

Сакситоксин-продуцирующие цианобактерии в озере Байкал

О. И. БЕЛЫХ, А. С. ГЛАДКИХ, Е. Г. СОРОКОВИКОВА, И. В. ТИХОНОВА,
С. А. ПОТАПОВ, Т. В. БУТИНА

Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Статья поступила 28.04.2014

Принята к печати 11.07.2014

АННОТАЦИЯ

Впервые в оз. Байкал в прибрежной зоне около пос. Турка обнаружены цианобактерии, содержащие гены синтеза нейротоксичного сакситоксина. Филогенетический анализ показал, что последовательности гена синтеза сакситоксина принадлежат роду *Anabaena* Borg. Концентрация сакситоксина в воде по данным иммуноферментного анализа составила $1,93 \pm 0,64$ мкг/л. С помощью пиросеквенирования по гену 16S рРНК охарактеризован генетический и таксономический состав бактериального сообщества Среднего Байкала. Установлено, что филум *Cyanobacteria* доминирует в составе летнего бактериопланктона литорали и пелагиали озера, при этом большее видовое разнообразие наблюдается в планктоне литоральной зоны.

Ключевые слова: оз. Байкал, цианобактерии, пиросеквенирование, сакситоксин, *sxtA*-ген, ИФА.

Цианобактерии – фотоавтотрофные прокариоты – играют большую роль в функционировании водных экосистем, они продуцируют органическое вещество, фиксируют атмосферный азот, служат пищевым ресурсом. Цианобактерии синтезируют широкий ряд вторичных метаболитов, среди которых как ценные в биомедицинском отношении соединения, так и токсины, опасные для жизни и здоровья человека и животных [Ibelings, Chorus, 2007; Burch, 2008; Smith et al., 2008]. В настоящий период наиболее известными цианотоксинами являются гепатотоксичные микроцистины (MC) и нейротоксичный сакситоксин (SXT) и его производные [Chorus, Bartram, 1999; Burch, 2008].

Долгое время единственными продуцентами сакситоксина считались морские динофитовые водоросли. В морях широко распространены и давно известны вредоносные “красные приливы” – обширные цветения динофитовых водорослей, более 100 видов которых способны производить сакситоксин и около 57 его аналогов [Wiese et al., 2010]. Эти соединения получили общее название – паралитические токсины моллюсков (paralytic shellfish toxins, PST), так как отравление наступало в результате употребления в пищу моллюсков и сопровождалось параличами [Ibelings, Chorus, 2007; Deeds et al., 2008; Smith et al., 2008; Wiese et al., 2010]. Сакситоксин – триалкил-тетрагидропурин ($C_{10}H_{17}N_7O_7$) –

впервые выделен из моллюска *Saxidomus giganteus* Desh., от которого и получил свое название [Cusick, Sayler, 2013]. SXT и его аналоги попадают в организм моллюсков вместе с токсичными водорослями и накапливаются в органах и тканях, не принося вреда животным. Известно также, что источниками PST являются многие обитатели водной среды, от зоопланктона до рыбы и китов, но наиболее распространенный путь переноса токсинов – это моллюски, фильтрующие планктон, и ракообразные, выедающие водоросли [Doucette et al., 2006].

Цианобактерии, подобно динофитовым, продуцируют ряд PST: сакситоксин, неосакситоксин, гониатоксины, С-токсины, лингбиатоксины, декарбамоиловые производные сакси-, неосакси- и гониатоксинов, дезоксикарбамоиловые производные сакси- и гониатоксинов [Wiese et al., 2010]. PST цианобактерий попадают в организм человека и млекопитающих, как правило, перорально при употреблении питьевой воды или во время купания при случайном заглатывании воды. Описаны случаи проникновения токсинов через эпителий слизистых у купальщиков. В последнее время наблюдается рост количества сообщений об отравлениях PST, содержащихся в пресноводной фауне: двустворчатых и брюхоногих моллюсках, ракообразных, рыбе [Ibelings, Chorus, 2007].

Сакситоксин, являясь селективным блокатором натриевых каналов мембран нервных и мышечных клеток, препятствует проведению электрических импульсов в возбудимых тканях, приводя к параличам и смерти в результате остановки дыхания [Chorus, Bartram, 1999; Ibelings, Chorus, 2007; Deeds et al., 2008; Burch, 2008; Wiese et al., 2010]. При “паралитическом отравлении моллюсками” (paralytic shellfish poisoning, PSP) чаще всего встречается паралитическая форма течения болезни, сопровождаемая, как правило, гастроэнтеральными симптомами, аллергическая форма наблюдается редко.

Синтез SXT у динофитовых водорослей и цианобактерий происходит с помощью модульного мультиферментного комплекса, состоящего из поликетидсинтазы (PKS) и набора ферментов, выполняющих специфические функции. Кластер генов, кодирующий биосинтез сакситоксина (*sxt*-гены), впервые

определен у *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju штамм T3, затем у *Anabaena circinalis* Rabenh. ex Born. et Fl. штамм AWQC131C, *Aphanizomenon* sp. NH-5, *Raphidiopsis brookii* Hill штамм D9 и *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont [Cusick, Sayler, 2013].

