

# Identification of microcystin producing cyanobacteria in the plankton of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir



Sorokovikova E.G. \*, Tikhonova I.V., Naidanova Ya.A., Belykh O.I.

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

**ABSTRACT.** Genes of synthesis of hepatotoxic microcystin belonging to the genera *Microcystis* and *Dolichospermum* (*Anabaena*) were previously identified in samples of plankton from Lake Baikal and reservoirs of the Angara HPP cascade. However, accurate identification of toxin producing species is not possible without culture studies. In this study, 17 strains of planktonic cyanobacteria belonging to the most widespread species in water bodies of temperate zone were obtained by isolation and propagation of individual filaments or colonies. Using molecular biological and immunoassay analyses, it was revealed that the species *Dolichospermum lemmermannii* and *Microcystis aeruginosa* were microcystin producers. Of the eight *D. lemmermannii* strains obtained, only two produced microcystins, their morphological feature being the ability to form large colonies.

**Keywords:** *Dolichospermum lemmermannii*, *Microcystis aeruginosa*, water bloom, microcystin

**For citation:** Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Naidanova Ya.A., Belykh O.I. Identification of microcystin producing cyanobacteria in the plankton of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1101-1108. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1101

## 1. Introduction

Cyanobacterial blooms are a characteristic consequence of global processes of water body eutrophication and climate change (Huisman et al., 2018). Many negative effects are observed during blooms of water bodies, such as water pollution by products of life activity and decomposition of cyanobacteria, decreased transparency and deterioration of water quality, increased organic matter content, oxygen deficiency, etc., leading to changes in species composition and structure of biocenoses, functional relationships of hydrobionts, and, ultimately, ecosystem degradation. Blooming of water bodies and deterioration of water quality are urgent problems in most countries of the world. The frequency and prevalence of cyanobacterial blooms, including toxic blooms, have increased significantly in recent decades.

The first reports on the occurrence in Lake Baikal of cyanobacteria containing microcystin synthesis (MC) genes were obtained in 2010 (Belykh et al., 2015). Using markers to the *mcyE* gene, two MC-producing cyanobacterial genera were detected in Lake Baikal: *Dolichospermum* and *Microcystis*. The number of *Microcystis mcyE* gene sequences was low, in contrast to *Dolichospermum*, which is consistent with

their abundance. The presence of microcystin in water samples and phytoplankton biomass has been repeatedly confirmed by immunochemistry and chromatomass spectrometry (Belykh et al., 2013). Water blooms caused by saxitoxin-producing *D. lemmermannii* have been recorded in the Irkutsk Reservoir (Grachev et al., 2018).

Usually, up to five *Dolichospermum* species and up to three *Microcystis* species occur simultaneously in the phytoplankton of Lake Baikal, and genus-specific genetic markers are insufficient to identify toxin-producing species. The aim of the study is to obtain unialgal cultures of cyanobacteria by isolating and propagating individual trichomes or colonies and to determine their species identity and toxinogenic potential.

## 2. Materials and methods

Mesh samples were collected in July-August 2023 in Lake Baikal (coastal areas) and in the Irkutsk Reservoir in Yelovy Bay near Patrony settlement. Cultures were obtained from isolated colonies or single trichomes sampled with a Pasteur pipette under a stereomicroscope. Each isolate was cleaned in a few drops of sterile Baikal water until visible contaminants were removed and transferred to a screw-capped glass tube

\*Corresponding author.

E-mail address: [katrin@lin.irk.ru](mailto:katrin@lin.irk.ru) (E.G. Sorokovikova)

**Received:** August 01, 2024; **Accepted:** August 15, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



with 20 ml of liquid medium. In the laboratory, cultures were dispersed into tubes and flasks to obtain biomass sufficient for molecular biological and chemical analysis. Z-8 medium (Rippka, 1988) was used for growing filamentous cyanobacteria, cultured at room temperature (20-26°C) under natural light with supplementary illumination by a full-spectrum LED phytolamp (Uniel, China) in day:night 12:12 h mode. Cyanobacteria of the genus *Microcystis* were grown on MA medium (Watanabe and Oishi, 1985) at temperature 27-30°C with illumination by a full-spectrum fluorescent phytolamp in the day:night 12:12 h regime. Taxonomic identification of cultures was performed using an Axio Imager microscope (Carl Zeiss, Germany) and guides (Komárek, 2013; Komárek and Anagnostidis, 1999).

