

ISSN 2658-3518

LIMNOLOGY & FRESHWATER BIOLOGY

2023, № 6

- > abiotic and biotic water components;
- > ecosystem-level studies;
- > systematics and aquatic ecology;
- > paleolimnology and environmental histories;
- > laboratory experiments and modeling

Sanitary-bacteriological monitoring of water quality in Lake Baikal – from single/one-off studies to systematic annual expeditions

Drucker V.V., Suslova M.Yu., Nebesnykh Yu.R., Potapov S.A., Podlesnaya G.V.*, Belykh O.I.

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

ABSTRACT. The analysis of sanitary-bacteriological assessment of water quality in the littoral and pelagic zones of Lake Baikal for the whole period of microbiological studies of the ecosystem was carried out. It was established that such studies were single in the last century and only from the end of the century they began to be carried out all over the lake, and now they are carried out annually in the spring, summer and autumn periods over the whole water area of Lake Baikal and in the estuaries of large tributaries. The water quality of the lake was assessed and unfavourable areas in the littoral zone were identified for exceeding SanPiN standards. In 2021-2023, wastewater samples were taken after the treatment facilities in the Slyudyanka and Severobaikalsk towns, low efficiency of disinfection and inflow of opportunistic and pathogenic bacteria into Lake Baikal (bacterial pollution) were revealed. The scheme and periodicity of sanitary-bacteriological monitoring of the Lake Baikal ecosystem is proposed.

Keywords: Lake Baikal, sanitary-indicative bacteria, water quality, sanitary-bacteriological monitoring scheme

1. Introduction

The surface waters of our planet, including lakes, reservoirs, and rivers, as well as seas and oceans, are subject to constant anthropogenic impact. The ecosystem of Lake Baikal, which was included in the UNESCO World Natural Heritage List in 1996 due to the uniqueness and purity of its waters, has not escaped this impact. The ecological condition of fresh water bodies – the main sources of drinking water – is degrading worldwide, which leads to the disruption of evolutionary microbiocenoses and the development of opportunistic and pathogenic bacteria in them. Because of their unusual competitive ability, developed over 3 billion years of existence, microorganisms can inhabit all ecological niches, from polar regions to deserts. Water is one of the most favorable habitats for them; in aquatic ecosystems, microorganisms reach high numbers, being determining and necessary links in the cycle of chemical elements, providing the process of continuous creation and destruction of organic substances as a result of interconnected functioning.

Microbiological studies of the Baikal water and sediments have been carried out for about 100 years (Yasnitsky et al., 1927; Nechaeva and Salimovska-

ya-Rodina, 1935; Kuznetsov, 1951; Romanova, 1958; et al.). In the following years, abundance and biomass of bacterioplankton were studied not only in the southern part of the lake but also throughout the Baikal water area. Their interannual dynamics and vertical distribution, peaks in seasonal development, correlations with the dynamics of abundance and composition of phytoplankton, and changes in water temperature were established, the time of bacterial generation was determined, and work on identification of the species composition of cultured microbial communities was started (Egorova et al., 1952; Rodina, 1954; Kuznetsov, 1957; Kriss and Chebotarev, 1970). During this period of microbiology formation in Lake Baikal, the microbiologists from research institutions in Moscow and Leningrad played the main role, using their knowledge and experience.

Sanitary-bacteriological assessment of water quality implies the determination of a set of sanitary indicators – criteria reflecting the sanitary condition of the water body under study – in accordance with the requirements of regulatory documents. Sanitary indicators are fecal indicator bacteria (FIB). They are used worldwide to detect and prevent fecal contami-

*Corresponding author.

E-mail address: podlesnaya@lin.irk.ru (G.V. Podlesnaya)

Received: October 19, 2023; **Accepted:** November 03, 2023;

Available online: November 10, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



nation and associated risks to human health due to the likely presence of pathogenic bacteria and viruses. FIB include bacterial groups such as total coliform bacteria (TCB), thermotolerant coliform bacteria (TCB), fecal coliform bacteria (fecal coliforms), *E. coli*, Enterococci, Bifidobacterium, Bacteroides, and Clostridium spp., which are widely distributed in the feces of humans and most animals. Their levels in wastewater and feces are relatively high, so they are usually detected when fecal pollution is present in surface waters. Therefore, surface waters are monitored using the FIB abundance, for which standards are set by legislative documents for assessing the quality of the waters used. Such water quality studies were initiated much later in Lake Baikal.

2. Materials and methods

After the reorganization of Baikal Limnological Station into Limnological Institute of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences in 1961 and the foundation of the “Laboratory of Applied Microbiology” in 1972, headed by M.A. Messineva (Cand. Sc. Biology), who investigated microorganisms of sediments in Lake Baikal in the 1950s (Messineva, 1957), research of microorganisms of Lake Baikal became planned, systematic, and comprehensive. Since the purpose of our work is to analyze the conducted studies on sanitary-bacteriological monitoring of Lake Baikal water quality for the previous period of work and to develop a scheme of it for the unique oligotrophic water body, we do not list all microbiological works, as they are available on the website of Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, as well as in the monograph-summary of microbiological studies of water bodies and watercourses of the Baikal-Angara-Yenisei hydrosystem (Vinogradova et al., 2004).

In 2023, the Government of the Russian Federation approved a new Resolution No. 260 “Regulations on State Environmental Monitoring of the Unique Ecological System of Lake Baikal”, in which it established the procedure for its implementation. In paragraphs 8 “d” and 11 “e” it is obliged to provide information to “the federal state budgetary institution “Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences” in terms of the results of observations of the state of Lake Baikal”. In order to assess the previously conducted volumes and periodicity of research on sanitary-bacteriological monitoring of the Baikal ecosystem, as well as to discuss the current use of specific standard and new indicators, research methods, water sampling stations, seasons, and the frequency of their sampling, which is necessary for the development and implementation of the scheme of microbiological monitoring itself, we have analyzed the available published set of sanitary-bacteriological studies of the lake.

