

УДК 582.232.2:615.91:579.262(282.256.341)

DOI: 10.15372/KhUR2022399

EDN: ZJDEYP

Микроцистин-продуцирующая цианобактерия *Tychoneta* sp. из биопленок озера Байкал

И. В. ТИХОНОВА, А. В. КУЗЬМИН, Е. Г. СОРОКОВИКОВА, А. Ю. КРАСНОПЕЕВ, Г. А. ФЕДОРОВА, Н. А. ЖУЧЕНКО, Е. В. ЕЛЕЦКАЯ, С. А. ПОТАПОВ, А. Д. ГАЛАЧЬЯНЦ, И. А. ЛИПКО, О. И. БЕЛЫХ

Лимнологический институт СО РАН,
Иркутск (Россия)

E-mail: iren@lin.irk.ru

(Поступила 18.11.21)

Аннотация

Впервые описана микроцистин-продуцирующая культура бентосной цианобактерии *Tychoneta* sp. BVK16, выделенная из биопленочных обрастаний прибрежной зоны озера Байкал. Розовый цвет трихомов и развитая керитомия клеток указывают на принадлежность к роду *Tychoneta*. Исследование морфологии и участка гена 16S РНК показало уникальность этого вида цианобактерии, ближайшим родственником нового вида является реофильная цианобактерия *Tychoneta* sp. K27 из карстового ручья. На филогенетическом древе вместе они образуют отдельную кладу бентосных прикрепленных форм. Обнаружено, что байкальский штамм *Tychoneta* sp. BVK16 продуцирует микроцистин LR и не синтезирует анатоксин, что отличает его от ранее описанных видов. Эта способность выявлена *in vitro* на средах с байкальской бутилированной водой и со сточной водой из очистных сооружений пос. Выдрино. Добавление к среде очищенной сточной воды усиливает метаболизм цианобактерий и приводит к увеличению концентрации микроцистина LR до 320 мкг/г сухой массы. Усвоение дополнительного количества биогенов, а также органических соединений цианобактериями оказывает стимулирующее воздействие на их метаболизм. Анализируя появление цианобактерий рода *Tychoneta* в озере Байкал, сделано предположение, что они массово развиваются в местах дополнительного поступления питательных веществ, в том числе и органического происхождения.

Ключевые слова: цианобактерии, микроцистин, питьевая вода, сточные воды

ВВЕДЕНИЕ

Начиная с 2011 г. в озере Байкал, самом глубоком на Земле, наблюдаются крупномасштабные негативные изменения в литоральной зоне, среди которых особое место занимают массовая гибель губок и интенсивное развитие нитчатых цианобактерий на различных субстратах, включая губки [1, 2]. В бентосных сообществах оз. Байкал найдены цианобактерии, содержащие гены синтеза токсинов и способные продуцировать различные варианты гепатотоксичных микроцистинов и нейротоксичных паралитических токсинов моллюсков [3, 4].

Массовое развитие цианобактерий на дне водоемов в литоральной зоне опасно тем, что продукция и выброс токсинов происходит в прибрежных участках, в местах интенсивной хозяйственной деятельности человека, в том числе вблизи населенных пунктов, где осуществляется забор воды [5]. В пресноводных бентосных цианобактериальных матах в основном доминируют нитчатые цианобактерии порядка Oscillatoriales, реже – представители Nostocales и Synechococcales [6]. Токсичными были маты, содержащие цианобактерии родов *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Tychoneta* и *Planktothrix* [5, 7–14]. Цианобактерии рода *Tychone-*

та – новые обитатели бентоса оз. Байкал – доминируют в биопленках-язвах байкальской губки и в других обрастаниях [1, 15, 16]. Экспансия планктонных видов рода *Tychoneta* является ярким признаком эвтрофирования водоемов [9]. Морфологические и молекулярно-генетические характеристики рода *Tychoneta* показывают его близость к родам *Phormidium* и *Microcoleus*. Несмотря на то, что виды родов *Phormidium*, *Microcoleus* и *Tychoneta* – ближайшие родственники, у видов *Tychoneta* способность к продукции микроцистинов до настоящего времени не выявлена, а установлен только синтез анатоксина и его производных [9, 14, 17].

Для ультрапресных вод Байкала характерны следовые количества биогенных элементов и органических веществ, поэтому попадание очищенных сточных вод в литоральную зону озера оказывает существенное влияние на его обитателей. Антропогенное влияние сточных вод на экосистему озера происходит следующими способами: 1) непосредственный сброс очищенных сточных вод в оз. Байкал (г. Байкальск); 2) сброс очищенных сточных вод в притоки оз. Байкал (города Улан-Удэ, Северобайкальск, Слюдянка, поселки Нижнеангарск, Выдрино и другие); 3) грунтовый сток хозяйственно-бытовых вод от населенных пунктов без очистных сооружений и туристических баз, расположенных в пятисотметровой береговой зоне. Ранее было показано, что хозяйственно-бытовые воды, сброшенные на берегу озера, способны просачиваться через грунт и стимулировать рост бентосных водорослей [18]. Поэтому мы исследовали штамм ВВК16 нового для Байкала рода *Tychoneta* и изучили его способность синтезировать цианотоксины под влиянием очищенных сточных вод *in vitro*.

Цель работы – установить таксономическое положение штамма, выделенного из биопленки оз. Байкал, на основе морфологических и молекулярно-биологических данных; определить типы и концентрации цианотоксинов в биомассе культуры, выращенной на среде с разными добавками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Пробы биопленки отобраны с подводной части дощатого пирса, расположенного в районе биостанции Лимнологического института СО РАН (пос. Большие Коты, 51°54.29'N, 105°4.47'E).

Ранее в образцах этой биопленки методами иммуноферментного анализа и масс-спектрометрии выявлено четыре варианта микроцистина ([D-Asp³,Dha⁷]MC-HtyR, MC-RR, MC-HtyR, [Dha⁷]MC-YR) в суммарной концентрации 30 мкг/кг сухой массы [1]. В эксперименте использовали стерильную негазированную бутилированную воду ООО “Вода Байкала” (пос. Листвянка). Проба сточной воды взята во время экспедиционных работ на научно-исследовательском судне “Академик Коптюг” в августе 2018 г. в месте сброса очищенных сточных вод пос. Выдрино в р. Снежная в 1.5 км от устья.

