

УДК 574.5

## ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О ЦИАНОТОКСИНАХ И ГЕНАХ ИХ БИОСИНТЕЗА В ФИТОПЛАНКТОНЕ МЕЗОТРОФНОГО оз. ПЛЕЩЕЕВО (РОССИЯ) В ПЕРИОД ЦВЕТЕНИЯ ВОДЫ ЦИАНОБАКТЕРИЕЙ *Gloeotrichia echinulata*

© 2024 г. С. И. Сиделев<sup>a, b, \*</sup>, Л. Г. Корнева<sup>b</sup>, Е. Н. Чернова<sup>c</sup>, Е. Г. Сахарова<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

<sup>b</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

<sup>c</sup>Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: Sidelev@mail.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 05.03.2024 г.

Принята к публикации 14.05.2024 г.

Впервые приведены данные о цианобактериальных токсинах и генах их биосинтеза в фитопланктоне мезотрофного оз. Плещеево (Ярославская обл.) в период “цветения” воды цианобактерией *Gloeotrichia echinulata* (Smith et Soweby) Richter. В фитопланктоне озера методом хромато-масс-спектрометрии обнаружено присутствие гепатотоксинов микроцистинов, а в ДНК, выделенной из планктона, методом ПЦР детектирован ген *тсуЕ* биосинтеза этих цианотоксинов. В период проведения исследования других типов цианотоксинов (цилиндропермопсин, анатоксин-а, сакситоксины) и наличия генов их синтеза в фитопланктоне не идентифицировано. В 30 колониях *G. echinulata*, изолированных из озера, гены *тсуА* и *тсуЕ* биосинтеза микроцистинов отсутствовали, что согласуется с их неспособностью к продуцированию цианотоксина. Показана потенциальная способность к биосинтезу микроцистинов цианобактерии *Microcystis aeruginosa* и видов рода *Dolichospermum*, обитающих в озере, с использованием молекулярных методов. Обсуждаются вопросы токсичности *Gloeotrichia echinulata* и необходимость дальнейшего долгосрочного мониторинга токсигенных цианобактерий в оз. Плещеево.

**Ключевые слова:** цианотоксины, микроцистины, токсичные цианобактерии, *Gloeotrichia echinulata*, оз. Плещеево, гены *тсу*

**DOI:** 10.31857/S0320965224060145, **EDN:** WWUNBI

### ВВЕДЕНИЕ

Токсичные цианобактериальные “цветения” воды (англ. cyanobacterial Harmful Algae Blooms) характерны для эвтрофных и гиперэвтрофных пресных водоемов, что связано с загрязнением воды соединениями азота и фосфора и усугубляется глобальным потеплением климата (Huisman et al., 2018; Chorus, Welker, 2021; Зайцева, Медведева, 2022; Александров, Смирнова, 2023). В последнее время вызывают научный интерес сообщения о массовом развитии потенциально токсигенных цианобактерий в олиготрофных и мезотрофных водах с низким содержанием биогенных элементов (Lepistö et al., 2005; Ernst et al., 2009; Vareli et al., 2009), поскольку они не

согласуются с классической концепцией эвтрофирования озер. Одним из таких примеров являются случаи массовых вспышек обилия цианобактерии *Gloeotrichia echinulata* (Smith et Soweby) Richter, которая часто вызывает цветение воды в олиго- и мезотрофных озерах (Carey et al., 2007, 2012). Традиционно *G. echinulata* включают в список токсичных видов цианобактерий (Ingram, Prescott, 1954; Горюнова, Демина, 1974; Кондратьева, Коваленко, 1975; Codd et al., 1989; Skulberg et al., 1993; Metcalf, Codd, 2012; Nowruzzi, Porzani, 2021). Некоторые случаи отравления животных при употреблении воды и появления кожных раздражений при купании у людей связывали с массовым развитием *G. echinulata* (Ingram, Prescott, 1954; Cronberg et al., 1999; Carey et al., 2012). Токсический эффект штамма *G. echinulata* UTEX 1303 на инфузории *Paramecium caudatum* Ehr. был

**Сокращения:** AN-а – анатоксин-а, CYN – цилиндропермопсин, MC – микроцистины, STX – сакситоксины.

продемонстрирован в лабораторных экспериментах, однако токсический агент не был выделен и идентифицирован (Ransom et al., 1978). Известно, что цианобактерии способны продуцировать разнообразные метаболиты, проявляющие токсические и аллелопатические свойства в отношении позвоночных и беспозвоночных животных, водных растений и микроводорослей (Chorus, Welker, 2021). По биологической активности в отношении млекопитающих цианобактериальные токсины принято классифицировать на гепатотоксины (>250 вариантов микроцистинов (MC)), цитотоксины (цилиндропермопсин (CYN)), нейротоксины – анатоксин-а (AN-a) и сакситоксины (STX), а также дерматотоксины (Chorus, Welker, 2021). Показано, что все эти метаболиты нерибосомно синтезируются в клетках цианобактерий с участием сложных мультиферментных комплексов, информация о которых закодирована в генных кластерах. Присутствие “генов токсичности” в клетках свидетельствует о потенциальной способности цианобактерий продуцировать соответствующие токсические метаболиты (Pearson et al., 2016).

Озеро Плещеево – одно из самых больших и чистых озер средней полосы России. Входит в состав национального парка, образованного в 1988 г., и представляет собой уникальный водоем в историческом, хозяйственном, рекреационном, научном и природоохранном аспектах. Озеро является источником питьевого водоснабжения для населения г. Переславль-Залесский. В последние годы (2014–2016 гг.) экологическое состояние озера по показателям фитопланктона было удовлетворительным, оно характеризовалось как стабильно мезотрофное, олиго-бета-мезосапробное с невысокими биомассами цианобактерий (Сахарова, 2019). Однако, начиная с 2017 г., в оз. Плещеево ежегодно наблюдают “цветения” воды, вызванные вспышками вегетации *G. echinulata* (рис. 1а), и локальные заморы рыбы. Ранее подобное явление для озера не отмечали (Экосистема..., 1989; Костина, 1992; Сахарова, 2019; Сиделев, Бабаназарова, 2020). Особая озабоченность местных властей и жителей связана с возможной токсичностью глеотрихии. Поскольку литературные данные о токсичности *G. echinulata* весьма противоречивы, важной задачей было определение присутствия цианотоксинов в оз. Плещеево и выяснение возможности *G. echinulata* продуцировать токсины.