SXT – один из наиболее токсичных природных нейротоксинов [Wiese et al., 2010]. ЛД₅₀ сакситоксина для мышей при внутрибрюшинном введении составляет 10 мкг/кг, при венозном – 3,4 мкг/кг [Chorus, Bartram, 1999]. Для SXT в настоящее время не разработано международных стандартов предельно допустимых концентраций в воде, они введены только в отдельных странах, где часто наблюдаются вспышки PSP, например, в Австралии, Бразилии. В моллюсках, предназначенных для употребления в пищу, предельная концентрация SXT по нормативам ЕС составляет 800 мкг/кг веса моллюсков [Chorus, 2012].

В России проблема токсичных цветений не является острой. Однако в последнее время токсичные цианобактерии все чаще выявляют в различных водоемах, в том числе и холодноводных. МС-продуцирующие цианобактерии обнаружены в озерах Байкал, Котокельское, в Братском и Усть-Илимском водохранилищах, в водоемах Украины и Беларуси, Куршском заливе Балтийского моря [Белых и др., 2013; Belykh et al., 2011]. Основными факторами, способствующими массовому развитию цианобактерий и появлению токсичных видов, являются эвтрофирование водоемов и глобальное потепление. Наличие в Байкале хорошо прогреваемых в летнее время заливов и мелководий, а также усиливающаяся антропогенная нагрузка способствуют массовому развитию цианобактерий в прибрежных участках. Таким образом, необходима оценка потенциальной опасности токсичных цветений в крупнейшем водоеме мира, содержащем 20 % мировых запасов поверхностных вод и более 90 % запасов России.

Цель настоящей работы – выявление в оз. Байкал сакситоксина методом иммуноферментного анализа (ИФА) и цианобактерий, содержащих гены синтеза сакситоксина с помощью молекулярно-генетических методов. Для характеристики генетического состава бактериального сообщества применено 454 пиросеквенирования фрагмента гена 16S рРНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Планктонные пробы отобраны в августе 2010 г. в Среднем Байкале на центральной станции разреза м. Ухан – м. Тонкий (52°53,824' с. ш., 107°32,202' в. д., глубина 1562 м) и в прибрежной зоне около пос. Турка в месте впадения р. Турка (52°56,377' с. ш., 108°11,570' в. д., глубина 7 м). Пробы брали батометрами в пелагиали через каждые 5 м от поверхности до глубины 25 м и через каждые 2 м до дна в литорали. Одновременно определяли прозрачность по диску Секки и температуру. Нефиксированные интегральные пробы общим объемом 1 л (равный объем с каждой глубины) сразу после отбора фильтровали через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (“Millipore”, США). Для поиска генов синтеза сакситоксина пробы отбирали с помощью сети Апштейна, изготовленной из мельничного сита с размером ячеек 16 мкм (диаметр входного отверстия 30 см, объем стаканчика 25 мл). Сеть два-три раза буксировали с глубины 5 м до получения концентрированной качественной пробы. Материал фиксировали этиловым спиртом до конечной концентрации 70 %, общий объем зафиксированной пробы не превышал 80–100 мл. Всего для анализа состава бактериального сообщества отобрано по три интегральные пробы в каждой точке, для поиска генов синтеза сакситоксина – по три интегральных и три сетных пробы.

Суммарную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Для поиска генов синтеза сакситоксина использовали праймеры к гену *sxtA*, кодирующему поликетидсинтазу, ответственную за инициацию синтеза сакситоксина. Амплификацию фрагмента *sxtA*-гена ранее успешно применяли для выявления многих видов цианобактерий, продуцирующих сакситоксины в пресных водоемах [Ballot et al., 2010]. В качестве контроля использовали ДНК штамма *Cylindrospermopsis raciborskii* NIES 992. ПЦР, клонирование и секвенирование проводили, как описано ранее [Belykh et al., 2011]. Выравнивание последовательностей, эволюционный и филогенетический анализ производили с помощью пакета программ “Mega” 6.0 [Tamura et al., 2013]. Филогенетические реконструкции выполняли методами ближай-

ших соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML). Для построения филогенетических древ методом NJ эволюционные расстояния подсчитывали с помощью двухпараметрической модели Кимуры. Для ML-анализа оптимальную модель нуклеотидных замен (T92 + I) рассчитывали с помощью программы “Mega” [Tamura et al., 2013]. Степень устойчивости полученных реконструкций оценивали с помощью бутстреп-анализа 1000 реплик. Последовательности *sxtA*-гена байкальских цианобактерий депонированы в GenBank под номерами JF739269–JF739274.