Методы исследования

Фрагменты биопленки промывали стерильной минеральной средой Z-8 [19], дробили на более мелкие части и помещали на агаризованные пластинки с этой же средой и культивировали в холодильнике. Условия культивирования были следующие: освещенность 1200 люкс, чередование ночного и дневного периодов освещения 16 : 8, температура 11–12 °C. Отдельные трихомы вырезали из агара в стерильных условиях, суспендировали в жидкой среде Z-8 и вновь культивировали до получения унияльгальной культуры. Для изучения морфологии, выделения ДНК и исследования продукции цианотоксинов штамм выращивали в жидкой среде.

Морфологическое исследование проводили с помощью светового микроскопа Axio Imager (Германия), снабженного ртутной лампой HBO 100W и зеленым фильтром (DM-580+0-590, BF-0-610, G(IF-545+BG-36)). Таксономическую принадлежность устанавливали по определителю [20].

ДНК выделяли методом ферментативного лизиса с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Фрагмент 16S рПНК гена амплифицировали с помощью универсального бактериального праймера 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) [21] и праймера 16 (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA), специфичного для цианобактерий [22]. Секвенирование по Сэнгеру осуществляли в Центре коллективного пользования “Геномика” СО РАН (г. Новосибирск). Последовательность зарегистрирована в Genbank под номером MN969972. Для филогенетического анализа использовали последовательности 16S рПНК генов цианобактерий из базы GenBank. Филогенетическое дерево построено с помощью байесовского анализа с применением программного обеспечения MrBayes, v.3.2.6 [23]. Методом Монте-Карло с Марковскими цепями сгенерирован 1 млн реплик с отжигом в 25 % и четырьмя цепями

(1 холодная и 3 горячих), модель эволюции JC (Jukes-Cantor). Среднее стандартное отклонение в разрыве частот равно 0.01, потенциальный коэффициент уменьшения масштаба – 1.000. Все расчеты проведены на вычислительном кластере “Академик В. М. Матросов” (Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН, <http://hpc.icc.ru>).

Для анализа метаболитов штамм *Tychonema* sp. ВВК16 выращивали в стерильной среде Z-8 в объеме 50 мл. После формирования биопленки, проводили эксперимент в течении 10 дней: через день к одной партии приливали по 1 мл стерильной бутилированной байкальской воды, а ко второй – по 1 мл очищенной сточной воды, стерилизованной фильтрованием и УФ-излучением. После окончания эксперимента биопленку выдерживали еще 5 дней, после чего приступали к анализу метаболитов.

Для определения химического состава среды Z-8 и очищенной сточной воды использовали методы, описанные ранее [24]. Кислотность (pH) и содержание гидрокарбонатов определяли потенциометрическим методом с помощью иономер-pH-метра “Эксперт-001” (Россия). Содержание хлоридов и сульфатов измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью жидкостного хроматографа “Милихром А-02” (Россия), содержание ионов кальция и магния определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии, а ионов натрия и калия – методом атомно-эмиссионной спектроскопии с использованием атомно-абсорбционного спектрометра ААС 30 (Германия). Концентрации фосфат- и нитрат-ионов определяли с помощью концентрационного фотоколориметра КФК-3 (Россия). Химическое потребление кислорода (ХПК) или бихроматную окисляемость измеряли фотометрическим методом с использованием анализатора жидкости “Флюорат-02” (Россия). Концентрацию нефтепродуктов определяли флуориметрическим методом также с помощью анализатора жидкости “Флюорат-02”, а содержание синтетических анионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) – экстракционно-фотометрическим методом в пересчете на додецилсульфат натрия.

Для определения содержания анатоксинов и микроцистинов 10 мг лиофильно высушенной биомассы суспендировали в 4 мл метанола (75 %). Цианотоксины экстрагировали в соответствии с методикой, описанной ранее [25]. Полученный экстракт анализировали методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). Анатоксины и микроцистины определяли из одного об-

разца, так как подготовка проб биомассы цианобактерий аналогичная [26]. Определением методом ЖХ-МС проводили с помощью хроматографа Agilent 1200 с диодно-матричным УФ-Вид детектором в сочетании с HR-ESI-MS детектором Agilent 6210 (Agilent Technologies, США). Хроматографическая колонка Zorbax SB C-18 (2.1 × 150 мм), температура колонки – 35 °C, элюент А – 0.1 % HFBA в воде, элюент Б – 0.1 % HFBA в ацетонитриле, поток 150 мкл/мин, градиент от 10 до 100 % Б за 20 мин, длины волн детектирования: 210, 238, 260, 280, 290 и 340 нм. Масс-детектор в режиме ESI+ (m/z 100–3200), температура газа-носителя (N_2) – 250 °C, поток газа-носителя – 3.5 л/мин, распылитель – 45 psi, напряжение на капилляре – 3.5 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое описание штамма

Штамм *Tychonema* sp. ВВК16 в жидкой среде формировал пленки красно-коричневого цвета, прикрепленные к стенкам и ко дну колбы. Процесс формирования биопленки занимал 4 недели, после чего рост останавливался. Трихомы подвижные, прямые, от красно-коричневого до розового цвета, у молодой культуры – без чехла или с тонким чехлом, у старой – заключенные в плотные бесцветные чехлы. Концы трихомов разной формы – тупозакругленные, суженные заостренные прямые либо редко слегка загнутые, без калиптры. Ширина клеток 5.0–7.7 мкм (средняя 6.2 мкм), длина 0.5–4.1 мкм (средняя 2.2 мкм). У большинства трихомов содержимое клеток характеризовалось сильной вакуолизацией или керитомией (рис. 1).

На основании морфологических признаков штамм был отнесен к роду *Tychonema* [20]. Прикрепленный образ жизни и размер клеток исследованного штамма сходны с характеристиками *Tychonema tenue*, однако наличие чехлов и полиморфизм конечной клетки трихомов не позволяет отнести штамм к этому виду.