3. Results and discussion

The analysis of the results of sanitary-bacteriological studies of Lake Baikal showed that in this scientific direction, single works started in connection

with the construction of the Baikal Pulp and Paper Mill (BPPM) only in the late 1960s of the last century. Microbial communities of water and polluted sediment in the area of the BPPM wastewater influence were first described in 1970–1973 in the works of G.A. Goman (1973). Works were then carried out in this area to assess the abundance of anaerobic saprophytes, sulfate reducers, and methanogens; rates of protein decomposition, cellulose decomposition, sulfate reduction, and methane formation were determined; and a forecast was made about the deterioration of the ecological situation in case of further wastewater discharge (Namsaraev et al., 1995; Zemskaya et al., 1997).

The water quality of Southern Baikal and, mainly, near the B. Koty settlement and the Baikalsk town was investigated during this period by scientists of Research Institute of Biology of Irkutsk State University (Maksimova and Maksimov, 1989). Long-term results of these authors' studies showed stable differences in the Baikal water quality during all periods: at the station “1 km from the shore” of the B. Koty settlement, remote from industrial and agricultural zones, water quality at all depths was high, while near the Baikalsk town within a radius of up to 10 km at all depths, water did not meet standards for drinking water, recreational, and fishery activities.

In 1993, the researchers of Limnological Institute SB RAS, V.V. Drucker, T.Y. Kostornova, O.A. Molozhaya, and V.A. Afanasiev, started and completed an assessment of the water quality in the littoral and pelagic zones of the whole Lake Baikal up to maximum depths using sanitary-bacteriological indicators. It has been found that the lake pelagic zone has high water quality both at the surface and at all depths. Coastal waters near all settlements have low quality, and *E. coli* are detected in many samples. At the same time, microbiological monitoring of the major tributaries of Lake Baikal began to be conducted, which showed poor water quality in the estuaries of the Selenga, Barguzin, Bolshaya Goloustnaya, Turka, Tyta, Pereemnaya, and Pokhabikha rivers entering the lake in spring (Drucker and Maslennikov, 1998).

To determine the scope of distribution and identify opportunistic bacteria in the water of Lake Baikal throughout its water area, the staff of the Laboratory of Aquatic Microbiology of LIN SB RAS conducted for the first time the intentional long-term studies in different seasons of the year between 1997 and 2000 (Drucker and Panasyuk, 2002; Panasyuk and Drucker, 2002). Water samples were taken along standard hydrological transects at the central deep stations at different horizons and at the coastal stations near the western and eastern shores: 1. Maritui settlement – Solzan settlement; 2. Listvyanka settlement – Tankhoi settlement; 3. Kadilny Cape – Mishikha settlement; 4. Kharauz Strait – Krasny Yar Cape; 5. Anga River – Sukhaya River 6. Boldakova River - Olkhonskiye Vorota Strait; 7. Ukhon Cape – Tonkii Cape; 8. Pokoyniki Cape – Ushkan Cape; 9. Elokhn Cape - Davsha settlement; 10. Kotelnikovskii Cape – Amundakan Cape; 11. Baikalskoe village – Turali Cape; 12. Zavorotny Cape – Sosnovka River; 13.

Krestovy Cape – Khoboy Cape; 14. Tyva River – Nemnyanka River.

As a result of the studies, 898 strains of potentially pathogenic bacteria (PPB) were isolated in the littoral zone of the lake, which are representatives of 31 species belonging to the *Enterobacteriaceae* family and non-fermenting group of bacteria. The number of studied bacteria increased in the water during the summer and autumn periods and decreased during the winter months. Opportunistic bacteria were unevenly distributed throughout the lake's water area, and their populations increased significantly at the locations where untreated wastewater from different sources was dumped. The greatest abundance and species diversity of this group of bacteria are found in the water of Southern Baikal – the Listvyanka settlement, Port Baikal settlement, Baikalsk town; in Central Baikal – Barguzin and Chivyrkuy bays, the Selenga river delta, and Maloe More strait; in Northern Baikal – a section of the Baikal-Amur railway. The studied group of bacteria was not found throughout the entire water column in the pelagic zone of the lake at various sites (more than 30 stations). The dominant species of opportunistic bacteria isolated from the littoral waters of the lake were *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Burkholderia cepacia*. The opportunistic bacteria isolated from the Lake Baikal waters have multiple antibiotic resistances, hemolytic activity in human erythrocytes, the ability to cultivate at 37°C, and, therefore, carry a potential epidemiological hazard to public health (Drucker and Panasyuk, 2006). The authors proposed to use additionally for sanitary-bacteriological control of the Baikal water quality the detected potential-pathogenic bacteria, as well as bacteria of the *Enterococcus* genus: *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. durans*, and *E. gallinarum*, as specific indicators of fecal (untreated) water inflow into the lake. Long-term studies have established that the main sources of pollution in the Baikal waters are untreated domestic wastewater from settlements located on the shores of the lake, agricultural enterprises, and tourist complexes, which do not have systems of disinfection, utilization, and removal of wastewater, as well as the increasing number of tourist boats, which do not have tanks for collecting domestic and bilge waters.

In 2000-2009, there was a trend towards an increase in sanitary-bacteriological indicators in water in the area of discharge of “decontaminated” wastewater from the Baikal Pulp and Paper Mill (Shchetinina et al., 2013). In view of the deteriorating sanitary situation, the authors of the paper conducted studies on the diversity and antibiotic resistance of bacteria isolated from water in the most anthropogenically influenced areas of the lake. Other authors have also found representatives of sanitary-bacteriological pollution – bacteria of the *Enterococcus* genus in the water of different areas of Lake Baikal (Kravchenko, 2009).

