

ОЦЕНКА И ПРОГНОЗ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧНЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ФИТОПЛАНКТОНЕ БОГУЧАНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Сороковикова Е. Г., Тихонова И. В., Подлесная Г. В., Белых О. И.

EVALUATION AND PREDICTION OF TOXIC CYANOBACTERIAL BLOOMING IN PHYTOPLANKTON OF THE BOGUCHANY RESERVOIR

Sorokovikova E. G., Tikhonova I. V., Podlesnaya G. V., Belykh O. I.

Аннотация

Богучанская ГЭС является одним из крупнейших экономических проектов России и частью Богучанского энергометаллургического объединения. Оценка ущерба окружающей среде делает востребованными исследования, связанные с экосистемой зарегулированной реки Ангары. Цель работы — получить информацию о составе и уровне развития цианобактерий в Богучанском водохранилище на проектном уровне заполнения в летнее время и оценить риски токсичных цветений в водоеме. Классические методы определения трофического статуса водоема и учета цианобактерий использовались в сочетании с поиском генетических маркеров синтеза токсинов цианобактерий — фрагментов генов *mcyE* и *sxtA*. В июле 2016 г. в составе фитопланктона доминировали три вида потенциально токсичных цианобактерий — *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum lemmermannii*, *D. flos-aquae*. Численность фитопланктона в слое 0–15 м составила 2,97 млн. кл/л, биомасса — 2,75 г/м³. Доля цианобактерий в общей численности фитопланктона составила 27 % (0,79 млн. кл/л), однако их вклад в биомассу фитопланктона вследствие малого размера клеток составлял всего 2 % (78 мг/м³). Максимальная концентрация хлорофилла *a* составляла 12,6 мкг/л и соответствовала эвтрофному водоему. ПЦР-скрининг выявил наличие цианобактерий — продуцентов микроцистинов и сакситоксинов и его аналогов (паралитических токсинов моллюсков). Концентрация микроцистинов в воде составляла 0,3 мкг/л. Результаты демонстрируют, что необходим мониторинг и стратегии по управлению за цветением токсичных цианобактерий. Важным пунктом является оценка экологического состояния Богучанского водохранилища с акцентом на развитие цианобактерий в летнее время в 2020 году.

Ключевые слова: цианобактерии, токсичные цветения, паралитические токсины моллюсков, микроцистины, Богучанское водохранилище, экологический менеджмент.

Введение

Гидроэнергетические ресурсы — наиболее экологически чистый источник энергии, использование которого позволяет снижать выбросы в атмосферу тепловых электростанций и сохра-

Abstract

Boguchany HPP is one of the largest Russian economic projects and a part of the Boguchany Energy and Metallurgical Association. Due to assessment of environmental damage, it is especially relevant to analyze the ecosystem of the regulated Angara River. The purpose of the present study is to obtain data on the composition and development of cyanobacteria in the Boguchany Reservoir at the design filling level in summer, as well as assess risks of toxic blooming in the reservoir. Classical methods for determining the trophic status of the reservoir and abundance of cyanobacteria were combined with detection of gene markers for cyanobacteria toxin synthesis — fragments of the *mcyE* and *sxtA* genes. In July 2016, three species of potentially toxic cyanobacteria, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum lemmermannii* and *D. flos-aquae*, dominated the composition of phytoplankton. The phytoplankton population in the 0–15 m layer was 2.97 million cells/L and the biomass was 2.75 g/m³. The proportion of cyanobacteria in the total abundance of phytoplankton was 27 % (0.79 million cells/L); however, due to small cell size their contribution to the phytoplankton biomass was only 2 % (78 mg/m³). The maximum concentration of chlorophyll *a* was 12.6 µg/L which corresponded to that in a eutrophic reservoir. PCR-screening revealed cyanobacteria producing microcystins as well as saxitoxin and its analogues (paralytic shellfish toxins). The concentration of microcystins in water was 0.3 µg/L. Those results indicate that monitoring and strategies of control over toxic cyanobacteria blooming are necessary. It also will be important to assess the ecological state of the Boguchany Reservoir, with the focus on toxic cyanobacteria, in summer of 2020.

Keywords: cyanobacteria, toxic blooming, paralytic shellfish toxins, microcystins, Boguchany Reservoir, environmental management.