Цель работы – исследовать присутствие разных типов цианотоксинов и определить их вероятных продуцентов молекулярными методами в мезотрофном оз. Плещеево в период массового развития *G. echinulata*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Озеро Плещеево – димиктический водоем ледникового происхождения,

расположено на юге Ярославской обл. между Нерльской низменностью и северными склонами Клинско-Дмитровской гряды в пределах 56°43'31"–56°48'26" с.ш. и 38°42'20"–38°50'36" в.д. (Экосистема..., 1989). Площадь акватории при среднемноголетнем уровне озера 137.31 мБС составляет 50.8 км<sup>2</sup> (Рохмистров, 1992). Озеро имеет овальную форму с хорошо развитой литоральной зоной, достигающей ~21% площади акватории. Максимальная глубина в центральной глубоководной части озера 24.3 м. Донные отложения представлены в мелководной части озера средними и мелкими песками, в глубоководной – илами (Экосистема..., 1989). Воды озера среднеминерализованны (~300 мг/л), нейтральные, относятся к кальциевой группе гидрокарбонатного класса, характеризуются высокой прозрачностью, достигающей до 5.5 м (Экосистема..., 1989). Средняя за вегетационный сезон биомасса фитопланктона в озере в разные годы варьировала от 1.0 до 3.5 мг/л (Экосистема..., 1989; Костина, 1992; Сахарова, 2019). Для ее сезонной динамики характерно два максимума: весенний, с доминированием диатомовой водоросли *Aulacoseira islandica* (O. Müll.) Sim., и летний, когда лидировали динофитовые водоросли и цианобактерии. По средним количественным характеристикам бактерио- и фитопланктона оз. Плещеево относится к мезотрофному типу с эвтрофными участками (Копылов, Косолапов, 2007; Сахарова, 2019).

**Обработка проб фитопланктона.** Для оценки таксономического состава, численности и биомассы фитопланктона в начале июля и в конце августа 2021 г. отбирали пробы из поверхностного слоя воды. Для количественного учета водорослей фитопланктон концентрировали методом прямой фильтрации 0.5 л воды под давлением последовательно через мембранные фильтры с диаметром пор 5 мкм и 1.2 мкм. Пробы сгущали до объема 5 мл и консервировали раствором Люголя с добавлением формалина, хромовой и ледяной уксусной кислот (Кузьмин, 1975). Помимо этого, для сбора фитопланктона использовали горизонтальное траление (~100 м) в поверхностном слое воды планктонной сетью с размером ячеек газа 64 мкм. Количественную оценку фитопланктона проводили с использованием светового микроскопа “Микромед 3 (вар. 3-20М)” в счетной камере “Учинская-2” объемом 0.01 мл. Для определения биомассы использовали обычный счетно-объемный стереометрический метод (Кузьмин, 1975). Линейные размеры клеток получали путем измерения клеток каждого встреченного организма. К доминирующим относили виды, биомасса которых составляла ≥10% суммарной биомассы фитопланктона.

**Хромато-масс-спектрометрический анализ цианотоксинов.** Пробы для определения внутриклеточных цианотоксинов представляли собой

сконцентрированную сеткой и высушенную биомассу фитопланктона. Проанализированы две пробы, собранные в озере 20 августа 2018 г. и 24 августа 2021 г. Для анализа MC, AN-а и CYN пробы высушенной биомассы предварительно обрабатывали 75%-ным метанолом в ультразвуковой ванне (Chernova et al., 2016; Sidelev et al., 2020). Производные STX извлекали из биомассы под действием ультразвука с использованием смеси 4 mM формиатного буфера с pH 3.5 и ацетонитрила с добавкой формиатного буфера (95:5, v/v) в соотношении 40:60 согласно (Halme et al., 2012).

При анализе использовали системы ВЭЖХ Prominence LC-20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Разделение MC, CYN и AN-а проводили на колонке Thermo Hypersil Gold RP C18 (100 мм × 3 мм, 3 мкм) с предколонкой Hypersil Gold (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) в режиме градиентного элюирования (0.2 мл/мин) смесью воды и ацетонитрила, содержащих 0.05% муравьиной кислоты. Производные соединения STX анализировали по методу, модифицированному в работе (Halme, 2012), используя колонку SeQuant ZIC-HILIC (100 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм) с предколонкой SeQuant ZIC-HILIC (20 мм × 2.1 мм) (Merck, Darmstadt, Germany) в режиме градиентного элюирования. Подвижная фаза состояла из двух компонентов: 4 mM буфер аммония формиата с pH 3.5 и ацетонитрил с добавкой аммония формиатного буфера (95 : 5, v/v).

Масс-спектрометрический анализ проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме детектирования положительных ионов. Целевые соединения идентифицировали на основании точного измерения массы ионов (разрешение 30 000, точность в пределах 5 ppm) и хроматографических времен удерживания. Для количественного определения применяли метод внешнего стандарта. Подробная информация об использованных реактивах и стандартах опубликована ранее (Чернова и др., 2016; Chernova et al., 2016; Chernova et al., 2017; Sidelev et al., 2020).

**Молекулярно-генетические методы.** Сетную пробу планктона, отобранную из озера 24 августа 2021 г. в период “цветения” воды цианобактерией *Gloeotrichia echinulata*, использовали для выделения метагеномной ДНК с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep 200 (ООО Лаборатория Изоген, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. ПЦР для детекции у цианобактерий гена *mcyE*, ответственного за синтез MC, проводили с помощью родоспецифичных праймеров *mcyE-F2/MicmcyE-R8* (*Microcystis*), *mcyE-F2/AnamcyE-12R* (*Dolichospermum*) и *mcyE-F2/mcyE-plaR3* (*Planktothrix*), позволяющих дифференцировать продуцентов

на родовом уровне непосредственно из природных проб со смешанным составом цианобактерий (Vaitooma et al., 2003; Rantala et al., 2006). Также был проведен поиск генов *aoaA*, *anaC* и *stxA*, отвечающих у цианобактерий за синтез CYN, AN-а и STX, с использованием соответствующих праймеров CatF1/CatR1, anaC-genF/anaC-genR и sxtaf/sxtar (Ballot et al., 2010; Rantala-Ylisen et al., 2011; Baron-Sola et al., 2012). Характеристики праймеров приведены в табл. 1. Амплификацию специфических участков генов синтеза цианотоксинов проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с применением готовой смеси реагентов GenPak PCR Core (ООО Лаборатория Изоген, Россия) в объеме 20 мкл по следующей программе: предварительная денатурация ДНК при 95°C в течение 3 мин, затем 40 циклов амплификации – 95°C в течение 30 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 1 мин, последний этап – элонгация при 72°C в течение 10 мин. В качестве положительных контролей использовали ДНК цианобактерий *Microcystis aeruginosa* штамм PCC 7806, *Planktothrix agardhii* штамм NIVA-CYA 126 и *Dolichospermum lemmermannii* (природные колонии из оз. Рюмниково, Ярославская обл.), продуцирующих MC, а также CYN-синтезирующего *Aphanizomenon* sp. штамм 10E9 и STX-продуцирующего *Aphanizomenon* sp. штамм AB59. В отрицательной контрольной реакции использовали ДНК цианобактерии, не продуцирующей исследуемых цианотоксинов (альгологически чистая культура *Gloeocapsa* sp.). Продукты ПЦР фракционировали электрофоретически в 1.5%-ном агарозном геле и анализировали в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием при помощи гель-документирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Дополнительно для видовой идентификации вероятных продуцентов MC 10 колоний *Microcystis aeruginosa* и 30 колоний *Gloeotrichia echinulata* были отобраны из планктонных проб, собранных в озере 18 августа 2016 г. и 24 августа 2021 г. соответственно. Для проведения “одноколониевой” ПЦР (single colony PCR) использовали методику из работы (Kurmayr, 2017). Кратко, колонии случайно отбирали с использованием бинокуляра и пипетки Пастера. Каждую колонию трижды промывали стерильной водой, проверяли отсутствие других потенциально токсичных цианобактерий, используя микроскоп (Axioscop 40L, Carl Zeiss, Germany), и помещали в отдельные стерильные пробирки. ДНК напрямую выделяли из каждой очищенной колонии с использованием ионообменной смолы Chelex-100 (набор InstaGene Matrix, Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Присутствие ДНК *Gloeotrichia echinulata* в образцах после ее выделения, а также отсутствие ингибиторов ПЦР проверяли с помощью амплификации фрагмента гена *nifH*, кодирующего одну из субъединиц (Fe-белок)



