

Лимнологическая характеристика и первые данные о встречаемости токсигенных цианобактерий и цианотоксинов в планктоне некоторых озер криолитозоны (Якутия, Россия)

В. А. ГАБЫШЕВ¹, С. И. СИДЕЛЕВ^{2, 3}, Е. Н. ЧЕРНОВА⁴, О. И. ГАБЫШЕВА¹, И. В. ВОРОНОВ¹, З. А. ЖАКОВСКАЯ⁴

¹Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН –
обособленное подразделение ФИЦ “Якутский научный центр СО РАН”
677980, Якутск, просп. Ленина, 41
E-mail: v. a.gabyшев@yandex.ru

²Ярославский государственный университет
150057, Ярославль, проезд Матросова, 9
E-mail: Sidelev@mail.ru

³Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
152742, Ярославская обл., пос. Борок

⁴ФГБУН «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр
Российской академии наук» (СПб ФИЦ РАН), Санкт-Петербургский
научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук
197110, Санкт-Петербург, ул. Корпусная, 18
E-mail: s3561389@yandex.ru

Статья поступила 11.05.2022

После доработки 18.10.2022

Принята к печати 03.11.2022

АННОТАЦИЯ

В исследовании получены первые данные о распространении токсинов цианобактерий и впервые проведена молекулярно-генетическая детекция продуцентов цианотоксинов в планктоне некоторых озер криолитозоны на территории Якутии. Большинство озер характеризовалось высокими концентрациями азота, фосфора, хлорофилла *a* и повышенным содержанием органического вещества, что могло быть связано с высокой антропогенной нагрузкой. В летний период визуально наблюдалось цветение воды в трех из шести обследованных озер. Численность и биомасса цианобактерий в озерах варьировались в пределах 13,7–676,3 млн кл./л и 0,6–4,8 мг/л соответственно. В фитопланктоне с помощью световой микроскопии обнаружено восемь видов потенциально токсигенных цианобактерий. В образцах ДНК, выделенной из планктонных проб, методом полимеразной цепной реакции амплифицированы участки гена *tsuE*, ответственного за биосинтез микроцистиновых цианотоксинов. В исследуемый период в озерах не были обнаружены цианобактерии, способные продуцировать нейротоксический анатоксин-а, сакситоксины и гепатотоксические нодулярины. С использованием родоспецифических праймеров к гену

© Габышев В. А., Сиделев С. И., Чернова Е. Н., Габышева О. И., Воронов И. В., Жаковская З. А., 2023

msyE установлено, что в большинстве озер основными продуцентами микроцистинов были виды рода *Microcystis*, и только в одном из озер (оз. Ытык-Кель) – виды *Dolichospermum*. Методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии в озерном планктоне идентифицировано до восьми структурных вариантов микроцистинов, в основном аргинин-содержащих изоформ MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LY, MC-HIR, [Asp³]MC-LR, [Asp³]MC-RR, [Asp³]MC-YR. Максимальная концентрация микроцистинов в планктоне (внутриклеточная фракция, 803 нг/л) отмечена в пробе из оз. Ытык-Кель. Рассчитанное удельное содержание микроцистинов в единице биомассы цианобактерий-продуцентов (квота токсина) было низким (0,005–0,069 мкг/мг). Для оценки потенциальной опасности токсигенных цианобактерий здоровью людей необходимо дальнейшее изучение распространения цианотоксинов и их продуцентов в водоемах региона.

Ключевые слова: токсигенные цианобактерии, цианотоксины, микроцистины, планктон, озера, криолитозона.

ВВЕДЕНИЕ

Вредоносное цианобактериальное цветение воды (cyanoHAB, cyanobacterial Harmful Algae Blooms), распространенное во всем мире, приводит к серьезным негативным экологическим и экономическим последствиям [Sivonen, Jones, 1999; Chorus, Welker, 2021]. Под этим термином понимается массовое размножение цианобактерий в водоеме, вызывающее видимое изменение окраски воды [Huisman et al., 2018]. Известно, что цианобактерии продуцируют высокотоксичные метаболиты – цианотоксины, которые могут вызывать неблагоприятные последствия для здоровья людей, домашних животных, а также наземных и водных организмов, вплоть до их гибели. Цианобактерии способны синтезировать гепатотоксичные нодулярины (NOD), нейротоксины анатоксин-а (AN-a) и сакситоксины (SXT) [van Apeldoorn et al., 2007]. Среди цианобактериальных токсинов в пресноводных экосистемах наиболее распространены гепатотоксичные микроцистины (MC), представленные более чем 250 вариантами структур [Meriluoto et al., 2017] и обладающие различной степенью токсичности [Rinehart et al., 1994]. MC относятся к классу циклических олигопептидов. Общая структура MC содержит цикл из семи аминокислот, пять из которых постоянны в составе соединений этого класса, включая характеристическую Adda-кислоту (3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота), а две L-аминокислоты в положениях 2 и 4 – переменны. Общепринятые аббревиатуры переменных аминокислот указываются в качестве суффикса в названии MC. Так, в структуре наиболее токсичного варианта MC-LR (молекулярная масса 994) присутствуют лейцин (Leu = L) в положении 2 и аргинин (Arg = R) в положении 4 [Botana, 2008].

Хотя цианобактерии колонизируют удивительно широкий диапазон местообитаний и встречаются в очень суровых температурных условиях [Paerl, Paul, 2012; Huisman et al., 2018], почти все современные знания о распространении цианотоксинов ограничены пресными водами умеренных и тропических широт из-за частого массового размножения цианобактерий в этих водоемах [Svirčev et al., 2019]. Однако в последние годы появились работы, показывающие присутствие цианотоксинов в водоемах северных и полярных регионов [Kleinteich et al., 2013, 2014; Смирнова и др., 2021; Denisov et al., 2021].

В условиях криолитозоны водоемы характеризуются коротким безледным периодом [Ресурсы..., 1970], что ограничивает продолжительность развития фитопланктона и токсигенных цианобактерий [Magnuson et al., 2000]. Так, на озерах, расположенных в черте Якутска и его окрестностей – города на северо-востоке России, лед отсутствует всего 120–125 дней [Аржакова и др., 2007]. Однако в последние десятилетия в связи с глобальными климатическими изменениями отмечались сдвиги в сроках льдообразования на северных водоемах. Так, увеличение продолжительности безледного периода на различных водных объектах Азиатской России с 1980 по 2014 г. составило в среднем от 4,63 до 11 суток за десятилетие [Vuglinsky, Valatin, 2018]. Прогноз на ближайшие десятилетия подтверждает сохранение этой тенденции [Field et al., 2014]. Ряд авторов уже сейчас отмечают массовое развитие водорослей в планктоне водоемов Фенноскандии, объясняя это явление положительными температурными аномалиями последних десятилетий [Денисов, Кашулин, 2016]. В водоемах Кольского п-ова начиная с 2000 г. отмечались ежегодные локальные явления массового развития цианобактерий, приводящие

к цветению воды. Кроме риска усиления массового развития фитопланктона, изменение климатических параметров может влиять на структуру водорослевых сообществ водоемов криолитозоны [Winder, Sommer, 2012]. Как глобальные климатические изменения, так и нарастающий антропогенный пресс могут привести к изменениям состава сообществ фитопланктона в озерах криолитозоны, увеличению биомассы цианобактерий и повышению риска накопления в воде и гидробионтах их токсичных метаболитов.

Исследования распространения токсичных цианометаболитов в приполярных и полярных регионах до недавнего времени затрагивали только бентосные цианобактерии, а также виды, образующие так называемые маты и биопленки [Hitzfeld et al., 2000; Jungblut et al., 2006; Wood et al., 2008; Kleinteich et al., 2012, 2013; Chrapusta et al., 2015]. Первая работа, посвященная определению концентраций МС в планктоне некоторых полярных озер, опубликована недавно [Trout-Haney et al., 2016]. Исследование показало, что пробы воды, отобранные из 18 озер Гренландии, содержали измеряемые количества гепатотоксичного цианотоксина МС. Однако для определения концентраций МС использовался неселективный метод иммуноферментного анализа (метод ELISA), поэтому осталось неясным, какие варианты МС встречались в планктоне исследованных озер. К тому же, как оказалось, источником МС в воде, вероятно, были не планктонные цианобактерии, а колонии бентосной цианобактерии *Nostoc pruniforme* [Trout-Haney et al., 2021]. Впервые присутствие аргинин-содержащих вариантов МС (МС-LR, МС-RR) и их деметилированных форм в планктоне обнаружено в полярном оз. Имандра (Северо-Запад России) с использованием высокоселективного метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии [Denisov et al., 2021]. Но достоверно установить продуцентов МС в планктоне озера не удалось [Denisov et al., 2021]. Остается неизвестным относительный вклад в продуцирование МС планктонных и бентосных цианобактериальных сообществ в северных приполярных и полярных пресных водоемах.

