

УДК 582.232:614.36-097.3:556.551(470+571)(476)(477)

Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины

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

Лимнологический институт Сибирского отделения РАН,
ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск 664033 (Россия)

E-mail: belykh@lin.irk.ru

(Поступила 18.12.12; после доработки 10.06.13)

Аннотация

Представлен обзор о гепатотоксинах микроцистинах, продуцируемых цианобактериями различных родов. Рассмотрены химическая структура и свойства микроцистинов, механизм их действия и токсикокинетика. Приведены методы анализа микроцистинов и генетическая основа их продукции. Представлены результаты по исследованию цианобактерий и их токсинов (микроцистинов) в различных водоемах России, Беларуси и Украины.

Ключевые слова: токсичные цианобактерии, *Microcystis*, *Anabaena*, оз. Байкал, оз. Котокельское, Балтийское море, Берешское водохранилище, р. Свислочь, р. Днепр, Каневское водохранилище, микроцистин, генетические маркеры

Оглавление

Введение	363
Химическая структура и свойства МС	364
Механизм действия МС	365
Токсичность МС	365
Токсикокинетика	366
Методы анализа МС	366
Генетическая основа продукции МС	367
Наши исследования	367
Сибирь	369
Водоохранилища ангарского каскада	369
Оз. Байкал	370
Оз. Котокельское	372
Берешское водохранилище	374
Балтийское море	375
Украина	375
Беларусь	375
Закключение	376

ВВЕДЕНИЕ

Цианобактерии (синезеленые водоросли, цианопрокариоты) – одна из самых древних на Земле группа организмов. Они возникли

около 3,5 млрд лет назад и сыграли важную роль в становлении атмосферы Земли, обогатив ее кислородом [1]. В настоящее время цианобактерии по-прежнему являются неотъемлемым компонентом водных и назем-

ных экосистем и распространены почти повсеместно, включая экстремальные экологические ниши: пустыни, термальные источники, озера Арктики и Антарктики [2].

Цианобактерии синтезируют большое количество вторичных метаболитов. Наиболее пристальное внимание исследователей привлекают токсины, поскольку они представляют опасность для жизни и здоровья человека и животных. Массовое развитие (“цветение”) цианобактерий в водоемах приводит к выделению токсинов и появлению технических и эстетических проблем при использовании воды для хозяйственных и рекреационных целей, а в некоторых случаях становится причиной нарушения и деградации всей экосистемы. Во время “цветения” водоемов концентрация токсинов в воде многократно возрастает на стадии гибели популяции цианобактерий, лизиса клеток и выхода из них токсинов; внутриклеточное содержание растворенных токсинов в молодых клетках обычно невысокое (0.1–10 мкг/л). В пресных и солоноватых водоемах выделяют две основные группы цианотоксинов в соответствии с их химической структурой: циклические пептиды (микроцистины и нодулярин) и алкалоиды (цилиндропермопсин, анатоксины, сакситоксины) [3, 4]. Помимо вторичных метаболитов, не участвующих в генеральном метаболизме, токсичность также проявляют структурные компоненты клеточных стенок цианобактерий – липополисахариды. Цианотоксины вызывают как острые, так и хронические отравления, а по действию на органы-мишени их разделяют на гепато-, нейро- и дерматотоксины.

Микроцистины (МС) – одни из самых известных и широко распространенных цианотоксинов в пресных водах, их основными продуцентами являются цианобактерии родов *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, которые зачастую вызывают токсичное “цветение” воды в продуктивных водоемах по всему миру [5].

ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МС

Впервые МС были изолированы из штамма *Microcystis aeruginosa* и названы в соответствии с родовым названием этих цианобактерий. В состав МС входят семь аминокислот:

цикло-(_D-Ala-**X**-_D-MeAsp-**Z**-Adda-_D-Glu-Mdha), где _D-Ala – _D-аланин, _D-MeAsp – _D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, Adda – 3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота, _D-Glu – _D-глутамат, Mdha – *N*-метилдегидроаланин, **X** и **Z** – вариабельные L-аминокислоты [6, 5]. Молекулярная масса МС варьирует от 500 до 4000 Да, для большинства вариантов она составляет 900–1100 Да. Аминокислота Adda – самая необычная структура в этой группе циклопептидов. Она обеспечивает характерную для МС и нодулярина абсорбцию при 238 нм благодаря наличию конъюгированной диеновой группы, и это свойство используется для разделения при ВЭЖХ [7]. В настоящее время идентифицировано более 90 вариантов МС [8]. Структурные варианты отмечены во всех семи аминокислотах, но наиболее часто в позиции вариабельных L-аминокислот: **X** (**X** – чаще всего лейцин, аргинин или тирозин, но возможны гомотирозин, аланин, фенилаланин, гомофенилаланин, метионин-S-оксид или триптофан) и **Z** (**Z** – аргинин или аланин, возможны аминокислоты: аминокислота, гомоаргинин или метионин-S-оксид). Наиболее часто встречается МС-LR, где вариабельные L-аминокислоты представлены лейцином и аргинином. Изоформы RR (аргинин-аргинин) и YR (тирозин-аргинин) менее распространены. Много вариантов образуется при метилировании/деметилировании _D-MeAsp и/или Mdha. Большинство МС содержит б-метиласпаргиновую кислоту, глутаминовую кислоту и аланин с метиламином, присоединенные к глутаминовой кислоте. В некоторых вариантах Mdha заменяется L-серином и _D-Ala _D-серином. Отдельные нетоксичные варианты идентифицированы как компоненты, содержащие 6Z-стереоизомер Adda. В целом некоторые структурные модификации Adda региона или ацилирование глутамата снижают токсичность МС и даже обеспечивают их нетоксичность. Этерификация (образование сложного эфира) свободной карбоксильной группы глутаминовой кислоты приводит к образованию неактивных структур (вариантов).

Микроцистины растворяются в воде, метаноле и этаноле и не растворяются в ацетоне, эфире, хлороформе и бензоле. Они ос-

таются стабильными в водоемах до 7 сут, но в течение продолжительного времени стабильны в фильтрованной или деионизированной воде. Микроцистины резистентны к химическому гидролизу или окислению при значениях рН, близких к нейтральным. При кипячении МС не разрушаются в течение нескольких часов. При высокой температуре (40 °С) и экстремально высоких или низких значениях рН (рН > 12 или рН ~ 1 соответственно) вследствие медленного гидролиза за 10 недель деградирует >90 % МС. Быстрый химический гидролиз МС возможен в лабораторных условиях, например при высокой температуре и добавлении 6 М HCl. Микроцистины окисляются озоном и другими сильными окислителями [3], очень стабильны при солнечном свете, в то время как быстро разрушаются под действием УФ в диапазоне абсорбционного максимума [9].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МС

Микроцистины в основном представляют собой гидрофильные пептиды (благодаря присутствию свободных карбоксильных групп и наличию аргинина) и не способны проникать через мембраны клеток животных; для их транспорта требуется АТФ-зависимый переносчик. Мультиспецифичный переносчик органических анионов (или переносчик желчных кислот) был описан в качестве переносчика циклических пептидов, в том числе МС [3]. Вследствие этого токсичность МС направлена на органы, осуществляющие перенос органических ионов через клеточные мембраны, в первую очередь на печень. При пероральном введении МС через подвздошную кишку (тонкий кишечник) посредством переносчиков попадают в кровь и далее концентрируются в печени в результате их активного захвата гепатоцитами. Некоторые МС, более гидрофобные, чем МС-LR, могут пересекать мембраны клеток другими способами, включая диффузию [3]. Микроцистины служат ингибиторами эукариотической серин/треонин фосфатазы 1 and 2A (PP1 и PP2A). Ингибирование PP1 и PP2A ведет к гиперфосфорилированию белков цитоскелета, что вызывает их деструкцию и приводит к деформации гепа-

тоцитов, потере клеточных контактов и способствует возникновению обширных кровоизлияний, вследствие чего печень увеличивается в размерах [10, 11]. Показано, что ингибирование фосфатаз и гиперфосфорилирование цитокератинов приводит к развитию рака в культурах гепатоцитов [12, 13]. Воздействие МС-LR в экспериментах с мышами вызывало иммунный ответ и продукцию восьми видов цитокинов, стимулирующих воспалительные реакции и рак [14]. Adda играет ключевую роль в токсичности МС, именно этот участок гептапептида взаимодействует с фосфатазами. Антагонисты МС – циклоспорин А, рифампицин и силумарин, предотвращающие токсичность МС в эксперименте [15].