In addition to these microorganisms, toxic cyanobacteria that are harmful to humans were discovered in Lake Baikal water for the first time in Russia during that time (Tikhonova, 2006; Belykh et al., 2013;

Belykh et al., 2015). Different types and variants of toxins and the genes that produce them were studied. This new factor is crucial for the sanitary-bacteriological monitoring of the Baikal water quality because cyanobacterial blooms, which are currently the most significant and recognizable effects of eutrophication in water bodies worldwide, are already happening in various regions of Lake Baikal. The concentrations of microcystins and saxitoxins in samples of plankton and benthos from the lake were determined, and the degree of hazard of toxic cyanobacteria to human and animal health was assessed. It is shown that “blooming” of benthic cyanobacteria with the presence of toxin-producing species, which started on Lake Baikal in 2011, have now taken on the character of an ecological crisis and may have caused mass mortality of Baikal sponges (Belykh et al., 2017). In order to address the issue of including these bacteria in the official documentation on microbiological monitoring of the Baikal water quality, these new research findings unquestionably merit a proper evaluation.

In recent years, the Lake Baikal ecosystem has been undergoing serious ecological changes. Signs of eutrophication – intensive development of algae non-specific for the littoral of the lake, mass mortality of sponges, and blooming of toxic cyanobacteria – have been observed in the coastal areas of some regions (Timoshkin et al., 2016). The volume of discharges of poorly treated and untreated wastewater from settlements into the lake is growing, recreational loads are increasing, and the number of tourist vessels not equipped with tanks for collecting domestic and bilge water has sharply increased. The number of tourists coming to Lake Baikal in all seasons of the year has increased manifold. Thus, in 2019, their number reached 2.2 million. More than 40 zones of recreational development have been formed directly on the lake coast, where most of the tourist accommodation facilities are concentrated: camping sites, hotels, and holiday homes. Questions arise: how effectively do septic tanks work in tourist recreation areas without damaging the Baikal ecosystem? How often does “Rosprirodnadzor” check the utilization of household and bilge water on tourist motorboats?

Since 2000, Limnological Institute SB RAS has developed a practice of conducting complex expeditions throughout Lake Baikal, in which microbiologists are constantly involved. It goes without saying that expeditionary work throughout Lake Baikal has been carried out before, but the complexity of the research was limited by the lack of necessary instruments for simultaneous collection of a large number of water and sediment samples, rapid measurement of abiotic parameters to maximum depths, etc. To date, only Limnological Institute has a research fleet equipped with the necessary instruments for scientific limnological studies in Lake Baikal. For this reason, sanitary-bacteriological monitoring of the water quality of Lake Baikal and its tributaries is carried out by the staff of the Laboratory of Aquatic Microbiology of the Institute, which has all necessary modern equipment and separate facilities for sanitary-bacteriological monitoring of the Lake Baikal

water quality by classical and modern molecular-biological methods. The Laboratory of Aquatic Microbiology is accredited in the national system of Rosakkreditation (№ RA.RU.21JI02).

Sanitary-bacteriological monitoring of the Baikal water quality carried out during 2010–2023 in the annual spring (second half of May–early June), summer (August), and autumn (second half of September) Circum-Baikal expeditions showed that FIB are constantly present in the coastal part of the lake. Littoral zone of the lake showed a significant amount of coliform bacteria and enterococci in Listvyanka settlement, Baikalsk town, Kultuk settlement – the southern part of the lake; in the waters of the Maloe More and Olkhonskiye Vorota straits and the Selenga delta – the central basin; in the Severobaikalsk town, and the Zarechny settlement – the northern part of the lake (Shtykova et al., 2016, 2018b; Suslova et al., 2017; Podlesnaya et al., 2022). In 2011, exceedance of the regulated water quality standards of the Russian Federation was observed throughout the entire pelagic zone of Lake Baikal, as well as in most of its major tributaries. In 2012 and 2015, an exceedance of sanitary-bacteriological indicators of pelagic waters was observed only in the southern part of the lake (Fig. 1). In September 2016, the maximum share of water samples with a low self-purification coefficient was recorded both in the pelagic zone (60%) and in the river mouths (62.5%).

In the waters of the estuaries of rivers flowing into the lake, the number of sanitary indicator-groups of bacteria in 2010–2020 was (Fig. 2), on average, by one order more than their content in the pelagic zone – the Goloustnaya, Buguldeika, Turka, Anga, Barguzin, Sukhaya rivers, as well as the Selenga delta (Drucker et al., 2022). The most unfavorable period for water quality was in August 2011 and May-June 2012, when the number of non-standard water samples was highest. In August 2010, May-June 2014, and September 2017, all river samples taken corresponded to “satisfactory”

surface water quality indicators.

In 2022–2023, besides the standard sanitary-bacteriological monitoring studies, we tested additional method – detection of fecal contamination using marker probes for bacteria (inhabitants of human and animal intestines), as well as detection of viral communities in water. Moreover, in 2021 the grid of sampling stations included treated wastewater from the treatment facilities of the Slyudyanka and Severobaikalsk towns, analyzed according to SanPiN 1.2.3685-21 “Hygienic standards and requirements to ensure safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans”. Also, 10 samples of sediments were taken in the coastal zone at various sites where tourists rest.

The results show notable exceedances of SanPiN norms in both years of the most recent investigations at 55 (170 water samples) and 59 (71 water samples) sites for the primary sanitary-bacteriological indicators. Thus, in 2023 these are the following areas the Baikalsk town, the Babushkin, Listvyanka, Tankhoy, B. Goloustnoye, and Posolsky Sor settlements, Peschanaya and Aya bays, and the bays of Maloe More (Bazarnaya, Kurkuts-kaya, Mandarkhan, Shida, and Khuzhirsky, Chivyrkuy bay – Kurbulik, Monakhovo, and Arangatui). The highest levels of these bacteria were found in the Babushkin town (*E. coli* in 1.7 times, enterococci in 20 times), the Listvyanka settlement (*E. coli* in 4 times, enterococci in 4.7 times), Chivyrkuy Bay (*E. coli* in 5.2 times, enterococci in 6.4 times) and Maloe More (enterococci in 4–6 times). Six out of seven tributaries, the rivers Pereemnaya, Snezhnaya, Solzan and Goryachiy Klyuch, also had exceedance values, especially the Pokhabikha (OCB in 11 times, *E. coli* in 58 times, Enterococci in 186 times) and the Medlyanka (OCB in 1.2 times, *E. coli* in 5 times, Enterococci in 63 times).