Таблица 1. Характеристика праймеров

Праймер	Ген-мишень	Последовательность нуклеотидов праймера (5'→3')	Размер ПЦР-продукта (пн)	Литературный источник
mcyE-F2 AnamcyE-12R	<i>mcyE</i> ( <i>Dolichospermum</i> )	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC CAATCTCGGTATAGCGGC	250	Vaitomaa et al., 2003
mcyE-F2 MicmcyE-R8	<i>mcyE</i> ( <i>Microcystis</i> )	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC CAATGGGAGCATAACGAG	250	Vaitomaa et al., 2003
mcyE-F2 mcyE-plaR3	<i>mcyE</i> ( <i>Planktothrix</i> )	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC CTCAATCTGAGGATAACGAT	250	Rantala et al., 2006
nifHf nifHr	<i>nifH</i>	CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA GCATACATCGCCATCATTTACC	350	Gugger et al., 2005
sxtaf sxtar	<i>sxtA</i>	GCGTACATCCAAGCTGGACTCG GTAGTCCAGCTAAGGCACTTGC	600	Ballot et al., 2010
CatF1 CatR1	<i>aoaA</i>	AGATGGTGCTTATTTTGAAC TCTTCACAGATGACCTTCTT	881	Baron-Sola et al., 2012
anaC-genF anaC-genR	<i>anaC</i>	TCTGGTATTCAGTCCCCTCTAT CCCAATAGCCTGTATCAA	366	Rantala-Ylinen et al., 2011
mcyA-Cd 1F mcyA-Cd 1R	<i>mcyA</i>	AAAATTTAAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	297	Hisbergues et al., 2003
HEPF HEPR	<i>mcyE</i>	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGG- CATAGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	472	Jungblut, Neilan, 2006

нитрогеназы у азотфиксирующих цианобактерий. ПЦР проводили с праймерами nifHf/nifHr (Gugger et al., 2005). После этого в образцах ДНК, выделенной из *G. echinulata*, проводили поиск двух генов биосинтеза MC (*mcyA* и *mcyE*) с помощью универсальных к гепатотоксичным цианобактериям праймеров mcyA-Cd1F/mcyA-Cd1R (Hisbergues et al., 2003) и HEPF/HEPR (Jungblut, Neilan, 2006). В случае с колониями *Microcystis aeruginosa* использовали *Microcystis*-специфичные праймеры mcyE-F2/MicmcyE-R8 для детекции гена *mcyE* биосинтеза MC.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Фитопланктон.** В июле 2021 г. общая биомасса фитопланктона в поверхностном слое оз. Плещеево варьировала от 0.6 до 68 мг/л. На всех участках доминировала цианобактерия *Gloeotrichia echinulata*, биомасса которой составляла от 23 до 99% суммарной биомассы фитопланктона (табл. 2). Ей сопутствовали миксотрофные фитоплагелляты из золотистых *Dinobryon divergens* Imhof (4–11%) и динофитовых *Peridinium cinctum* Ehr. (11–22%). В августе 2021 г., наряду с *Gloeotrichia echinulata*, из цианобактерий доминировал *Dolichospermum* sp. (рис. 1).

**Хромато-масс-спектрометрический анализ цианотоксинов.** В двух пробах, отобранных 20.08.2018 г. и 24.08.2021 г. в период “цветения” воды *Gloeotrichia echinulata*, были обнаружены следовые количества внутриклеточных MC. Содержание MC

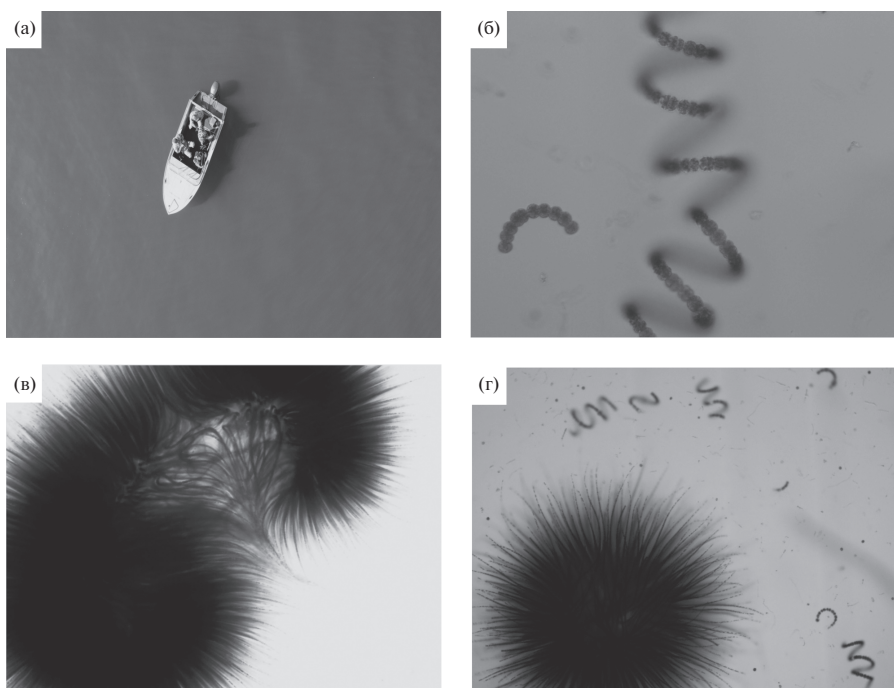
не превышало десятков наногрмм токсина на грамм сухой массы собранной биомассы фитопланктона. В августе 2018 г. в образце присутствовало два варианта MC: MC-RR и [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR (рис. 2). Идентифицированные структуры были подтверждены с помощью фрагментных спектров (рис. 3). В пробе фитопланктона с большим количеством макроскопических колоний *G. echinulata*, отобранной в августе 2021 г., было детектировано следовое количество наиболее токсичного варианта микроцистинов – MC-LR. Внутриклеточные AN-a, STX и CYN в пробах из оз. Плещеево не были обнаружены.