ТОКСИЧНОСТЬ МС

Варианты МС отличаются различной токсичностью: LD₅₀ (полулетальная доза) при внутрибрюшинном введении у мышей варьирует от 50 до 1200 мкг/кг массы тела [5, 16]. Наиболее токсичным оказался МС-LR: его пероральная доза для мышей составляет 500–10 900 мкг/кг массы тела. При внутрибрюшинном введении МС-LR у мышей LD₅₀ варьирует от 25 до 150 мкг/кг массы тела (в среднем 50–60 мкг/кг массы тела) [3, 17]. Люди подвергаются воздействию МС при употреблении питьевой воды, таблетированных препаратов цианобактерий или через кожу при купании в озерах и реках [15]. Согласно рекомендациям ВОЗ, концентрация МС-LR в питьевой воде не должна превышать 1 мкг/л при однократном применении и 0.1 мкг/л для многократного потребления [18]. При использовании водоемов в рекреационных целях представляет угрозу численность цианобактерий 20 × 10⁶ кл/л и концентрация МС 2–4 мкг/л [19]. Употребление БАДов, содержащих водоросли (обычно это *Aphanizomenon flos-aquae* и *Spirulina*) опасно тем, что помимо этих видов в таблетках часто встречается токсичный *M. aeruginosa* [3, 20]. Первое сообщение о цианотоксинах датируется 1878 г., когда было зарегистрировано отравление лошадей, мелкого рогатого скота, собак и свиней цианобактерией *Nodularia spumigena*, образующей толстые пленки на дне р. Мур-

рей, Австралия [21]. Спустя 100 лет было показано, что этот вид продуцирует нодулярин – циклический пентапептид, схожий по клиническим симптомам и патогистологическим признакам с МС. Самым известным примером токсичности МС стало острое отравление сотен пациентов гемодиализного центра в Бразилии, 54 из которых погибли [22].

ТОКСИКОКИНЕТИКА

Исследования на лабораторных животных показали, что 50–70 % МС аккумулируется в печени, 7–10 % в тонком кишечнике, 1–5 % в почках, а оставшаяся часть распределяется по всему организму. Микроцистины резистентны к расщеплению в пищеварительном тракте, поскольку пептиды связаны в цепь d-аминокислотами и не чувствительны к гидролитическим ферментам; МС устойчивы к деградации в тканях [7]. Для их экскреции требуется желчь, поэтому печень играет основную роль в детоксикации МС [3].

На клеточном уровне действие МС проявляется в повышенной проницаемости мембран гепатоцитов, их вакуолизации, сокращении клеток и перераспределении органелл в фибробластах, в эндотелиальных и эпителиальных клетках, лимфоцитах [23–25]. Отмечено кардиотоксическое действие МС [26]. Кроме того, ингибирование фосфатаз может приводить к клеточной пролиферации, трансформации и, следовательно, к возникновению опухолей, как показали исследования Национального центра рака Японии [27] и подтвердили другие работы [12, 13, 28–30]. Длительным воздействием низких доз МС объясняется появление гепатоцеллюлярной карциномы у жителей Южного Китая, где “цветение” водоемов носит массовый характер, причем после введения контроля качества питьевой воды уровень заболеваний раком снизился [3].

Клинические симптомы при интоксикации МС следующие: диарея, тошнота, озноб, слабость, бледность [28]. Смерть при остром отравлении МС наступает в результате гиповолемического шока, вызванного быстрой и тяжелой обструкцией сосудов печени и обширными печеночными кровоизлияниями. Дерматологические симптомы при контакте с МС

следующие: волдыри на губах, аллергические реакции (контактный дерматит, астма, сенная лихорадка и конъюнктивит) [15]. Известен синдром, названный “дерматитом кулачков”, при котором наблюдается диарея, рвота, симптомы лихорадки, кожная сыпь, язвы во рту, раздражение глаз и ушей в течение 7 сут после воздействия воды, содержащей токсичные цианобактерии. Эти симптомы напрямую связаны с количеством клеток цианобактерий [3, 7].

МЕТОДЫ АНАЛИЗА МС

Для анализа цианотоксинов в воде и клетках цианобактерий разработан целый ряд методов, наиболее важные критерии их выбора – специфичность и чувствительность. Существует три основных методических подхода: биологический, физико-химический и биохимический. Биологические методы (биоанализ) включают использование мелких животных (мыши, кролики, ракообразные и др.) и микроорганизмов в качестве тест-объектов. Преимущество этого метода состоит в простоте и скорости анализа, но, во-первых, его применение ограничено по этическим соображениям, а во-вторых, он не дает информации о природе токсина. Физико-химические методы включают хроматографию: тонкослойную хроматографию (ТСХ, TLC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ, HPLC); масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми атомами (БАБ, FAB), ионизацией электрораспылением (ИЭР, ESI), с использованием режима регистрации по выбранным ионам (SIM) или по выбранным реакциям (SRM), ядерный магнитный резонанс (NMR, ЯМР). Физико-химические методы чувствительны и высокоэффективны для качественной и количественной оценки токсинов. Биохимические методы представлены иммуноанализом (ELISA) и ферментным анализом (ингибирование белковых фосфатаз, ацетилхолинэстераз и т. п.), они стали хорошей заменой биоанализу, но менее чувствительны, чем физико-химические методики, и более всего пригодны для быстрого скрининга проб при мониторинге.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА ПРОДУКЦИИ МС

Биосинтез МС осуществляется мультиферментным комплексом, который состоит из различных модулей нерибосомной пептид-синтетазы (NRPS), поликетидсинтазы (PKS) и дополнительных модифицирующих ферментов [31–34]. Модули NRPS содержат АТФ-зависимый домен аденилирования, который активирует специфичные или предпочтительные аминокислоты, пептидил-переносящий домен (PCP) для связывания субстрата во время сборки, и конденсирующий домен, который катализирует формирование амидных мостиков между PCP-связанными субстратами. Собранный молекула пептида освобождается из ферментного комплекса, обычно с помощью тиюэстеразного домена, который также может участвовать в прямой циклизации конечного продукта. Нерибосомные пептид-синтетазы осуществляют синтез линейных, циклических и разветвленных циклических пептидов, включая антибиотики, такие как пенициллин, ванкомицин, циклоспорин [35]. Поликетидсинтаза – мегасинтаза, образованная повторяющимися функциональными модулями, выполняет функции кетоацилсинтазы, кетоацилредуктазы, ацил- и метилтрансфераз, дегидратазы и ацил-переносящего белка.

Кластер генов, кодирующий комплекс МС-синтетазы, впервые открыт и описан для штаммов *Microcystis aeruginosa* K-139 [31], PCC 7806 [32]. Его длина составляет 55 тыс. п.н. (kb), он состоит из шести открытых рамок считывания (ORFs) смешанной NRPS/PKS (*mcyABCDE* и *mcyG*) и 4 ORFs, кодирующие домены с предполагаемой функцией модификации молекул предшественников и МС (*mcyF* и *mcyHIJ*). В последнее время гены, ответственные за синтез МС, определены у *Planktothrix agardhii* 126/8 [33] и *Anabaena* sp. 90 [34].

Между основными МС-продуцирующими родами *Microcystis*, *Anabaena* и *Planktothrix* существуют некоторые различия, как в организации генов *mcy*, так и в последовательности нуклеотидов [32–34]. Открытие кластера генов (*mcyABCDEFGHIJ*) позволило разработать маркеры, которые в дальнейшем были использованы для выявления потенциально токсичных видов, содержащих гены синтеза МС [31, 32, 36, 37]. Известно, что в разных

озерах в зависимости от экологических условий один и тот же вид может продуцировать или не продуцировать токсины [38]. Более того, различные штаммы одного вида могут быть токсичными и нетоксичными, причем при микроскопических исследованиях различить их невозможно. Метод молекулярно-биологической детекции генов синтеза токсинов позволяет определить потенциальную угрозу еще до появления в воде токсинов, которые выявляются аналитическими методами [39]. Наиболее часто используемыми генетическими мишенями являются *mcyABCDE* гены, с помощью которых выявлено присутствие токсигенных цианобактерий во многих водоемах мира [40–44].

НАШИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 2005 г. нами впервые в России начаты молекулярно-биологические исследования токсичных цианобактерий. В оз. Байкал и водохранилищах ангарского каскада (Иркутском, Усть-Илимском и Братском) с помощью генетических маркеров был проведен поиск потенциально токсичных цианобактерий [45, 46]. До наших исследований сведений о токсичных видах цианобактерий в оз. Байкал не было, а вопрос токсичных “цветений” целенаправленно не изучался. Байкал – крупнейшее и самое глубокое озеро в мире – является олиготрофным водоемом и содержит огромные запасы чистой пресной воды. Вместе с тем, наличие в озере хорошо прогреваемых в летнее время заливов, соров и мелководий (до 17–22 °С), усиливающаяся антропогенная нагрузка вследствие интенсивной туристско-рекреационной деятельности и вызванное ей массовое развитие фитопланктона, включая цианобактерии в прибрежных участках, определили наш интерес к исследованию этого объекта. Ранее на примере альпийских озер Швейцарии, где в течение нескольких лет наблюдалась гибель крупнорогатого скота при употреблении воды из озер, был показан риск развития токсичных цианобактерий и в олиготрофных водоемах [3].