DNA isolation, PCR, and tree construction were performed according to the methods described previously (Belykh et al., 2011). The primers HepF and HepR were used to detect the *mcyE* gene (Jungblut and Neilan, 2006). Sequences were obtained on a Nanofor genetic analyzer (Syntol, Russia) using GenSeq reagents (Syntol) and deposited in GenBank under accession numbers PP971142-PP971144.

The presence of MC was determined using immunochemical “Test-system for rapid determination of microcystin in water and freshwater fish” (Signal Research Center, Russia) according to the manufacturer’s instructions. Preliminary 1 ml of culture was treated by freeze-thawing (5 cycles at – 20 and + 25°C) to destroy cell walls.

### 3. Results and discussion

The study of morphology using light microscopy showed that among the obtained strains, eight belong to the species *Dolichospermum lemmermannii* (family Aphanizomenonaceae, order Nostocales), a colonial filamentous cyanobacterium causing water blooms in Lake Baikal and Irkutsk Reservoir (Bondarenko et al., 2021; Grachev et al., 2018) (Table).

During the *D. lemmermannii* blooms, *D. smithii* and *D. crassum* species are usually found in phytoplankton in low abundance, and they were represented by one and two strains, respectively, in the culture collection. The strains *Aphanizomenon flos-aquae* 12/23Y and *Gloeotrichia echinulata* 14/23M belong to the same family. All these species are widely distributed in temperate zone water bodies, often cause water blooms and are potential producers of various cyanotoxins (Komárek, 2013).

Cyanobacteria of the genus *Microcystis* (order Chroococcales) were represented by species of *Microcystis aeruginosa* and *M. novacekii*, the latter being observed in Lake Baikal for the first time. These species are warm-loving and develop in the temperate zone only in shallow, well-warmed water bodies (Komárek and Anagnostidis, 1999). A strain of the associated cyanobacterium *Pseudanabaena mucicola* 13/23T (order Pseudanabaenales) was isolated from a colony of *M. novacekii* strain BT23 that inhabited in its colonial mucus. Strain 15/23M had small coccoid cells surrounded by mucus, it and was identified as a represen-

**Table.** Cyanobacterial strains and their characterization

No	Species	Strain	Place of isolation	Microcystin synthetase, <i>mcyE</i> gene	MC concentration, ng/mL
1	<i>Dolichospermum lemmermannii</i>	1/23Mu	Lake Baikal, Maloe More Strait, Mukhor Bay	–	0
2	<i>D. lemmermannii</i>	2/23M	Lake Baikal, Maritui settl.	+	> 1
3	<i>D. lemmermannii</i>	3/23Y	Irkutsk Reservoir, Yelovy Bay	–	0
4	<i>D. lemmermannii</i>	4/23Y		+	> 1
5	<i>D. lemmermannii</i>	5/23Y		–	0
6	<i>D. lemmermannii</i>	6/23M	Lake Baikal, Maritui settl.	–	0
7	<i>D. lemmermannii</i>	7/23M		–	0
8	<i>D. lemmermannii</i>	8/23M		–	0
9	<i>D. smithii</i>	9/23Y	Irkutsk Reservoir, Yelovy Bay	–	0
10	<i>D. crassum</i>	10/23Y		–	0
11	<i>D. crassum</i>	11/23Y		–	0
12	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BN23	Lake Baikal, Nizhneangarsk settl.	+	> 1
13	<i>M. novacekii</i>	BT23	Lake Baikal, Turka settl.	–	0
14	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	12/23Y	Irkutsk Reservoir, Yelovy Bay	–	0
15	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	13/23T	Lake Baikal, Turka settl. (endogloetic in <i>M. novacekii</i> BT23)	–	0
16	<i>Gloeotrichia echinulata</i>	14/23M	Lake Baikal, Maritui settl.	–	0
17	<i>Aphanocapsa</i> sp.	15/23M		–	0

tative of the genus *Aphanocapsa* (order Chroococcales) (Table).