Для анализа состава бактериальных сообществ ДНК из образцов, отобранных в каждой точке, объединяли. Пиросеквенирование произведено компанией ChunLab Inc. (Национальный университет Сеула, Респ. Корея) на приборе Roche/454 Genome Sequencer FLX Titanium. Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали эубактериальные праймеры 9F и 541R. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей (НП) выполняли согласно алгоритму, описанному Парфеновой с соавт. [2013]. Массивы последовательностей, полученные в данной работе, депонированы в NCBI под номером SRR866519.

Наличие SXT в пробах воды определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя набор Abraxis Saxitoxin ELISA (Abraxis LLC, США) согласно инструкции производителя. Нижний предел определения сакситоксинов с помощью данного набора составляет 0,015 мг/л. Обработка результатов производилась с использованием программы RIDA® SOFT Win.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В августе температура воды в пелагиали озера на разрезе м. Ухан – м. Тонкий составляла на поверхности 9,3 °С, на глубине 25 м – 5,9 °С. Прозрачность по диску Секки достигала 6 м. В прибрежной зоне у пос. Турка температура воды на поверхности составляла 14 °С, у дна – 12,8 °С; прозрачность – 3,2 м.

В планктоне прибрежной зоны с помощью пиросеквенирования выявлено 1906 нуклеотидных последовательностей (НП) фрагмен-

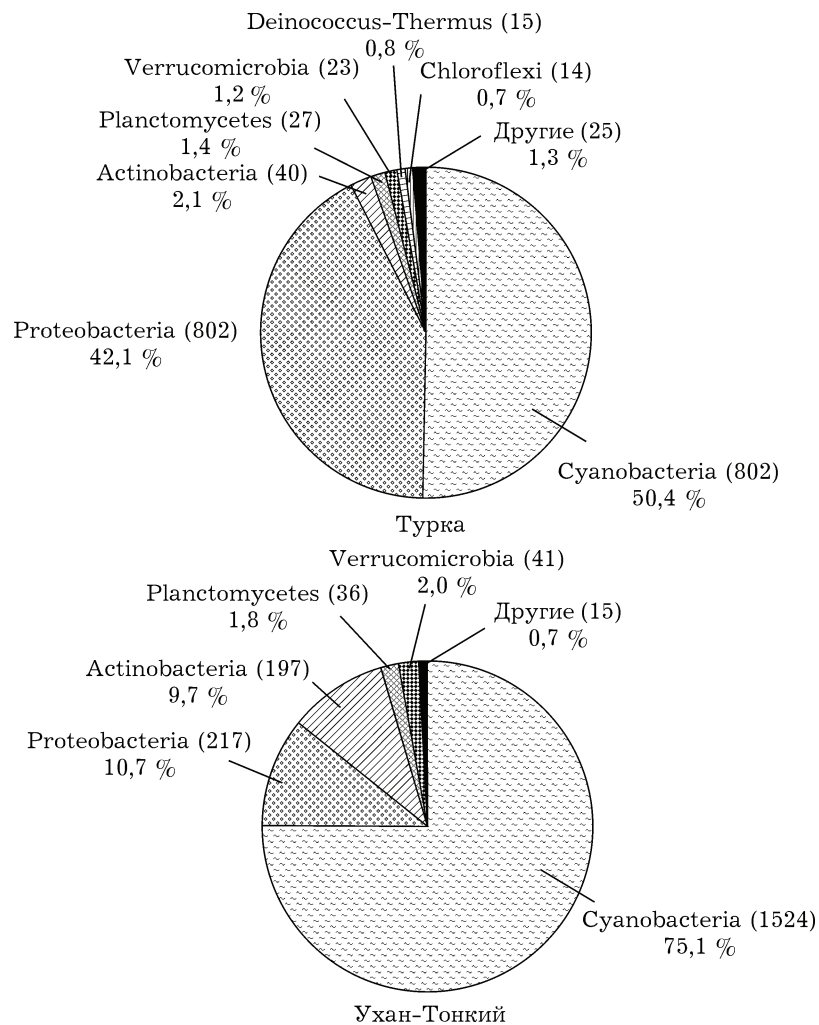


Рис. 1. Метагеномный анализ бактериальных сообществ планктона из прибрежной зоны пос. Турка и станции м. Ухан – м. Тонкий по данным пиросеквенирования последовательностей фрагмента гена 16S рРНК

та гена 16S рРНК, принадлежащих домену Bacteria. Большинство НП отнесены к филумам Cyanobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Deinococcus-Thermus, Chloroflexi, Bacteroidetes, Acidobacteria, Firmicutes и Armatimonadetes. Восемь НП принадлежали фантомным филумам MATCR, BRC1, TDNP, TM7, AD3, OP11 и TM6. Всего выявлен 191 филотип. Видовое богатство (кластерное расстояние 0,03), оцененное с помощью непараметрического критерия Chaol, составляло 370. Основу сообщества формировали риботипы филумов Cyanobacteria и Proteobacteria, составляя соответственно 50 и 42 % от общего числа НП (рис. 1). Цианобактерии представлены порядками Chroococcales и Nostocales. Доминирова-