За весь период исследований (2005–2012 гг.) были отобраны пробы в водоемах России (Иркутская обл., Республика Бурятия, Красно-

ярский край, Калининградская обл.), Украины и Белоруссии. В Иркутской области отбор проб проводили в пелагиали и прибрежных районах озера Байкал, в водохранилищах ангарского каскада: Иркутском (залив Еловый у пос. Патроны), Усть-Илимском (залив Вихорева, пос. Седаново, Нижнеилимский участок, Карапчанский залив у пос. Железнодорожный) и Братском (пос. Усть-Уда, залив Тангуй, залив Сухой Лог в черте г. Братска, Долоновское расширение); в Красноярском крае – в Берешском водохранилище, в Бурятии – в оз. Котокельское, в Калининградской области – в российской части Куршского залива Балтийского моря.

Планктонные пробы отбирали сетью Апштейна и батометром Рутнера с глубин 0–25 м с интервалом в 5 м. Одновременно с отбором проб определяли температуру и прозрачность воды по диску Секки. Батометрические пробы фиксировали раствором Люголя и концентрировали с помощью осадочного метода. Сетные пробы фиксировали формалином для микроскопического наблюдения и этанолом для молекулярно-биологического анализа (конечная концентрация 2 и 80 % соответственно). Химический анализ проб воды: содержание общего и фосфатного фосфора, нитратного, нитритного и аммонийного азота, перманганатной и бихроматной окисляемости – выполняли общепринятыми в гидрохимии пресных вод методами, описанными в работе [47]. Для определения концентрации хлорофилла *a* пробы фильтровали через поликарбонатные фильтры Millipore (США) с диаметром пор 0.45 мкм. Экстракцию проводили горячим метанолом [48], параметр *a* определяли с помощью спектрофотометра SmartSpec™ Plus (Bio-Rad, США).

Для изучения видового состава и оценки численности фитопланктона использовали световой микроскоп Axio Imager (Zeiss, Германия). Водоросли и цианобактерии просчитывали при увеличении в 400 и в 1000 раз в трех повторностях. Биообъем каждого вида устанавливали по средним размерам клеток, измеренным по микрофотографиям, которые были получены с помощью камеры AxioCam MRm (Pixera Corp., США) и программы Axio Vision (версия 4.7.2.0), входящей в комплект поставки микроскопа.

Для молекулярно-генетической детекции потенциально токсичных видов в первых работах [45, 46] применяли набор праймеров к генам МС-синтетазы *mscE* и *mscA* [40, 49, 50]. В последующих исследованиях в качестве маркера был выбран домен аминотрансферазы (АМТ) [51–53]. Аминотрансфераза входит в состав всех известных МС-синтетаз и, как недавно показано, нодулярин-синтетазы (*nda*), кодирующей синтез другого известного гепатотоксина – нодулярина, продуцируемого видами рода *Nodularia* [54]. Аминотрансфераза локализуется между NRPS и PKS-модулями генов *mscE* и *ndaF* и играет ключевую роль в биосинтезе МС и нодуляринов, выполняя перенос аминокислоты на Adda мотив [32, 54]. Домен АМТ найден у *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium*, содержащихся в пробах из разных водоемов, причем наличие АМТ-домена положительно коррелировало с продукцией МС и нодуляринов [50].

В качестве положительного контроля применяли два штамма токсичных цианобактерий *Microcystis aeruginosa* CALU 972 и 973, предоставленных Л. Н. Волошко (БИН, С.-Петербург). Токсичность штаммов предварительно тестирована на ракообразных *Daphnia magna* и на эндемичных *Epishura baicalensis* [45].

Наличие МС в пробах устанавливали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора Microcystins (ADDA), ELISA kit (Abraxis, США), который предназначен для количественного, чувствительного и высокоспецифичного определения МС в воде. Анализ основан на реакции взаимодействия антиген–антитело и представляет собой вариант “сэндвич”-ИФА. Процедуру анализа проводили согласно инструкции производителя, концентрацию МС рассчитывали, измеряя оптическую плотность (ОП) на иммуноферментном анализаторе EL301 (BioTek, США) при длине волны 450 нм. Оптическая плотность в лунках, измеренная спектрофотометрическим способом, обратно пропорциональна концентрации МС в исследуемых образцах. Обработку результатов проводили с помощью программы RIDA SOFT Win (R-Biofarm, Германия). Калибровочную кривую строили методом линейной регрессии на

основании измерений ОП в реакциях со стандартными растворами, содержащими известные концентрации МС. Статистическую обработку данных (расчет стандартного отклонения) проводили с помощью программы Microsoft Excel 2010 для Windows (Microsoft, США).

Варианты токсинов в пробах определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Для детекции МС концентрированную пробу фитопланктона пятикратно подвергали процедуре “замораживание–оттаивание” и высушивали при температуре 60 °С до постоянной массы. Высушенный образец экстрагировали метанолом, упаривали досуха на роторном испарителе ИКА RV 05 Basic (ИКА-WERKE, Германия). Сухой остаток перерастворяли в 0.5 мл метанола перед хромато-масс-спектрометрическим (ЖХ-МС) определением. Анализ ЖХ-МС выполняли с использованием хроматографа Agilent HP 1200 (Hewlett Packard, США) в сочетании с времяпролетным масс-спектрометром Agilent 6210 (Agilent Technologies, США) ионизацией методом электростатического распыления (ESI) в режиме регистрации положительных ионов.

Сибирь

Водохранилища ангарского каскада.

В Усть-Илимском водохранилище в августе 2005 г. отмечалось массовое развитие цианобактерий *Aphanizomenon flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *M. pulverea*. Численность *A. flos-aquae* составляла 100 млн кл/л, *M. aeruginosa* – 500 тыс. кл/л, *M. pulverea* – 300 тыс. кл/л. Характерное для данного водоема “цветение” воды с преобладанием *A. flos-aquae* (до 1.4 млрд кл/л) регистрируется с периода заполнения водохранилища (1975–1977 гг.) [55]. Следует отметить, что в предыдущие годы численность *M. aeruginosa* в летне-осеннее время в водохранилище была ниже, в среднем 200–400 тыс. кл/л.

В 2010 г. в Усть-Илимском водохранилище численность и биомасса цианобактерий составляли 4.0 млн кл/л и 16.2 мг/м³ соответственно, по биомассе доминировали *Aphanizomenon flos-aquae* и *Anabaena lemmermannii*. В пробах 2005 и 2010 гг. обнаружены гены синтеза МС, принадлежащие родам *Microcystis*

и *Anabaena* (рис. 1, 2). Концентрация МС в воде, измеренная методом ИФА, в 2010 г. составляла (0.25±0.02) мкг/л. Основной вид, вызывающий “цветение” воды в Усть-Илимском водохранилище, – *Aphanizomenon flos-aquae*. Согласно полученным данным, он не синтезирует МС, но может быть потенциальным продуцентом других цианотоксинов.

В Братском водохранилище массовое развитие цианобактерии *Anabaena flos-aquae*, содержащей гены синтеза МС, отмечалось в 2005 г. в заливе Сухой Лог в районе городского водозабора Братска, в 2012 г. – в заливе Тангуй (см. рис. 2). Концентрации МС в воде не измеряли [56].

В Иркутском водохранилище мониторинг токсин-продуцирующих цианобактерий проводили в 2005, 2006, 2010 гг. в заливе Еловый у пос. Патроны. В составе фитопланктона потенциально токсичные виды цианобактерий обнаружены в 2005 и 2006 гг., ПЦР-анализ на гены синтеза МС был отрицательным. По данным автора [55], в Иркутском водохранилище потенциально токсичные виды *Anabaena lemmermannii*, *A. flos-aquae* и *Aphanizomenon flos-aquae* встречаются часто, но довольно редко преобладают в сообществе. Таким образом, риск развития токсичных цветений в Иркутском водохранилище невысокий.