Филогенетический анализ штамма по гену 16S rRNA

Получена последовательность длиной 1441 нуклеотид, которая согласно BLASTn-анализу на 99.8 % (с покрытием 96 %) сходна с последовательностью осцилляториевой цианобактерии *Tychonema* sp. K27, выделенной из биопленок известковых туфов карстового ручья в Германии [27].

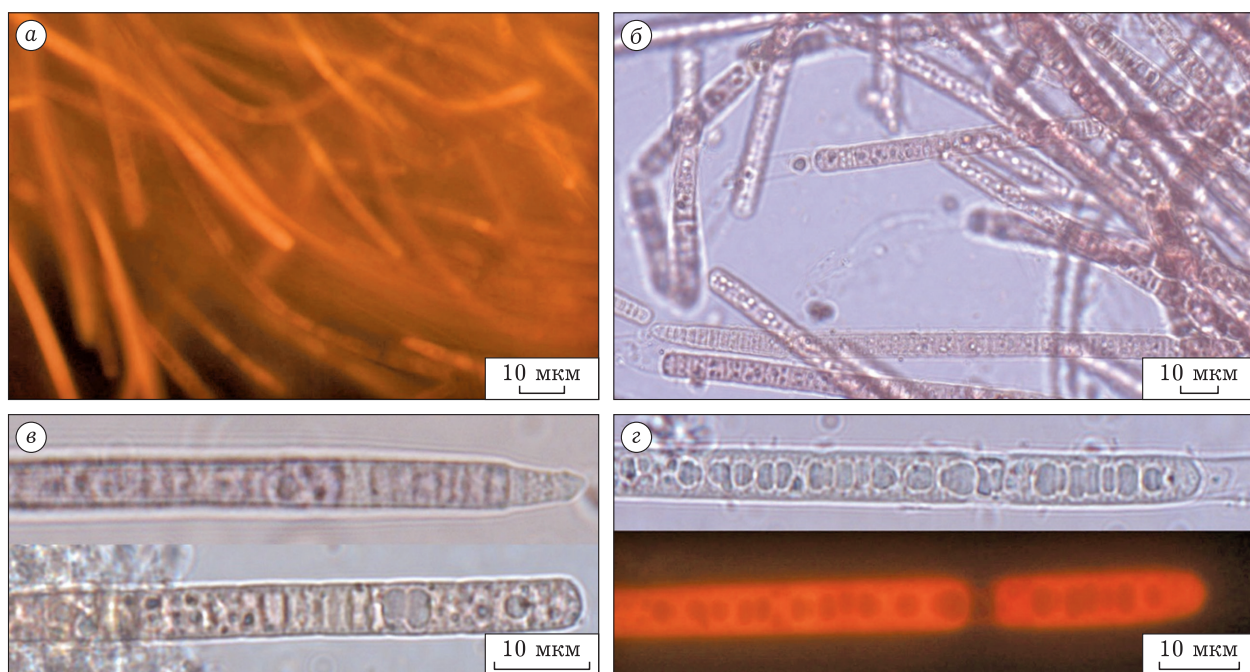


Рис. 1. Штамм *Tychonema* sp. BVK16 (а), эпифлуоресцентная и световая микроскопия биопленки (б), трихомы с заостренной и округлой конечной клеткой (в), световая и эпифлуоресцентная микроскопия трихома с чехлом и развитой керитомией (г).

Сходство с последовательностями других штаммов рода *Tychonema*, включая типовые, составило 99.3–99.5 %. На филогенетическом дереве они сформировали отдельный кластер с поддержкой 99 % в смешанной кладе *Tychonema/Phormidium autumnale/Microcoleus anatoxicus* (рис. 2).

В результате проведенного филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК показано, что штамм BVK16 принадлежит к роду *Tychonema*, образуя вместе с *Tychonema* sp. K27 отдельную кладу бентосных прикрепленных форм.

Химические параметры питательной среды

Исследование химического состава среды и добавок, использованных для культивирования, показало, что бутилированная байкальская вода имеет pH выше, чем очищенная сточная вода, в которой содержание основных ионов в несколько раз больше (табл. 1). Так, зарегистрировано превышение содержания хлорид-ионов в 100 раз, нитрат-ионов – более чем в 200 раз, сульфат-ионов – в 8 раз, фосфат-ионов – более чем в 1000 раз, а ионов натрия – в 20 раз. По сравнению с бутилированной водой с низким содержанием ионов аммония (фоновое значение для оз. Байкал – менее 0.005 мг/л), в очищенной сточной воде их содержится до 10 мг/л, что также превышает значение для байкальской воды бо-

лее чем в 1000 раз. Помимо этого, для очищенной сточной воды отмечено присутствие нефтепродуктов, синтетических анионных ПАВ и значительное количество органических веществ по сравнению с водой озера [30–32] (см. табл. 1).

Жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

В исследованных нами образцах биопленок штамма *Tychonema* sp. BVK16 методом ЖХ-МС анатоксин не выявлен. При добавлении в среду Z-8 бутилированной байкальской воды этот штамм синтезировал только следы фенилаланина. Добавление сточной воды значительно увеличивало продукцию еще двух ароматических протеиногенных аминокислот – тирозина и триптофана (рис. 3).