ли хроококковые пикопланктонные виды родов *Synechococcus* Näg. (729 НП) и *Cyanobium* Rippka et Cohen-Bazire (119 НП), а также род *Cyanobacterium* Rippka et Cohen-Bazire (26 НП) с диаметром клеток немного больше 3 мкм. Среди крупноклеточных видов в прибрежном сообществе на основании более чем 97 % сходства последовательностей гена 16S рРНК определены виды *Anabaena flos-aquae* Breb. ex Born. et Fl., *A. lemmermannii* P. Richt., *A. solitaria* Kleb., *Gloeotrichia echinulata* (J. S. Smith) P. Richt., *Microcystis* sp., *M. aeruginosa* Kütz., *Chamaesiphon* sp., *Phormidium* sp., *Tolypothrix* sp. Необходимо отметить, что в настоящее время планктонные виды с газовыми вакуолями, ранее принадлежащие роду *Anabaena*, выделены в отдельный род *Do-*

lichospermum (Ralfs ex Born. et Fl.) с типовым видом *D. flos-aquae* = *A. flos-aquae*, этот род включает и *D. lemmermannii*, известный как *A. lemmermannii*, и *D. solitarium* = *A. solitaria* [<http://www.cyanodb.cz>]. В данной работе мы придерживаемся систематики согласно М. М. Голлербаху с соавт. [1953]. В базе данных GenBank также используется традиционная таксономия, и НП рода *Dolichospermum* зарегистрированы как *Anabaena*.

В образцах планктона пелагиали Среднего Байкала обнаружено 2030 НП 16S рНК, принадлежащих домену Bacteria. Сообщество представлено в основном филумами Cyanobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Verucomicrobia и Planctomycetes. Минорными филумами, состоящими из единичных НП, были Bacteroidetes, Thermobaculum_p, Armatimonadetes, Acidobacteria, TM7 и GN02. Цианобактерии составляли более 75 % бактериального сообщества, Proteobacteria и Actinobacteria – 11 и 10 % соответственно. Показатели видового разнообразия бактериопланктона в пелагиали и литорали оказались сходными: в пелагических образцах выявлено 198 филотипов, коэффициент Chao1 составлял 405. Доминирующий филотип в пелагиали – *Synechococcus* sp. (1346 НП, 66,3 %). В составе филума Cyanobacteria помимо *Synechococcus* sp. обнаружили НП, принадлежащие родам *Cyanobium* и *Cyanobacterium*. В отличие от прибрежного района последовательности порядка Nostocales в пелагиали не найдены, как и другие нанопланктонные цианобактерии.

В ПЦР с использованием в качестве матрицы суммарной ДНК из проб фитопланктона и праймеров к *sxtA*-гену получен положительный ответ в пробах, отобранных в литорали и отрицательный ответ в образцах с глубоководной станции. Длина фрагментов *sxtA*-гена составила 555 нуклеотидов. Тридцать клонов, полученных из положительных проб, представляли шесть различных генотипов. Полученные НП имели более 99 % сходства с таковыми *Anabaena* (*Dolichospermum*), *Anabaenopsis* (Woloszyńska) Miller и *Arhanizomenon* Morron из озер Германии, Франции, Испании и Австралии. На филогенетическом древе НП из оз. Байкал формировали обособленный кластер с бутстреп-поддержкой выше 53 % из-за наличия двух си-

нонимичных замен (173 позиция А вместо G, 422 позиция С вместо G), нехарактерных для других близкородственных последовательностей, имеющих в GenBank (рис. 2).

Концентрация сакситоксина, измеренная с помощью ИФА, в заливе Турка составила 1,92 мкг/л ($\pm 0,15$), на глубоководной станции сакситоксин не обнаружен.

В ходе исследования изучены два различных по морфометрии, гидрохимическому и гидрофизическому режиму участка оз. Байкал: глубоководный пелагический и прибрежный, где большое влияние оказывает р. Турка – четвертый по водности приток Байкала [Многолетние данные..., 1986]. В приустьевых зонах рек по сравнению с пелагиалью озера отмечаются более высокие показатели концентрации биогенов, численности и биомассы фитопланктона согласно многолетним данным [Белых и др., 2007].

В районе пос. Турка с 2010 г. ведется интенсивное строительство туристических объектов, порта и других сооружений в рамках развития туристско-рекреационной зоны “Байкальская гавань”, которая в будущем станет одним из основных центров туризма и первым современным портом на восточном побережье оз. Байкал.

В планктоне литоральной зоны у пос. Турка выявлены цианобактерии, содержащие *sxtA*-гены и способные синтезировать сакситоксин, содержание которого в воде составило 1,92 мкг/л. В пелагиали озера сакситоксин-продуцирующие цианобактерии не обнаружены.