**ПЦР анализ генов биосинтеза цианотоксинов.** В ДНК, выделенной из планктона оз. Плещеево, амплифицировали специфичные для *Microcystis* и *Dolichospermum* участки гена микроцистинсинтеза *mcyE* (рис. 4). Гены, ответственные за биосинтез MC у видов *Planktothrix* (*mcyE*) (рис. 4), гены синтеза AN-a (*anaC*), STX (*sxtA*) и CYN (*aoaA*) в “планктонной” ДНК не были детектированы. Количества ДНК, выделенной из каждой отдельной колонии *Microcystis aeruginosa* или *Gloeotrichia echinulata*, оказалось достаточно для проведения ПЦР. Как показано на рис. 5а, наличие ДНК цианобактерии *G. echinulata* в пробирках и отсутствие ингибирования ПЦР было подтверждено успешной амплификацией участка гена *nifH*, кодирующего одну из субъединиц нитрогеназы у азотфиксирующих цианобактерий. Однако молекулярный анализ колоний *G. echinulata* с

**Таблица 2.** Состав и биомасса (мг/л) цианобактерий в фитопланктоне оз. Плещеево

Вид	Станция						
	1	2	3	4	5	6	7
	Июль 2021 г.						
<i>Dolichospermum</i> sp.	0.017	0.034	0.019	0.016	0.005	0.007	0.002
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	0.369	1.305	0.199	0.148	0.188	1.143	67.772
	Август 2021 г.						
<i>Dolichospermum</i> sp.	–	0.637	–	0.822	–	0.979	–
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	–	66.987	–	7.372	–	0	–

Примечание. 1 – глубоководная центральная котловина; 2 – исток р. Векса; 3 – глубоководная оконечность центральной котловины; 4 – юго-восточная часть озера, литораль у водозабора; 5 – выход р. Трубеж; 6 – юго-западная часть озера, между Ботиком Петра I и р. Еглевка; 7 – траление планктонной сетью ~100 м; “–” – данные отсутствуют.



**Рис. 1.** Озеро Плещеево: а – цветение воды *G. echinulata* (фото А.И. Цветкова); б – трихом *Dolichospermum* sp. в фитопланктоне (проба от 24.08.2021 г.); в, г – колонии *G. echinulata* в фитопланктоне (проба от 24.08.2021 г.) (фото Л.Г. Корневой).

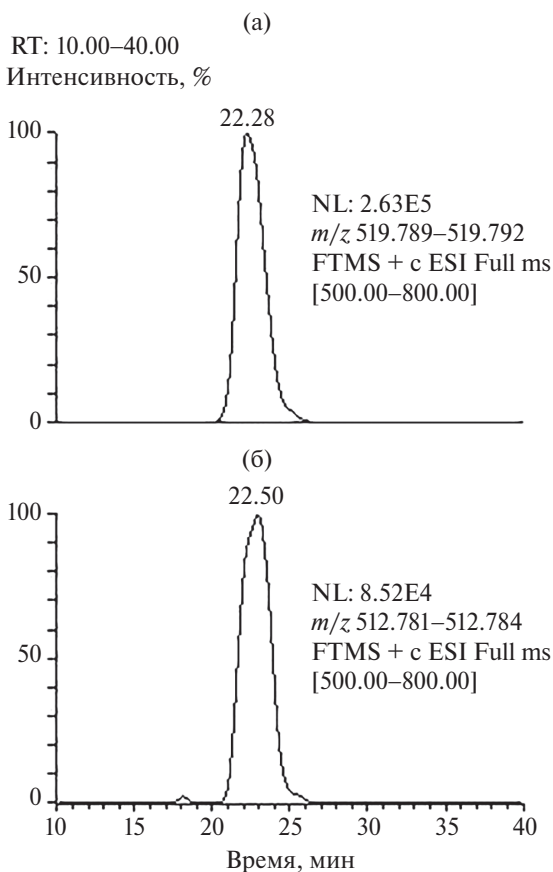
использованием универсальных праймеров НЕР и *msuACd* подтвердил отсутствие в ДНК этой цианобактерии генов *msuE* и *msuA*, необходимых для синтеза МС (рис. 5б, 5в). Напротив, все проанализированные 10 колоний *Microcystis aeruginosa*, изолированные из оз. Плещеево, содержали ген *msuE* биосинтеза МС (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые в фитопланктоне оз. Плещеево был проведен поиск цианотоксинов и их продуцентов с использованием молекулярных и масс-спектрометрических методов. Оба методических подхода показали согласующиеся результаты. В фитопланктоне озера выявлено присутствие опасных для животных и людей гепатотоксинов МС и

генов их биосинтеза. Других типов цианотоксинов, в частности, цито- и нейротоксинов, в период исследования не обнаружено.

Поскольку *Gloeotrichia echinulata* традиционно относится к токсичным видам (Ingram, Prescott, 1954; Codd et al., 1989; Skulberg et al., 1993; Nowruzzi, Porzani, 2021), мы предполагали, что эта цианобактерия могла быть продуцентом МС в оз. Плещеево. В последние годы здесь отмечают массовые вспышки развития *G. echinulata*, что вызывает тревогу местных жителей, поскольку водоем является источником питьевого водоснабжения г. Переславль-Залесский. Неожиданным результатом оказалось обнаружение лишь следовых количеств МС в проанализированных образцах сетных проб, что плохо согласовалось с высокой биомассой *G. echinulata*. Молекулярный анализ



**Рис. 2.** Масс-хроматограммы по выделенному току для экстракта фитопланктона из оз. Плещеево (дата 20.08.2018): а –  $m/z$  519,79, соответствующий сигналу двухзарядного иона MC-RR; б –  $m/z$  512,78, соответствующий сигналу двухзарядного иона [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR. По оси ординат дана интенсивность, %.

колоний *G. echinulata* из оз. Плещеево не выявил наличия генов, ответственных за биосинтез MC. Эти данные противоречили гипотезе о способности этой цианобактерии продуцировать MC в оз. Плещеево. Ранее (Сиделев, Бабаназарова, 2020) нами также было показано отсутствие генов биосинтеза MC в колониях *G. echinulata*, выделенных из Горьковского водохранилища (г. Ярославль). Сообщения о возможной токсичности *G. echinulata* основывались на случаях отравления людей и животных при купании в водоемах или при употреблении “цветущей” воды, в которой присутствовали колонии этой цианобактерии (Ingram, Prescott, 1954; Codd et al., 1989; Cronberg et al., 1999). Однако во всех описанных эпизодах токсикога животных или людей *G. echinulata* не образовывала монодоминантного цветения воды; совместно с этим видом, в “цветущей” воде развивались и другие потенциально токсичные цианобактерии. Таким образом, подтвердить токсичность *G. echinulata*, основываясь только на наблюдениях в природе, не представляется возможным. Токсикологические эксперименты,