Согласно результатам проведенных исследований, потенциально токсичные цианобактерии родов *Microcystis* и *Anabaena*, содержащие гены синтеза МС, присутствуют в Усть-Илимском и Братском водохранилищах, которые по биомассе водорослей и содержанию хлорофилла характеризуются как мезотрофные водоемы с наличием эвтрофных участков [56]. Данные водохранилища подвержены сильному антропогенному влиянию, концентрация органических веществ и биогенных элементов в них превышает ПДК. В настоящее время по содержанию загрязняющих веществ р. Вихорева, вблизи устья которой отмечено “цветение” токсин-продуцирующих видов, входит в перечень наиболее загрязненных водных объектов. В нее сбрасывают сточные воды ОАО “Братский ЦКК” и жилищно-коммунальные хозяйства городов Братск и Вихоревка, концентрации органических веществ и био-

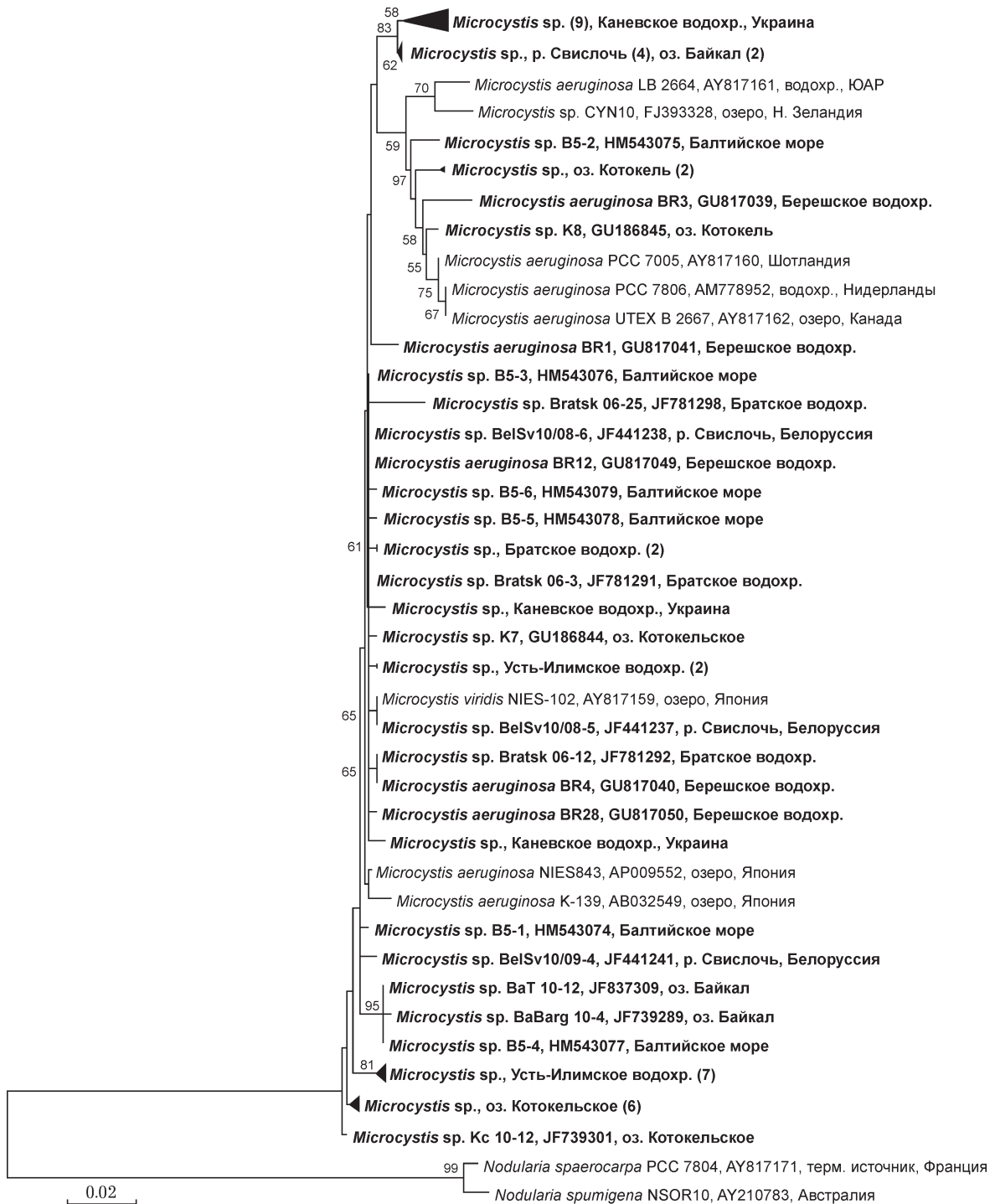


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основе последовательностей домена АМТ гена *mcyE* цианобактерий рода *Microcystis*. В качестве аутгруппы использованы последовательности гена *ndaF* рода *Nodularia*. Нуклеотидные последовательности, полученные авторами, выделены жирным шрифтом. В узлах ветвления указаны результаты бутстреп-анализа. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

генных элементов (аммонийного и нитритного азота, минерального фосфора) в реке превышают ПДК в несколько раз [57].

Оз. Байкал. Микроскопическое наблюдение фитопланктона в оз. Байкал показало, что в зимне-весенний период в пелагиали присут-

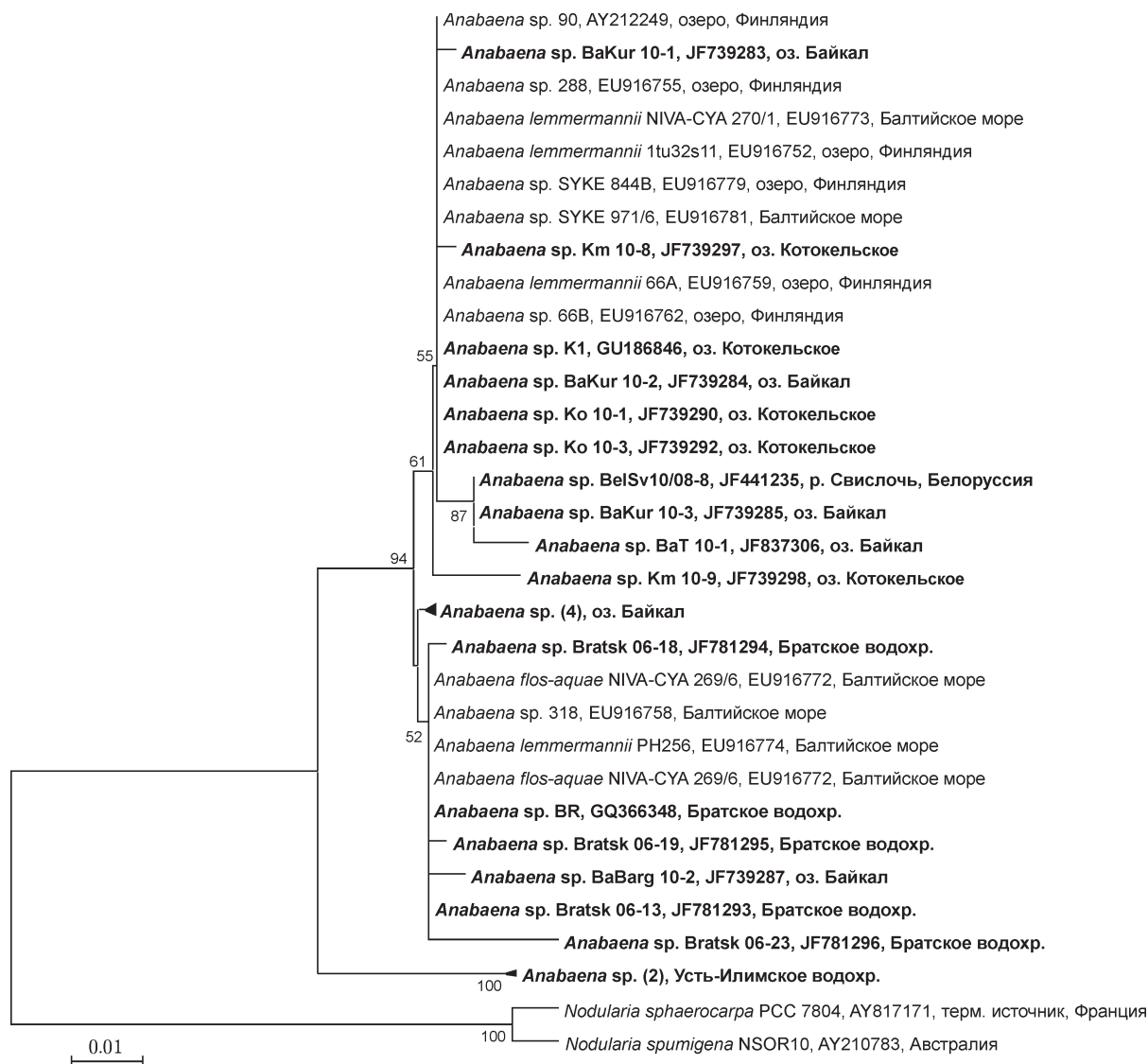


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе последовательностей домена АМТ гена *mcyE* цианобактерий рода *Anabaena*. В качестве аутгруппы использованы последовательности гена *ndaF* рода *Nodularia*. Нуклеотидные последовательности, полученные авторами, выделены жирным шрифтом. В узлах ветвления указаны результаты бутстреп-анализа. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов.