нять запасы углеводородного топлива для будущих поколений. Однако издержками строительства ГЭС является изменение экосистем зарегулированных рек. В России сосредоточено более 100 гидроэлектростанций. Богучанская ГЭС —

крупная гидроэлектростанция в Красноярском крае на р. Ангаре и часть Богучанского энергометаллургического объединения. Богучанское водохранилище — третье по площади водохранилище России — располагается в ангарском каскаде после Иркутского, Братского и Усть-Илимского водохранилищ. Его наполнение проходило в 2012–2015 гг., площадь поверхности составляет 2326 км², средняя глубина — 25 м, максимальная — 87 м [5]. По морфометрии и гидрологии оно отличается от Иркутского и Братского водохранилищ и наиболее сходно с Усть-Илимским, поэтому имеет аналогичные экологические риски с последним: эвтрофирование, массовое развитие цианобактерий, локальные заморы [3, 5]. В прогнозе формирования фитопланктона в Богучанском водохранилище, основанном на более чем полувековой истории исследования водохранилищ ангарского каскада, указывалось на высокую вероятность цветения воды, вызванного цианобактериями родов *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Microcystis*, на всех его этапах [8].

Цветения воды, вызванные массовым развитием цианобактерий, регистрируются в водохранилищах и естественных водоемах по всему миру [12]. Цианобактерии — общепризнанные экологические индикаторы состояния водной экосистемы, их массовое развитие указывает на потепление климата, поступление избытка азота и фосфора из организованных и неорганизованных поверхностных стоков и грунтовых вод. В связи со способностью цианобактерий продуцировать множество биологически-активных метаболитов, среди которых есть опасные для здоровья людей и животных токсины — микроцистины (MC), паралитические токсины моллюсков (PST), анатоксин, цилиндропермопсин и др., Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить мониторинг цианотоксинов в воде. Установленная ВОЗ предельно допустимая концентрация самых распространенных гепатотоксинов — микроцистинов — в питьевой воде составляет 1 мкг/л, в водоемах, используемых в рекреационных целях, — 4 мкг/л [12, 22]. В России, несмотря на то, что микроцистины являются приоритетными веществами для гигиенического нормирования, отечественных нормативов для содержания в воде не разработано [6]. Для сакситоксина и его про-

изводных, вызывающих паралич дыхательной мускулатуры и быструю смерть, установлен допустимый уровень в мясе моллюсков 800 мкг/кг, однако для воды ПДК паралитических токсинов моллюсков отсутствуют [7]. В странах с частыми цветениями пресных водоемов, например Австралии и Бразилии, введены региональные нормативы содержания токсинов цианобактерий в воде [11].

Генетическими маркерами токсичности цианобактерий являются для микроцистина — фрагменты генов, входящих в кластер генов микроцистинсинтетазы [19], для сакситоксина — фрагмент гена поликетидсинтетазы *sxtA* мультиферментного комплекса из 26 ферментов [17]. Ранее исследования цианобактерий Братского и Усть-Илимского водохранилищ выявили наличие генов синтеза микроцистинов *mcuE* и *mcuA*, принадлежащих цианобактериям родов *Microcystis* и *Anabaena* [1]. Ген синтеза сакситоксина *sxtA* был детектирован только в Усть-Илимском водохранилище [2]. Концентрация токсинов в воде, измеренная в Усть-Илимском водохранилище методом иммуноферментного анализа (ИФА) в 2010 г. была ниже пороговой и составила 0,25 мкг/л для микроцистинов и 1,37 мкг/л для паралитических токсинов [1, 2]. Цель работы — получить информацию о составе и уровне развития цианобактерий в Богучанском водохранилище на проектном уровне заполнения в летнее время и оценить риски токсичных цветений в водоеме.