According to the results of analyses, the treated wastewater from the Slyudyanka wastewater treatment plant does not meet the requirements of SanPiN 1.2.3685-21 and exceeded the following indicators

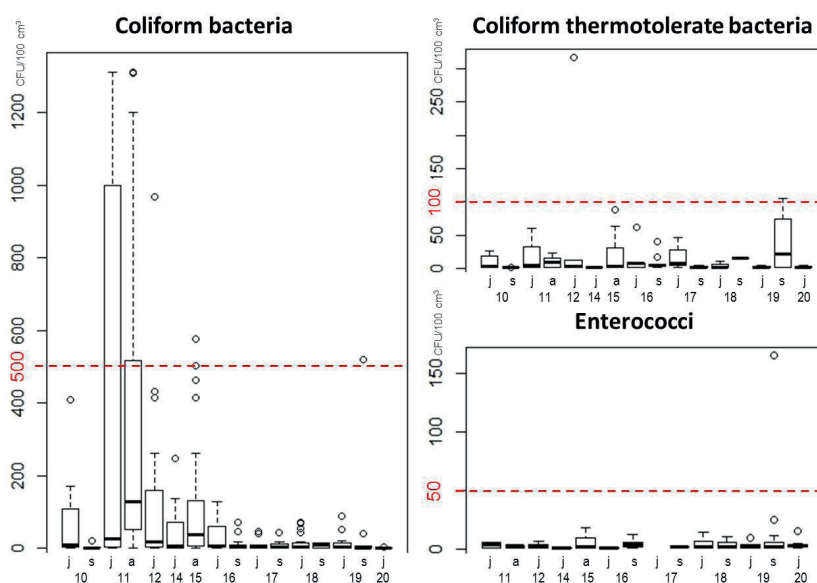


Fig.1. Abundance of sanitary-microbiological indicators in the pelagial water zone of Lake Baikal in 2010–2020 data (j–June, a–August and s–September). Red color –the standards.

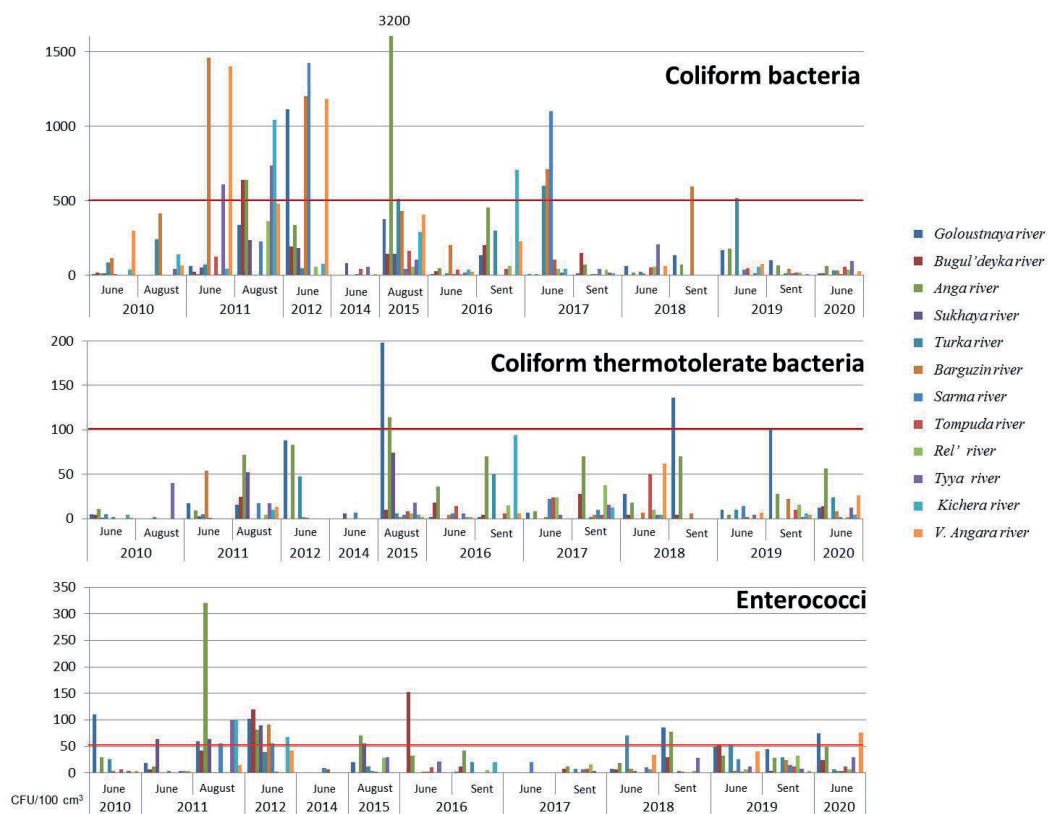


Fig.2. Abundance of sanitary-microbiological indicators in water of the tributaries in 2010-2020 data. Red color –the standards.

(OCB in 4200 times, *E. coli* in 17000 times and Enterococci in 3600 times), which indicated the absence of disinfection stages. Similar results were obtained for the treated waste water from the waste water treatment plant in the Severobaikalsk town in 2022. Studies of 10 samples of coastal sandy sediments from different areas of Lake Baikal were characterized by different degrees of contamination with sanitary-indicative bacteria and enabled these areas to be classified into three groups according to the degree of epidemiological hazard:

1. extremely dangerous – the Slyudyanka town;
2. dangerous – the Kultuk, Maksimikha, Kurbulik, and Sakhyurta settlements, Aya and Zmeinaya bays;
3. moderately dangerous – the Baikalsk town, Khuzhir and B. Kotv settlements.