ствуют пять видов нанопланктонных цианобактерий: *Microcystis pulverea*, *Anabaena* sp., *Chroococcus limneticus*, *Gomphosphaeria lacustris*, *Planktolyngbia* sp. Численность этих цианобактерий не превышала 10 тыс. кл/л. Летом в планктоне наблюдали *Microcystis aeruginosa*, *Coelosphaerium kuetsingianum*, *Planktolyngbya* sp. в концентрации до 10 тыс. кл/л. В пробах фитопланктона из пелагиали оз. Байкал в 2005–2009 гг. гены, кодирующие синтез МС, не обнаружены.

В 2010–2011 гг. отбор проб для мониторинга генов синтеза цианотоксина производили не только в пелагиали, но и в заливах и прибрежных участках оз. Байкал в июле–августе, в период максимального прогрева воды. Установлено, что в пелагиали потенциально токсичных видов цианобактерий нет; в заливах отмечено семь видов, среди которых доминировали виды рода *Anabaena*: *A. lemmermannii*, *A. spiroides*, *A. scheremetievi*, *A. zinserlingii*, – а также встречались *Gloeotrichia echinulata* и *Trichodesmium lacustre*.

Положительный результат ПЦР получен для проб, отобранных в Баргузинском и Чивыркуйском заливе, заливах Куркут и Мухор (пролив Малое Море), в заливе Турка. За весь период мониторинга планктона оз. Байкал гены синтеза МС (с 2005 г.) выявлены впервые. Сравнительный и филогенетический анализ полученных последовательностей АМТ-домена *msyE*-гена показал, что в планктоне заливов оз. Байкал присутствовали цианобактерии родов *Anabaena* и *Microcystis* (см. рис. 1, 2). В 2010 г. определяли концентрацию МС в воде методом ИФА. В оз. Байкал МС обнаружены в прибрежной зоне около пос. Турка, их концентрация составляла (0.17 ± 0.02) мкг/л, что не превышает ПДК, установленную Всемирной организацией здравоохранения [18]. Побережье у с. Турка входит в границы Особой экономической зоны туристско-рекреационного типа “Байкальская гавань”. В 2010 г. началось строительство туристических объектов в районе с. Турка. Увеличение потока отдыхающих и загрязнение воды биогенными элементами могут ухудшить ситуацию с летним “цветением” воды цианобактериями в прибрежных участках оз. Байкал, а наличие токсигенных штаммов в составе фитопланктона представляет потенциальную угрозу для населения.

Оз. Котокельское. Комплексный подход с использованием микроскопических, молекулярно-генетических и аналитических методов, апробированный нами ранее при изучении водоемов Иркутской области, применен при исследовании проб из оз. Котокельское (Бурятия) [51, 53]. Это озеро – крупный промышленный водоем, расположенный в 2 км от восточного берега оз. Байкал и связанный с ним посредством системы мелких рек. Озеро Котокельское представляет собой объект туристско-рекреационной зоны “Байкальская гавань”, здесь расположено множество турбаз и пансионатов. Летом 2008 г. на озере была зарегистрирована массовая гибель рыб, водоплавающих птиц и домашних кошек, отмечено 16 случаев отравлений человека, связанных с употреблением в пищу леща, выловленного в озере. У всех пострадавших наблюдались симптомы “гаффской” болезни (алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии). Этиология “гаффской” болезни, также назы-

ваемой юксовско-сартланской, недостаточно изучена, в качестве одной из возможных причин указывают действие биологически активных веществ цианобактерий. С июня 2009 г. на озере действует запрет на употребление в пищу рыбы, купание и использование воды для бытовых и хозяйственных нужд.

Озеро Котокельское, как показали наши исследования, по концентрации общего фосфора, содержанию хлорофилла *a* и прозрачности относится к водоемам эвтрофного типа. В фитопланктоне озера обнаружены 25 видов цианобактерий, преобладала *Aphanocapsa holsatica* (53–98.5 % от общей численности). Среди цианобактерий, обнаруженных в планктоне оз. Котокельское, наиболее известные потенциальные продуценты МС – виды родов *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*) и *Anabaena* (*A. lemmermannii*, *A. flos-aquae*, *A. circinalis*). Численность и биомасса цианобактерий в батометрических пробах составили 6.17 млн кл/л и 3.87 г/м³ соответственно. Поиск токсичных цианобактерий в планктоне оз. Котокельское в августе 2008–2009 гг. проводили с помощью маркеров к домену аминотрансферазы генов *msyE* и *ndaF* [51, 53]. При ПЦР-анализе получен положительный результат. Данные филогенетического исследования выявили высокое сходство (97–100 %) полученных ампликонов с *msyE*-генами токсичных цианобактерий *Microcystis* и *Anabaena* (см. рис. 1, 2). Последовательности *msyE*-гена *Microcystis* spp. имели 98–99 % сходства с последовательностями штаммов *M. viridis*, *M. aeruginosa* и *M. wesenbergii*, выделенных при токсичных “цветениях” озер Касумигаура и Кавагучи (Япония) и водоемов Европы и Северной Америки. Последовательности *msyE* гена *Anabaena* sp. отличались 100 % гомологией с последовательностями штаммов рода *Anabaena* из скандинавских озер. Количество клонов *Microcystis* spp. на порядок превышало таковое для *Anabaena* spp. Наши данные согласуются с результатами, полученными при анализе фитопланктона озер Финляндии [38]. Авторы показали, что род *Microcystis* включает большее количество токсичных генотипов по сравнению с *Anabaena*. Так, несмотря на более высокую концентрацию *Anabaena* по сравнению с *Microcystis*, последний был основным продуцентом МС.

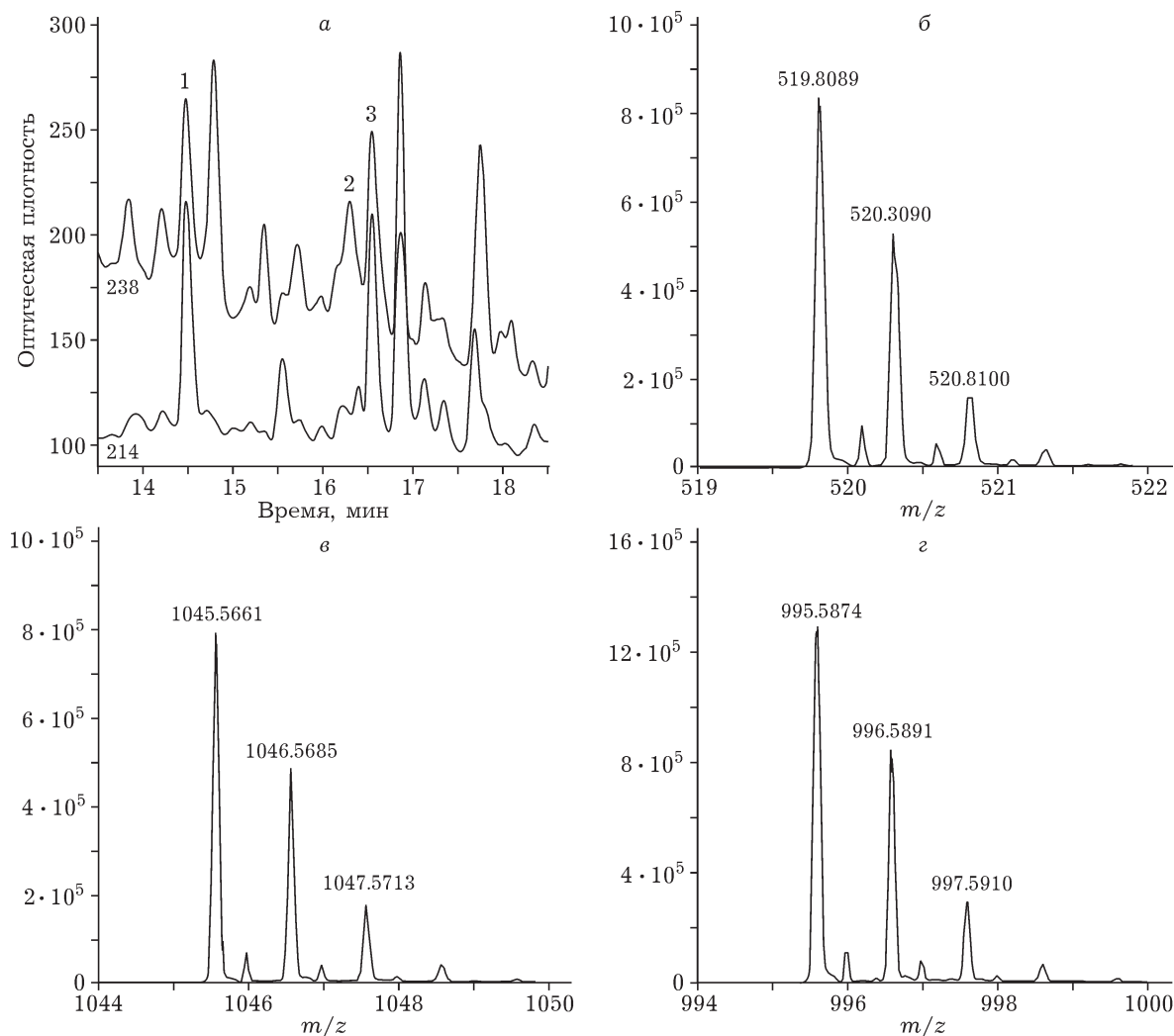


Рис. 3. ВЭЖХ-МС определение микроцистинов в экстракте из фитопланктона оз. Котокельское. а – хроматограмма экстракта микроцистинов: 1 – микроцистин-RR ($T_R = 14.50$ мин), 2 – микроцистин-YR ($T_R = 16.55$ мин), 3 – микроцистин-LR ($T_R = 16.86$ мин); б-д – масс-спектры для пиков 1-3 соответственно.