Согласно результатам 454 пиросеквенирования в августе в оз. Байкал как в литорали, так и в пелагиали доминировали представители филумов Cyanobacteria и Proteobacteria. Для сравнения, в июне бактериопланктон литорали Южного Байкала представлялся филумами Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria [Парфенова и др., 2013].

Видовой состав цианобактерий беден в отличие от высокого генетического разнообразия. Так, на глубоководной станции м. Ухан – м. Тонкий выявлены несколько видов порядка Chroococcales. Как известно, в августе в пелагиали массово развиваются пикопланктонные цианобактерии родов *Synechococcus*, *Synechocystis* и *Cyanobium* с размером кле-

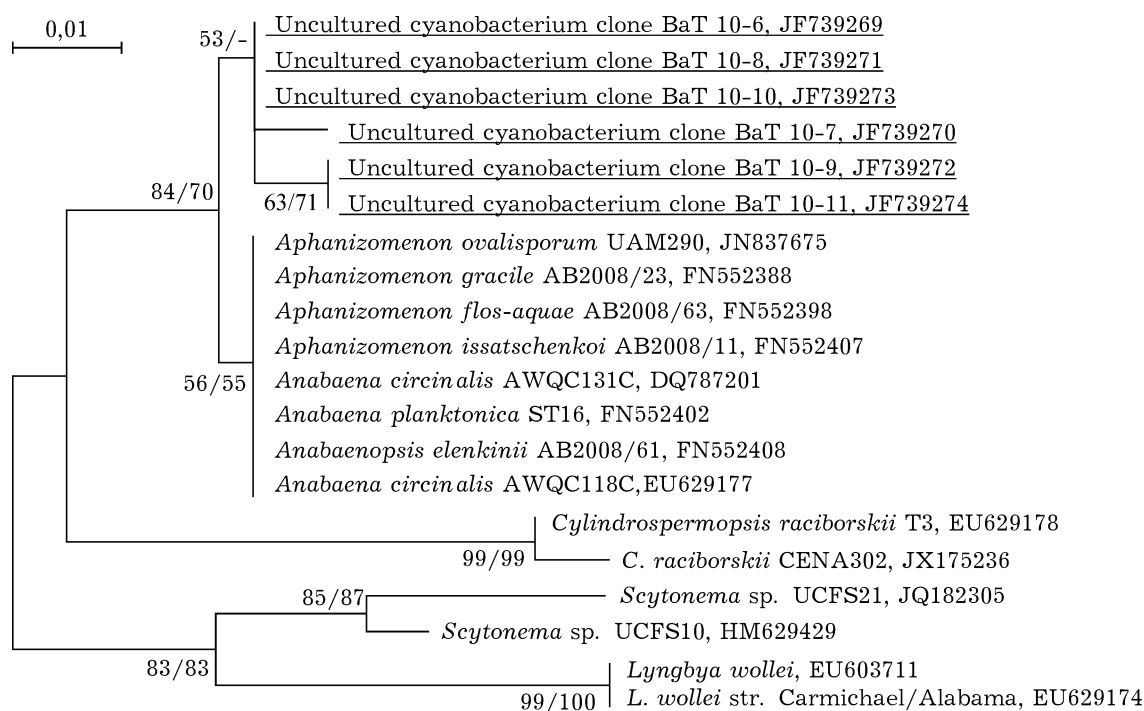


Рис. 2. Филогенетическое древо цианобактерий, основанное на результатах анализа фрагмента *sxtA*-гена длиной 555 нуклеотидов, построенное методом максимального правдоподобия (ML). Цифрами в узлах ветвления обозначены результаты бутстреп-анализа (достоверность >50 %) ветвления двумя методами (NJ/ML). Последовательности *sxtA*-гена, полученные в данной работе, подчеркнуты

ток менее 2 мкм, их численность в высокопродуктивные годы составляла 3 млн кл./мл [Belykh, Sorokovikova, 2003], вклад в общую биомассу фитопланктона достигал 71 % [Белых и др., 2007]. По данным метагеномного анализа в пелагиали 100 % генотипов цианобактерий представлены родами *Synechococcus* и *Cyanobium* (гомология с ближайшими родственниками 99 % и выше). В литоральной зоне вклад пикоцианобактерий снижался (90 %), присутствовали генотипы крупноклеточных цианобактерий, включая *A. lemmermannii* – потенциального продуцента сакситоксина, на долю которой приходилось 2,9 % от общего количества НП.

Метагеномный подход для оценки бактериального сообщества в цветущих водоемах применяется пока довольно редко. Наши данные сходны с результатами исследования озер Эри и Сент-Мэрис. В этих озерах, как и в литорали Байкала, цианобактерии преобладали в составе сообществ во время цветения токсин-продуцирующих видов (77–88 %), а протеобактерии были вторым по численности доминирующим филумом, пред-

ставляя вместе с *Cyanobacteria* более 90 % сообщества. До 70 % НП, полученных из озер Сев. Америки, также принадлежали пикопланктонным видам [Steffen et al., 2012].