Studies of the surface water in the pelagic zone of Lake Baikal both in previous years and in this period correspond to the norms of SanPiN 1.2.3685-21 and MUK 4.2.1884-04 "Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water in surface water bodies", with single exceptions of samples for the number of OCB in 2011-2012, 2015, 2019, 2021-2022.

A collection of 172 cultured opportunistic bacterial strains isolated from the Lake Baikal plankton, epilithon, treated wastewater and coastal sediments of the lake was created. Sixty-two strains isolated from biofilms and surface water samples were analyzed by modern identification methods (molecular-genetic and mass-spectrometry analyses) (Shtykova et al., 2018a; Shtykova et al., 2020). A total of 18 genera and 21 species of opportunistic bacteria were identified by this

method. Among them are representatives of the order Enterobacterales of the genus *Yersinia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Leclercia*, *Lelliottia*, *Enterobacter*, *Shigella*, of the order Pseudomonadales of the genus *Pseudomonas*, *Acitrobacter*, of the order Bacillales of the genus *Bacillus*, *Exiguobacterium* and *Staphylococcus*, of the family Aeromonadaceae of the genus *Aeromonas*, of the family Enterococcaceae of the genus *Enterococcus*, of the family Aerococcaceae of the genus *Aerococcus*, family Comamonadaceae of the genus *Delftia*, of the family Xanthomonadaceae of the genus *Stenotrophomonas*.

Species of opportunistic bacteria dangerous for human and animal health were isolated from different places throughout littoral zone of Lake Baikal. Thus, bacteria of the genus *Aeromonas* are the most widespread, were found in Maloe More Strait in Bazarnaya Bay and in Khuzhir-Nagaysky Bay, in Khool Bay, near the Khuzhir, Listvyanka settlements, B. Koty, and B. Goloustnoye settlements, and in Aya Bay. Bacteria of the genus *Enterococcus* are found in many bays of Maloye More. The strains of *E. coli* were detected in different water areas of the lake – in bays of Mukhor and Khool, near the settlement of B. Koty, and near the Ushkan Islands. We took into account that from 2022, according to new changes in SanPiN 1.2.3685-21, *E. coli* bacteria and enterococci are obligatory indicators in the sanitary-microbiological assessment of water quality.

In 2021-2023, wastewater samples were taken after the treatment facilities in the Slyudyanka and Severobaikalsk towns, low efficiency of disinfection and inflow of opportunistic and pathogenic bac-

teria into Lake Baikal were revealed (Potapov et al., 2023). Seventy bacterial strains isolated from water and 17 strains from wastewater treated at Slyudyanka treatment plant were subjected to antibiotic sensitivity tests, and the results revealed antibiotic resistance to all tested broad-spectrum antibiotics used to treat infectious diseases (penicillins, cephalosporins, carbapenems, macrolides, aminoglycosides, tetracyclines, nitrofurans, etc.).

4. Conclusion

Analysis of the results of sanitary-bacteriological monitoring for the previous and present centuries clearly indicates a decrease in water quality in the coastal zone of Lake Baikal, as well as in the tributaries of its southern basin: the number of OCB, TCB, and enterococci has increased, exceeding the requirements of SanPiN 1.2.3685-21. Over the last decade, an increase in the number of enterococci was seen in the lake's deep-water area. The results obtained indicate that untreated or insufficiently treated wastewater flows into the rivers and the lake itself. According to sanitary-microbiological analyses, the Slyudyanka and Severobaikalsk wastewater treatment plants were inefficient during the studied period. Wastewater from the outlet pipes of the waste water treatment plants did not meet the requirements of SanPiN 1.2.3685-21, the number of coliform bacteria exceeded the normative values. A collection of 172 culturable opportunistic bacteria isolated from the Lake Baikal water, treated waste water and coastal sediments of the lake was created.

We propose the “Scheme of sanitary-bacteriological monitoring” as a result of the analysis of long-term studies of sanitary-indicative microorganisms in Lake Baikal, which calls for the determination of the water quality of the littoral and pelagic parts to be done throughout the year in all four seasons: winter (March), spring (late May-early June), summer (August), and autumn (late September-early October) (Fig. 3). The problem of preserving high-quality water is of great practical importance for Lake Baikal, which contains 20% of all fresh water on Earth, at the current time of global warming and increasing anthropogenic (biological and chemical) impact; regular sanitary-bacteriological monitoring will rapidly and reliably show trends in the trophicity of its ecosystem. The obtained data confirm that the waters of Lake Baikal are subjected to an intensive anthropogenic load, which has been steadily increasing in recent years. The distribution of FIB has an irregular, local character, caused by localization to the places of anthropogenic influence on the lake, which is also confirmed by the results of chemical analysis of the waters. The maximum number of sanitary-indicative bacteria is observed in the estuaries of rivers, gradually decreasing as the river water spreads into the lake. Based on the results of recent studies, it is suggested that under the influence of anthropogenic factors in coastal zones, there is a shift of autochthonous microbiota towards allochthonous microbiota characterized by high resistance to antibiotics. The introduction of