По данным хроматографического анализа, для экстракта фитопланктона наблюдаются три пика с временами удерживания 14.5, 16.55 и 16.86 мин. УФ-спектры полученных пиков характерны для микроцистинов (рис. 3, а). Данные ЖХ-МС подтвердили присутствие трех МС с характеристическими отношениями m/z : МС-RR ($m/z = 519.8089 [M + 2H]^{2+}$) МС-LR ($m/z = 995.5874 [M + H]^+$), МС-YR ($m/z = 1045.5661 [M + H]^+$) (см. рис. 3, б-д). Концентрации МС рассчитаны с использованием коэффициента молярной экстинкции для МС-LR [58]. Соотношение МС было следующим: МС-RR – 49 %, МС-LR – 42.5 %, МС-YR – 8.5 %; суммарное содержание МС в пересчете на сухую массу составило 53 мкг/г. Для сравнения:

суммарная концентрация МС в фитопланктоне пресных водоемов Китая достигала 7300, Португалии – 1600–7100 мкг/г сухой массы [5]. В скандинавских озерах при массовом развитии *Microcystis* средняя концентрация МС достигала 770 мкг/г сухой массы, а для *Anabaena* она составляла 107 мкг/г сухой массы.

Штаммы *Microcystis* и *Anabaena* обычно синтезируют более двух вариантов МС одновременно, причем представители этих родов способны продуцировать МС одного варианта [5, 59]. Так, обнаруженные нами в оз. Котокельское варианты МС могут синтезировать как *Microcystis*, так и *Anabaena*. В пробах, которые обычно содержат несколько штаммов одного или более токсин-продуцирующе-

го вида, выявлено разнообразие вариантов МС. Во время “цветения” *Microcystis* spp. в оз. Хомер (США) определены 19 различных МС, в Австралии при массовом развитии *M. aeruginosa* – 23 варианта МС, при этом МС-LR-варианта среди них не обнаружено. При токсичном “цветении” *Anabaena* spp. в пробах наблюдалось меньшее количество изоформ; напротив, штаммы *Anabaena*, изолированные из пресных озер Финляндии, продуцировали 17 вариантов МС, где кроме МС-LR определен МС-RR и деметилированные формы [5].

В оз. Котокельское незначительно преобладал наименее токсичный МС-RR, доля высокотоксичного МС-LR в суммарном содержании МС была меньше, а вклад МС-YR, характеризующегося средней токсичностью, оказался самым низким. Состав и соотношение МС в оз. Котокельском сопоставимы с таковыми для озер Японии, где в основном доминируют МС-LR, МС-RR и МС-YR. Однако содержание МС в озерах Японии более высокое: сумма трех МС достигала 2100 мкг/г сухой массы [5]. Показано, что у большинства штаммов из озер Японии преобладает МС-RR [59, 60]. В водоемах Таиланда среди трех основных вариантов МС (LR, YR и RR) преобладает МС-RR.

В целом МС-LR – доминирующий токсин в водоемах Европы, Канады и Северной Америки [3]. В оз. Онтарио с токсиногенными *Microcystis*, *Anabaena* и *Planktothrix* определено пять вариантов МС, включая RR, YR, LR [44]. Как и в западной части оз. Эри и Гурон, здесь преобладает МС-LR (50–100 %), а также МС-RR или МС-LA, в зависимости от станции [61]. Последующий анализ состава МС в другой части оз. Эри показал, что здесь преимущественно встречаются деметилированные изоформы dRR (63 %) и dLR (12 %), в прибрежной части озера – МС-LR (78 %), а доля МС-RR достигала 22 % [62]. В Великих озерах МС-YR оказался практически минорным компонентом: его доля составляла 9–23 % в суммарном содержании МС [44, 61, 62].

Сходство между оз. Котокельское и небольшими озерами Японии наблюдается не только в вариантах и соотношениях МС. Нами также выявлено генетическое родство токсиногенных видов *Microcystis* для этих озер.

В целом, для вариантов МС отмечается географическая приуроченность. Так, значительное разнообразие вариантов в позиции L-аминокислот зарегистрировано в Южной Африке, довольно часто деметилированные изоформы встречаются в штаммах из озер Финляндии [5]. Частично это распределение отражает региональные различия в видовом составе цианобактерий. В случае с оз. Котокельское наблюдается некоторое сходство вариантов МС с озерами восточно-азиатского региона, но вместе с тем некоторые МС-продуцирующие виды из озера имеют высокое сходство *msyE*-гена с изолятами из озер Европы и Северной Америки.

У штаммов *A. lemmermanii* из финских озер, филогенетически близких последовательностям *Anabaena* sp. из оз. Котокельское, в качестве основных МС фигурируют МС-LR, МС-RR и деметилированные варианты Mdha. В низкой концентрации также зафиксированы деметилированные варианты MeAsp [63]. У штамма *A. lemmermanii* 66A преобладали производные гомотирозина (Hty) и гомофенилаланина (Hph).

Цианобактерии, содержащие гены МС-синтетазы и синтезирующие МС в водоеме, расположенном вблизи Байкала и имеющем с ним прямую водную связь, могут быть потенциально опасными для глубочайшего озера мира. Наличие токсиногенных цианобактерий и МС в заливах и мелководных участках оз. Байкал, особенно в районе пос. Турка, куда через систему рек впадают воды оз. Котокельское, свидетельствует о возможном заносе МС-продуцирующих цианобактерий из этого водоема. Известно, что распространению цианобактериального “цветения” способствует миграция МС-продуцирующих генотипов между водоемами. Токсичные виды попадают в озеро из расположенных поблизости мелких озер и луж в результате переноса водных масс во время штормов либо при перемещении рыбачьих лодок, оборудования и др. Подобный факт был описан и для Великих озер (оз. Онтарио) [44].

Берешское водохранилище. Помимо водоемов Байкальского региона в Сибири исследовано Берешское водохранилище – гиперэвтрофный водоем-охладитель Березовской ГРЭС (Красноярский край), где в массовом количестве развивались *M. aeruginosa* и

Anabaena flos-aquae. По данным генетического анализа, в пробах из водоема-охладителя в больших количествах содержатся последовательности АМТ-домена, которые на 97–99 % схожи с изолятами *M. aeruginosa* – возбудителями токсичных “цветений” в различных водоемах мира [64].

Балтийское море

С помощью метода молекулярно-генетической детекции в Куршском заливе – гиперэвтрофной пресноводной лагуне Балтийского моря – обнаружены цианобактерии рода *Microcystis*, содержащие гены синтеза МС [52]. За период мониторинга с апреля по ноябрь 2002–2008 гг. здесь выявлен 91 вид цианобактерий. Среди них преобладали и вызывали “цветение” шесть потенциально токсичных видов: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena* sp., *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*, *Planktothrix agardhii*. Биомасса цианобактерий была значительной, варьируя в среднем за вегетационный период от 10 до 113 г/м³, что составляло до 82 % от всей биомассы фитопланктона. Последовательности АМТ-домена *mscE*-генов из Куршского залива имели наибольшее сходство с таковыми у *M. aeruginosa* и *M. viridis*. Акватория залива входит в состав туристско-рекреационной зоны “Куршская коса” и активно используется населением. Ввиду интенсивных и продолжительных “цветений” воды, вызванных потенциально токсичными и токсигенными цианобактериями, экологическая ситуация в Куршском заливе считается неблагоприятной.

Украина

В отличие от холодных водоемов Восточной Сибири, наличие токсичных МС-продуцирующих цианобактерий в продуктивных водоемах Украины было предсказуемым [65]. Пробы отбирались в Киевском и Каневском водохранилищах, в прудах и озерах Киева и Киевской области, в р. Днепр и его заливах в 2009–2010 гг. В 2009 г. ПЦР-анализ на наличие генов, кодирующих синтез микроцистинов, был положительным для 68 % иссле-

дованных водоемов Украины, в 2010 г. – для 90 % водоемов. Показано, что “цветение” токсичных цианобактерий характерно для сообществ с доминированием нескольких видов, в то время как в монодоминантных сообществах оно не выявлено. Нами проанализированы 34 культуры из коллекции Института гидробиологии НАН Украины. ПЦР-анализ штаммов выявил наличие *mscE*-гена у одной культуры, которая, по данным определения последовательности гена 16S рРНК, принадлежит роду *Fischerella*. Таким образом, нами впервые установлено наличие *mscE*-гена у этого рода. С помощью хромато-масс-спектрометрии в фитопланктоне Каневского водохранилища определены микроцистины LR, RR, YR и др., а также эругинозины – линейные пептиды, обладающие противотромбиновой активностью.

