irk.ru