Якутск является самым крупным городом в мире, расположенным в зоне многолетней мерзлоты. Численность населения Якутска

быстро растет и за последние 15 лет увеличилась почти на 40 %, составляя в настоящее время 330 тыс. жителей. В черте города и его окрестностях находится большое количество озер, которые являются важным компонентом городской среды. С развитием сельского хозяйства, увеличением коммунально-бытовой нагрузки на исследованные водоемы растет поступление в них биогенных и органических веществ с прилегающих территорий, что может стимулировать токсичные цианобактериальные цветения воды. Насколько нам удалось выяснить, в литературе до сих пор отсутствуют данные о возможном распространении цианотоксинов в водоемах Якутии, характеризующейся суровым арктическим климатом и наличием многолетней мерзлоты. Исследований по молекулярно-генетической диагностике продуцентов МС среди планктонных цианобактерий, обитающих в водоемах этого региона, также не проводилось.

Цель настоящего исследования – получение первых данных о встречаемости, концентрациях и структурных вариантах внутриклеточных цианотоксинов, а также видовом составе потенциально токсичных цианобактерий в озерах, расположенных на многолетней мерзлоте на территории Якутии. Отдельное внимание уделено решению следующих вопросов: 1) возможно ли цветение воды с участием планктонных токсигенных цианобактерий в водоемах, расположенных в суровых климатических условиях криолитозоны на территории Якутии? 2) какие цианобактерии являются главными продуцентами токсинов в регионе? 3) содержатся ли в исследованных водоемах цианотоксины в концентрации опасной для здоровья человека?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Описание района работ

Район исследований находится на 62-й параллели с. ш. в среднем течении р. Лены, в зоне сплошного распространения многолетней мерзлоты. Большое влияние на климатические условия региона оказывает формирующийся в зимнее время в центре Азии сибирский антициклон, мощный отрог которого занимает всю Восточную Сибирь. На особенности климата значительно влияют частые вторжения воздушных масс со стороны Северного

Ледовитого океана с очень малым содержанием водяного пара летом. Климат резко-континентальный с продолжительной суровой зимой и коротким жарким летом. В регионе расположен «полюс холода» (с. Оймякон), где отмечены самые низкие температуры в Северном полушарии Земли. По данным, полученным на портале www.worldclim.org, среднегодовая температура воздуха для района отбора проб колеблется от $-2,4$ до $-8,7$ °C, максимальная температура в летний период – от $22,2$ до $25,0$ °C.

Наши работы проводились на шести разнотипных озерах (рис. 1, табл. 1). Некоторые озера расположены на надпойменной террасе р. Лены и относятся к речным (старичного происхождения), представляя собой от-

членившиеся от реки протоки. Другие озера имеют термокарстовое происхождение, их котловины образовались в результате протавивания подземных льдов многолетней мерзлоты. Один из исследованных водоемов имеет искусственное происхождение (см. табл. 1).

Отбор проб воды

Отбор проб проводился из приповерхностного слоя воды (0–0,3 м) в летнюю межень 1–5 августа 2021 г. Пробы для качественного и количественного анализа фитопланктона отбирались сетью Апштейна (материал Sefar Nitex с размером ячеек 15 мкм). Исходный объем пробы для количественного анализа составлял 20 л, объем сгущенной про-



Рис. 1. Карта-схема расположения района работ и озер г. Якутска и его окрестностей: а – оз. Леонтьевское, б – оз. Дачное, в – оз. Ытык-Кель, г – оз. Лог, д – оз. Нал-Тюнгюлю, е – оз. Тюнгюлю

Т а б л и ц а 1
Краткая характеристика исследованных озер

Озеро	Географические координаты, град. (с. ш./в. д.)	Длина, м	Ширина, м	Глубина, м	Площадь зеркала воды, тыс. м ²	Использование	Тип, генезис
Лог	62,017514 129,707035	3500	60	2,5	221,9	РЦ	Р
Ытык-Кель	62,023662 129,618245	4400	400	3,0	790,3	РЦ, СХИ, Х	Р
Дачное	62,124150 129,624445	1270	610	3,5	229,3	РЦ, Х	И
Леонтьевское	62,117600 129,558634	700	500	2,5	126,7	РЦ, СХИ	Т
Нал-Тюнгюлю	62,169853 130,658904	3500	1500	2,5	3510	В, Х, П (зимой)	Т
Тюнгюлю	62,202739 130,655056	600	600	1,5	237,6	В	Т

П р и м е ч а н и е. Тип, генезис озера: Р – речное (старичного происхождения); И – искусственное плотинное; Т – термокарстовое. Вид использования озер: П – снабжение питьевой водой, РЦ – рекреационные цели, СХИ – сельскохозяйственная ирригация, Х – водоснабжение для хозяйственно-бытовых целей, В – водопой сельскохозяйственных животных.

бы фитопланктона – 15 мл, и фиксировался тремя каплями 40%-го раствора формалина. Фитопланктон для детекции внутриклеточной фракции токсинов и молекулярно-генетического анализа отбирался простым зачерпыванием воды, и клетки осаждались на нитратцеллюлозных фильтрах Sartorius (с размером пор 0,8 мкм) под избыточным давлением. Фильтры с биомассой немедленно замораживали при –20 °С. Озерная вода для гидрохимического анализа отбиралась зачерпыванием и отправлялась в лабораторию для немедленного анализа.

Гидрохимический анализ

Химико-аналитические работы проведены с применением методов, описанных в руководстве по химическому анализу поверхностных вод суши [Семенов, 1977]. Температура воды измерялась электронным термометром Chektemp (Hanna Instruments, США). Содержание растворенного кислорода определено титриметрическим методом (йодометрическое определение). Соленость воды рассчитана как сумма анионов и катионов: сульфат-анион определен турбидиметрическим методом, хлориды – меркуриметрическим методом, гидрокарбонаты – методом обратного титрования,

кальций – титриметрическим методом с трилоном Б, катионы калия и натрия – атомно-эмиссионной спектрометрией на приборе ААС АAnalyst400 (Perkin Elmer, США). Цветность определялась методом определения светопоглощательной способности с использованием спектрофотометра ПЭ-5300ВИ (Экротекс, Россия), водородный показатель – потенциометрическим методом на приборе МультиТест ИПЛ-101 (НПП Семика, Россия).

Фотометрическим методом определены следующие компоненты: железо общее – с сульфациловой кислотой, ион аммония – с реактивом Несслера, нитрит-ион – с реактивом Грисса, нитрат-ион – с салицилатом натрия. Фосфаты детектированы методом образования фосфорно-молибденового комплекса, фосфор общий – методом персульфатного окисления, показатель химического потребления кислорода (ХПК) – фотометрическим методом на спектрофлуориметре Флюорат-02 (Люмэкс, Россия).

Для проведения сравнительного анализа значения гидрохимических показателей, измеренных в различных шкалах, приведены к условно общей шкале путем получения нормализованных значений переменных массива, характеризующихся средним и стандартным отклонением.

Обработка проб фитопланктона

Качественный и количественный анализ фитопланктона выполнялся с использованием светового микроскопа Olympus BH-2 (Olympus, Япония). Биомасса определялась произведением результата подсчета численности клеток на их объем, который вычислялся стереометрическим методом и рассчитывался по данным собственных измерений клеток [Макарова, Пичкилы, 1970]. При этом удельный вес водорослей принимался равным единице. Подсчет численности клеток водорослей осуществлялся в счетной камере Нахотта объемом 0,01 см³. Идентификация видов цианобактерий выполнялась с применением определителей J. Komárek, K. Anagnostidis [1998, 2005, 2013]. Таксономия видов приведена в соответствии с данными, опубликованными на портале algaebase.org.

Определение хлорофиллов выполнялось путем концентрации клеток фитопланктона на мембранных фильтрах, после чего проводились экстракция пигментов 90%-м ацетоном и спектрофотометрирование [Руководство..., 1983].

Выделение ДНК из планктонных проб и ПЦР-анализ

Выделение ДНК из собранного на фильтрах планктона проведено сорбционным методом с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep 200 (Лаборатория Изоген, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с применением известных из литературы праймеров, специфичных к генам синтеза гепатотоксинов МС (ген *mscE*) и нейротоксинов SXT (гены *sxtA* и *sxtI*). Для детекции генов, ответственных за биосинтез SXT, использовались пары праймеров *sxtaf/sxtar* к гену *sxtA* (ПЦР продукт размером 600 п. н.) и *sxtIf/sxtIr* к гену *sxtI* (910 п. н.) [Ballot et al., 2010; Casero et al., 2014]. Поиск МС-продуцирующих таксонов непосредственно в природных пробах (метагеномной ДНК) со смешанным составом цианобактерий состоял из двух этапов. Вначале были проведены реакции с универсальными праймерами NEPF и NEPR, комплементарными концам фрагмента нуклеотидной последова-

тельности гена *mscE* размером 472 п. н. Эти праймеры разработаны для диагностики присутствия в пробе продуцентов МС безотносительно к их таксономической принадлежности (продуценты из родов *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum*) [Jungblut, Neilan, 2006]. При положительном результате с праймерами NEPF/NEPR использовали родоспецифичные праймеры *mscE*-F2/*MicmscE*-R8 (род *Microcystis*, ~250 п. н.) и *mscE*-F2/*AnamscE*-12R (род *Dolichospermum*, ~250 п. н.) [Vaitomaa et al., 2003], позволяющие идентифицировать до рода продуцентов МС из проб со смешанным составом цианобактерий. ДНК МС-продуцирующего штамма *Microcystis aeruginosa* PCC7806 и SXT-продуцирующего штамма *Aphanizomenon* sp. AB59 использовали в качестве положительного контроля.