проведенные на мышах с разными штаммами *G. echinulata*, продемонстрировали отсутствие острого токсического эффекта (Gorham, 1962, 1964; Kappers et al., 1981; Leeuwangh et al., 1983). Однако недавно были опубликованы две работы (Carey et al., 2007, 2012), где впервые сообщалось об обнаружении внутриклеточного MC-LR в колониях *G. echinulata* из некоторых олиготрофных озер США. Необходимо отметить, что эти данные пока нельзя считать убедительным доказательством способности *G. echinulata* продуцировать MC. Используемый авторами метод иммуноферментного анализа MC (ELISA) рекомендуется применять для первоначального скрининга цианотоксинов и положительные результаты детекции MC необходимо подтверждать независимыми методами, такими как ПЦР или/и хромато-масс-спектрометрия, что в этих работах не было сделано. Метод ELISA не способен дифференцированно определять разные варианты MC, поэтому сообщение о присутствии именно варианта MC-LR в биомассе *G. echinulata* в данном случае нельзя считать подтвержденным. Кроме того, авторы не сообщили о других видах цианобактерий, которые могли присутствовать в небольшом количестве в фитопланктоне исследованных озер, совместно с колониями *G. echinulata*. Используемый метод сбора большого количества (100) колоний *G. echinulata* для анализа методом ELISA не исключал возможности попадания других потенциально токсигенных цианобактерий, которые могли легко прилипнуть к колониям *G. echinulata* и быть источником MC. Возможно, на это указывают и очень низкие количества MC (58–7148 нг MC-LR на грамм сухой массы колоний), обнаруженные в биомассе собранных колоний *G. echinulata* (Carey et al., 2012). Таким образом, вопрос о способности *G. echinulata* продуцировать MC остается дискуссионным.

Низкое содержание MC в биомассе фитопланктона оз. Плещеево, несмотря на массовое развитие *G. echinulata*, могло объясняться сопутствующим присутствием малочисленных популяций других MC-продуцирующих цианобактерий. Это предположение нашло подтверждение при молекулярно-генетическом анализе ДНК, выделенной из фитопланктона. Так, в “планктонной” ДНК был обнаружен ген *tcyE* биосинтеза MC, принадлежащий видам *Microcystis* и *Dolichospermum*. Дополнительно с помощью метода “одноколониальной” ПЦР подтверждено присутствие гена *tcyE* в колониях *Microcystis aeruginosa*, изолированных из планктона озера. Это доказывало, что источником MC в оз. Плещеево были цианобактерии из рода *Dolichospermum* и *Microcystis aeruginosa*. Их присутствие в фитопланктоне озера обнаружено в настоящем исследовании. Ранее было показано, что в фитопланктоне озера среди цианобактерий в летний период преобладали виды рода

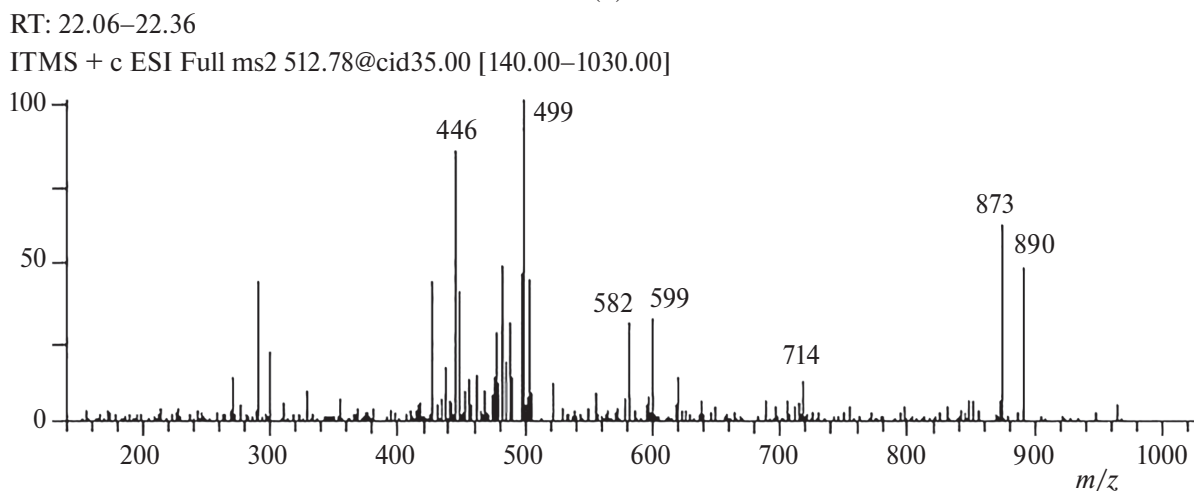
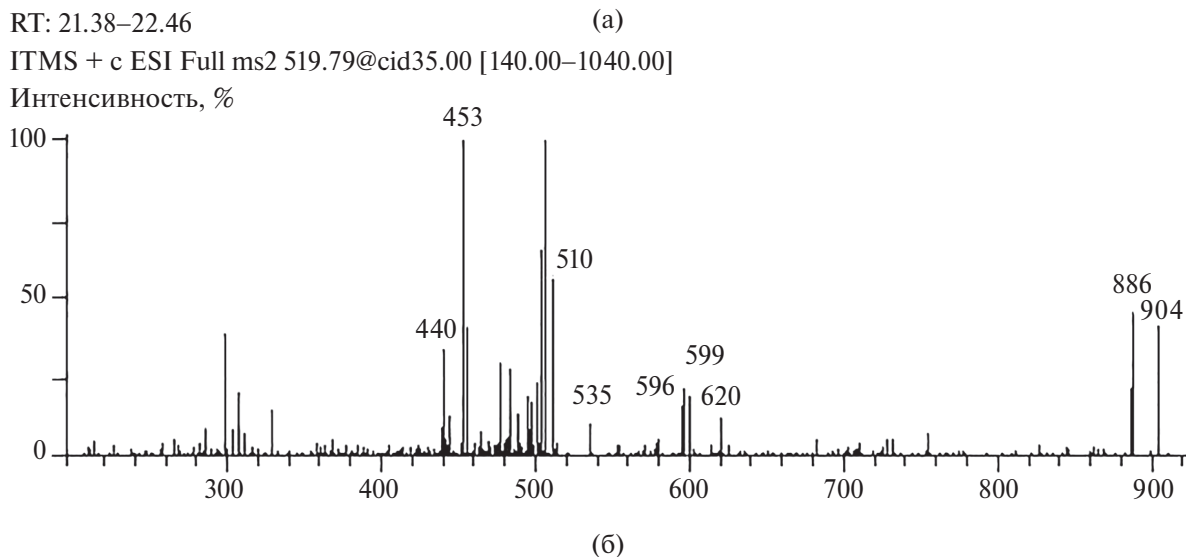


Рис. 3. Полные MS/MS-спектры: а – вариант структуры MS-RR для  $m/z$  519.79; б – вариант структуры  $[D\text{-Asp}^3]\text{MS-RR}$  для  $m/z$  512.78. По оси ординат дана интенсивность, %.