Molecular biological analysis of strains using genus-specific primers to the aminotransferase domain of the microcystinsynthetase *mcyE* gene was positive for strains *Dolichospermum lemmermannii* 2/23M, *D. lemmermannii* 4/23Y, and *Microcystis aeruginosa* BN23. The sequence of strain BN23 was 98.5-98% similar to the sequences of *Microcystis aeruginosa* strains S1-S4 from Hilla River, Iraq, NIES-843 from Lake Kasumigaura, Japan and FCY-26 from Lake Paldang, Korea. The maximum similarity (98.7%) was observed with the uncultured sequence KF219506 obtained earlier from Lake Baikal (Belykh et al., 2015).

The sequence of strain 2/23M had close similarity (99.1-99%) to the sequences of *D. lemmermannii* strains 1tu32s11, NIVA-CYA 438 and NIVA-CYA 269 isolated from lakes in Norway and Finland. The sequence of strain 4/23Y was 99.5-99% similar to the sequences of *Dolichospermum* sp. strains BIR250A, UHCC 0315A and 0tu33s16 from Finnish lakes. It should be noted that the maximum similarity for strains 2/23M and 4/23Y (99.8% and 99.6%, respectively) was observed with the previously obtained uncultured sequence KF219514 from the Ust-Ilmsk reservoir (Belykh et al., 2013).

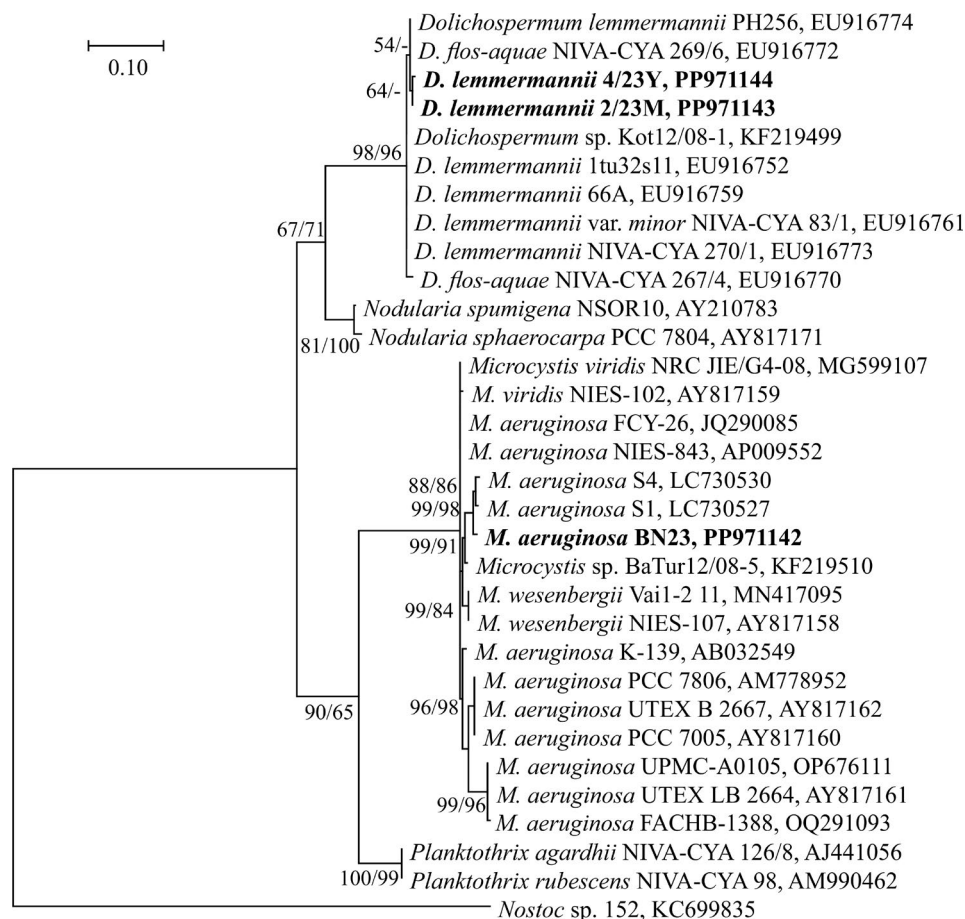
Phylogenetic trees constructed by the two different methods had a similar topology. The sequences are grouped into four stable clades according to cyanobacteria genera: *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, and *Planktothrix* (Fig.).