Основываясь на данных пиросеквенирования и прямого секвенирования можно предположить, что НП *sxtA*-гена, выявленные в литоральной зоне оз. Байкал, принадлежат роду *Anabaena*. Согласно результатам пиросеквенирования последовательности других родов – продуцентов SXT – не обнаружены в микробиоме. На сегодняшний день в базе данных GenBank имеются НП *sxtA*-гена только двух видов *Anabaena*: *A. circinalis* и *A. planktonica* (Brunnthaler) Wacklin, которые группируются на филогенетическом древе с *Aphanizomenon* spp. и *Anabaenopsis elenkinii* Miller (*A. circinalis* AWQC ANA-311F, ошибочно зарегистрированная как *A. flos-aquae*). Филогенетические отношения между этими родами по гену *sxtA* не разрешены, как и по гену 16S рРНК. Показано, что морфологически хорошо различимые рода *Anabaena* и *Aphanizomenon* полифилетичны и кластеризуются вместе на дендрограммах, основан-

ных на определении последовательностей гена 16S рРНК [Rajaniemi et al., 2005].

Принимая во внимание литературные данные и результаты иммуноферментного анализа, наиболее вероятным продуцентом сакситоксина в планктоне прибрежной зоны оз. Байкал в 2010 г. являлась *A. lemmermannii*. Это распространенный вид в пресных водоемах, особенно часто встречается в умеренных широтах северного полушария, хотя обнаруживается также в Австралии и Новой Зеландии [<http://www.algaebase.org>]. В оз. Байкал *A. lemmermannii* развивается во всех участках озера с июня по сентябрь, достигая наибольшей численности (до 1–10 млн кл./л) в сорах и заливах [Поповская, Белых, 2002]. Вид доминирует в фитопланктоне многих скандинавских озер различного трофического статуса – от олиготрофных до гиперэвтрофных [Rapala et al., 2005; Lepisto et al., 2005]. В озерах Финляндии и Дании присутствие SXT связывали с *A. lemmermannii*, так как фитопланктон в положительных пробах на 95–100 % состоял из этого вида [Rapala et al., 2005; Lepisto et al., 2005]. Цветение *A. lemmermannii* в скандинавских озерах оказалось одним из самых высокотоксичных среди зарегистрированных случаев, концентрация SXT в воде по данным жидкостной хроматографии согласовывалась с таковой в культуре изолированных штаммов [Rapala et al., 2005]. У детей после купания в озерах с высоким содержанием SXT наблюдали клинические симптомы отравления. В оз. Байкал концентрация SXT значительно ниже минимальных значений, выявленных в озерах Финляндии (30 мкг/л). Следует отметить, что до наших исследований сакситоксин-продуцирующая *A. lemmermannii* выявлена только в скандинавских озерах. Кроме того, эти озера оказались первыми из холодноводных, где обнаружили SXT, при этом его максимальные концентрации (1070 мкг/л) зарегистрированы в олиготрофном озере [Rapala et al., 2005]. Недавно появились сведения о присутствии в арктических водоемах сакситоксина и *sxtA*-генов, вероятно, принадлежащих *Lyngbya wollei* и *Scytonema* sp. [Kleinteich et al., 2013]. Концентрация SXT по результатам ИФА была низкой, как и численность сакситоксин-продуцирующих видов.

Ранее PST чаще всего обнаруживали в эвтрофных озерах, расположенных, как правило, в тропических и субтропических широтах [Chorus, Bartram, 1999]. SXT и его аналоги выявлены во многих водоемах Австралии, Бразилии, США, Мексики, Португалии, Италии, Германии, Китая [Chorus, Bartram, 1999; Burch, 2008; Wiese et al., 2010]. Некоторые виды цианобактерий отличаются значительным разнообразием синтезируемых вариантов PST, среди них *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei* [Wiese et al., 2010]. *A. lemmermannii* известна как продуцент только SXT, других вариантов PST во время цветения этого вида в воде не обнаружено [Rapala et al., 2005]. SXT, наряду с другими его аналогами, продуцируют виды *Anabaena circinalis*, *Aph. flos-aquae*, *Aph. gracile* Lemm., *Aph. issatschenkoi* (Usacev) Proshkina-Lavrenko, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix* sp., *Raphidiopsis brookii*, *Scytonema crispum* (Ag.) Born.

Необходимо отметить, что набор, использованный для определения сакситоксина, допускает 0,6–29 % перекрестную реактивность с аналогами сакситоксина: dcSXT, neoSXT, GTX и декарбамоиловыми вариантами GTX, поэтому в байкальских пробах могли присутствовать вышеназванные PST. Однако если продуцентом PSP в Байкале является *A. lemmermannii*, то возможно, что в воде содержался только сакситоксин.