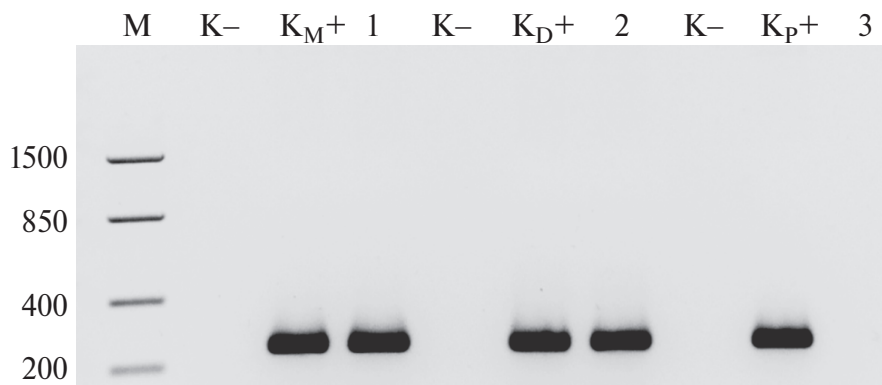
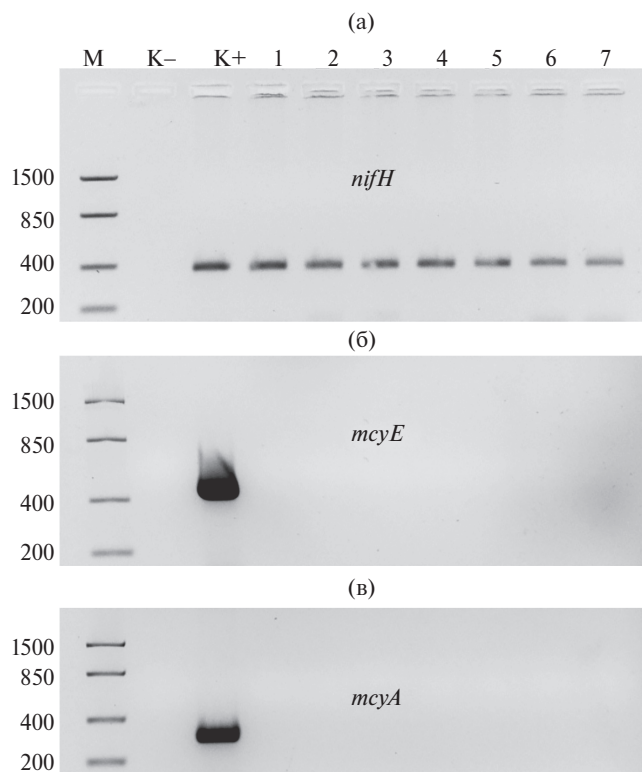


Рис. 4. Амплификация участка гена *tcyE* в ДНК, выделенной из планктонной пробы оз. Плещеево (24.08.2021 г.). Дорожки: М – маркер молекулярной массы ДНК (пн); К<sup>-</sup> – отрицательная контрольная реакция (ДНК MS-непродуцирующей *Gloeocapsa* sp.); К<sub>М</sub><sup>+</sup> – ДНК *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 с праймерами *tcyE*-F2/*Mic**tcyE*-R8; 1 – “планктонная” ДНК из оз. Плещеево с праймерами *tcyE*-F2/*Mic**tcyE*-R8; К<sub>Д</sub><sup>+</sup> – ДНК *Dolichospermum lemmermannii* с праймерами *tcyE*-F2/*Ana**tcyE*-12R; 2 – “планктонная” ДНК из оз. Плещеево с праймерами *tcyE*-F2/*Ana**tcyE*-12R; К<sub>Р</sub><sup>+</sup> – ДНК *Planktothrix agardhii* NIVA–СYA 126 с праймерами *tcyE*-F2/*tcyE*-plaR3; 3 – “планктонная” ДНК из оз. Плещеево с праймерами *tcyE*-F2/*tcyE*-plaR3.

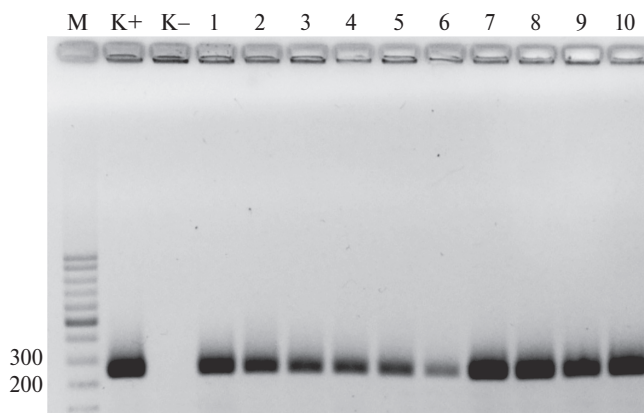




**Рис. 5.** ПЦР анализ на присутствие генов *nifH* (а), *mcyE* (б) и *mcyA* (в) в ДНК отдельных колоний *G. echinulata*, изолированных из планктона оз. Плещеево. Дорожки: К– – отрицательная контрольная реакция (ДНК *Gloeocapsa* sp.); К+ – положительный контроль (а – ДНК *Aphanizomenon* sp. 10E9, б и в – ДНК *Microcystis aeruginosa* 7806; 1–7 – ДНК отдельных колоний *Gloeocapsa echinulata* из оз. Плещеево.

*Dolichospermum* (ранее *Anabaena*), *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs и *Microcystis aeruginosa* (Экосистема..., 1989; Костина, 1992; Сахарова, 2019). При этом, в 1990 г. и в 2014–2015 гг. биомасса цианобактерий в среднем для озера не превышала 0.3 мг/л. Цианобактерии появились в эпилимнионе с установлением температурной летней стратификации и сохранялись до октября (Костина, 1992; Сахарова, 2019).

Поскольку МС, в том числе МС-LR, в биомассе цианобактерий оз. Плещеево были обнаружены лишь в следовых количествах, это не представляет пока серьезной экологической опасности и угрозы здоровью людей. Следует отметить, что в исследованиях оз. Плещеево в июне и августе 2013 г. в озерной воде не было детектировано присутствие МС-продуцирующих цианобактерий молекулярными методами и МС методом ELISA. Также в водопроводной воде, поступающей к жителям г. Переславль-Залесский, МС отсутствовали (Сиделев, Бабаназарова, 2020). Все эти факты свидетельствуют, что МС–продуцирующие генотипы в популяциях *Microcystis* и *Dolichospermum* размножаются в планктоне озера в разные годы спорадически и составляют, по-видимому, незначительную долю в общей численности и



**Рис. 6.** ПЦР анализ на присутствие гена *mcyE* в ДНК отдельных колоний *M. aeruginosa*, изолированных из планктона оз. Плещеево. Дорожки: К+ – положительный контроль (ДНК штамма *M. aeruginosa* РСС 7806); К– – отрицательная контрольная реакция (ДНК МС-непродуцирующей *Gloeocapsa* sp.); 1–10 – ДНК-колоний *M. aeruginosa* из оз. Плещеево.