Амплификация генов с использованием набора реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) проводилась в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: предварительная денатурация ДНК при температуре 95 °С в течение 3 мин. Затем 37 циклов амплификации: при 95 °С в течение 30 с, при 58 °С – 30 с и при 72 °С – 1 мин. В последнем цикле этап элонгации при 72 °С длился 10 мин. Продукты ПЦР фракционировали электрофоретически в 1,5%-м агарозном геле и анализировали в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием с помощью гель-документирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Размер амплифицированных фрагментов ДНК определяли с использованием маркера молекулярных масс FastRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, США).

Определение содержания цианотоксинов методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии

Экстракция цианотоксинов из клеток, осажденных на фильтрах, осуществлялась при обработке 75%-м водным метанолом под действием ультразвука. Идентификация структурных вариантов цианотоксинов, проявляющих различную токсичность, и их количественное определение проводились комплексным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Анализ выполняли с использованием системы ВЭЖХ Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) в сочетании с масс-спектрометром LTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение токсинов проводили на колонке Thermo Hypersil Gold RPC18 (100 × 3 мм, 3 мкм, Thermo Fisher Scientific) в режиме градиентного элюирования (0,2 мл/мин) смесью воды и ацетонитрила, содержащих 0,05 % муравьиной кислоты. Масс-спектрометрический анализ цианотоксинов проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме детектирования положительных ионов. Фрагментные спектры получали с использованием диссоциации, активируемой соударениями (cid, ДАС). Параметры масс-спектрометрического анализа: температура нагревателя 300 °С, температура капилляра 300 °С, газ-носитель 45 Arb, распыляющий газ 10 Arb, напряжение на ионном источнике 3,5 кВ, частота модуляции S-линз 69 %.

Целевые соединения идентифицировали на основании точного измерения массы ионов $[M + H]^+$ или $[M + 2H]^{2+}$ (разрешение 30 000, точность в пределах 5 ppm) [Chernova et al., 2016], данных из спектров фрагментации [Чернова и др., 2016] и хроматографических времен удерживания, установленных с использованием коммерчески доступных стандартных соединений цианотоксинов (AN-а, MC, NOD).

Количественный анализ проводили с использованием метода внешнего стандар-

та. С использованием растворов девяти стандартных соединений MC-LR, MC-RR, MC-YR (Sigma Aldrich, США), а также MC-LY, MC-LA, MC-LW, MC-LF, [D-Asp³]MC-LR и [D-Asp³]MC-RR, AN-а фумарата (Enzo Life Sciences, Inc., США), 2 стандартных соединения NOD (NOD-R, [D-Asp¹]NOD-R) (Sigma-Aldrich Corp., США) были построены калибровочные зависимости в диапазоне от 1 до 500 нг/мл.

Использовались следующие реактивы: ацетонитрил сорт "0" (Криохром, Россия), метанол (LiChrosolv hypergrade для LC-MS, Merck, Германия), муравьиная кислота (98–100 %, Fluka Chemika, Buchs, Швейцария), а также вода, очищенная с помощью системы Direct-Q (Millipore, электропроводность 0,056 мС/см при 25 °С) (Массачусетс, США).

Удельное содержание MC в единице биомассы (В) цианобактерий-продуцентов (квота MC, мкгMC/мгВ) рассчитывалось как отношение внутриклеточной концентрации MC к суммарной биомассе цианобактерий-продуцентов, идентифицированных методом ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Химический состав вод

Вода озер в приповерхностном слое при отборе проб была достаточно хорошо прогрета, имела высокое содержание растворенного кислорода (табл. 2) и слабощелочную реакцию, за исключением оз. Дачное, которое обладало нейтральной реакцией.

Т а б л и ц а 2
Физико-химические показатели вод исследованных озер

Показатель	Озеро					
	1	2	3	4	5	6
Температура воды, °С	22,6	22,0	23,1	22,2	23,3	24,1
Кислород (O ₂), мг/л	9,5	12,9	9,8	10,5	12,9	7,7
pH, ед.	7,30	9,06	8,74	9,30	8,99	9,60
Соленость, мг/л	489,6	493,2	448,6	486,3	497,2	1725,5
Цветность, град	32	29	87	25	46	69
ХПК, мг/л	42,15	38,60	47,17	42,93	62,58	89,40
NH ₄ , мг/л	0,33	0,42	0,41	0,35	0,40	0,70
NO ₂ , мг/л	0,10	0,08	0,11	0,02	0,08	0,24
NO ₃ , мг/л	0,68	0,72	0,90	0,96	0,85	1,31
PO ₄ , мг/л	0,08	0,11	0,15	0,08	0,08	0,15
P _{общ} , мг/л	0,16	0,18	0,46	0,19	0,15	0,48
Fe _{общ} , мг/л	0,32	0,40	0,58	0,48	0,54	0,62
N/P	7,0	3,1	6,8	6,9	8,9	4,7

П р и м е ч а н и е. 1 – Дачное; 2 – Леонтьевское; 3 – Ытык-Кель; 4 – Лог; 5 – Нал-Тюнгюлю; 6 – Тюнгюлю.

По содержанию солей воды большинства озер являлись среднеминерализованными, за исключением оз. Тюнгюлю, где концентрация данного компонента была выше, чем в остальных водоемах, более чем в 3 раза. Повышенным показателем цветности выделялось оз. Ытык-Кель, а также термокарстовые озера. Показатели ХПК оказались высокими во всех водоемах, достигая максимальных значений в термокарстовых озерах. Концентрация иона аммония была высокой во всех озерах, максимальные показатели отмечены для оз. Тюнгюлю, минимальные – для озер Дачное и Лог. Содержание нитритов колебалось в довольно широких пределах и достигало максимальных значений в оз. Тюнгюлю. Содержание нитратов было также высоким, достигая максимума в оз. Тюнгюлю, а также в озерах Лог и Ытык-Кель. Максимальная концентрация фосфатов и фосфора общего характерна для озер Ытык-Кель и Тюнгюлю. Содержание железа общего высокое во всех озерах, достигая

максимальных значений в озерах Тюнгюлю, Ытык-Кель и Нал-Тюнгюлю.

На графике нормализованных значений физико-химических показателей вод исследованных озер видно, что оз. Тюнгюлю значительно отличалось от остальных озер максимальным содержанием солей, соединений азота и ХПК (рис. 2), а также наибольшим значением pH и концентрации железа общего. Наибольшим содержанием соединений фосфора и максимальной цветностью выделялись озера Тюнгюлю и Ытык-Кель.

Таксономический состав цианобактерий, виды-доминанты и концентрация хлорофилла

В планктоне озер выявлено 18 видов цианобактерий из 11 родов и 1 таксон определен до рода. Наибольшего видового богатства цианобактерии достигали в озерах Нал-Тюнгюлю, Леонтьевское и Ытык-Кель (табл. 3).

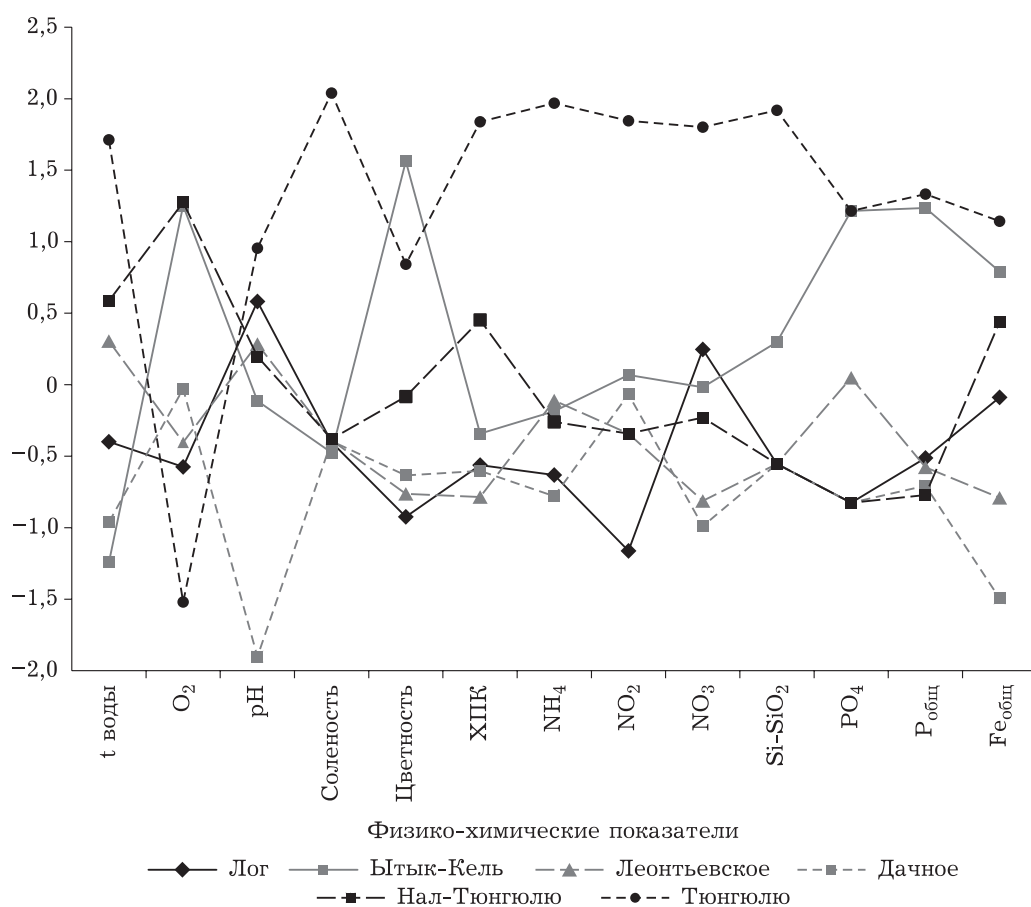


Рис. 2. График нормализованных показателей физико-химических параметров исследованных озер