Материалы и методы исследования

Пробы отбирали в июле 2016 г. на центральной станции верхнего бьефа Богучанского водохранилища (58°41'55.35» N, 99°9'49.92» E) батометром с глубины 0, 5, 10, 15, 20, 25, и придонного слоя 72 м и сетью Апштейна в приповерхностном слое. Воду фильтровали через поликарбонатные фильтры Millipore с диаметром пор 3 мкм и окрашивали ДАФИ. Учет доминирующих видов фитопланктона проводили с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного УФ светофильтром и фотокамерой AxioCam MRm. Клетки водорослей подсчитывали на 20 микрофотографиях с помощью программы Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc.), биомассу вычисляли счетно-объемным методом. Концентрацию хлорофилла *a* в планктоне, скон-

центрированном на фильтрах Millipore (диаметр пор 0,4 мкм), определяли с помощью спектрофотометра Cintra 20 (GBC Scientific Equipment Ltd.) [16]. Суммарную ДНК выделяли из сетных проб, фиксированных 70 %-ным этиловым спиртом, с использованием набора ДНК-сорб (Амплипрайм, Россия). Амплификацию и клонирование генов синтеза микроцистина *mcuE* и сакситоксина *sxtA* проводили, как описано в работах [1, 2]. Полученные последовательности были депонированы в GenBank под номерами MF000761–MF000779 и MF977698–MF977703. Наличие МС в воде определяли методом ИФА, используя набор Microcystins ADDA ELISA (Abraxis LLC, США) в компании Стайлаб (Москва).

Результаты и обсуждение

В июле 2016 г. температура воды составляла на поверхности 20,1 °С, на глубине 72 м — 4,6 °С. В составе доминирующих видов фитопланктона зарегистрированы три вида цианобактерий — *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum lemmermannii*, *D. flos-aquae*, диатомовые водоросли *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*, динофлагеллят *Ceratium hirundinella*, десмидиевая водоросль *Staurastrum gracile* и зеленая водоросль *Sphaerocystis Schroeteri*.

Aph. flos-aquae наиболее часто упоминается как массовый вид при цветениях водоемов, приводящих к отравлениям домашних животных и рыб, может синтезировать STX, анатоксин и цилиндроспермопсин [12]. Физиология этой цианобактерии такова, что синтез токсинов максимален при температуре воды от 15 до 20 °С, а при дефиците азота внутриклеточная концентрация токсинов становится выше в 1,5–2 раза [13].

D. lemmermannii и *D. flos-aquae* — широко распространенные виды, имеющие несколько эко-типов. Наиболее характерные вторичные метаболиты этих цианобактерий — МС и анатоксины, однако они могут быть и продуцентами STX [10, 12].

Численность фитопланктона в слое 0–15 м составила 2,97 млн кл/л, биомасса — 2,75 г/м³. Концентрация хлорофилла *a* была максимальна в слое 0–5 метров и составляла 12,6 мкг/л, постепенно снижаясь до 1,2 мкг/л (для слоя 20–72 м). Доля цианобактерий в общей численности фитопланктона составила 27 %, однако их вклад в биомассу фитопланктона вследствие малого размера клеток составлял всего 2 % (78 мг/м³) (рис. 1). По концентрации хлорофилла статус водохранилища можно оценить как эвтрофный согласно классификации Vollenweider [20]. ВОЗ рекомендует ограничивать использование водоемов в рекреационных целях при численности цианобактерий свыше 20 млн кл/л [12]. В Богучанском водохранилище этот показатель был на порядок ниже порогового значения.

ПЦР-анализ со специфическими праймерами выявил наличие генов синтеза микроцистинов и сакситоксина и его производных. С помощью программы BLASTn установлено, что полученные авторами последовательности генов микроцистина на были на 99 % сходны с последовательностями штаммов *Dolichospermum lemmermannii* и *Anabaena* sp. из Финляндии и некультивируемых клонов из Усть-Илимского и Братского водохранилищ [1]. Последовательности *D. flos-aquae* кластеризовались отдельно внутри клады рода *Dolichospermum* (*Anabaena*)