биомассе фитопланктона. Однако в работе (Carey, Rengefors, 2010) было экспериментально показано, что присутствие колоний *Gloeotrichia echinulata* стимулирует рост *Microcystis* и *Dolichospermum*. Хотя механизм этого явления неизвестен, авторы предположили способность *Gloeotrichia echinulata* экскретировать в воду биоактивные вторичные метаболиты, а также соединения азота и фосфора. Следовательно, необходимым мониторинг в оз. Плещеево популяции *G. echinulata*, а также популяций *Microcystis* и *Dolichospermum* как потенциальных продуцентов МС. Возрастание биомассы цианобактерий *Microcystis* и *Dolichospermum* будет служить индикатором увеличения рисков негативного воздействия МС как на экосистему водоема, так и на здоровье людей. Следует отметить, что, несмотря на отсутствие убедительных доказательств способности *Gloeotrichia echinulata* продуцировать МС, не исключено, что этот вид способен выделять другие еще неидентифицированные токсичные для гидробионтов соединения, что было показано в работе (Ransom et al., 1978). Также следует ожидать появления косвенных негативных последствий “цветения” воды *G. echinulata* для экосистемы оз. Плещеево. В августе 2023 г. в р. Векса и в самом озере наблюдали замор рыбы из-за снижения концентрации кислорода в воде, вызванного бурным развитием и разложением отмирающей биомассы глеотрихи-<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Шibaева А. Плавают рядом с берегом: в Плещеевом озере в Ярославской области заметили мертвую рыбу. URL: <https://76.ru/text/ecology/2023/08/10/72586997> (Дата обращения 27.10.2023).

<sup>2</sup> Геворкян К. Вода изменила цвет: в прокуратуре ответили на жалобу о море рыбы в Плещеевом озере и реке Вексе. URL: <https://76.ru/text/ecology/2023/08/22/72620075> (Дата обращения 27.10.2023).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые был проведен анализ фитопланктона оз. Плещеево на присутствие основных типов цианотоксинов, а также генов их биосинтеза. Среди цианотоксинов в биомассе фитопланктона идентифицированы лишь следовые количества MC-LR, MC-RR и [D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR. Первоначальное предположение о способности *G. echinulata* из оз. Плещеево продуцировать MC не подтвердилось. Однако в ДНК, выделенной из планктона озера, были обнаружены гены *mcuE* биосинтеза MC, принадлежащие видам *Microcystis* и *Dolichospermum*, обитающим в озере. Поскольку известно, что цветение воды глеотрихией в дальнейшем способно стимулировать рост биомассы *Microcystis* и *Dolichospermum*, рекомендуется проводить постоянный мониторинг популяций этих цианобактерий в оз. Плещеево для оценки риска негативного влияния гепатотоксичных MC на гидробионтов и здоровье людей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы глубоко признательны А.И. Цветкову (Институт биологии внутренних вод РАН) за предоставленные материалы аэрофотосъемки озера в период цветения воды цианобактериями и за помощь в отборе проб фитопланктона.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке государственных заданий № 124032100076-2 и 122041100086-5. Молекулярно-генетические исследования были проведены в научно-образовательной лаборатории “Молекулярная генетика и биотехнология” и финансировались в рамках программы развития Ярославского государственного университета до 2030 г. (№ 123042800011-6).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров С.В., Смирнова М.М. 2023. Влияние “цветения” воды на прибрежную зону Куршского залива Балтийского моря // Биология внутр. вод. № 6. С. 801. <https://doi.org/10.31857/S0320965223060037>
- Горюнова С.В., Демина Н.С. 1974. Водоросли – продуценты токсических веществ. М.: Наука.
- Зайцева Т.Б., Медведева Н.Г. 2022. Влияние биогенных элементов на рост нитчатых цианобактерий – возбудителей “цветения” воды и синтез ими метаболитов // Биология внутр. вод. № 3. С. 290. <https://doi.org/10.31857/S0320965222030196>
- Кондратьева Н.В., Коваленко О.В. 1975. Краткий определитель видов токсических синезеленых водорослей. Киев: Наук. думка.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б. 2007. Микробиологические индикаторы эвтрофирования пресных

- водоемов // Сб. матер. междунар. конф. “Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем”. СПб.: ЛЕМА. С. 176.
- Костина Т.Б. 1992. Фитопланктона озера Плещеево в 1990 г. // Факторы и процессы эвтрофикации озера Плещеево. Ярославль: Яросл. гос. ун-т. С. 28.
- Кузьмин Г.В. 1975. Фитопланктон. Видовой состав и обилие // Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М.: Наука. С. 73.
- Рохмистров В.Л. 1992. Физико-географические особенности бассейна озера Плещеево // Факторы и процессы эвтрофикации озера Плещеево. Ярославль: Яросл. гос. ун-т. С. 5.
- Сахарова Е.Г. 2019. Фитопланктон озера Плещеево в 2014–2016 гг. // Тр. Ин-та биологии внутр. вод им. И.Д. Папанина РАН. Вып. 86(89). С. 23.
- Сиделев С.И., Бабаназарова О.В. 2020. Обнаружение цианобактериальных токсинов в источниках водоснабжения и водопроводной воде некоторых городов России: поиск продуцентов и апробация методов удаления // Водн. ресурсы. Т. 47. № 2. С. 218.
- Чернова Е.Н., Русских Я.В., Подольская Е.П. и др. 2016. Определение микроцистинов и анатоксина-а методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения // Научное приборостроение. Т. 26. № 1. С. 11.
- Экосистема озера Плещеево. 1989. Л.: Наука.
- Ballot A., Fastner J., Wiedner C. 2010. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany // Appl. and Environ. Microbiol. V. 76. P. 1173. <https://doi.org/10.1128/AEM.02285-09>
- Baron-Sola A., Ouahid Y., Campo F. 2012. Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions // Ecotoxicol. and Environ. Saf. V. 75. P. 102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.022>
- Carey C.C., Rengefors K. 2010. The cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata* stimulates the growth of other phytoplankton // J. Plankton Res. V. 32. P. 1349. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq046>
- Carey C.C., Haney J.F., Cottingham K.L. 2007. First report of microcystin-LR in the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata* // Environ. Toxicol. V. 22. № 3. P. 337. <https://doi.org/10.1002/tox.20245>
- Carey C.C., Ewing H.A., Cottingham K.L. et al. 2012. Occurrence and toxicity of the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata* in low-nutrient lakes in the northeastern United States // Aquat. Ecol. V. 46. № 4. P. 395. <https://doi.org/10.1007/s10452-012-9409-9>
- Chernova E., Russkikh I.A., Voyakina E. et al. 2016. Occurrence of microcystins and anatoxin-a in eutrophic lakes of Saint-Petersburg, Northwestern Russia // Oceanol. and Hydrobiol. Stud. V. 45. № 4. P. 466. <https://dx.doi.org/10.1515/ohs-2016-0040>