Видовой состав, численность, млн кл./л (числитель) и биомасса, мг/л (знаменатель) цианобактерий
исследованных озер

Вид	Озеро					
	1	2	3	4	5	6
<i>Anabaena aequalis</i> O. Borge	—	—	$\frac{0,36}{0,04}$	—	—	—
<i>A. contorta</i> H. Bachmann	—	—	—	—	$\frac{0,66}{0,07}$	—
<i>Anathece clathrata</i> (West & G. S. West) Komárek, Kastovsky & Jezberová	—	$\frac{21,28}{0,03}$	$\frac{31,01}{0,04}$	—	$\frac{50,36}{0,07}$	—
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault*	$\frac{22,86}{1,6}$	$\frac{4,62}{0,30}$	$\frac{6,52}{0,60}$	$\frac{2,35}{0,20}$	$\frac{6,74}{0,60}$	—
<i>Aphanocapsa incerta</i> (Lemmermann) G. Cronberg & Komárek*	$\frac{52,63}{0,10}$	$\frac{18,18}{0,04}$	—	—	$\frac{19,05}{0,04}$	—
<i>A. planctonica</i> (G. M. Smith) Komárek & Anagnostidis	—	—	$\frac{4,37}{0,04}$	—	—	—
<i>Dolichospermum spiroides</i> (Klebhan) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek*	—	$\frac{0,29}{0,07}$	$\frac{0,65}{0,15}$	—	—	—
<i>D. viguieri</i> (Denis & Frémy) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek*	—	—	$\frac{2,00}{0,30}$	$\frac{1,11}{0,20}$	—	—
<i>Gomphosphaeria aponina</i> Kützing	—	—	—	—	—	$\frac{0,94}{0,10}$
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing	—	$\frac{0,50}{0,03}$	—	—	—	$\frac{1,59}{0,10}$
<i>M. minima</i> G. Beck in G. Beck & Zahlbruckner	—	—	$\frac{198,7}{0,03}$	$\frac{662,3}{0,01}$	—	—
<i>M. tranquilla</i> (Ehrenberg) Trevisan	—	—	—	—	$\frac{4,19}{0,06}$	—
<i>Microcrocis irregularis</i> (Lagerheim) Geitler	—	—	—	—	$\frac{3,40}{0,04}$	—
<i>M. aeruginosa</i> (Kützing) Kützing*	$\frac{3,08}{0,20}$	$\frac{46,67}{3,50}$	—	$\frac{1,43}{0,10}$	$\frac{2,78}{0,20}$	—
<i>M. flos-aquae</i> (Wittrock) Kirchner*	—	—	$\frac{79,65}{3,20}$	—	—	—
<i>M. pulverea</i> (H. C. Wood) Forti	$\frac{10,0}{0,10}$	$\frac{9,09}{0,10}$	$\frac{13,33}{0,20}$	—	$\frac{4,29}{0,06}$	—
<i>Oscillatoria</i> sp.	$\frac{0,84}{0,10}$	$\frac{0,25}{0,03}$	—	$\frac{0,84}{0,10}$	$\frac{0,34}{0,04}$	$\frac{1,69}{0,20}$
<i>Snowella lacustris</i> (Chodat) Komárek & Hindák*	—	—	—	$\frac{8,33}{0,10}$	$\frac{3,33}{0,06}$	$\frac{6,25}{0,10}$
<i>Woronichinia naegeliana</i> (Unger) Elenkin*	$\frac{3,13}{0,10}$	—	$\frac{6,06}{0,20}$	—	$\frac{1,76}{0,06}$	$\frac{3,23}{0,10}$
Общая численность/биомасса цианобактерий	$\frac{92,53}{2,20}$	$\frac{100,9}{4,10}$	$\frac{342,6}{4,80}$	$\frac{676,3}{0,80}$	$\frac{96,89}{1,30}$	$\frac{13,70}{0,60}$

П р и м е ч а н и е. Нумерация озер, как в табл. 2. * – потенциально токсичные виды; “—” – вид не обнаружен.

Цветение воды визуально отмечено в озерах Ытык-Кель, Дачное и Леонтьевское в виде наблюдаемых скоплений цианобактерий в приповерхностном слое воды. Их общая численность и биомасса варьировались в пределах 13,7–676,3 млн кл./л и 0,6–4,8 мг/л соответственно (см. табл. 3). Самыми массово развивающимися видами были *Microcystis flos-aquae*, *M. aeruginosa* и *Aphanizomenon*

flos-aquae. Доля цианобактерий от общей биомассы фитопланктона составляла от 60 до 98 %.

Результаты анализа пигментов показали, что наибольшая концентрация хлорофилла *a* характерна для оз. Нал-Тюнгюлю, высокое его содержание также отмечено для озер Ытык-Кель и Дачное (табл. 4). Наименьшее содержание хлорофилла *a* – в планктоне оз. Тюнгюлю. Содержание хлорофиллов *b* и *c* в большинстве

Т а б л и ц а 4

Концентрация хлорофиллов фитопланктона исследованных озер, мкг/л

Озеро	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>c</i>
Дачное	20,15	4,86	15,54
Ытык-Кель	26,14	1,81	15,67
Леонтьевское	10,65	0,46	5,34
Лог	18,39	1,35	7,46
Нал-Тюнгюлю	33,05	10,04	47,40
Тюнгюлю	5,35	0,47	2,78

озер было меньше, чем хлорофилла *a*, за исключением оз. Нал-Тюнгюлю, где концентрация хлорофилла *c* была наибольшей.

Цианотоксины и гены их биосинтеза

Фрагменты гена биосинтеза МС *msyE* размером около 470 п. н. амплифицировали с помощью универсальных к гепатотоксичным

цианобактериям НЕР праймеров из образцов метагеномной ДНК, выделенной из планктона озер Дачное, Леонтьевское, Ытык-Кель, Лог и Нал-Тюнгюлю. Из тех же самых образцов ДНК получены ПЦР-продукты ожидаемого размера (~250 п. н.) с использованием специфичных для МС-продуцирующих *Microcystis* праймеров *msyE*-F2/*MicmsyE*-R8 (табл. 5).

Т а б л и ц а 5

Результаты анализа проб планктона на присутствие цианотоксинов и генов их биосинтеза методами жидкостной хромато-масс-спектрометрии и ПЦР

Озеро	Общая концентрация цианотоксинов, нг/л (идентифицированные структурные варианты)				Квота МС, мкг/мг	Цианотоксин-продуцирующий ген			
	MC	NOD	SXT	AN-a		<i>msyE</i> (продукты МС)	<i>msyE</i> (продукты МС рода <i>Microcystis</i>)	<i>msyE</i> (продукты МС рода <i>Dolichosper-</i> <i>ium</i>)	<i>sxtA</i> , <i>sxtI</i> (продукты SXT)
1	11 (MC-LR, MC-RR, MC-YR)	ND	ND	ND	0,055	+	+	–	–
2	7 (MC-LR, MC-YR)	ND	ND	ND	0,002	+	+	–	–
3	803 (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LY, MC-HIIR, [D-Asp ³]MC-LR, [D-Asp ³]MC-RR, [D-Asp ³]MC-YR)	ND	ND	ND	0,220	+	+	+	–
4	3 (MC-RR)	ND	ND	ND	0,030	+	+	–	–
5	12 (MC-LR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp ³]MC-RR)	ND	ND	ND	0,060	+	+	–	–
6	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е. Нумерация озер, как в табл. 2. МС – микроцистины; NOD – нодулярины; SXT – сакситоксины; AN-a – анатоксин-а; ND – концентрации ниже предела обнаружения (< 0,001 мкг/л); “+” – присутствие гена продуцирования МС *msyE* в метагеномной ДНК подтверждено методом ПЦР; “–” – специфические участки генов биосинтеза цианотоксинов в метагеномной ДНК не обнаружены.

ПЦР с *Dolichospermum*-специфичными праймерами mcyE-F2/AnamcyE-12R показал положительный результат только для озера Ытык-Кель. Гены, вовлеченные в биосинтез SXT, в метагеномной ДНК, выделенной из планктона обследованных озер, обнаружены не были (см. табл. 5).

В пяти из шести обследованных озер обнаружены МС методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии, в пробе из оз. Тюнгюлю МС не были детектированы. Наибольшая внутриклеточная концентрация МС определена в пробе из оз. Ытык-Кель (803 нг/л), в озерах Дачное, Леонтьевское, Лог и Нал-Тюнгюлю присутствовали следовые количества МС. Квоты МС в изученных озерах были низкими и варьировались в пределах 0,002–0,22 мкг/мг (см. табл. 5).