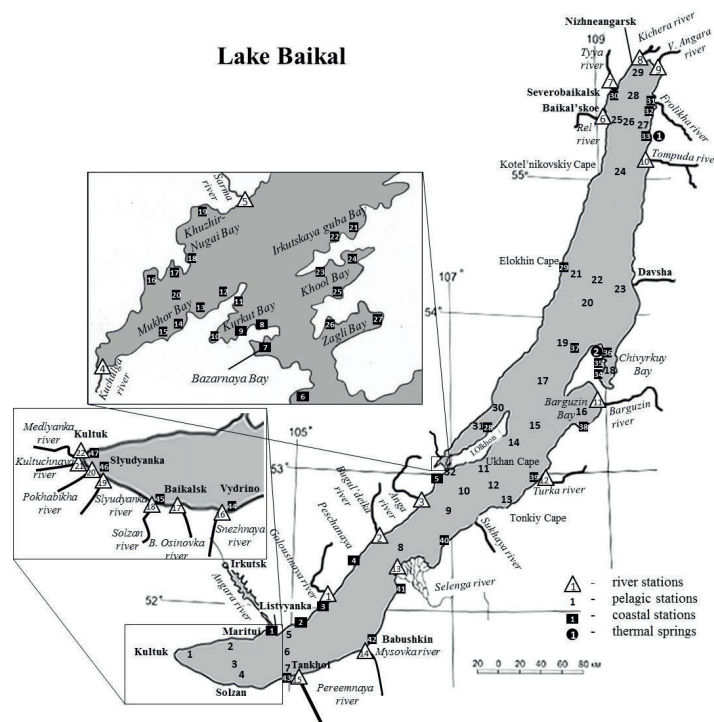


Fig.3. The scheme of sanitary-bacteriological monitoring of Lake Baikal. *River stations:* 1 – Goloustnaya, 2 – Bugul'deika, 3 – Anga, 4 – Kuchulga, 5 – Sarma, 6 – Rel', 7 – Tyya, 8 – Kichera, 9 – V. Angara, 10 – Tompuda, 11 – Barguzin, 12 – Turka, 13 – Selenga, 14 – Mysovka, 15 – Pereemnaya, 16 – Snezhnaya, 17 – B. Osinovka, 18 – Solzan, 19 – Slyudyanka, 20 – Pokhabikha, 21 – Kultuchnaya, 22 – Medlyanka. *Pelagic stations:* 1 – 12 km from Kultuk, 2 – 3 km from Maritui, 3 – Maritui–Solzan, 4 – 3 km from Solzan, 5 – 3 km from Listvyanka, 6 – Listvyanka–Tankhoi, 7 – 3 km from Tankhoi, 8 – Krasnyi Yar–Kharauz, 9 – Anga–Sukhaya, 10 – Boldakova–Malye Olkhonskie vorota, 11 – 3 km from Ukhan, 12 – Ukhan–Tonkiy, 13 – 3 km from Tonkiy, 14 – 7 km from Izhimei, 15 – Khoboi–Krestovyi, 16 – Barguzin Bay, 17 – Akademicheskii Ridge, 18 – Chivyrkui Bay, 19 – Solnechnaya–Ushkanyi Islands, 20 – Zavorotnyi–Sosnovka, 21 – 3 km from Elokhin, 22 – Elokhin–Davsha, 23 – 3 km from Davsha, 24 – Kotelnikovskiy–Amundakan, 25 – 3 km from Baikalskoe, 26 – Baikalskoe–Turali, 27 – 3 km from Turali, 28 – Tyya–Nemnyanka, 29 – 7 km from Nizhneangarsk, 30 – Aral–Khoboy, 31 – Maloye More Strait, 32 – Malye Olkhonskie vorota. *Coastal stations:* 1 – Listvyanka, 2 – B. Koty, 3 – B. Goloustnoe, 4 – Peschanaya Bay, 5 – Aya Bay, 6 – Tutaiski Bay, 7 – Bazarnaya Bay, 8 – Shchuchiy Bay, 9 – Radost' Bay, 10 – Kurkut Bay, 11 – Burluk Cape, 12 – Chukotka Bay, 13 – Mandarkhan Bay, 14 – Zuun-Khagun Bay, 15 – Baruun-Khagun Bay, 16 – Shida Bay, 17 – Ulirba Cape, 18 – Khuzhir-Nugai Bay, 19 – Sarma, 20 – Mukhor Bay, 21 – Irkutskaya guba Bay, 22 – Tutyarkhey Bay, 23 – Kharin-Irgi Bay, 24 – Khool Bay, 25 – Khytyrhey Bay, 26 и 27 – Zagli Bay, 28 – Khuzhir, 29 – Elokhin Cape, 30 – Severobaikalsk, 31 – Frolikha Bay, 32 – Ayaya Bay, 33 – Khakusy Bay, 34 – Monakhovo, 35 – Kurbulik, 36 – Zmeinaya Bay, 37 – Peshcherka Bay (Ushkany Islands), 38 – Maksimikha, 39 – Turka, 40 – N. Enkhaluk, 41 – Posol'skiy sor, 42 – Babushkin, 43 – Tankhoi, 44 – Vydrino, 45 – Baikalsk, 46 – Slyudyanka, 47 – Kultuk. *Thermal springs stations:* 1 – Khakusy, 2 – Zmeinyy.

antibiotic-resistant strains into environmental objects maintains the pool of resistant strains due to the transfer of resistance genes among autochthonous bacterial communities in the ecosystem. The transfer of antibiotic resistance genes into communities has received worldwide attention. The spread of such genes among bacteria is known to increase morbidity and mortality from the infections they cause. If there are additional factors contributing to the persistence and multiplication of PPB and if there are no community treatment facilities, the self-cleaning capacity of the lake coastal waters may be reduced to such an extent that their use becomes epidemiologically unsafe. This requires the development of a water quality management strategy for Lake Baikal.