Immunoassay analysis using test strips showed that cultures containing the *mcyE* gene produced hepatotoxic microcystins at concentrations of more than 1 ng/mL (Table).

Thus, only two *D. lemmermannii* strains out of eight contained the *mcyE* gene and produced microcystins, which is consistent with the known evidence that both toxic and non-toxic genotypes belonging to the same species are simultaneously present in cyanobacterial communities (Vaitomaa et al., 2003). Toxic strains of *D. lemmermannii* had similar cell morphology to the non-toxic ones, but differed from them in their ability to form very large (up to 5 mm in diameter) colonies.

#### 4. Conclusions

In July-August 2023, 17 unialgal cultures of cyanobacteria were isolated from samples collected in the coastal areas of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir, 15 of which are potential causative agents of water blooms and toxin producers. The strains were identified as *Aphanocapsa* sp., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum crassum*, *D. lemmermannii*, *D. smithii*, *Gloeotrichia echinulata*, *Microcystis aeruginosa*, *M. novacekii* and *Pseudanabaena mucicola*. The two last species are new to Lake Baikal. Molecular biological and immunochemical analyses were used to identify cyanobacteria producing microcystins in Lake Baikal (*D. lemmermannii* and *Microcystis aeruginosa*) and Irkutsk Reservoir (*D. lemmermannii*). It was shown that toxic



**Fig.** Phylogenetic analysis of the aminotransferase domain of the *mcyE* and *ndaF* genes of planktonic cyanobacteria. The rooted tree obtained by ML analysis is shown. Numbers show bootstrap analysis results for trees ( $n = 1000$ ) constructed by different methods (ML/NJ). The sequences obtained in this work are shown in bold.

and non-microcystin-producing genotypes of *D. lemmermannii*, differing in colony size, exist simultaneously in the plankton of both water bodies.

## Acknowledgements

This study was carried out in The Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS within the framework of the State Task № 0279-2021-0015. The authors are grateful to the crew of R/V “Titov” for their assistance in sampling.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2015. Identification of toxic Cyanobacteria in Lake Baikal. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 463: 220-224. DOI: [10.1134/S1607672915040067](https://doi.org/10.1134/S1607672915040067)
- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2013. Microcystin-Producing Cyanobacteria in Water Reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chemistry for Sustainable Development* 21: 347-361.
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Fedorova G.A. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Bondarenko N.A., Tomberg I.V., Shirokaya A.A. et al. 2021. *Dolichospermum lemmermannii* (Nostocales) bloom in world's deepest Lake Baikal (East Siberia): abundance, toxicity and factors influencing growth. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 1101-1110. DOI: [10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101)
- Grachev M., Zubkov I., Tikhonova I. et al. 2018. Extensive Contamination of Water with Saxitoxin Near the Dam of the Irkutsk Hydropower Station Reservoir (East Siberia, Russia). *Toxins* 10: 402. DOI: [10.3390/toxins10100402](https://doi.org/10.3390/toxins10100402)
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16: 471-483. DOI: [10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)
- Jungblut A.D., Neilan B.A. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of microbiology* 185: 107-114. DOI: [10.1007/s00203-005-0073-5](https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5)
- Komárek J. 2013. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota. 3. Teil/Part 3: Heterocytous Genera. Heidelberg, Germany: Springer Spektrum. 1149 p.
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/1. Cyanoprokaryota. 1. Teil/Part 1: Chroococcales. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 554 p.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27. DOI: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K. et al. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7289-7297. DOI: [10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003)
- Watanabe M.F., Oishi S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1342-1344. DOI: [10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985](https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985)

# Идентификация цианобактерий-продуцентов микроцистина в планктоне озера Байкал и Иркутского водохранилища

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Сороковикова Е.Г.\* , Тихонова И.В., Найданова Я.А., Белых О.И.

Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В пробах планктона оз. Байкал и водохранилищ Ангарского каскада ГЭС ранее были идентифицированы гены синтеза гепатотоксина микроцистина, принадлежащие родам *Microcystis* и *Dolichospermum* (*Anabaena*). Однако точная идентификация видов, продуцирующих токсины, невозможна без исследования культур. В ходе исследования путем изолирования и размножения отдельных нитей или колоний было получено 17 штаммов планктонных цианобактерий, принадлежащих наиболее распространенным в водоемах умеренной зоны видам. С помощью молекулярно-биологического и иммуноферментного анализов показано, что продуцентами микроцистинов являлись виды *Dolichospermum lemmermannii* и *Microcystis aeruginosa*. Из восьми полученных штаммов *D. lemmermannii* только два продуцировали микроцистины, их морфологической особенностью являлась способность формировать крупные колонии.