Таким образом, токсигенные цианобактерии с высокой частотой встречаются в водоемах Украины, причем в большинстве проб, отобранных в черте Киева и его окрестностях. Анализ показал, что потенциально токсичными являются представители рода *Microcystis*. Очевидно, что природоохранным органам и предприятиям, осуществляющим водозабор и водоподготовку, следует обратить внимание на полученные результаты.

Беларусь

Исследован видовой состав цианобактерий, их количественное развитие (численность и биомасса) в хозяйственно важных и рекреационных водоемах Минска (Республика Беларусь): водохранилище Дрозды, Комсомольское озеро и проточные участки р. Свислочь в пределах города [66]. Река Свислочь с водоемами-водохранилищами подвергается различным антропогенным воздействиям. В настоящее время, несмотря на предпринимаемые мероприятия по улучшению качества ее вод, это наиболее загрязненная река Беларуси. В августе 2006–2010 гг. по биомассе здесь преобладали *Aphanothece clathrata* (10–66 %), *Microcystis aeruginosa* (8–57 %), *M. wesenbergii* – (5–18 %), *M. viridis* (8–13 %), *Synechococcus aeruginosus* (25–50 %), *Aphanizomenon flos-aquae* (10–20 %), из девяти ви-

дов рода *Anabaena* наиболее значимые *A. flos-aquae* и *A. lemmermannii*, из других родов – *Planktothrix agardhii*. Биомасса цианобактерий на станциях р. Свислочь в местах отдыха достигала в отдельные годы 30–40 мг/л, а их численность – $2 \cdot 10^9$ кл/л, что многократно превышает показатели, рекомендованные ВОЗ для рекреационных водоемов – $20 \cdot 10^6$ кл/л [19]. Из проб фитопланктона р. Свислочь (станция на ул. Ванеева, август и сентябрь 2010 г.) получено восемь последовательностей *тсyE*-гена, семь из которых принадлежали цианобактериям рода *Microcystis*, а одна – *Anabaena* (см. рис. 1, 2). Последовательности *Microcystis* sp. имели высокую степень сходства (98–99 %) с последовательностями штаммов *M. aeruginosa*, *M. viridis* и *M. wesenbergii*, выделенных во время токсичных “цветений” водоемов Японии, Нидерландов, США и ЮАР.

Таким образом, во всех исследованных водоемах обнаружены виды рода *Microcystis* и *Anabaena*, содержащие *тсyE*-гены, которые кодируют синтез МС. При этом среди них преобладают представители рода *Microcystis*, как и в большинстве пресных водоемов мира.

Известно, что более 80–90 % проб из водоемов Дании, Германии, Чехии и Кореи, где доминируют *Microcystis*, содержат МС [5]. Максимальное количество токсичных штаммов найдено у *M. aeruginosa*, примерно половина из них имеют *тсy*-гены и продуцируют МС, при этом концентрация МС у штаммов *M. aeruginosa* выше по сравнению с токсичными штаммами других видов *Microcystis* [59, 60, 67, 68]. Анализ *Microcystis* spp. из озера Ванзее (Германия) выявил, что 73 % колоний *M. aeruginosa* содержали *тсy*-гены [69]. Часто численность *Microcystis* spp. при токсичном “цветении” превышает предельные значения не только в тропической, но и в зоне умеренных широт. Например, в Великих озерах Гурон и Эри численность *Microcystis* spp. составляла 13–50 и 5–34 млн кл/л соответственно [61], а в оз. Ванзее достигала 610 млн кл/мл [70], что многократно превышает концентрации *Microcystis* spp. в исследованных нами водоемах.

МС-продуцирующие штаммы *Anabaena* обнаружены во многих водоемах мира, “цветения” *Anabaena* обширны в солоноватых водах Балтийского моря [5]. Однако в пресных

водоемах разного трофического уровня *Anabaena* редко является единственным доминирующим видом. В 15 % мезотрофных и 25 % эвтрофных озер одновременно встречаются токсигенные *Microcystis* и *Anabaena* [49]. *Anabaena*, благодаря способности фиксировать азот, может развиваться в условиях его лимитирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным международной гидрологической программы UNESCO “CYANONET”, “цветение” цианобактерий и связанное с ним появление токсинов выявлено в водоемах и водотоках 65 стран мира [71]. В одном из последних обзоров Россия и исследованные нами страны СНГ не отмечены на карте токсичных “цветений” [4]. Нами установлено, что в большинстве изученных водоемов Восточной Сибири, Украины, Беларуси присутствуют токсигенные цианобактерии, способные синтезировать МС. Полученные данные согласуются с работой финских исследователей, показавших, что в странах с холодным климатом МС-продуцирующие виды обитают в 91 % озер [49].

Для выяснения возможности хозяйственного и рекреационного использования водоемов, где наблюдается массовое развитие цианобактерий, без риска для здоровья людей необходим мониторинг концентрации цианотоксинов в воде с помощью аналитических методов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 05-04-97222, 09-04-90420, 10-04-01613, 11-04-92220, 11-04-972220, 12-04-90012), Президента РФ (проект № МК-1239.2010.4), Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН 2006 г. (проект № 140) и Лимнологического института СО РАН (проект № 01201052128).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Schopf J. W., Walter M. R. // The Biology of the Cyanobacteria / N. G. Carr and B. A. Whitton (Eds.). Oxford: Blackwell, 1982. P. 543–564.
- 2 Castenholz R. W., Waterbury J. B. Group I. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 3. / N. R. Krieg, J. G. Holt (Eds.). Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. P. 1710–1728.
- 3 Chorus I., Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management // World Health Organization. London: Für WHO durch E & FN Spon / Chapman & Hall, 1999. 416 pp.