Acknowledgements

The study was carried out within the State Task No. 0279-2021-0015 (121032300269-9).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G. et al. 2013. Microcystine-Producing Cyanobacteria in Water Reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chemistry for Sustainable Development* 21: 347-361
- 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., Fedorova G.A., Kuzmin A.V. et al. 2017. Microcystins in Cyanobacterial Biofilms from the Littoral Zone of Lake Baikal. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 72(4): 225-231
- Drucker V.V., Kostornova T.Ya., Molozhavaya O.A. et al. 1993. Water quality assessment of Lake Baikal by sanitary-bacteriological indicators. *Geography and Natural Resources* 1: 60-64. (in Russian)
- Drucker V.V., Maslenikov A.A. 1998. Microbiological monitoring of Lake Baikal tributaries. In: *International. Symposium, Environmental control and rehabilitation*. (in Russian)
- Drucker V.V., Panasyuk E.Yu. 2002. Potentially pathogenic bacteria - indicators of Baikal water quality. In: *Assessment of the current state of microbiological research in the Eastern Siberian region*, pp. 140. (in Russian)
- Drucker V.V., Panasyuk E.Yu. 2006. Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal. *Hydrobiologia* 568: 267-271. DOI [10.1007/s10750-006-0304-z](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0304-z)
- Drucker V.V., Shtykova Y.R., Suslova M.Yu. et al. 2022. Microbiological monitoring. In: *Takhteev V.V. (Ed.), Ecological monitoring of Lake Baikal*. Irkutsk, pp. 32-49. (in Russian)
- Egorova A.A., Deryugina Z.P., Kuznetsov S.I. 1952. Characteristic of saprophytic microflora of water in a number of lakes of various trophic degrees. *Trudy Baikalskoi limnologicheskoi stantsii AN SSSR [Proceedings of the Baikal Limnological Station of the Academy of Sciences of the USSR]* 2: 118-127. (in Russian)
- Goman G.A. 1973. Influence of the waste water of the Baikal pulp mill on the microbiological processes in the water and sediments of Southern Baikal. *Cand. Sc. Dissertation*, Irkutsk State University, Irkutsk, Russia. (in Russian)
- Kravchenko O.S. 2009. Bacteria of the genus *Enterococcus* in Lake Baikal: distribution, species composition and adaptation mechanism. *Cand. Sc. Dissertation*, Buryat State University, Ulan-Ude, Russia. (in Russian)
- Kriss A.E., Chebotarev E.I. 1970. Vertical distribution of heterotrophic bacteria in the open deep water of Lake Baikal. *Microbiologia* 39(1): 146-148. (in Russian)
- Kuznetsov S.I. 1951. Comparative characteristics of the biomass of bacteria and phytoplankton in the surface water layer of the Central Baikal. *Trudy Baikalskoi limnologicheskoi stantsii AN SSSR [Proceedings of the Baikal Limnological Station of the Academy of Sciences of the USSR]* 13: 217-225. (in Russian)
- Kuznetsov S.I. 1957. Microbiological characteristics of water and soils of Baikal. *Trudy Baikalskoi limnologicheskoi stantsii AN SSSR [Proceedings of the Baikal Limnological Station of the Academy of Sciences of the USSR]* 15: 388-396. (in Russian)
- Maksimova E.A., Maksimov V.N. 1989. *Microbiology of Baikal waters*. Irkutsk: Publishing House of the Irkutsk State University. (in Russian)
- Messineva M.A. 1957. Biogeochemical studies of Baikal deep-water stantsii AN SSSR [Proceedings of the Baikal Limnological Station of the Academy of Sciences of the USSR] 15: 199-211. (in Russian)
- MUK 4.2.1884-04. Sanitarno-mikrobiologicheskii i sanitarno-parazitologicheskii analiz vody poverhnostnykh vodnykh ob'yektov [Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water in surface water bodies] (in Russian)
- Namsaraev V.V., Dulov L.E., Zemskaya T.I., et al. 1995. Anthropogenic activation of bacterial production in bottom sediments of Lake Baikal. *Microbiologia* 64(4): 548-552.
- Nechaeva N.B., Salimovskaya-Rodina A.G. 1935. Micro-biological analysis of Baikal bottom sediments. *Trudy Baikalskoi limnologicheskoi stantsii AN SSSR [Proceedings of the Baikal Limnological Station of the Academy of Sciences of the USSR]* 6: 5-14. (in Russian)
- Panasyuk E.Yu., Drucker V.V. 2002. Dominant species of potentially pathogenic bacteria isolated from Lake Baikal water. In: *Assessment of the current state of microbiological research in the Eastern Siberian region*, pp. 64. (in Russian)
- Podlesnaya G.V., Galachyants A.D., Shtykova Yu.R. et al. 2022. Sanitary-microbiological assessment of the water quality in the Listvennichnyi Bay at the period of extremely high water level in Lake Baikal. *Geography and Natural Resources* 43(5): 163-169. DOI: [10.15372/GIPR20220517](https://doi.org/10.15372/GIPR20220517)
- Potapov S., Gorshkova A., Krasnopeev A. et al. 2023. RNA-Seq Virus Fraction in Lake Baikal and Treated Wastewaters. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1-26. DOI: [10.3390/ijms241512049](https://doi.org/10.3390/ijms241512049)
- Rodina A.G. 1954. Bacteria in the productivity of the rocky littoral zone of Lake Baikal. In: *Problems of Inland Waters Hydrobiology in USSR*, pp. 172-201. (in Russian)
- Romanova A.P. 1958. Seasonal dynamics of bacterioplankton, its horizontal and vertical distribution in the southern part of Lake Baikal. *Izvestiya SO AN SSSR [Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences]* 7: 28-35. (in Russian)
- SanPiN 1.2.3685-21. *Gigienicheskiye normativy i trebovaniya k obespecheniyu bezopasnosti i (ili) bezvrednosti dlya cheloveka faktorov sredy obitaniya [Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness to humans of environmental factors]* (in Russian)
- Suslova M.Yu., Pestunova O.S., Parfenova V.V. 2017. *Water Quality Assessment in the Selenga River and its Delta*

in Terms of Sanitary AND Microbiological Indices. *Hydrobiological Journal* 53(3):70-81. DOI: [10.1615/HydrobJ.v53.i3.70](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v53.i3.70)

Shchetinina E.V., Maksimov V.V., Kraikivskaya O.V., et al. 2013. Assessing the State of Water Masses of the Southern Baikal in the Zone of Influence of Baikal PPM by Many-Year Microbiological Characteristics. *Water Resources*. 40(6): 649-656. DOI: [10.7868/S0321059613060114](https://doi.org/10.7868/S0321059613060114)

Shtykova Yu.R., Gladkikh A.S., Mironova L.V. et al. 2018a. Maldi-tof-ms analysis in accelerated identification of opportunistic bacteria in different ecotopes of the coastal zone of Lake Baikal. In: International Conference "Freshwater Ecosystems – Key Problems", p. 314.