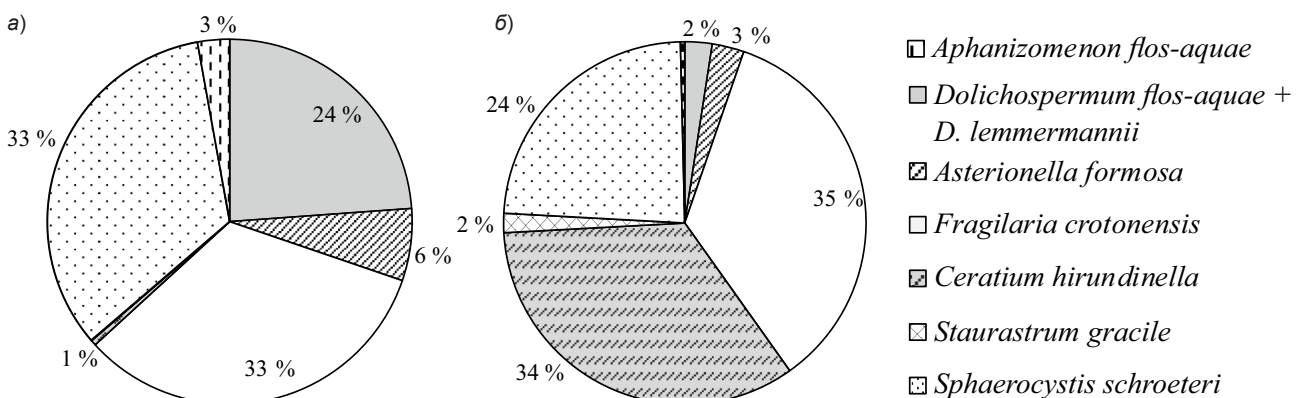


Рис. 1. Вклад доминирующих видов фитопланктона в среднюю численность (а) и биомассу (б) в слое 0–15 м.

(рис. 2). Вероятнее всего, продуцентом микроцистина в Богучанском водохранилище является вид *D. lemmermannii*. По данным ИФА концентрация МС в биомассе фитопланктона была невысокой и составляла 0,3 мкг/л.

Полученные фрагменты *sxtA* гена были на 99 % сходны с последовательностями штаммов *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aph. ovalisporum*, *Aph. gracile*, *Dolichospermum flos-aquae* и *D. circinale*, и с некультивируемыми последовательностями из Усть-Илимского водохранилища и озера Байкал, описанными ранее [2]. Однако этот участок гена не является родоспецифичным, поэтому невозможно предположить точно, какие из цианобактерий, присутствующих в Богучанском водохранилище, являются продуцентами паралитических токсинов моллюсков.

Выводы

Обнаружение токсинов цианобактерий в приплотинных водохранилищах гидроэлектростанций является мировой проблемой [14, 15]. В Богучанском водохранилище, находящемся на начальной стадии формирования, численность цианобактерий еще не достигла максимального прогнозируемого уровня [3]. Однако уже следует отметить, что олиготрофные воды р. Ангары меняются на эвтрофные Богучанского водохранилища, и наблюдается цианобактерий *D. lemmermannii*, *D. flos-aquae* и *Aphanizomenon flos-aquae*. Массовое появление этих азотфиксирующих микроорганизмов, способных к продукции токсинов, свидетельствует об активном процессе самоочищения и органическом загрязнении этой акватории. *D.lemmermannii* — рас-