- 4 Zurawell R. W., Chen H. R., Burke J. M., Prepas E. E. // *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 2005. Vol. 8. P. 1–37.
- 5 Sivonen K., Jones G. *Cyanobacterial Toxins // Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management / I. Chorus and J. Bertram (Eds.) The World Health Organization. London: E and FN Spon, 1999. P. 41–111.*
- 6 Botes D. P., Tuinman A. A., Wessels P. L., Viljoen C. C., Kruger H., Williams D. H., Santikarn S., Smith R. J., Hammond S. J. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1984. Vol. 1. P. 2311–2318.
- 7 Falconer I. R., Humpage A. R. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2005. Vol. 2. P. 43–50.
- 8 Welker M., Brunke M., Preussel K., Lippert I., Von Döhren H. // *Microbiology SGM.* 2004. Vol. 150. P. 1785–1796.
- 9 Hitzfeld B. C., Höger S. J., Dietrich D. R. // *Environ. Health Perspect.* 2000. Vol. 108. P. 113–122.
- 10 Honkanen R. E., Zwiller J., Moore R. E., Daily S., Khatra B. S., Dukelow M., Boynton A. L. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 19401–19404.
- 11 MacKintosh C., Beattie K. A., Klumpp S., Cohen P., Codd G. A. // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 264. P. 187–192.
- 12 Ohta T., Nishiwaki R., Yatsunami J., Komori A., Suganuma M., Fujiki H. // *Carcinogenesis.* 1992. Vol. 13. P. 2443–2447.
- 13 Xing Y., Xu Y., Chen Y., Jeffrey P. D., Chao Y., Lin Z., Li Z., Strack S., Stock J. B., Shi Y. // *Cell.* 2006. Vol. 127(2). P. 341–353.
- 14 Chen T., Wang Q., Cui J., Yang W., Shi Q., Hua Z., Ji J., Shen P. // *Mol. Cell Proteomics.* 2005. Vol. 4. P. 958–974.
- 15 Rao P. V. L., Gupta N., Bhaskar A. S. B., Jayaraj R. // *J. Environ. Biol.* 2002. Vol. 23. P. 215–224.
- 16 Humpage A. // *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Adv. Exp. Med. Biol.*, 619, Chapter 16. / H. K. Hudnell (Ed.). NY: Springer Press, 2008. P. 383–416.
- 17 Fawell J. K., Mitchell R. E., Everett D. J., Hill R. E. // *Hum. Exp. Toxicol.* 1999. Vol. 18. P. 162–167.
- 18 World Health Organization. *Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Vol. 1: Coastal and Fresh Waters.* Geneva: World Health Organization, 2003. 219 p.
- 19 World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality. 3rd ed.* Geneva: World Health Organization, 2004. Vol. 1. P. 407–408.
- 20 Lehane L. // *National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra, Australia, 2000.*
- 21 Francis G. // *Nature.* 1878. Vol. 18. P. 11–12.
- 22 Jochimsen E. M., Carmichael W. W., An J., Cardo D. M., Cookson S. T., Holmes C. E. M., Antunes B. C., de Melo Filho D. A., Lyra T. M., Barreto V. S. T., Azevedo S. M. F. O., Jarvis W. R. // *New Engl. J. Med.* 1998. Vol. 338. P. 873–878.
- 23 Hermansky S. J., Stohs S. J., Eldeen Z. M., Roche V. F., Mereish K. A. // *J. Appl. Toxicol.* 1991. Vol. 11. P. 65–73.
- 24 McDermott C. M., Nho C. W., Howard W., Holton B. // *Toxicol.* 1998. Vol. 36. P. 1981–1996.
- 25 Mankiewicz J., Walter Z., Tarczyńska M., Fladmark K. E., Døskeland S. O., Zalewski M. // *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 2001. Vol. 3. P. 225–233.
- 26 LeClaire R. D., Parker G. W., Franz D. R. // *J. Appl. Toxicol.* 1995. Vol. 15. P. 303–311.
- 27 Matsushima R., Yoshizawa S., Watanabe M. F., Harada K. I., Furusawa M., Carmichael W. W., Fujiki H. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1990. Vol. 171. P. 867–874.
- 28 Bell S. G., Codd G. A. // *Rev. Med. Microbiol.* 1994. Vol. 5. P. 256–264.
- 29 Rudolph-Böhner S., Mierke D. F., Moroder L. // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 349. P. 319–323.
- 30 Zegura B., Sedmak B., Filipic M. // *Toxicol.* 2003. Vol. 41. P. 41–8
- 31 Nishizawa T., Asayama M., Fujii K., Harada K., Shirai M. // *J. Biochem.* 1999. Vol. 126. P. 520–529.
- 32 Tillett D., Dittmann E., Erhard M., von Döhren H., Börner T., Neilan B. A. // *Chem. Biol.* 2000. Vol. 7. P. 753–764.
- 33 Christiansen G., Fastner J., Erhard M., Börner T., Dittmann E. // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185. P. 564–572.
- 34 Rouhiainen L., Vakkilainen T., Siemer B. L., Buikema W., Haselkorn R., Sivonen K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 70. P. 686–692.
- 35 Konz D., Marahel M. A. // *Chem. Biol.* 1999. Vol. 6(2). P. 39–48.
- 36 Dittmann E., Neilan B. A., Erhard M., von Döhren H., Börner T. // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 26. P. 779–787.
- 37 Baker L. C. // *Lake and Reservoir Management.* 2002. Vol. 18. P. 20–31.
- 38 Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K., Rouhiainen L., Tallberg P., Møkelke L., Sivonen K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69, No 12. P. 7289–7297.
- 39 Pan H., Song L. R., Liu Y. D., Borner T. // *Arch. Microbiol.* 2002. Vol. 178. P. 421–427.
- 40 Mikalsen B., Boison G., Skulberg O. M., Fastner J., Davies W., Gabrielsen T. M., Rudi K., Jakobsen K. S. // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185. P. 2774–2785.
- 41 Via-Ordorika L., Fastner J., Kurmayer R., Hisbergues M., Dittmann E., Komarek J., Erhard M., Chorus I. // *System. Appl. Microbiol.* 2004. Vol. 27. P. 592–602.
- 42 Mbedi S., Welker M., Fastner J., Wiedner C. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 245(2). P. 299–306.
- 43 Ouellette A. A., Handy S., Wilhelm S. // *Microbiol. Ecol.* 2006. Vol. 51. P. 154–165.
- 44 Hotto A. M., Satchwell M. F., Boyer G. L. // *AEM.* 2007. Vol. 73, No. 14. P. 4570–4578.
- 45 Тихонова И. В., Белых О. И., Помазкина Г. В., Гладких А. С. // *Докл. РАН.* 2006. Т. 409, № 3. С. 425–427.
- 46 Тихонова И. В., Гладких А. С., Белых О. И., Сороковикова Е. Г. // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* 2006. Т. 2. С. 202–205.
- 47 *Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши // Л.: Гидрометеиздат, 1977. 534 с.*
- 48 Jeffrey S. W., Humphrey G. F. // *Biochem. Physiol. Pflanz.* 1975. Vol. 167. P. 191–195.
- 49 Rantala A., Rajaniemi-Wacklin P., Lyra C., Lepistö L., Rintala J., Mankiewicz-Boczek J., Sivonen K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72. P. 6101–6110.
- 50 Jungblut A.-D., Neilan B. A. // *Arch. Microbiol.* 2006. Vol. 185. P. 107–114.
- 51 Белых О. И., Тихонова И. В., Сороковикова Е. Г., Гладких А. С., Каложная Ок. В. // *Вестн. Томского гос. ун-та.* 2010. № 330. С. 172–175.
- 52 Белых О. И., Дмитриева О. А., Гладких А. С., Сороковикова Е. Г. // *Океанология.* 2013. №1. С. 78–87.
- 53 Belykh O. I., Sorokovikova E. G., Fedorova G. A., Kaluzhnaya O. V., Korneva E. S., Sakirko M. V., Sherbakova T. A. // *Hydrobiologia.* 2011. Vol. 671. P. 241–252.
- 54 Moffitt M. C., Neilan B. A. // *AEM.* 2004. Vol. 70, No. 11. P. 6353–6362.

- 55 Воробьева С. С. Фитопланктон водоемов Ангары. Новосибирск: Наука, 1995. 126 с.
- 56 Тихонова И. В., Гладких А. С., Белых О. И., Сороковикова Е. Г. // *Scientific Articles 2007. Ecology. Bulgaria: ScienceBg Publishing*, 2007. Vol. 1. P. 99–106.
- 57 Кудринская Г. Б., Морева О. А. // *Материалы рабочего совещания по выполнению природоохранных мероприятий ОАО “ЦКК” – ОАО “БКХ” в 2000–2003 гг.* Иркутск, 2004. С. 53–60.
- 58 Lawton L. A., Edwards C., Codd G. A. // *Analyst*. 1994. Vol. 119. P. 1525–1530.
- 59 Watanabe M. F., Oishi S., Harada K.-I., Matsuura K., Kawai H., Suzuki M. // *Toxicon*. 1988. Vol. 26. P. 1017–1025.
- 60 Yasuno M., Sugaya Y., Kaya K., Watanabe M. M. // *Phycol. Res.* 1998. Vol. 46 (Suppl.). P. 31–36.
- 61 Dyble J., Fahnenstiel G. L., Litaker R. W., Millie D. F., Patricia A. T. // *Environ. Toxicol.* 2008. Vol. 23. P. 507–516.
- 62 Allender C. J., LeCleir G. R., Rinta-Kanto J. M., Small R. L., Satchwell M. F., Boyer G. L., Wilhelm S. W. // *AEM*. 2009. Vol. 75. P. 3598–3604.
- 63 Rapala J., Sivonen K., Lyra C., Niemelä S. I. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 2206–2212.
- 64 Gaevsky N. A., Kolmakov V. I., Belykh O. I., Tikhonova I. V., Joung Y., Ahn T. S., Nabatova V. A., Gladkikh A. S. // *Microbiol.* 2011. Vol. 49(5). P. 714–720.
- 65 Курейшевич А. В., Ярмошенко Л. П., Кирпенко Н. И., Белых О. И., Сороковикова Е. Г. // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Биол.* 2010. № 2(43). С. 307–310.
- 66 Mikheyeva T. M., Belykh O. I., Sorokovikova E. G., Gladkikh A. S., Luk'yanova E. V., Potapov S. A., Tikhonova I. V., Fedorova G. A., Korneva E. S., Kuzmin A. V. // *Baltic Coastal Zone*. 2012. Vol. 16. P. 131–146.
- 67 Tillet D., Parker D. L., Neilan B. A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. P. 2810–2818.
- 68 Ozawa K., Fujioka H., Muranaka M., Yokoyama A., Katagami Y., Homma T., Ishikawa K., Tsujimura S., Kumagai M., Watanabe M. F., Park H.-D. // *Environ. Toxicol.* 2005. Vol. 20. P. 270–276.
- 69 Kurmayer R., Dittmann E., Fastner J., Chorus I. // *Microb. Ecol.* 2002. Vol. 4. P. 107–118.
- 70 Kurmayer R., Christiansen G., Chorus I. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 787–795.
- 71 Codd G. A., Azevedo S. M. F. O., Bagchi S. N., Burch M. D., Carmichael W. W., Kaya K., Utkilen H. C. CYANONET. A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management – Initial Situation Assessment and Recommendations // *Int. Hydrol. Progr. VI (Unesco, Paris), Tech. Doc. Hydrol. No. 76*. 2005. 138 p.