В пробах обнаружено от 1 до 8 структурных вариантов МС, наибольший вклад внесли аргинин-содержащие варианты МС-RR, МС-LR и МС-YR, содержание деметилированных вариантов было ниже. На рис. 3 в качестве примера представлены масс-хроматограммы ионных токов (рис. 3, а) и фрагментные спектры (рис. 3, б), полученные при анализе экстракта пробы из оз. Ытык-Кель. В качестве характеристических ионов для аргинин-содержащих микроцистинов выбрали фрагменты [Arg-Adda-Glu+H]⁺ (соответствующий сигнал с m/z 599) и [C₁₁H₁₅O-Glu-Mdha]⁺ (m/z 375) (см. рис. 3, б), а также ионы, характерные для каждого структурного варианта. Во всех пробах присутствовал наиболее токсичный из всех вариантов МС-LR, его максимальная концентрация в планктоне отмечена в оз. Ытык-Кель (300 нг/л). Внутриклеточный нейротоксичный AN-a, SXT и гепатотоксичные NOD в пробах не обнаружены.

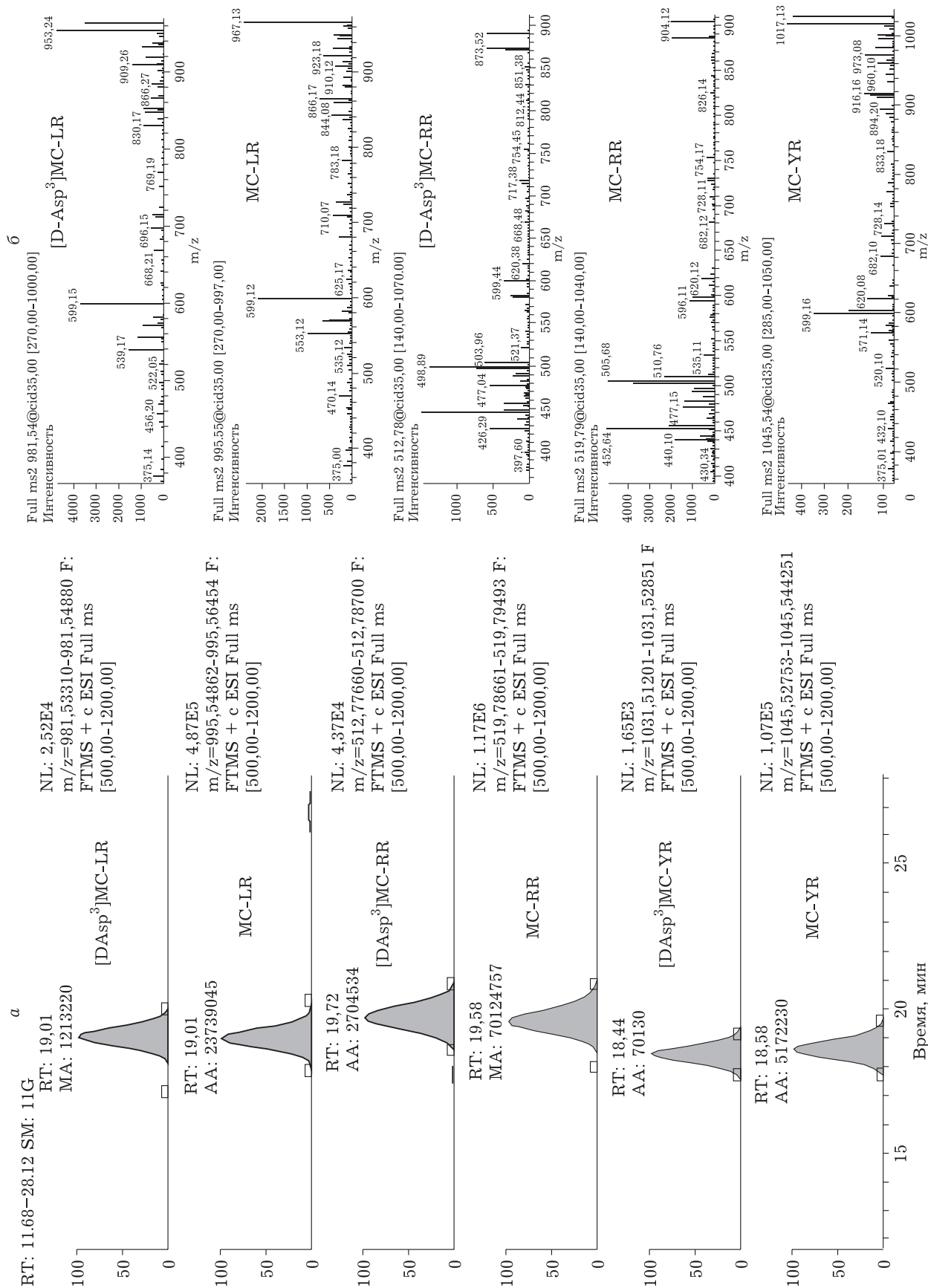
ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследованные озера, по-видимому, испытывали антропогенную нагрузку в виде органических и биогенных веществ, поступающих с водосбора, и, как следствие, высоких концентраций соединений азота, фосфора, высокой цветности и ХПК, в связи с чем трофность озер оказалась высокой. Согласно классификации R. G. Wetzel [2001] по содержанию минерального азота оз. Тюнгюлю относилось к гипертрофным водоемам, остальные

озера – к β-эвтрофным. По концентрации общего фосфора все водоемы были гипертрофными. Отношение содержания минерального азота к фосфору общему, согласно этой же классификации, также свидетельствовало о том, что водоемы являются гипертрофными. При этом наибольшей биомассы фитопланктон достигал только в озерах Ытык-Кель, Леонтьевское и Дачное, где цветение отмечалось визуально по зеленоватому оттенку воды. По биомассе фитопланктона, в соответствии с классификацией G. K. Nürnberg [1996], озера Тюнгюлю, Лог и Нал-Тюнгюлю являлись α-β-мезотрофными, остальные – β-эвтрофными. Согласно классификации трофии озер G. K. Nürnberg [1996] по концентрации хлорофилла *a*, оз. Тюнгюлю относилось к α-β-мезотрофным водоемам, оз. Ытык-Кель и Нал-Тюнгюлю – к политрофным, остальные озера – к α-β-эвтрофным. Следует отметить, что для всех озер было характерно высокое содержание железа общего. Известно, что в водах, богатых кислородом и железом, доля биологически доступного фосфора может составлять лишь часть от его общего количества [Nurnberg, Peters, 1984]. Поэтому, несмотря на повышенное содержание биогенных веществ в исследованных водоемах, их биологическая доступность могла быть ограничена.

Причиной относительно низкого развития цианобактерий оз. Тюнгюлю может являться высокий уровень pH. Существует общее мнение, что рост цианобактерий существенно снижается при pH > 9,5 [Fontes et al., 1987; Wang et al., 2011].

Особенность термокарстовых озер заключается в том, что они являются бессточными, что на различных стадиях развития таких водоемов приводит к повышению минерализации вод. Этим объясняется высокое содержание солей, отмеченное в оз. Тюнгюлю, которое, согласно классификации В. С. Самариной [1977], относится к солоноватым озерам. Повышенная концентрация солей, отмеченная в воде оз. Тюнгюлю, вероятно, являлась еще одной причиной того, что при высоком уровне трофности водоема, значительном содержании соединений азота и фосфора биомасса цианобактерий и концентрация хлорофиллов были наиболее низкими среди исследованных озер. Явление снижения биомассы



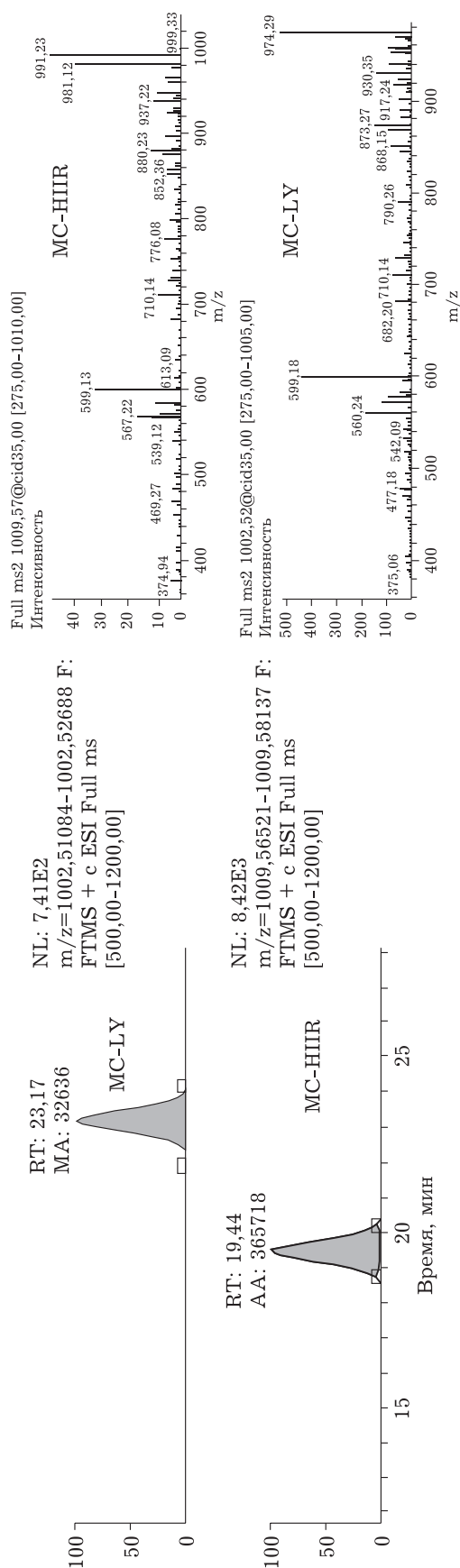


Рис. 3. Масс-хроматограмма по выделенному току (а) и фрагментные спектры (б) для детектированных структурных вариантов МС в экстракте пробы из оз. Ытык-Кель