При исследовании цианобактерии *Tychonema* sp. BVK16, культивируемой на среде с добавлением байкальской бутилированной воды, выявлен микроцистин LR (MC-LR) на основании сравнения времени удерживания (t_R) и значения m/z молекулярного иона $[M+H]^+$ со стандартом MC-LR ($t_R = 29$ мин) (рис. 4). Концентрация MC-LR составляла 55 нг/г сухой массы. Для образцов биопленки, культивируемой на очищенной сточной воде, отмечено значительное увеличение концентрации MC-LR – до 320 мкг/г сухой массы (в 5800 раз) и появление

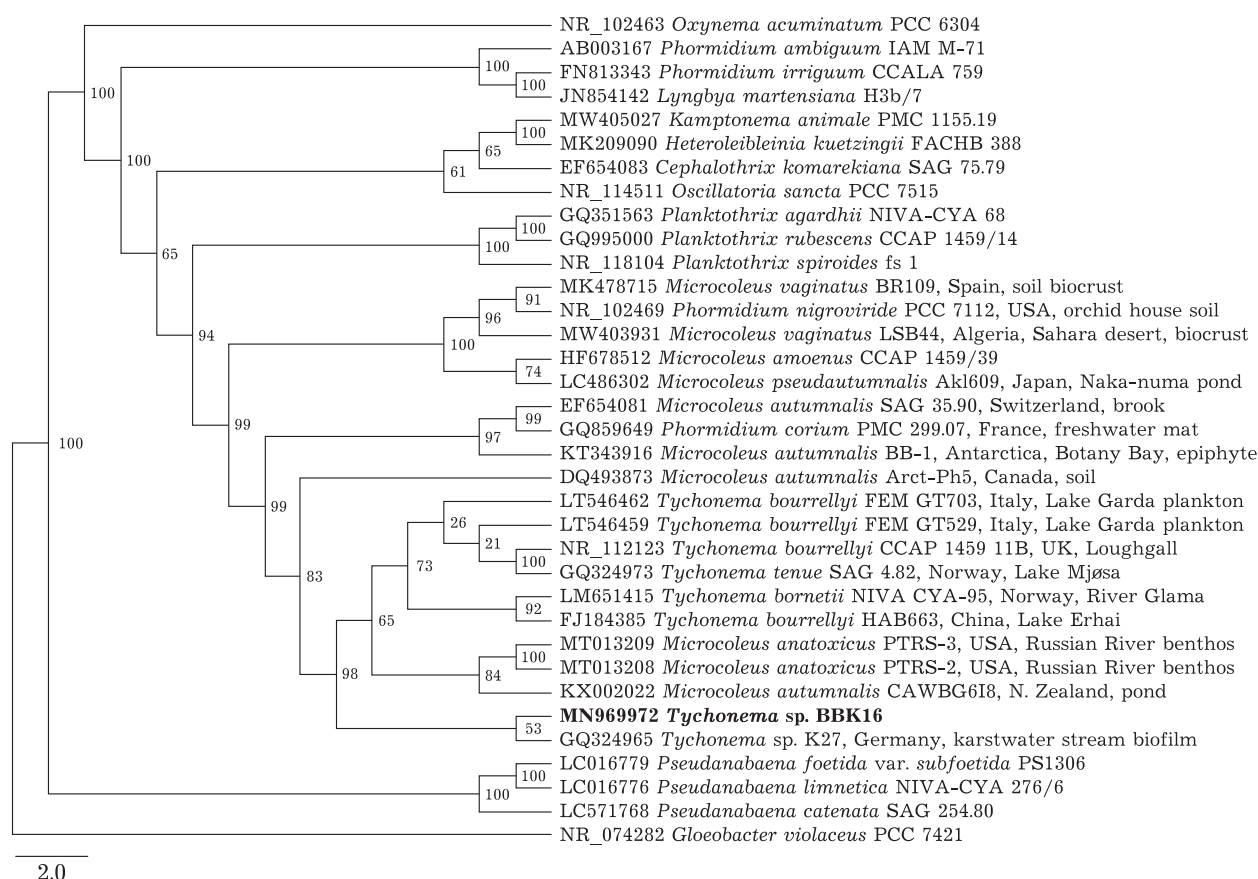


Рис. 2. Байесовское филогенетическое дерево, основанное на результатах секвенирования 16S рРНК осцилляториевых цианобактерий. Набор данных содержит 35 последовательностей длиной около 1400 нуклеотидов. Байесовские апостериорные вероятности показаны в узлах ветвления. Последовательность, полученная в данной работе, выделена жирным шрифтом. Масштаб – ожидаемое количество генетических замен на участке гена.

дополнительного слабо токсичного варианта микроцистина [Ser⁷]MCYST-LR в концентрации 20 мкг/г сухой массы в пересчете на MC-LR.

Определение нового штамма микроцистин-продуцирующей *Tychonema* sp. BBK16 и стимуляция биосинтеза токсинов у цианобактерий

Из биопленки, взятой с нижней поверхности дощатого пирса, получена культура цианобактерии, которая по морфологическим признакам соответствует роду *Tychonema*. Определение видовой принадлежности представителей клады *Phormidium*/*Microcoleus*/*Tychonema* сопряжено с трудностями ввиду их морфологической схожести. Морфология байкальского штамма имеет сходные признаки с представителями родов *Microcoleus* и *Phormidium*, а именно: рост в виде биопленок, наличие чехлов, конечные клетки трихомов заостренной формы. Но розовый цвет трихомов и развитая керитомия клеток харак-

терна для представителей рода *Tychonema* [20], что подтверждается данными филогенетического анализа фрагмента гена 16S рРНК.

Род *Tychonema* включает планктонные, тихопланктонные, бентосные и перифитонные виды [20]. Они являются продуцентами различных биоактивных веществ, таких как анатоксин и гомоанатоксин [9], геосмин и β-ионон [33], эругинозины и цианопептолины [34, 35], брунsvикамид [36] и тихонамид А и Б [37]. Бентосные виды *Tychonema* sp. обнаружены в биопленках пресноводного карстового ручья [27], в язвах больной байкальской губки [1] и в немецком оз. Мандихо [14]. В последние десятилетия описано много новых видов – продуцентов токсинов [38–41]. Мы впервые описали культуру бентосной микроцистин-продуцирующей цианобактерии рода *Tychonema*. Этот вид отличен от *Tychonema*, вызывающей язвенные поражения байкальских губок. Он способен продуцировать микроцистин LR, концентрация которого возрастает на три порядка с добавлением сточной воды в среду для

ТАБЛИЦА 1

Сравнение химического состава среды Z-8 и экспериментальных добавок с гидрохимическими характеристиками прибрежных и пелагических вод оз. Байкал