**Ключевые слова:** *Dolichospermum lemmermannii*, *Microcystis aeruginosa*, цветение воды, микроцистин

Для цитирования: Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Найданова Я.А., Белых О.И. Идентификация цианобактерий-продуцентов микроцистина в планктоне озера Байкал и Иркутского водохранилища // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1101-1108. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1101

## 1. Введение

Цветения воды, вызванные цианобактериями, являются характерным следствием глобальных процессов эвтрофирования водоемов и изменения климата (Huisman et al., 2018). При цветении водоемов наблюдается множество негативных явлений, таких как загрязнение воды продуктами жизнедеятельности и разложения цианобактерий, уменьшение прозрачности и ухудшение качества воды, увеличение содержания органических веществ, дефицит кислорода и т.п., приводящих к изменению видового состава и структуры биоценозов, функциональных связей гидробионтов, и, в конечном итоге, к деградации экосистемы. Цветение водоемов и ухудшение качества воды являются актуальными проблемами в большинстве стран мира. Частота и распространенность вызванных цианобактериями цветений, в том числе и токсичных, существенно возросли в последние десятилетия.

Первые сведения о наличии в оз. Байкал цианобактерий, содержащих гены синтеза микроцистина (МС), были получены в 2010 г. (Belykh et al., 2015). С помощью маркеров к *mscE*-гену в оз. Байкал обнаружены два МС-продуцирующих рода

цианобактерий: *Dolichospermum* и *Microcystis*, при этом количество последовательностей *mscE*-гена *Microcystis* было невысоким, в отличие от таковых *Dolichospermum*, что согласуется с показателями их численности. Наличие микроцистинов в пробах воды и биомассе фитопланктона неоднократно подтверждалась с помощью иммунохимии и хромато-масспектрометрии (Belykh et al., 2013). В Иркутском водохранилище зарегистрировано цветение воды, вызванное *D. lemmermannii* с продукцией сакситоксинов (Grachev et al., 2018).

Обычно в фитопланктоне оз. Байкал одновременно встречаются до пяти видов *Dolichospermum* и до трех видов *Microcystis*, и родоспецифичных генетических маркеров недостаточно для идентификации видов-продуцентов токсинов. Цель исследования – получить чистые культуры цианобактерий путем изолирования и размножения отдельных трихомов или колоний и определить их видовую принадлежность и токсигенный потенциал.

## 2. Материалы и методы

Сетные пробы были отобраны в июле-августе 2023 г. в оз. Байкал (прибрежные районы) и в

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [katrin@lin.irk.ru](mailto:katrin@lin.irk.ru) (Е.Г. Сороковикова)

Поступила: 01 августа 2024; Принята: 15 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Иркутском водохранилище в заливе Еловый в районе пос. Патроны. Культуры получали из изолированных колоний либо единичных трихомов, отобранных пипеткой Пастера под стереомикроскопом. Каждый изолят был очищен в нескольких каплях стерильной байкальской воды до удаления видимых контаминантов и перенесен в стеклянную пробирку с винтовой крышкой с 20 мл жидкой среды. В лаборатории культуры рассеивали в пробирки и колбы для получения биомассы, достаточной для молекулярно-биологического и химического анализа. Для выращивания нитчатых цианобактерий использовали среду Z-8 (Rippka, 1988), культивировали при комнатной температуре (20-26°C) при естественном освещении с досветкой светодиодной фитолампой полного спектра (Uniel, Китай) в режиме день:ночь 12:12 ч. Цианобактерии рода *Microcystis* выращивали на среде MA (Watanabe and Oishi, 1985) при температуре 27-30°C с освещением люминисцентной фитолампой полного спектра в режиме день:ночь 12:12 ч. Таксономическую идентификацию культур проводили с помощью микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия) и определителей (Komárek, 2013; Komárek and Anagnostidis, 1999).