Опубликовано сравнительно немного данных о содержании сакситоксина в водоемах разных стран, в основном они касаются внутриклеточной концентрации SXT на сухой вес фитопланктона и изолированных культур. Более низкая, чем в воде оз. Байкал, концентрация SXT выявлена в водоемах Новой Зеландии при цветении *Anabaena* spp. методом ИФА, в Бразилии – с помощью жидкостной хроматографии. Более высокое по сравнению с оз. Байкал содержание PST определено во время массового развития видов *Aphanizomenon* в реках и озерах Испании и небольшом водоеме около г. Париж, используя масс-спектрометрию и анализ на клетках нейробластомы [Chorus, 2012].

Концентрация сакситоксина в Байкале ниже пороговой для питьевой воды и рекре-

ационных вод. В странах, где токсичные цветения широко распространены и представляют значительную угрозу для здоровья населения, введены национальные нормативы. В Новой Зеландии, Австралии и Бразилии ПДК для сакситоксина в питьевой воде составляет 3 мкг/л [Chorus, 2012]. Эта концентрация токсина наблюдается, когда численность *A. circinalis* – основного возбудителя токсичных цветений и продуцента SXT – достигает 20 млн кл./л. Предварительно установленный предел безопасного рекреационного использования воды для купания и случайного проглатывания составляет 75 мкг/л [Chorus, 2012].

В настоящее время токсичные цветения цианобактерий являются обычным явлением в большинстве озер умеренных широт [Chorus, Bartram, 1999; Rapala et al., 2005; Ibelings, Chorus, 2007; Burch, 2008]. На рост и развитие цианобактерий влияет комплекс климатических, гидрологических и гидрохимических факторов, среди которых содержание биогенов, температура, стратификация вод имеют наибольшее значение [Chorus, Bartram, 1999]. Относительно возникновения SXT-продуцирующих цветений цианобактерий, подобная точка зрения подтверждается многочисленными фактами выявления новых очагов по всему миру.

Как известно, глобальная температура в среднем повысилась на 0,8 °C в период с 1889 по 1990 г. Многолетние исследования показали, что на оз. Байкал также происходят изменения климата. В последние десятилетия на Байкале наблюдается тренд повышения температуры воздуха и воды. Так, за период наблюдений с 1896 г. годовая температура увеличивалась со средней скоростью 1,2 °C/100 лет. За последние 60 лет постепенно возрастает температура верхних слоев воды в теплое время года [Shimaraev, Domysheva, 2013]. В настоящее время в связи с развитием туристического бизнеса на озере усиливается антропогенная нагрузка, что неизбежно приводит к эвтрофированию мелководных заливов и прибрежных участков.

Настоящее исследование продемонстрировало, что в прибрежных хорошо прогреваемых участках оз. Байкал развиваются виды цианобактерий, продуцирующие токсины. Увеличение потока отдыхающих, загрязне-

ние воды биогенными элементами могут ухудшить ситуацию с токсичными цветениями в оз. Байкал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены данные о присутствии в оз. Байкал сакситоксина и наличии генотипов цианобактерий, содержащих гены синтеза сакситоксина. Учитывая все имеющиеся предпосылки развития токсичных цветений в мелководных участках озера, которые являются зонами туризма и рекреации, необходимо продолжать мониторинг с целью своевременного выявления очагов потенциальной опасности.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы VI.55.1.3. “Структура, динамика формирования и метаболический потенциал сообщества микроорганизмов и фагов в биопленках пресноводных водоемов”, при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ 09-04-90420 Укр_ф_а, 10-04-01613а, 12-04-90012 Бел_а, 12-04-31672 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

- Белых О. И., Гладких А. С., Сороковикова Е. Г., Тихонова И. В., Потапов С. А., Федорова Г. А. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины // Химия в интересах устойчивого развития. 2013. Т. 21. С. 363–378.
- Белых О. И., Помазкина Г. В., Тихонова И. В., Томберг И. В. Характеристика летнего фитопланктона и автотрофного пикопланктона озера Байкал в 2005 г. // Альгология. 2007. Т. 17. С. 380–396.
- Голлербах М. М., Косинская Е. К., Полянский В. И. Определитель пресноводных водорослей СССР. М.: Сов. наука, 1953. Т. 2. 652 с.
- Многолетние данные о режиме и ресурсах поверхностных вод суши. Л.: Гидрометиздат, 1986. Т. 1, вып. 14. 363 с.
- Парфенова В. В., Гладких А. С., Белых О. И. Сравнительный анализ биоразнообразия бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 94–105 [Parfenova V. V., Gladkikh A. S., Belykh O. I. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal // Microbiology. 2013. Vol. 82, N 1. P. 91–101].
- Поповская Г. И., Белых О. И. Массовые, эндемичные и индикаторные виды планктонных водорослей озера Байкал. Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2002.
- Ballot A., Fastner J., Wiedner C. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76. P. 1173–1180.
- Belykh O. I., Sorokovikova E. G. Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: abundance, dynamics, and distri-