Гидрохимический показатель	Среда Z-8	Бутилированная вода	Очищенная сточная вода	Прибрежная вода	Пелагическая вода
pH	7.5±0.1	7.5±0.5	7.0±0.1	8.0±0.2 ¹	н. д.
Содержание, мг/л:					
HCO ₃ ³⁻	450±6	65±2	79±2	67.3±3.3 ²	66.3±1.3 ³
SO ₄ ²⁻	140±7	5.5±0.1	47±3	5.5±0.3 ²	5.5±0.1 ³
Cl ⁻	1.33±0.05	0.44±0.03	71±4	0.47±0.03 ²	0.44±0.03 ³
Na	264±8	3.4±0.1	78±10	3.26±0.10 ²	3.3±0.1 ³
K	83±4	1.0±0.1	21±1	0.98±0.05 ²	1.0±0.1 ³
Ca	17.2±0.4	16.8±0.4	34±4	15.9±0.5 ²	16.4±0.4 ³
Mg	36±2	3.0±0.1	5.4±0.4	3.0±0.1 ²	3.0±0.1 ³
PO ₄ ³⁻	69±12	0.012±0.005	20±3	0.010±0.005 ¹	0.037±0.002 ³
NO ₃ ⁻	97±14	0.40±0.02	115±24	0.25±0.10 ¹	0.40±0.02 ³
NH ₄ ⁺	н. о.	<0.005	8±2	<0.005 ³	<0.005 ³
Нефтепродукты	н. о.	н. о.	0.055±0.016	н. д.	0.021±0.006 ⁶
Синтетические анионные ПАВ	н. о.	н. о.	0.10±0.01	0.005±0.003 ⁴	0.002±0.001 ⁴
ХПК, мгО/л	3.4±0.9	3.3±0.8	138±23	6.0±4.0 ⁵	4.5±2.0 ⁵

Примечание: ПАВ – поверхностно-активные вещества; ХПК – химическое потребление кислорода;

н. д. – нет данных; н. о. – не обнаружено.

¹ Данные из [28].

² Данные из [29].

³ Данные из [24].

⁴ Данные из [30].

⁵ Данные из [31].

⁶ Данные из [32].

культивирования. Очевидно, что после очистки в сточной воде остаются вещества, стимулирующие метаболизм цианобактерий.

Показано, что у *Microcystis aeruginosa* присутствие аммония в среде коррелирует с синтезом аминокислот (предшественников микроцистина) и концентрацией микроцистина [42]. Культивирование цианобактерии *Cuspidothrix issatschenkoii* на средах с разными источниками азота стимулирует выработку анатоксина, причем органические соединения способствуют большему образованию токсина [43]. В экспериментах установлено, что совместное добавление минеральных форм фосфора и азота и органических соединений приводит к значительному увеличению продукции микроцистинов осцилляториевой цианобактерией *Planktothrix agardhii* [44]. В нашем опыте в очищенной сточной воде обнаружена повышенная концентрация нитратов, фосфатов и органических веществ.

Выявленный фенилаланин является изобарным аналогом анатоксина [45] и одним из предшественников микроцистина, поскольку непр-

теиногенная аминокислота (Adda) первой синтезируется из фенилаланина и ацетат-аниона [46] и является ключевым интермедиатом производства микроцистинов. Можно предполагать, что добавление сточной воды усиливает шикиматный метаболический путь биосинтеза, который составляет основу первичного метаболизма и является основным поставщиком субстратов для построения вторичных метаболитов. Кроме того, появление варианта микроцистина с серином может свидетельствовать об усилении гликолиза при синтезе этой аминокислоты. Ранее мы отмечали, что представители рода *Tycho-peta* активно колонизируют байкальские губки ввиду их способности усваивать органические вещества и аммоний, образующиеся в результате распада тел губок [15]. Мы полагаем, что массовое развитие цианобактерий *Tycho-peta* sp. в бентосных биоотложениях оз. Байкал также может быть обусловлено поступлением в водоем очищенных сточных вод, содержащих минеральные и органические соединения фосфора и азота. Молекулы микроцистина содержат больше азота, чем молекулы анатоксина, поэтому

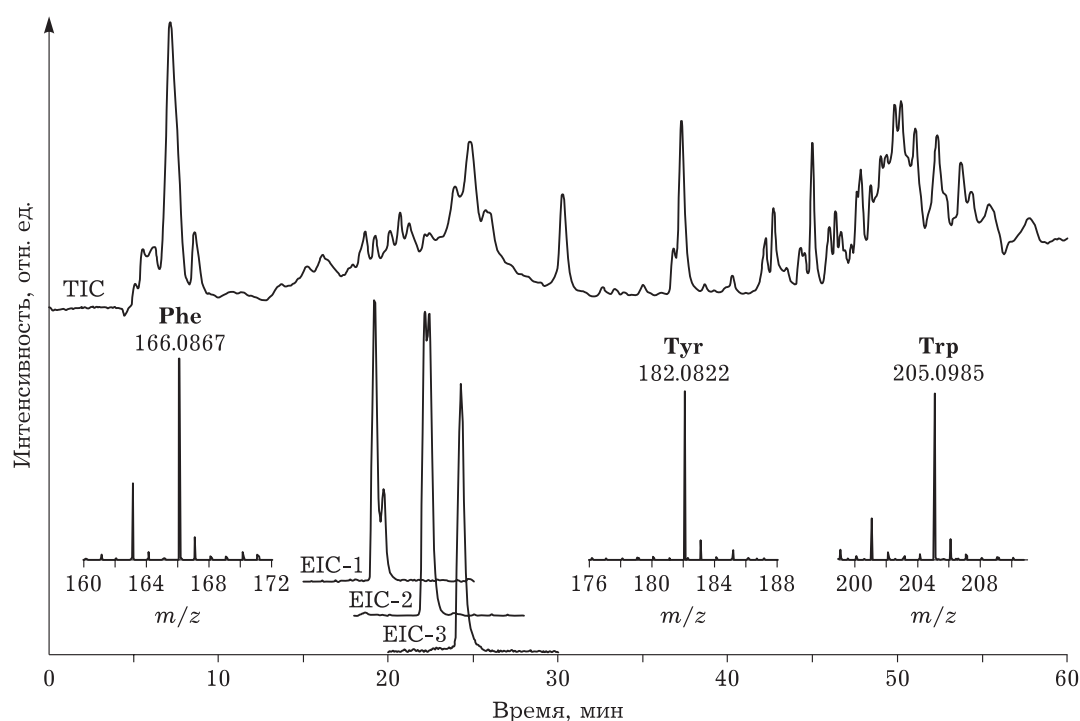


Рис. 3. Хроматограмма полного ионного тока (TIC) образца *Tychonema* sp. BVK16, полученного на среде с добавлением очищенной сточной воды, а также пики молекулярных ионов по выбранному ионному току: EIC-1 – фенилаланин (Phe), EIC-2 – тирозин (Tyr), EIC-3 – триптофан (Trp) и их масс-спектры.