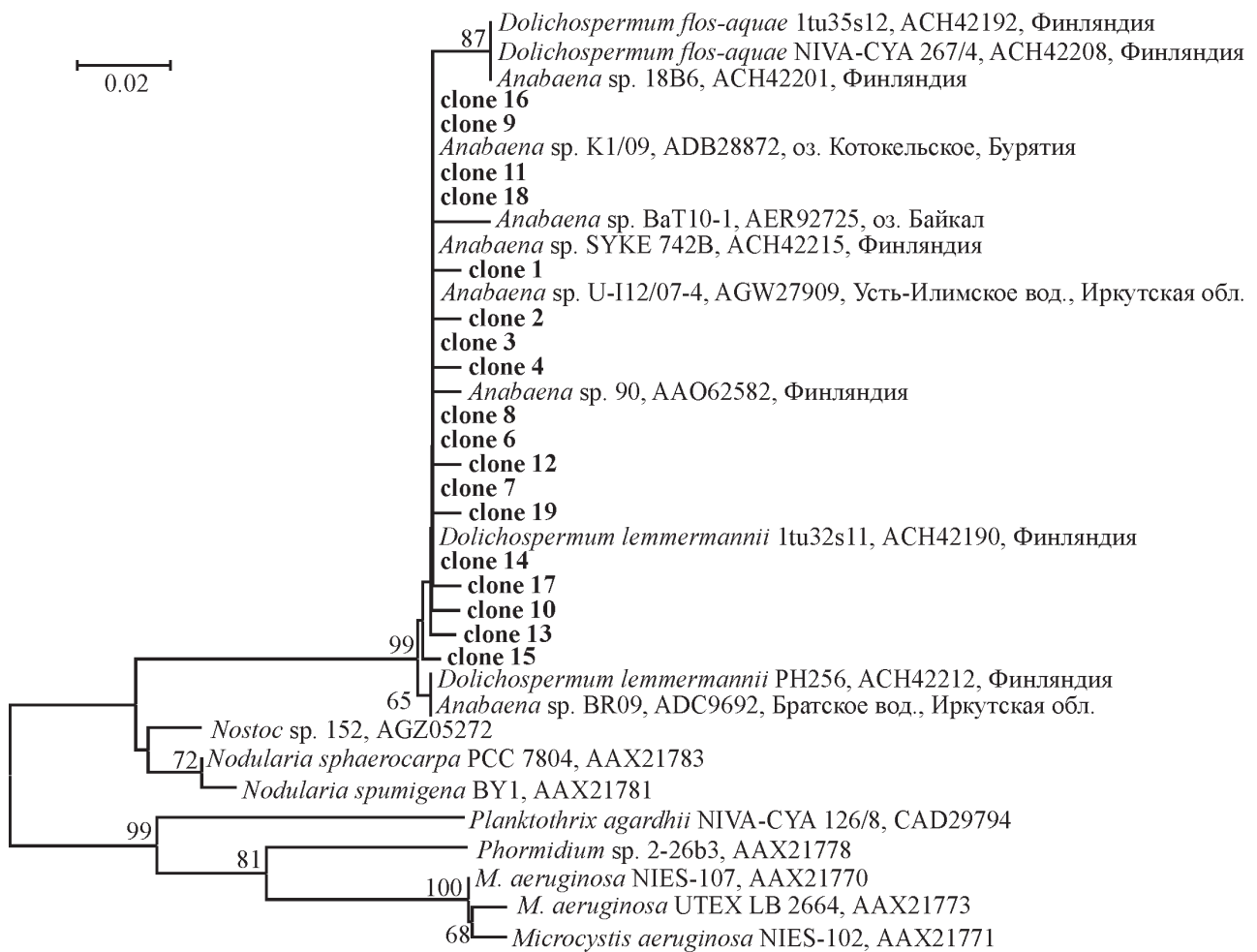


Рис. 2. Древо аминокислотных последовательностей АМТ-домена микроцистинсинтетазы цианобактерий, построенное с использованием метода ближайших соседей. Цифрами показаны результаты бутстреп-анализа 1000 реплик. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в данной работе. Масштаб соответствует двум заменам на 100 а.о.