Выделение ДНК, ПЦР и построение деревьев проводили в соответствии с методиками, описанными ранее (Belykh et al., 2011). Для выявления

гена *mscE* использовали праймеры HerF и HerR (Jungblut and Neilan, 2006). Последовательности были получены на генетическом анализаторе Нанофор (Синтол, Россия) с использованием реактивов GenSeq (Синтол) и депонированы в GenBank под номерами доступа PP971142–PP971144.

Наличие МС определяли с помощью иммунохимической «Тест-системы для экспресс-определения микроцистина в воде и пресноводной рыбе» (ФГУП НЦ «Сигнал», Россия) по методике производителя. Предварительно 1 мл культуры обрабатывали замораживанием-оттаиванием (5 циклов при –20 и +25°C) для разрушения клеточных стенок.

### 3. Результаты и обсуждение

Исследование морфологии с помощью световой микроскопии показало, что среди полученных штаммов восемь относятся к виду *Dolichospermum lemmermannii* (семейство Arphanizomenonaceae, порядок Nostocales) – колониальной нитчатой цианобактерии, вызывающей цветение воды в оз. Байкал и Иркутском водохранилище (Bondarenko et al., 2021; Grachev et al., 2018) (Таблица). Во время массового развития *D. lemmermannii* виды *D. smithii* и *D. crassum* обычно встречаются в фитопланктоне в небольшом количестве, в коллекции культур они были представлены одним и двумя штаммами, соответ-

Таблица. Штаммы цианобактерий и их характеристика

№	Вид	Штамм	Место выделения	Микроцистинсинтетаза, <i>mscE</i> -ген	Концентрация МС, нг/мл
1	<i>Dolichospermum lemmermannii</i>	1/23Му	Оз. Байкал, пр. Малое Море, з-в Мухор	–	0
2	<i>D. lemmermannii</i>	2/23М	Оз. Байкал, пос. Маритуй	+	> 1
3	<i>D. lemmermannii</i>	3/23У	Иркутское в-ще, з-в Еловый	–	0
4	<i>D. lemmermannii</i>	4/23У		+	> 1
5	<i>D. lemmermannii</i>	5/23У		–	0
6	<i>D. lemmermannii</i>	6/23М	Оз. Байкал, пос. Маритуй	–	0
7	<i>D. lemmermannii</i>	7/23М		–	0
8	<i>D. lemmermannii</i>	8/23М		–	0
9	<i>D. smithii</i>	9/23У	Иркутское в-ще, з-в Еловый	–	0
10	<i>D. crassum</i>	10/23У		–	0
11	<i>D. crassum</i>	11/23У		–	0
12	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BN23	Оз. Байкал, пос. Нижнеангарск	+	> 1
13	<i>M. novacekii</i>	BT23	Оз. Байкал, пос. Турка	–	0
14	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	12/23У	Иркутское в-ще, з-в Еловый	–	0
15	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	13/23Т	Оз. Байкал, пос. Турка (из колонии <i>M. novacekii</i> BT23)	–	0
16	<i>Gloeotrichia echinulata</i>	14/23М	Озеро Байкал, пос. Маритуй	–	0
17	<i>Aphanocapsa</i> sp.	15/23М		–	0

ственно. К этому же семейству относятся штаммы *Aphanizomenon flos-aquae* 12/23Y и *Gloeotrichia echinulata* 14/23M. Все эти виды широко распространены в водоемах умеренной зоны, часто вызывают цветение воды и являются потенциальными продуцентами различных цианотоксинов (Komárek, 2013).

Цианобактерии рода *Microcystis* (порядок Chroococcales) были представлены видами *Microcystis aeruginosa* и *M. novacekii*, последний отмечается в оз. Байкал впервые. Эти виды теплолюбивы, в умеренной зоне развиваются только в мелководных, хорошо прогреваемых водоемах (Komárek and Anagnostidis, 1999). Из колонии штамма *M. novacekii* BT23 выделен штамм сопутствующей цианобактерии *Pseudanabaena mucicola* 13/23T (порядок Pseudanabaenales), обитавший в его колониальной слизи. Штамм 15/23M имел мелкие коккоидные клетки, объединенные слизью, он был идентифицирован как представитель рода *Aphanocapsa* (порядок Chroococcales) (Таблица).