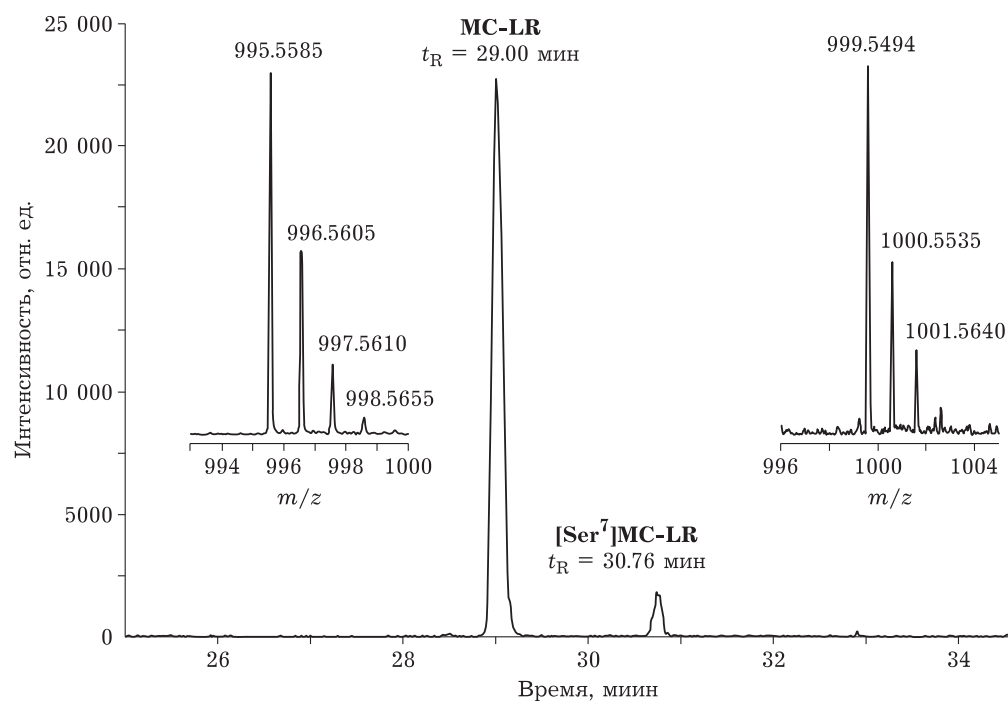


Рис. 4. Хроматограмма выбранного ионного тока (EIC) образца *Tychonema* sp. BVK16, полученного на среде с добавлением очищенной сточной воды, и масс-спектры в области молекулярных ионов MC-LR и $[\text{Ser}^7]\text{MC-LR}$. t_R – время удержания.

синтез микроцистина более зависим от наличия биогенов и веществ-предшественников. Усвоение дополнительного количества биогенов и ор-

ганических соединений цианобактериями оказывает стимулирующее воздействие на их метаболизм и синтез микроцистинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование штамма осцилляторной цианобактерии ВВК16, отнесенного к роду *Tychonema* – новому для оз. Байкал. Штамм *Tychonema* sp. ВВК16 продуцирует микроцистин, что отличает его от ранее изученных представителей этого рода. Экспериментально показано, что добавление очищенных сточных вод в среду для культивирования значительно меняет метаболизм цианобактерии и приводит к увеличению концентрации микроцистина в биопленке. Таким образом, попадание очищенных сточных вод в оз. Байкал может стимулировать продукцию цианотоксинов и создавать угрозу жизни и здоровью человека и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке национального правительства и в рамках государственного задания ЛИН СО РАН (темы № 0279-2021-0015 и 0279-2021-0005).