4. Borodulin, I. V., Milyutkin, V. A. and Rosenberg, G. S. (2016). Razrabotka tekhnologiy i tekhnicheskikh sredstv dlya sbora i utilizatsii sine-zelenykh vodorosley [Development of technology and equipment for collection and disposal of blue-green algae]. *Samarskaya Luka: Problemy Regionalnoy i Globalnoy Ekologii*, vol. 25, No. 4, pp. 123–129 (in Russian).
5. Vorobyeva, S. S. (1995). *Fitoplankton vodoyomov Angary [Phytoplankton of Angara reservoirs]*. Novosibirsk: Nauka, 123 p. (in Russian).
6. Rakhmanin, A. Yu. (2012). Aktualizirovannye problemy zdorovya cheloveka i sredy yego obitaniya i problemy ikh resheniya [Updating the problems of human ecology and environmental health and the ways of solving them]. *Hygiene and Sanitation*, vol. 91, No. 5, pp. 4–8 (in Russian).
7. Tekhekspert (2017). *Tekhnichesky reglament Yevraziyskogo ekonomicheskogo soyuza "O bezopasnosti ryby i rybnoy produktii" (TR YeAES 040/2016). Prilozheniye 4 "Gigiyenicheskiye trebovaniya bezopasnosti k pishchevoy produktii" [Technical Regulations of the Eurasian Economic Union "On the safety of fish and fish products" (EEU TR 040/2016). Appendix 4 "Hygienic requirements for food safety"]*. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456089790> (in Russian).
8. Sheveleva, N. G. and Vorobyeva, S. S. (2009). Sostoyaniye i razvitiye fito- i zooplanktona nizhnego uchastka Angary, prognoz formirovaniya planktona v Boguchanskom vodokhranilishche [State and development of phyto- and zooplankton in lower reach of the Angara River: prognosis for forming plankton in Boguchanskoe Reservoir]. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, vol. 2, No. 3, pp. 313–326 (in Russian).
9. Capelli, C., Ballot, A., Cerasino, L., Papini, A. and Salmaso, N. (2017). Biogeography of bloom-forming microcystin producing and non-toxicogenic populations of *Dolichospermum lemmermannii* (Cyanobacteria). *Harmful Algae*, vol. 67, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.hal.2017.05.004.
10. Chernova, E., Sidelev, S., Russkikh, I., Voyakina, E., Babanazarova, O., Romanov, R., Kotovshchikov, A. and Mazur-Marzec, H. (2017). *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* as neurotoxins producers in some Russian freshwaters. *Toxicon*, vol. 130, pp. 47–55. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.02.016.
11. Chorus, I. (ed.) (2012). Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau-Roßlau: Federal Environmental Agency, 151 p.
12. Chorus, I. and Bartram, J. (eds.) (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management. London and New York: World Health Organization, 416 p.
13. Cires, S. and Ballot, A. (2016). A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria). *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 21–43. doi: 10.1016/j.hal.2015.09.007.
14. González-Piana, M., Fabian, D., Delbene, L., Chalar, G. (2011) Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Rio Negro reservoirs, Uruguay, *Harmful Algae News*, vol. 43, pp. 16–17.
15. González-Piana, M., Fabián, D., Piccardo, A. and Chalar G. (2017) Dynamics of total microcystin LR concentration in three subtropical hydroelectric generation reservoirs in Uruguay, South America. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 99, pp. 488–492. doi: 10.1007/s00128-017-2158-7.
16. Henriques, M., Silva, A. and Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. In: Mendez-Vilas, A. (ed.) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badajoz: Formatex, vol. 2, pp. 586–593.
17. Kellmann, R., Michali, T. K., Jeon, Y. J., Pickford, R., Pomati, F. and Neilan, B. A. (2008). Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, No. 13, pp. 4044–4053. doi: 10.1128/AEM.00353-08.
18. Kramer, B., Davis, T., Meyer, K., Rosen, B., Goleski, J., Dick, G., Oh, G. and Gobler, C. (2018). Nitrogen limitation, toxin synthesis potential, and toxicity of cyanobacterial populations in Lake Okeechobee and the St. Lucie River Estuary, Florida, during the 2016 state of emergency event. *PLoS ONE*, 13 (5), e0196278. doi: 10.1371/journal.pone.0196278.
19. Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W., Haselkorn, R. and Sivonen, K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, No. 2, pp. 686–692. doi: 10.1128/AEM.70.2.686-692.2004.
20. Vollenweider, R. A. and Kerekes, J. E. (1982). *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control*. Paris: OECD, 154 p.
21. Walls, J., Wyatt, K., Doll, J., Rubenstein, E. and Rober, A. (2018). Hot and toxic: temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. *Science of the Total Environment*, vol. 610–611, pp. 786–795. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.149.
22. WHO (2003). Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: coastal and fresh waters. Geneva: WHO, 219 p.

Авторы

Сороковикова Екатерина Георгиевна, канд. биол. наук
Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
E-mail: katrin@lin.irk.ru

Тихонова Ирина Васильевна, канд. биол. наук
Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
E-mail: iren@lin.irk.ru

Подлесная Галина Владимировна
Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
E-mail: podlesnaya@lin.irk.ru

Белых Ольга Ивановна, канд. биол. наук
Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Authors

Sorokovikova Ekaterina Georgievna, Ph. D. in Biology
Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
E-mail: katrin@lin.irk.ru

Tikhonova Irina Vasilevna, Ph. D. in Biology
Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
E-mail: iren@lin.irk.ru

Podlesnaya Galina Vladimirovna

Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
E-mail: podlesnaya@lin.irk.ru

Belykh Olga Ivanovna, Ph. D. in Biology

Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Подписано к печати 19.03.2019. Формат 60×90^{1/8}. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 11,8. Тираж 1000 экз. Заказ 26. «С» 4. Отпечатано на МФУ.
198095, Санкт-Петербург, ул. Розенштейна, д. 32, лит А