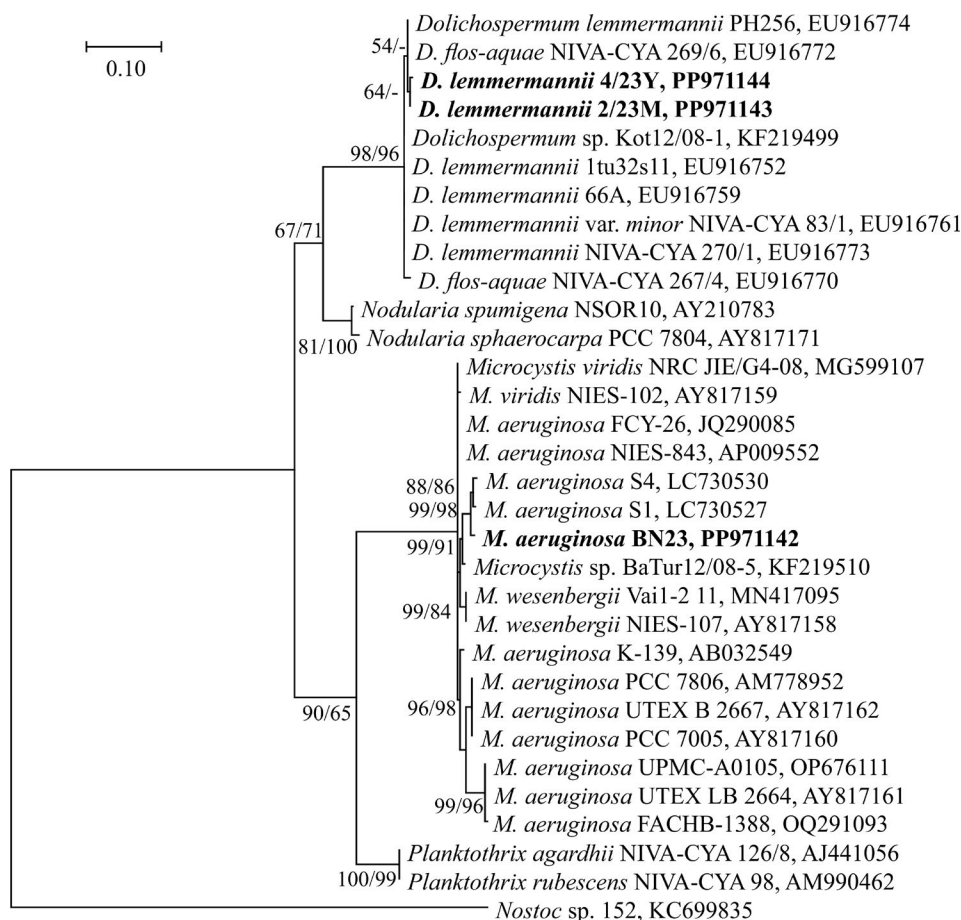
Молекулярно-биологический анализ штаммов с использованием родоспецифичных праймеров к домену аминотрансферазы гена микроцистинсинтетазы *mscE* был положительным для культур *Dolichospermum lemmermannii* 2/23M, *D. lemmermannii* 4/23Y и *Microcystis aeruginosa* BN23. Последовательность штамма BN23 была на 98.5-98% сходна с последовательностями штаммов *Microcystis*

*aeruginosa* S1-S4 из реки Hilla в Ираке, NIES-843 из оз. Kasumigaura, Япония и FCY-26 из оз. Палданг, Корея. Максимальное сходство (98.7%) было отмечено с некультивируемой последовательностью KF219506, полученной ранее из оз. Байкал (Belykh et al., 2015).

Последовательность штамма 2/23M имела близкое сходство (99.1-99%) с последовательностями штаммов *D. lemmermannii* 1tu32s11, NIVA-CYA 438 и NIVA-CYA 269, выделенных из озер Норвегии и Финляндии. Последовательность штамма 4/23Y была на 99.5-99% сходна с последовательностями штаммов *Dolichospermum* sp. BIR250A, UHCC 0315A и 0tu33s16 из озер Финляндии. Следует отметить, что максимальное сходство для штаммов 2/23M и 4/23Y (99.8% и 99.6%, соответственно) было отмечено с ранее полученной некультивируемой последовательностью KF219514 из Усть-Илимского водохранилища (Belykh et al., 2013).