- bution // *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 2003. Vol. 3. P. 251–261.
- Belykh O. I., Sorokovikova E. G., Fedorova G. A., Kaluzhnaya O. V., Korneva E. S., Sakirko M. V., Sherbakova T. A. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region) // *Hydrobiologia*. 2011. Vol. 671. P. 241–252.
- Burch M. D. Effective doses, guidelines and regulations // *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs* / ed. H. K. Hudnell. 2008. Chapter 36. 950 p. http://www.epa.gov/cyano_habs_symposium/monograph/Ch36.pdf
- Chorus I. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Ed. 2012. 63 Dessau-Roßlau, December 2012. <http://www.uba.de/uba-info-medien-e/4390.html>. 147 p.
- Chorus I., Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: E&FNSpon, 1999.
- Cusick K., Sayler G. Overview on the Marine Neurotoxin, Saxitoxin: Genetics, Molecular Targets, Methods of Detection and Ecological Functions // *Mar. Drugs*. 2013. Vol. 11. P. 991–1018.
- Deeds J. R., Landsberg J. H., Etheridge S. M., Pitcher G. C., Longan S. W. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning // *Ibid.* 2008. Vol. 6. P. 308–348.
- Doucette G. J., Cembella A. D., Martin J. L., Michaud J., Cole T. V. N., Rolland R. M. PSP toxins in North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) and their zooplankton prey in the Bay of Fundy, Canada // *Mar. Ecol. Progress Series*. 2006. Vol. 306. P. 303–313.
- Ibelings B. W., Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review // *Environ. Pollut.* 2007. Vol. 150. P. 177–192.
- Kleinteich J., Wood S. A., Puddick J., Schleheck D., Küpper F. C., Dietrich D. Potent toxins in Arctic environments – presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems // *Chem. Biol. Interact.* 2013. Vol. 206. P. 423–431.
- Lepisto L., Rapala, J., Lyra C., Berg K. A., Erkomaa K., Issakainen J. Occurrence and toxicity of cyanobacterial blooms dominated by *Anabaena lemmermannii* P. Richter and *Aphanizomenon* spp. in boreal lakes in 2003 // *Algol. Stud.* 2005. Vol. 117. P. 315–328.
- Rajaniemi P., Komarek J., Willame R., Hrouzek P., Kastovska K., Hoffmann L., Sivonen K. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains // *Arch. für Hydrobiol. Suppl.* 2005. Vol. 159. P. 371–391.
- Rapala, J., Robertson A., Negri A. P., Berg, K. A., Tuomi P., Lyra C., Erkomaa K., Lahti K., Hoppu K., Lepisto L. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health // *Environ. Toxicol.* 2005. Vol. 20. P. 331–340.
- Shimaraev M. N., Domysheva V. M. Trends in hydrological and hydrochemical processes in Lake Baikal under conditions of modern climate change // *Climatic change and global warming of inland waters. Impacts and Mitigation for ecosystems and societies* / eds. C. Goldman, M. Kumagai, R. D. Robarts. Wiley-Blackwell, 2013. P. 43–66.
- Smith J. L., Boyer G. L., Zimba P. V. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture // *Aquaculture*. 2008. Vol. 280. P. 5–20.
- Steffen M. M., Li Z., Effler T. C., Hauser L. J., Boyer G. L., Wilhelm S. W. Comparative metagenomics of toxic freshwater cyanobacteria bloom communities on two continents // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, N 8. e44002. doi:10.1371/journal.pone.0044002.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipki A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.
- Wiese M., D’Agostino P. M., Mihali T. K., Moffitt M. C., Neilan B. A. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs // *Mar. Drugs*. 2010. Vol. 8. P. 2185–2211.

Saxitoxin-Producing Cyanobacteria in Lake Baikal

O. I. BELYKH, A. S. GLADKIKH, E. G. SOROKOVIKOVA, I. V. TIKHONOVA,
S. A. POTAPOV, T. V. BUTINA

Limnological Institute SB RAS
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Cyanobacteria containing neurotoxic saxitoxin synthesis genes were found in the coastal zone of Lake Baikal near the village Turka for the first time. Phylogenetic analysis showed that the sequences of saxitoxin synthesis genes belong to the genus *Anabaena* Bory. Saxitoxin concentration in the water according to ELISA was 1.93 ± 0.64 mg/l. Genetic and taxonomic composition of the bacterial community of the Central part (basin) of Lake Baikal was characterized using 16S rRNA gene pyrosequencing. It was established that phylum Cyanobacteria dominated in the composition of summer bacterioplankton in both littoral and pelagic zones of the lake, but higher species diversity was noted in the plankton of littoral zone.

Key words: Lake Baikal, cyanobacteria, pyrosequencing, saxitoxin, *sxtA*-gene, ELISA.