Авторы благодарят сотрудников УНУ “Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов” (<http://lin.irk.ru/aqua>) за предоставление условий культивирования цианобактерий и постановку эксперимента со сточной водой, а также Центр коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН за анализ метаболитов цианобактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belykh O. I., Fedorova G. A., Kuzmin A. V., Tikhonova I. V., Timoshkin O. A., Sorokovikova E. G. Microcystins in cyanobacterial biofilms from the littoral zone of Lake Baikal // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. P. 225–231.
- Timoshkin O. A., Samsonov D. P., Yamamuro M., Moore M. V., Belykh O. I., Malnik V. V., Sakirko M. V., Shirokaya A. A., Bondarenko N. A., Domysheva V. M., Fedorova G. A., Kochetkov A. I., Kuzmin A. V., Lukhnev A. G., Medvezhonkova O. V., Nepokrytykh A. V., Pasyunkova E. M., Poberezhnaya A. E., Potapovskaya N. V., Rozhkova N. A., Sheveleva N. G., Tikhonova I. V., Timoshkina E. M., Tomberg I. V., Volkova E. A., Zaitseva E. P., Zvereva Y. M., Kupchinsky A. B., Bukshuk N. A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // J. Great Lakes Res. 2016. Vol. 42. P. 487–497.
- Belykh O. I., Tikhonova I. V., Kuzmin A. V., Sorokovikova E. G., Fedorova G. A., Khanaev I. V., Sherbakova T. A., Timoshkin O. A. First detection of benthic cyanobacteria in Lake Baikal producing paralytic shellfish toxins // Toxicon. 2016. Vol. 121. P. 36–40.
- Ивачева М. А., Тихонова И. В., Сороковикова Е. Г., Краснопеев А. Ю., Потапов С. А., Чойдаш Б., Бельх О. И. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в бентосе озера Байкал // Изв. Иркутского гос. ун-та. Серия: Биология. Экология. 2016. Т. 17. С. 38–44.
- Mez K., Beattie K., Codd G., Hanselmann K., Hauser B., Naegeli H., Preisig H. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland // Eur. J. Phycol. 1997. Vol. 32, No. 2. P. 111–117.
- Quiblier C., Wood S., Echenique-Subiabre I., Heath M., Villeneuve A., Humbert J.-F. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management // Water Res. 2013. Vol. 47, No. 15. P. 5464–5479.
- Heath M., Wood S., Ryan K. Spatial and temporal variability in *Phormidium* mats and associated anatoxin-a and homoanatoxin-a in two New Zealand rivers // Aquat. Microb. Ecol. 2011. Vol. 64. P. 69–79.
- McAllister T. G., Wood S. A., Hawes I. The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity // Harmful Algae. 2016. Vol. 55. P. 282–294.
- Salmaso N., Cerasino L., Boscaini A., Capelli C. Planktic *Tychonema* (Cyanobacteria) in the large lakes south of the Alps: Phylogenetic assessment and toxigenic potential // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. Vol. 92, No. 10. Art. fiw155.
- Cantoral Uriza E. A., Asencio A. D., Aboal M. Are we underestimating benthic cyanotoxins? Extensive sampling results from Spain // Toxins. 2017. Vol. 9, No. 12. Art. 385.
- Wood S. A., Heath M. W., Holland P. T., Munday R., McGregor G. B., Ryan K. G. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (*Oscillatoriales*) associated with a dog poisoning in New Zealand // Toxicon. 2010. Vol. 55, No. 4. P. 897–903.
- Fastner J., Beulker C., Geiser B., Hoffmann A., Kröger R., Teske K., Hoppe J., Mundhenk L., Neurath H., Sagebiel D., Chorus I. Fatal neurotoxicosis in dogs associated with tychoplanktic, anatoxin-a producing *Tychonema* sp. in mesotrophic Lake Tegel, Berlin // Toxins. 2018. Vol. 10, No. 2. Art. 60.
- Conklin K. Y., Stancheva R., Otten T. G., Fadness R., Boyer G. L., Read B., Zhang X., Sheath R. G. Molecular and morphological characterization of a novel dihydroanatoxin-a producing *Microcoleus* species (cyanobacteria) from the Russian River, California, USA // Harmful Algae. 2020. Vol. 93. Art. 101767.
- Bauer F., Fastner J., Bartha-Dima B., Breuer W., Falkenau A., Mayer C., Raeder U. Mass occurrence of anatoxin-a- and dihydroanatoxin-a-producing *Tychonema* sp. in mesotrophic reservoir Mandichosee (River Lech, Germany) as a cause of neurotoxicosis in dogs // Toxins. 2020. Vol. 12, No. 11. Art. 726.
- Sorokovikova E., Belykh O., Krasnopeev A., Potapov S., Tikhonova I., Khanaev I., Kabilov M., Baturina O., Podlesnaya G., Timoshkin O. First data on cyanobacterial biodiversity in benthic biofilms during mass mortality of endemic sponges in Lake Baikal // J. Great Lakes Res. 2020. Vol. 46, No. 1. P. 75–84.
- Zvereva Yu., Medvezhonkova O., Naumova T., Sheveleva N., Lukhnev A., Sorokovikova E., Evstigneeva T., Timoshkin O. Variation of sponge-inhabiting infauna with the state of health of the sponge *Lubomirskia baikalensis* (Pallas, 1776) in Lake Baikal // Limnology. 2019. Vol. 20, No. 3. P. 267–277.
- Shams S., Capelli C., Cerasino L., Ballot A., Dietrich D. R., Sivonen K., Salmaso N. Anatoxin-a producing *Tychonema* (Cyanobacteria) in European waterbodies // Water Res. 2015. Vol. 69. P. 68–79.
- Timoshkin O. A., Moore M. V., Kulikova N. N., Tomberg I. V., Malnik V. V., Shimaraev M. N., Troitskaya E. S., Shirokaya A. A., Sinyukovich V. N., Zaitseva E. P., Domysheva V. M., Yamamuro M., Poberezhnaya A. E., Timoshkina E. M. Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia) // J. Great Lakes Res. 2018. Vol. 44. P. 230–244.
- Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria // Methods in Enzymology. Vol. 167. Cyanobacteria. L. Packer,