Филогенетические деревья, построенные двумя различными методами, имели сходную топологию. Последовательности группируются в четыре устойчивые клады согласно родовой принадлежности цианобактерий: *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* (Рис.).

Иммуноферментный анализ с применением тест-полосок показал, что культуры, содержащие *mscE* ген, продуцируют гепатотоксины микроцистины в концентрации более 1 нг/мл (Таблица).



**Рис.** Филогенетический анализ домена аминотрансферазы *mscE* и *ndaF* генов планктонных цианобактерий. Изображено укорененное древо, полученное с помощью ML-анализа. Цифрами показаны результаты бутстреп-анализа для деревьев ( $n = 1000$ ), построенных разными методами (ML/NJ). Полученные в данной работе последовательности выделены жирным.

Таким образом, только два штамма *D. lemmermannii* из восьми содержали *тсуЕ* ген и продуцировали микроцистины, что согласуется с известными данными о том, что в сообществах цианобактерий одновременно присутствуют как токсичные, так и нетоксичные генотипы, относящиеся к одному виду (Vaitomaa et al., 2003). Токсичные штаммы *D. lemmermannii* имели сходную морфологию клеток с нетоксичными, но отличались от них способностью формировать очень крупные (до 5 мм в диаметре) колонии.

#### 4. Выводы

В июле-августе 2023 г. из проб, отобранных в прибрежных районах оз. Байкал и Иркутского водохранилища, выделено 17 чистых культур цианобактерий, 15 из которых являются потенциальными возбудителями цветения воды и продуцентами токсинов. Штаммы идентифицированы как *Aphanocapsa* sp., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum crassum*, *D. lemmermannii*, *D. smithii*, *Gloeotrichia echinulata*, *Microcystis aeruginosa*, *M. novacekii* и *Pseudanabaena mucicola*. Последние два вида являются новыми для оз. Байкал. С помощью молекулярно-биологического и иммунохимического анализов выявлены цианобактерии-продуценты микроцистинов в оз. Байкал (*D. lemmermannii* и *Microcystis aeruginosa*) и Иркутском водохранилище (*D. lemmermannii*). Показано, что в планктоне обоих водоемов одновременно существуют токсичный и не продуцирующий микроцистины генотипы *D. lemmermannii*, отличающиеся размером колоний.

#### Благодарности

Работа проводилась на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ») при финансовой поддержке гос. задания № 0279-2021-0015. Авторы выражают благодарность экипажу НИС «Титов» за помощь в отборе проб.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2015. Identification of toxic Cyanobacteria in Lake Baikal. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 463: 220-224. DOI: [10.1134/S1607672915040067](https://doi.org/10.1134/S1607672915040067)
- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2013. Microcystin-producing cyanobacteria in water reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chemistry for Sustainable Development* 21: 347-361.
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Fedorova G.A. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Bondarenko N.A., Tomberg I.V., Shirokaya A.A. et al. 2021. *Dolichospermum lemmermannii* (Nostocales) bloom in world's deepest Lake Baikal (East Siberia): abundance, toxicity and factors influencing growth. *Limnology and Freshwater Biology* 1: 1101-1110. DOI: [10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2021-a-1-1101)
- Grachev M., Zubkov I., Tikhonova I. et al. 2018. Extensive contamination of water with saxitoxin near the dam of the Irkutsk hydropower station reservoir (East Siberia, Russia). *Toxins* 10: 402. DOI: [10.3390/toxins10100402](https://doi.org/10.3390/toxins10100402)
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16: 471-483. DOI: [10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)
- Jungblut A.D., Neilan B.A. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of microbiology* 185: 107-114. DOI: [10.1007/s00203-005-0073-5](https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5)
- Komárek J. 2013. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota. 3. Teil/Part 3: Heterocytous Genera. Heidelberg, Germany: Springer Spektrum. 1149 p.
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/1. Cyanoprokaryota. 1. Teil/Part 1: Chroococcales. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 554 p.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27. DOI: [10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K. et al. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7289-7297. DOI: [10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003)
- Watanabe M.F., Oishi S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1342-1344. DOI: [10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985](https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1342-1344.1985)