- Chernova E., Sidelev S., Russkikh I. et al. 2017. *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* as neurotoxins producers in some Russian freshwaters // *Toxicon*. V. 130. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.016>
- Chorus I., Welker M. 2021. Toxic cyanobacteria in water. London: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
- Codd G.A., Bell S.G., Brooks W.P. 1989. Cyanobacterial toxins in water // *Water Sci. and Technol.* V. 21. № 3. P. 1. <https://doi.org/10.2166/wst.1989.0071>
- Cronberg G., Annadotter H., Lawton L.A. 1999. The occurrence of toxic blue-green algae in Lake Ringsjön, southern Sweden, despite nutrient reduction and fish biomanipulation // *Hydrobiologia*. V. 404. P. 123. <https://doi.org/10.1023/A:1003780731471>
- Ernst B., Hoeger S.J., O'Brien E. et al. 2009. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany // *Harmful Algae*. V. 8. № 2. P. 329. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.07.006>
- Gorham P.R. 1962. Laboratory studies on the toxins produced by waterblooms of blue-green algae // *Amer. J. Public Health*. V. 52. № 12. P. 2100. <https://doi.org/10.2105/ajph.52.12.2100>
- Gorham P.R. 1964. Toxic algae // *Algae and Man*. N.Y.: Plenum Press. P. 307. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1719-7>
- Gugger M., Molica R., Le Berre B. et al. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents // *Appl. and Environ. Microbiol.* V. 71. № 2. P. 1097. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1097-1100.2005>
- Halme M., Rapinaja M.-L., Karjalainen M. et al. 2012. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method // *J. Chromatography B*. V. 880. P. 50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.015>
- Hisbergues M., Christiansen G., Rouhiainen L. et al. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera // *Arch. Microbiol.* V. 180. P. 402. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0605-9>
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W. et al. 2018. Cyanobacterial blooms // *Nat. Rev. Microbiol.* V. 16. № 8. P. 471. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- Ingram W.M., Prescott G.W. 1954. Toxic freshwater algae // *American Midland Naturalist*. V. 52. № 1. P. 75. <https://doi.org/10.2307/2422044>
- 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 // *Arch. Microbiol.* V. 185. P. 107. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5>
- Kappers F.I., Leeuwangh P., Dekker M. et al. 1981. Investigation of the presence of toxins produced by cyanobacteria (blue-green algae) in the Netherlands // *Sci. Total Environ.* V. 18. P. 359. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(81\)80072-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(81)80072-1)
- Kurmayer R. 2017. Isolation of single cyanobacteria colonies/filaments // *Molecular tools for detection and quantification of toxigenic cyanobacteria*. Hoboken: Wiley. P. 32.
- Leeuwangh P., Kappers F.I., Dekker M et al. 1983. Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs // *Aquat. Toxicol.* V. 4. P. 63. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(83\)90061-9](https://doi.org/10.1016/0166-445X(83)90061-9)
- Lepistö L., Rapala J., Lyra C. 2005. Occurrence and toxicity of cyanobacterial blooms dominated by *Anabaena lemmermannii* P. Richter and *Aphanizomenon* spp. in boreal lakes in 2003 // *Algological Studies/Archiv für Hydrobiol.* V. 118. P. 315. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0315>
- Metcalfe J.S., Codd G.A. 2012. Cyanotoxins // *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Dordrecht: Springer. P. 651. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_24](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_24)
- Nowruzi B., Porzani S.J. 2021. Toxic compounds produced by cyanobacteria belonging to several species of the order Nostocales: A review // *J. Appl. Toxicol.* V. 41. № 4. P. 510. <https://doi.org/10.1002/jat.4088>
- Pearson L.A., Dittmann E., Mazmouz R. et al. 2016. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria // *Harmful Algae*. V. 54. P. 98. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>
- Ransom R.E., Nerad T.A., Meier P.G. 1978. Acute toxicity of some blue green algae to the protozoan *Paramecium caudatum* // *J. Phycol.* V. 14. № 1. P. 114. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb00642.x>
- Rantala A., Rajaniemi-Wacklin P., Lyra C. et al. 2006. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (mcyE) PCR and associations with environmental factors // *Appl. and Environ. Microbiol.* V. 72. P. 6101. <https://doi.org/10.1128/AEM.01058-06>
- Rantala-Ylinen A., Kana S., Wang H. et al. 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers // *Appl. and Environ. Microbiol.* V. 77. P. 7271. <https://doi.org/10.1128/AEM.06022-11>
- Sidelev S., Koksharova O., Babanazarova O. et al. 2020. Phylogeographic, toxicological and ecological evidence for the global distribution of *Raphidiopsis raciborskii* and its northernmost presence in Lake Nero, Central Western Russia // *Harmful Algae*. V. 98. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101889>
- Skulberg O.M., Carmichael W.W., Codd G.A. et al. 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria) // *Algal toxins in seafood and drinking water*. L.: Acad. Press. P. 145.
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K. et al. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase gene E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes // *Appl. and Environ. Microbiol.* V. 69. P. 7289.

<https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003>  
 Vareli K., Briasoulis E., Pilidis G. et al. 2009. Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause

of intense, microcystin–synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece // *Harmful Algae*. 2009. V. 8. № 3. P. 447.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.09.005>

## First Data on Cyanotoxins and Genes of Their Biosynthesis in the Phytoplankton of the Mesotrophic Lake Pleshcheyevo (Russia) During the Bloom Formation of Cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*

S. I. Sidelev<sup>1, 2, \*</sup>, L. G. Korneva<sup>2</sup>, E. N. Chernova<sup>3</sup>, E. G. Sakharova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*P.G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia*

<sup>2</sup>*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, Russia*

<sup>3</sup>*St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

\*e-mail: Sidelev@mail.ru

The article presents for the first time the data on cyanobacterial toxins and the genes of their biosynthesis in the phytoplankton of the mesotrophic Lake Pleshcheyevo Yaroslavl Region, during the period of cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata* (Smith et Soweby) Richter – bloom. In the phytoplankton of the lake, the presence of hepatotoxins microcystins was recorded using chromatography–mass spectrometry; in DNA isolated from plankton, the *mcyE* gene for the biosynthesis of these cyanotoxins was detected using PCR. During the study period, other types of cyanotoxins (cylindrospermopsin, anatoxin–a, saxitoxins) and the presence of genes for their synthesis in the phytoplankton were not identified. In thirty colonies of *G. echinulata* isolated from the lake, the microcystin biosynthesis genes *mcyA* and *mcyE* were absent, which is consistent with their inability to produce cyanotoxin. Using molecular methods, the potential ability to biosynthesize microcystins in *Microcystis aeruginosa* and species of the genus *Dolichospermum* inhabiting in the lake was demonstrated. The paper discusses the toxicity of *Gloeotrichia echinulata* and the need for further long-term monitoring of toxigenic cyanobacteria in Lake Pleshcheyevo.

**Keywords:** cyanotoxins, microcystins, toxic cyanobacteria, *Gloeotrichia echinulata*, Lake Pleshcheyevo, *mcy* genes