фитопланктона с ростом минерализации воды описано на примере водоемов системы оз. Чаны [Сафонова, Ермолаев, 1983]. В эксперименте с культурами *Microcystis*, подвергнутыми воздействию различных концентраций солей, L. Tonk et al. [2007] наблюдали, что МС больше не обнаруживались при солености более 10 ‰, однако *Microcystis* все еще мог расти при солености до 17 ‰. Высокая концентрация хлорофиллов b и c в озерах Дачное, Лог и особенно Нал-Тюнгюлю объяснялась значительным развитием диатомовых и зеленых водорослей, их биомасса достигала от 15 до 40 % от общей биомассы фитопланктона.

Из имеющихся данных известно, что цианобактерии встречаются в исследованных озерах с июня по сентябрь, но их максимальная биомасса приходится на вторую половину июля и начало августа [Иванова, 2000]. Таким образом, пик массового развития цианобактерий приурочен к довольно короткому временному отрезку, что связано с ограниченным периодом вегетации в исследованных озерах. Следует отметить, что для оз. Ытык-Кель имеются сведения о фитопланктоне за 1964 г., согласно которым массовое развитие цианобактерий было характерно для водоема и ранее, их биомасса достигала в июле 8,5 мг/л [Васильева, 1968]. Однако состав массовых видов отличался от современного, среди них отсутствовали представители рода *Microcystis*, а доминировали *Dolichospermum affine* (Lemmermann) Wacklin, L. Hoffmann & J. Komárek, *D. flos-aquae* (Brébisson ex Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Hoffmann & J. Komárek, *Aphanizomenon flos-aquae* и *Trichodesmium lacustre* Klebahn.

Среди цианобактерий, согласно нашим данным, в исследованных озерах присутствовали виды, токсигенность которых ранее убедительно подтверждена на основе изучения отдельных культивируемых штаммов: *Microcystis aeruginosa* и *M. flos-aquae* – продуценты МС, *Aphanizomenon flos-aquae* и *Dolichospermum spiroides* – продуценты АН-а [Bernard et al., 2017]. Некоторые цианобактерии, обнаруженные в планктоне данных озер в результате наших работ, в настоящее время относятся к потенциально токсичным видам, поскольку либо установлена высокая частота их встречаемости в водоемах по всему миру,

в которых детектировано присутствие цианотоксинов, и/или известен токсический эффект их экстрактов на животных без идентификации токсинов. В озерах были отмечены *Aphanocapsa incerta* – вероятный продуцент NOD [Jakubowska, Szelaґ-Wasielewska, 2015]; *Woronichinia naegeliana* – MC и AN-a [Willame et al., 2005; Voloshko et al., 2008; Bober, Bialczyk, 2017]; *Snowella lacustris* – MC [Humpage, 2008], *Dolichospermum viquieri* – MC [Mariani et al., 2015] и *Aphanizomenon flos-aquae* – SXT [Cires, Ballot, 2016; Lyon-Colbert et al., 2018].

Совместная апробация методов ПЦР и жидкостной хромато-масс-спектрометрии показала, что цианобактерии, способные продуцировать нейротоксины SXT и AN-a, а также гепатотоксичные NOD, отсутствовали в исследованных озерах в период их изучения. Однако мы получили первые доказательства развития MC-продуцирующих цианобактерий в планктоне пяти из шести исследованных озер. Амплификация участка гена *mcuE* с использованием универсальных к гепатотоксичным цианобактериям НЕР праймеров и детекция самих внутриклеточных MC подтвердили способность цианобактерий, обитающих в озерах Якутии, продуцировать эти цианотоксины. Дальнейший молекулярный анализ был направлен на идентификацию продуцентов MC с использованием родоспецифичных праймеров к гену *mcuE*. Основным продуцентом MC во всех озерах оказался *Microcystis*, поскольку ПЦР-продукты размером 250 п. н. были получены с использованием специфичных для MC-продуцирующих *Microcystis* праймеров *mcuE*-F2/*McismcuE*-R8. Результаты световой микроскопии хорошо согласовались с данными ПЦР. В планктоне пяти из шести озер обнаружены два вида – *M. aeruginosa* и *M. flos-aquae*, известные из литературы как продуценты MC [Bernard et al., 2017]. Показано, что виды *Microcystis* преимущественно продуцируют MC-RR, MC-LR и MC-YR [Furey et al., 2008], преобладание именно этих аргинин-содержащих вариантов MC было детектировано в озерах. В оз. Ытык-Кель обнаружены *mcuE* ген-содержащие популяции *Dolichospermum*, ПЦР-продукт ожидаемого размера (250 п. н.) амплифицирован с родоспецифичными праймерами *mcuE*-F2/*Ana-mcuE*-12R. Как показал микроскопический

анализ фитопланктона и метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии, в этом озере присутствовали виды *Dolichospermum*, а также обнаружены внутриклеточные MC. В оз. Тюнгюлю цианобактерии в фитопланктоне присутствовали в следовых количествах, незначительного развития достигали потенциально токсичные *Woronichinia naegeliana* и *Snowella lacustris*. Однако как внутриклеточные цианотоксины, так и гены их биосинтеза в пробах из оз. Тюнгюлю не обнаружены, что подтвердило неспособность развивающихся в озере популяций *Woronichinia naegeliana* и *Snowella lacustris* к синтезу цианотоксинов.

Данные о возможных концентрациях MC в планктоне северных приполярных и полярных озер малочисленны. До настоящего времени основное внимание при изучении токсичных цианобактерий в арктических и антарктических водоемах уделялось бентосным видам из родов *Nostoc*, *Scytonema* и *Oscillatoria*, входящих в состав цианобактериальных матов [Hitzfeld et al., 2000; Jungblut et al., 2006; Wood et al., 2008; Kleinteich et al., 2012; Chrapusta et al., 2015]. Поэтому все опубликованные концентрации MC выражались как количество токсина (в нг или мкг), отнесенное к грамму сухого органического вещества (цианобактериального мата), что оказалось несопоставимо с концентрациями MC, определяемыми в воде и планктоне, поскольку их принято рассчитывать как количество токсина в литре профильтрованной воды (нг/л или мкг/л). Недавно в работе J. V. Trout-Haney et al. [2016] сообщалось, что в воде арктических озер Юго-Западной Гренландии за 2 года наблюдений максимальное общее содержание MC (включающее в себя внутриклеточную и внеклеточную фракции) не превышало 400 нг/л, что сопоставимо с концентрацией внутриклеточного MC, установленной в данном исследовании в оз. Ытык-Кель. В целом отмечается, что концентрации MC в северных водоемах, расположенных в суровых климатических условиях, на порядки ниже, чем во многих эвтрофных умеренных или тропических пресноводных экосистемах [Cires et al., 2017]. В то же время концентрации MC в “пятнах цветения” в приполярных и арктических озерах Северо-Запада России могут достигать от 2500 нг/л в оз. Имандра [Denisov et al., 2021] до 12500 нг/л в оз. Святозе-

ро Онежского бассейна [Смирнова и др., 2021]. Таким образом, в случае образования пятен цветения в исследованных и других озерах, расположенных в криолитозоне на территории Якутии, следует ожидать значительного превышения ПДК МС-LR (1000 нг/л), недавно введенного для поверхностных водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования в Российской Федерации согласно СанПиН 1.2.3685-21.

Квота МС представляет собой количество цианотоксина, содержащегося в единице биомассы (или в одной клетке) цианобактерий-продуцентов. Квота МС используется в качестве косвенного показателя уровня токсичности природных цианобактериальных цветений водоемов для оценки потенциальных рисков здоровью людей [Fastner et al., 2001; Chorus, Welker, 2021].