- A. N. Glazer (Eds.). San Diego, CA: Academic Press, 1988. P. 3–27.
- 20 Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota – 2. Teil: Oscillatoriales / Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/2. B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner, M. Schagerl (Eds.). Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. 759 p.
 - 21 Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 17, No. 19. P. 7843–7853.
 - 22 Wilmotte A., Van der Auwera G., de Wachter R. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis // FEBS Lett. 1993. Vol. 317, No. 1–2. P. 96–100.
 - 23 Huelsenbeck J. P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics (Oxford, England). 2001. Vol. 17, No. 8. P. 754–755.
 - 24 Khodzher T. V., Domyshova V. M., Sorokovikova L. M., Sakirko M. V., Tomberg I. V. Current chemical composition of Lake Baikal water // Inland Waters. 2017. Vol. 7, No. 3. P. 250–258.
 - 25 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 Kootokel (Russia, Lake Baikal Region) // Hydrobiologia. 2011. Vol. 671, No. 1. P. 241–252.
 - 26 Nivsarkar M., Acharya J., Rao P. V. L., Kaushik M. P. Simultaneous detection of anatoxin-a and microcystin-LR from cyanobacterial strains using high-performance liquid chromatography and LC-ESI-MS method // Indian J. Chem. 2002. Vol. 41A. P. 1867–1870.
 - 27 Arp G., Bissett A., Brinkmann N., Cousin S., De Beer D., Friedl T., Mohr K. I., Neu T. R., Reimer A., Shiraishi F., Stackebrandt E., Zippel B. Tufa-forming biofilms of German karstwater streams: Microorganisms, exopolymers, hydrochemistry and calcification // Geological Society, London, Special Publications. 2010. Vol. 336, No. 1. P. 83–118.
 - 28 Томберг И. В., Сакирко М. В., Домышева В. М., Сезько Н. П., Лопатина И. Н., Башенхаева Н. В., Филевич Е. А., Куликова Н. Н., Попова О. В., Мальник В. В., Лухнев А. Г., Зайцева Е. П., Потапская Н. В., Зверева Ю. М., Тимошкин О. А. Первые сведения о химическом составе интестициальных вод заплесковой зоны озера Байкал // Изв. Иркутского гос. ун-та. Серия: Биология. Экология. 2012. Т. 5, No. 3. С. 64–74.
 - 29 Голобокова Л. П., Сакирко М. В., Онищук Н. А., Погодаева Т. В., Сезько Н. П., Доля И. Н. Часть VI. Глава 4. Гидрохимическая характеристика вод литорали северо-западного участка Южного Байкала / Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Том 2. Водоемы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии. Книга 1. Под ред. О. А. Тимошкина, В. И. Провиз, Т. Я. Ситниковой и др. Новосибирск: Наука, 2009. С. 760–784.
 - 30 Nikonova A. A. Organic synthetic anionic surfactants as persistent organic pollutants of water ecosystems // Limnol. Freshwater Biol. 2020. No. 4. P. 620–621.
 - 31 Bondarenko N. A., Vorobyova S. S., Zhuchenko N. A., Golobokova L. P. Current state of phytoplankton in the littoral area of Lake Baikal, spring 2017 // J. Great Lakes Res. 2020. Vol. 46, No. 1. P. 17–28.
 - 32 Marinaite I. I., Zhuchenko N. A., Tomberg I. V., Onischuk N. A. The concentrations of petroleum products in the waters of Lake Baikal and its tributaries during different seasons from 2010 to 2019 // Limnol. Freshwater Biol. 2020. No. 4. P. 857–858.
 - 33 Zhang H., Song G., Shao J., Xiang X., Li Q., Chen Y., Yang P., Yu G. Dynamics and polyphasic characterization of odor-producing cyanobacterium *Tychonema bourrellyi* from Lake Erhai, China // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016. Vol. 23, No. 6. P. 5420–5430.
 - 34 Cerasino L., Capelli C., Salmasso N. A comparative study of the metabolic profiles of common nuisance cyanobacteria in southern perialpine lakes // Adv. Oceanogr. Limnol. 2017. Vol. 8, No. 1. P. 22–32.
 - 35 Ивачева М. А., Тихонова И. В., Кузьмин А. В., Сорокови́кова Е. Г., Потапов С. А., Краснопеев А. Ю., Чойдаш Б., Белых О. И. Цианобактерии озера Байкал – продуценты эругинозинов // Вопросы современной альгологии. 2018. Т. 16, No. 1. С. 1–7.
 - 36 Müller D., Krick A., Kehraus S., Mehner C., Hart M., Küpper F. C., Saxena K., Prinz H., Schwalbe H., Janning P., Waldmann H., König G. M. Brunsvicamides A–C: Sponge-related cyanobacterial peptides with *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase inhibitory activity // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49, No. 16. P. 4871–4878.
 - 37 Mehner C., Müller D., Krick A., Kehraus S., Löser R., Gütschow M., Maier A., Fiebig H.-H., Brun R., König G. M. A novel β -amino acid in cytotoxic peptides from the cyanobacterium *Tychonema* sp. // Eur. J. Org. Chem. 2008. Vol. 9, No. 10. P. 1732–1739.
 - 38 Izaguirre G., Jungblut A. D., Neilan B. A. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California // Water Res. 2007. Vol. 41, No. 2. P. 492–498.
 - 39 Brown J., Hawkes K., Calvaruso R., Reyes-Prieto A. Seasonality and distribution of cyanobacteria and microcystin toxin genes in an oligotrophic lake of Atlantic Canada // J. Phycol. 2021. Vol. 57, No. 6. P. 1768–1776.
 - 40 Berthold D. E., Lefler F. W., Huang I.-S., Abdulla H., Zimba P. V., Laughinghouse IV H. D. *Iningainema tapete* sp. nov. (Scytonemataceae, Cyanobacteria) from greenhouses in central Florida (USA) produces two types of nodularin with biosynthetic potential for microcystin-LR and anabaenopeptin production // Harmful Algae. 2021. Vol. 101. Art. 101969.
 - 41 Tavakoli Y., Mohammadipanah F., Te S. H., You L., Gin K. Y.-H. Biodiversity, phylogeny and toxin production profile of cyanobacterial strains isolated from lake Latyan in Iran // Harmful Algae. 2021. Vol. 106. Art. 102054.
 - 42 Chen Q., Wang M., Zhang J., Shi W., Mynett A. E., Yan H., Hu L. Physiological effects of nitrate, ammonium, and urea on the growth and microcystins contamination of *Microcystis aeruginosa*: Implication for nitrogen mitigation // Water Res. 2019. Vol. 163. Art. 114890.
 - 43 Tao S., Wang S., Song L., Gan N. Understanding the differences in the growth and toxin production of anatoxin-producing *Cuspidothrix issatschenkoi* cultured with inorganic and organic N sources from a new perspective: Carbon/nitrogen metabolic balance // Toxins. 2020. Vol. 12, No. 11. Art. 724.
 - 44 Davis T. W., Bullerjahn G. S., Tuttle T., McKay R. M. L., Watson S. B. Effects of increasing nitrogen and phosphorus concentrations on phytoplankton community growth and toxicity during *Planktothrix* blooms in Sandusky Bay, Lake Erie // Environ. Sci. Technol. 2015. Vol. 49, No. 12. P. 7197–7207.
 - 45 Furey A., Crowley J., Hamilton B., Lehane M., James K. J. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1082, No. 1. P. 91–97.
 - 46 Moore R. E., Chen J. L., Moore B. S., Patterson G. M. L., Carmichael W. W. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the adda and masp units // J. Am. Chem. Soc. 1991. Vol. 113, No. 13. P. 5083–5084.