Рассчитанные квоты МС для исследованных озер криолитозоны оказались крайне низкими и изменялись в диапазоне от 0,002 до 0,22 мкгМС/мгВ. В исследованиях полярного оз. Имандра квота МС также оказалась невысокой – 0,005–0,069 мкгМС/мгВ, и отмечались значительные вариации этого показателя между годами наблюдения [Denisov et al., 2021]. Напротив, в водоемах умеренной зоны квоты МС значительно выше: в озерах Германии – 0,05–3,8 мкгМС/мгВ [Fastner et al., 2001], в водохранилищах Волги, Камы и Дона – 0,14–5,6 мкгМС/мгВ [Chernova et al., 2020]. Хотя данных недостаточно, можно предположить, что удельное содержание МС в единице биомассы цианобактерий-продуцентов, по-видимому, может быть значительно ниже в водоемах северных регионов по сравнению с пресными водами умеренных широт. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, связаны ли столь низкие квоты МС у северных популяций цианобактерий с более низкой продукцией МС (экспрессией генов биосинтеза МС) в суровых климатических условиях или с небольшой долей штаммов, способных продуцировать МС. Так, недавно показано, что только около 50 % проанализированных колоний *Microcystis flos-aquae* – одного из распространенных продуцентов МС в российских пресных водах, содержали *msc*-гены биосинтеза МС и потенциально были способны продуцировать токсин [Sidelev et al., 2020]. При этом в нашем исследовании в оз. Ытык-Кель этот вид был основным источником МС и достигал значительной биомассы (3,2 мг/л), но при этом внутриклеточная концентрация МС, а соответственно, и квота токсина были низкими.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены данные о присутствии в планктоне некоторых озер, расположенных на многолетней мерзлоте на территории Якутии (г. Якутск и его окрестности), цианотоксинов МС и их потенциальных продуцентов. В большинстве исследованных озер отмечались высокие концентрации соединений азота и фосфора, высокая цветность и повышенное содержание органического вещества, что может объясняться высокой антропогенной нагрузкой. Как следствие, цианобактериальное цветение воды визуально было детектировано в августе 2021 г. в озерах Ытык-Кель, Леонтьевское и Дачное. В пробах планктона внутриклеточная концентрация МС достигала 803 нг/л с преобладанием наиболее токсичного для организмов варианта МС-LR. Молекулярными методами установлено, что основными продуцентами МС являлись виды рода *Microcystis*, и в одном из озер – виды *Dolichospermum*, присутствие которых в фитопланктоне подтверждено методом световой микроскопии при количественной обработке проб. Имеющиеся данные о фитопланктоне оз. Ытык-Кель в середине прошлого столетия позволили заключить, что, несмотря на то что уровень развития биомассы не повысился, изменились структура видового состава и набор доминантных видов. Эти изменения могли быть связаны как с нарастающим антропогенным прессом, так и с глобальными климатическими изменениями. В связи с этим актуальность изучения распространения цианотоксинов и их продуцентов в регионе будет расти. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении для оценки потенциальной опасности цианотоксинов здоровью людей. Ряд озер Центральной Якутии используется для промышленного вылова рыбы. Некоторые из этих водоемов характеризуются цветением воды в летний период с массовым развитием цианобактерий. Учитывая то, что МС являются высокостабильными соединениями, способными накапливаться в тканях живых

организмов, перспективными, на наш взгляд, могут оказаться исследования наличия цианотоксинов не только в биомассе цианобактерий, но и в озерной воде, а также в тканях добываемой в озерах рыбы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ по проекту № FWRS-2021-0023, ЕГИСУ НИОКТР № АААА-А21-121012190038-0; в рамках государственной бюджетной темы № FFZF-2022-0012, номер в РосРид 122041100086-5. Молекулярно-генетические исследования выполнены С. И. Сиделевым в научно-образовательной лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии ЯрГУ и финансировались в рамках Программы развития ЯрГУ (НИР № P2-GL3-2022).

ЛИТЕРАТУРА

- Аржакова С. К., Жирков И. И., Кусатов К. И., Андронов И. М. Реки и озера Якутии: краткий справочник. Якутск: Бичик, 2007. 176 с.
- Васильева И. И. Состав и сезонная динамика фитопланктона озер окрестностей г. Якутска: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1968. 16 с.
- Денисов Д. Б., Кашулин Н. А. Цианопрокариоты в составе планктона оз. Имандра (Кольский полуостров) // Тр. Кольского науч. центра РАН. 2016. Вып. 4, № 7(41). С. 40–57.
- Иванова А. П. Водоросли городских и пригородных озер долины Средней Лены: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Якутск, 2000. 18 с.
- Макарова И. В., Пичкилы Л. О. К некоторым вопросам методики вычисления биомассы планктона // Ботан. журн. 1970. Т. 55, № 10. С. 1448–1494.
- Ресурсы поверхностных вод СССР. Т. 1. Кольский полуостров. Л.: Гидрометеиздат, 1970. 315 с.
- Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений / под ред. В. А. Абакумова. Л.: Гидрометеиздат, 1983. 240 с.
- Самарина В. С. Гидрогеохимия. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1977. 359 с.
- Сафонова Т. А., Ермолаев В. И. Водоросли водоемов системы озера Чаны. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1983. 153 с.
- Семенов А. Д. Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Л., 1977. 540 с.
- Смирнова В. С., Теканова Е. В., Калинин Н. М., Чернова Е. Н. Состояние фитопланктона и цианотоксины в пятне "цветения" в озере Святозеро (бассейн Онежского озера, Россия) // Вода и экология: проблемы и решения. 2021. № 1 (85). С. 50–60.
- Чернова Е. Н., Русских Я. В., Подольская Е. П., Жаковская З. А. Определение микроцистинов и анатоксина-а методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения // Науч. приборостроение. 2016. Т. 26, № 1. С. 11–25.
- 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.
- Bernard C., Ballot A., Thomazeau S., Maloufi S., Furey A., Mankiewicz-Boczek J., Pawlik-Skowrońska B., Capelli C., Salmasso N. Cyanobacteria associated with the production of cyanotoxins / Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis / Eds. J. Meriluoto, L. Spoof, G. A. Codd. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2017. P. 501–525.
- Bober B., Bialczyk J. Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegelia-na* (Unger) Elenkin // J. Appl. Phycol. 2017. Vol. 29. P. 1355–1362.
- Botana L. Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection. Boca Raton: CRC Press, 2008. 941 p.
- Casero M. C., Ballot A., Agha R., Quesada A., Cires S. Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of *sxt* genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon gracile* // Harmful Algae. 2014. Vol. 37. P. 28–37.
- Chernova E., Russkikh I., Voyakina E., Zhakovskaya Z. Occurrence of microcystins and anatoxin-a in eutrophic lakes of Saint Petersburg, Northwestern Russia // Oceanol. Hydrobiol. Stud. 2016. Vol. 45, N 4. P. 466–484.
- Chernova E., Sidelev S., Russkikh I., Korneva L., Solovyova V., Mineeva N., Stepanova I., Zhakovskaya Z. Spatial distribution of cyanotoxins and ratios of microcystin to biomass indicators in the reservoirs of the Volga, Kama and Don Rivers, the European part of Russia // Limnologica. 2020. Vol. 84. P. 1–10. Chorus I., Welker M. Toxic Cyanobacteria in Water. Boca Raton: CRC Press, 2021. 859 p.
- Chrapusta E., Węgrzyn M., Zabaglo K., Kaminski A., Adamski M., Wietrzyk P., Bialczyk J. Microcystins and anatoxin-a in Arctic bio crust cyanobacterial communities // Toxicon. 2015. Vol. 101. P. 35–40.
- Cires S., Ballot A. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria) // Harmful Algae. 2016. Vol. 54. P. 21–43.
- Cires S., Casero M., Quesada A. Toxicity at the edge of life: a review on cyanobacterial toxins from extreme environments // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, N 7. P. 1–18.
- Denisov D. B., Chernova E. N., Russkikh I. V. Toxic Cyanobacteria in the Arctic Lakes: New Environmental Challenges. A Case Study // Advanced technologies for sustainable development of urban green infrastructure. SSC2020. Springer Geography / Eds. V. Vasenev et al. Berlin: Springer, 2021. P. 161–170.
- Fastner J., Wirsing B., Wiedner C., Heinze R., Neumann U., Chorus I. Microcystins and hepatocyte toxicity // Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences / Ed. I. Chorus. Berlin: Springer, 2001. P. 22–37.
- Field C. B., Barros V. R., Dokken D. J., Mach K. J., Mastrandrea M. D., Bilir T. E., Chatterjee M., Ebi K. L., Estrada Y. O., Genova R. C., Girma B., Kissel E. S., Levy A. N., MacCracken S., Mastrandrea P. R., White L. L. IPCC2014: Summary for policymakers in Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects // Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge; New York: Cambridge University Press. 2014. P. 1–32.

- Fontes A. G., Angeles Vargas M., Moreno J., Guerrero M. G., Losada M. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture // *Biomass*. 1987. Vol. 13. P. 33–43.
- Furey A., Allis O., Ortea P. M., Lehane M., James K. J. Hepatotoxins: context and chemical determination / *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection* / Ed. L. Botana. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. P. 844–886.
- Hitzfeld B. C., Lampert C. S., Spaeth N., Mountfort D., Kaspar H., Dietrich D. R. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo ice shelf, Antarctica // *Toxicon*. 2000. Vol. 38. P. 1731–1748.
- Huisman J., Codd G. A., Paerl H. W., Ibelings B. W., Verspagen J. M. H., Visser P. M. Cyanobacterial blooms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018 Vol. 16. P. 471–483.
- Humpage A. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics // *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs* / Ed. H. K. Hudnell. New York: Springer, 2008. 950 p.
- Jakubowska N., Szeląg-Wasielewska E. Toxic picoplanktonic cyanobacteria – Review // *Mar Drugs*. 2015. Vol. 13, N 3. P. 1497–1518.
- Jungblut A. D., Hoeger S. J., Mountfort D., Hitzfeld B. C., Dietrich D. R., Neilan B. A. Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community // *Toxicon*. 2006. Vol. 47. P. 271–278.
- Jungblut A. D., Neilan B. A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria // *Arch. Microbiol.* 2006. Vol. 185. P. 107–114.
- Kleinteich J., Hildebrand F., Wood S., Cirés S., Agha R., Quesada A., Pearce D. A., Convey P., Küpper F. C., Dietrich D. R. Diversity of toxin and non-toxin containing cyanobacterial mats of meltwater ponds on the Antarctic Peninsula: A pyrosequencing approach // *Antarct. Sci.* 2014. Vol. 26. P. 521–532.
- Kleinteich J., Wood S. A., Puddick J., Schleheck D., Küpper F. C., Dietrich D. Potential toxins in Arctic environments – presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems // *Chem. Biol. Interact.* 2013. Vol. 206, N 2. P. 423–431.
- Kleinteich J., Wood S., Küpper F., Camacho A., Quesada A., Frickey T., Dietrich D. Temperature-related changes in polar cyanobacterial mat diversity and toxin production // *Nat. Clim. Chang.* 2012. Vol. 2. P. 356–360.
- Komárek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota. T. 1. Chroococcales*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1998. 548 S.
- Komárek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota. T. 2. Oscillatoriales*. München: Elsevier, 2005. 759 S.
- Komárek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota. T. 3. Heterocytous genera*. Berlin: Springer, 2013. 1130 S.
- Lyon-Colbert A., Su S., Cude C. A systematic literature review for evidence of *Aphanizomenon flos-aquae* toxicity in recreational waters and toxicity of dietary supplements: 2000–2017 // *Toxins*. 2018. Vol. 10, N 7. P. 1–18.
- Magnuson J. J., Robertson D. M., Benson B. J., Wynne R. H., Livingstone D. M., Arai R. A., Barry R. G., Card V., Kuusisto E., Granin N. G., Prowse T. D., Stewart K. M., Vuglinski V. S. Historical trends in lake and river ice cover in the Northern Hemisphere // *Science*. 2000. Vol. 289, N 5485. P. 1743–1746.
- Mariani M., Padedda B., Kaštovský J., Buscarinu P., Sechi N., Virdis T., Lugliè A. Effects of trophic status on microcystin production and the dominance of cyanobacteria in the phytoplankton assemblage of Mediterranean reservoirs // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 1–16.
- Meriluoto J., Spoof L., Codd G. A. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2017. 576 p.
- Nürnberg G. K. Trophic state of clear and colored, soft- and hardwater lakes with special consideration of nutrients, anoxia, phytoplankton and fish // *J. Lake and Reservoir Management*. 1996. Vol. 12. P. 432–447.
- Nürnberg G. K., Peters R. H. Biological availability of soluble reactive phosphorus in anoxic and oxic freshwaters // *Can. J. Fish. and Aquat. Sci.* 1984. Vol. 41, N 5. P. 757–765.
- Paerl H. W., Paul V. J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria // *Water Res.* 2012. Vol. 46. P. 1349–1363.
- Rinehart K. L., Namikoshi M., Choi B. W. Structure and biosynthesis of toxins from bluegreen algae (cyanobacteria) // *J. Appl. Phycol.* 1994. Vol. 6. P. 159–176.
- Sidelev S., Zubishina A., Chernova E. Distribution of microcystin-producing genes in *Microcystis* colonies from some Russian freshwaters: is there any correlation with morphospecies and colony size // *Toxicon*. 2020. Vol. 184. P. 136–142.
- Sivonen K., Jones G. *Cyanobacterial toxins* // *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* / Eds. I. Chorus, J. Bartram. London: E & FN Spon, 1999. 432 p.
- Svirčev Z., Lalić D., Savić B. G., Tokodi N., Drobac B. D., Chen L., Meriluoto J., Codd G. A. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings // *Arch. Toxicol.* 2019. Vol. 93. P. 2429–2481.
- Tonk L., Bosch K., Visser P. M., Huisman J. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* // *Aquat. Microb. Ecol.* 2007. Vol. 46. P. 117–123.
- Trout-Haney J., Ritger A., Cottingham K. Benthic cyanobacteria of the genus *Nostoc* are a source of microcystins in Greenlandic lakes and ponds // *Freshwater Biol.* 2021. Vol. 66. P. 266–277.
- Trout-Haney J. V., Wood Z. T., Cottingham K. L. Presence of the cyanotoxin microcystin in arctic lakes of southwestern Greenland // *Toxins*. 2016. Vol. 8, N 9. P. 1–6.
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K., Rouhiainen L., Tallberg P., Møkelke L., Sivonen K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase gene E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 7289–7297.
- van Apeldoorn M. E., van Egmond H. P., Speijers G. J. A., Bakker G. J. I. Toxins of cyanobacteria // *Mol. Nutr. Food Res.* 2007. Vol. 51. P. 7–60.
- Voloshko L., Kopecky J., Safronova T., Pljusch A., Titova N., Hrouzek P., Drabkova V. Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga // *Est. J. Ecol.* 2008. Vol. 57. P. 100–110.
- Vuglinsky V., Valatin D. Changes in ice cover duration and maximum ice thickness for rivers and lakes in the Asian part of Russia // *Nat. Resources*. 2018. Vol. 9. P. 73–87.
- Wang X., Hao C., Zhang F., Feng C., Yang Y. Inhibition of the growth of two blue-green algae species (*Microcystis aeruginosa* and *Anabaena spiroides*) by acidification treatments using carbon dioxide // *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102. P. 5742–5748.

- Wetzel R. G. Limnology: lake and river ecosystems. San Diego: Acad. Press, 2001. 1006 p.
- Willame R., Jurczak T., Kull T., Meriluoto J., Homann L. Distribution of hepatotoxic cyanobacterial blooms in Belgium and Luxembourg // *Hydrobiologia*. 2005. Vol. 551. P. 99–117.
- Winder M., Sommer U. Phytoplankton response to a changing climate // *Hydrobiologia*. 2012. Vol. 698. P. 5–16.
- Wood S. A., Mountfort D., Selwood A. I., Holland P. T., Puddick J., Cary S. C. Widespread distribution and identification of eight novel microcystins in Antarctic cyanobacterial mats // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74. P. 7243–7251.

Limnological characterization and the first data on occurrence of toxigenic cyanobacteria and cyanotoxins in the plankton of some lakes in the permafrost zone (Yakutia, Russia)

V. A. GABYSHEV¹, S. I. SIDELEV^{2, 3}, E. N. CHERNOVA⁴, O. I. GABYSHEVA¹, I. V. VORONOV¹, Z. A. ZHAKOVSKAYA⁴

¹*Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS
677980, Yakutsk, Lenin ave., 41
E-mail: v. a.gabyshev@yandex.ru*

²*Yaroslavl State University
150057, Yaroslavl, proezd Matrosova, 9
E-mail: Sidelev@mail.ru*

³*Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS
152742, Borok settlement, Yaroslavl oblast*

⁴*St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences (SPC RAS),
Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences
197110, Saint Petersburg, Korpurnaya str., 18
E-mail: s3561389@yandex.ru*

In the study, the first data on the distribution of cyanobacterial toxins were obtained and, for the first time, a molecular genetic determination of cyanotoxin producers in the plankton of some lakes in the permafrost zone in Yakutia was carried out. Most of the lakes were characterized by high concentrations of nitrogen, phosphorus, chlorophyll *a* and an increased content of organic matter, which could be associated with a high anthropogenic load. During the summer period, water blooms were visually observed in three of the six studied lakes. The abundance and biomass of cyanobacteria in the lakes varied within 13.7–676.3 million cells/l and 0.6–4.8 mg/l, respectively. Eight species of potentially toxigenic cyanobacteria were found in phytoplankton using light microscopy. In environmental DNA isolated from planktonic samples, regions of the *mcyE* gene involved in the biosynthesis of microcystin were amplified using the polymerase chain reaction method. During the study period, cyanobacteria capable of producing neurotoxic anatoxin-a, saxitoxins, and hepatotoxic nodularins were absent in the lakes. Using genus-specific primers to the *mcyE* gene, it was found that species of the genus *Microcystis* were the main producers of microcystins in most of the lakes; and species of *Dolichospermum* – only in one of the lakes. Up to 8 structural variants of microcystins, in general arginine-containing isoforms MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LY, MC-HIIR, [Asp³]MC-LR, [Asp³]MC-RR, [Asp³]MC-YR, were identified in lake plankton using liquid chromatography-mass spectrometry. The maximum concentration of microcystins in plankton (intracellular fraction, 803 ng/l) was recorded in a sample from Lake Ytyk-Kel. The calculated content of microcystins per unit biomass of producing cyanobacteria (toxin quota) was low (0.005–0.069 µg/mg). In order to assess the potential hazard of toxigenic species of cyanobacteria to human health, the distribution of cyanotoxins and their producers should be further studied in water bodies of the region.

Key words: toxigenic cyanobacteria, cyanotoxins, microcystins, plankton, lakes, permafrost zone.