Shtykova Y.R., Drucker V.V., Sorokovikova E.G. et al. 2018b. Sanitary-microbiological and toxicological monitoring of Lake Baikal. Part 1: water area of the Maloe more in 2016. *Environmental control systems* 11(31): 110-114. DOI: [10.33075/2220-5861-2018-1-110-114](https://doi.org/10.33075/2220-5861-2018-1-110-114) (in Russian)

Shtykova Y.R., Suslova M.Yu., Kostornova T.Ya. et al. 2016. Sanitary and Microbiological Monitoring in the Lake Baikal Pelagic Zone and Baikal's Major Tributaries from 2010 through 2015. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series "Biology. Ecology"*. 17:71-62. (in Russian)

Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Podlesnaya G.V. et al. 2020. Antibiotic-resistant opportunistic bacteria in the coastal

zone of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology*. 4: 1026-1027. DOI: [10.31951/2658-3518-2020-A-4-1026](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-4-1026)

Tikhonova I.V. 2006. Morphological and genetic features of picoplanktonic cyanobacteria of Lake Baikal. Cand. Sc. Dissertation, Irkutsk State University, Irkutsk, Russia. (in Russian)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *J. Great Lakes Res.* 42(3): 487-497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Vinogradova T.P., Kerber E.V., Drucker V.V., et al. 2004. Microbiological heritage of the 20th century. Part 1. Results of the Study of the Baikal-Angaro-Yenisei Ecosystem. Irkutsk: Izd-vo Inst-ta Geografiya SB RAS. (in Russian)

Yasnitsky V.A., Blankov B.N., Gortikov V.I. 1927. Report on the work of the Baikal limnological station. *Izvestiya Biol.-geogr. Institut at ISU* 3(3): 47-54. (in Russian)

Zemskaya T.I., Namsaraev B.B., Parfenova V.V., et al. 1997. Microorganisms in Bottom Sediments of Lake Baikal and Environmental Conditions. *Russian Journal of Ecology*. 28(1): 36-40.

Санитарно-бактериологический мониторинг качества воды озера Байкал: от единичных/разовых исследований до систематических ежегодных экспедиций

Дрюккер В.В., Суслова М.Ю., Небесных Ю.Р., Потапов С.А.,
Подлесная Г.В.*, Белых О.И.

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Проведён анализ санитарно-бактериологической оценки качества воды литорали и пелагиали озера Байкал за весь период микробиологических исследований экосистемы. Установлено, что подобные исследования в прошлом веке были единичными и только с конца его они стали проводиться по всему озеру, а в настоящее время исследования проводятся ежегодно в весенний, летний и осенний периоды по всей акватории Байкала и в устьевых участках крупных притоков. Оценено качество вод озера, установлены неблагополучные районы в литоральной части по превышению нормативов СанПиН. В 2021-2023 гг. отобраны пробы сточных вод после прохождения очистных сооружений в гг. Слюдянке и Северобайкальске, установлена низкая эффективность обеззараживания и поступление условно-патогенных и патогенных бактерий в Байкал (бактериальное загрязнение). Предложена схема и периодичность проведения санитарно-бактериологического мониторинга экосистемы оз. Байкал.

Ключевые слова: озеро Байкал, санитарно-показательные бактерии, качество воды, схема санитарно-бактериологического мониторинга

1. Введение

Поверхностные воды нашей планеты: озера, водохранилища, реки, также как моря и океаны, подвергаются постоянному антропогенному воздействию. Не избежала этого влияния и экосистема озера Байкал, включенная в 1996 г. в Список объектов всемирного природного наследия ЮНЕСКО в силу своей уникальности и чистоты вод. Во всем мире наблюдается ухудшение экологического состояния пресных водоемов – основных источников питьевой воды, что приводит к нарушению эволюционно сложившихся микробиоценозов и развитию в них условно-патогенных и патогенных бактерий. Благодаря необычной конкурентоспособности, выработанной за 3 млрд. лет существования, микроорганизмы могут поселяться во всех экологических нишах – от полярных регионов до пустынь. Вода – одна из наиболее благоприятных сред обитания для них, в водных экосистемах микроорганизмы достигают высокой численности, являясь определяющими и необходимыми звеньями круговорота химических элементов, обеспечивая процесс

непрерывного создания и деструкции органических веществ в результате взаимосвязанного функционирования.

Микробиологические исследования воды и грунтов Байкала проводятся уже около 100 лет (Яснитский и др., 1927; Нечаева и Салимовская-Родина, 1935; Кузнецов, 1951; Романова, 1958; и др.). В последующие годы были изучены численность и биомасса бактериопланктона не только в южной части озера, но и по всей акватории Байкала, их межгодовая динамика и вертикальное распределение, установлены пики в сезонном развитии, связи с динамикой численности и составом фитопланктона, с изменениями температуры воды, определено время генерации бактерий, начата работа по идентификации видового состава культивируемых микробных сообществ (Кузнецов, 1957; Егорова и др., 1952; Родина, 1954; Крисс и Чеботарев, 1970). В этот период становления микробиологии на Байкале главную роль сыграли специалисты-микробиологи из научно-исследовательских учреждений гг. Москвы и Ленинграда, используя свои знания и опыт.

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: podlesnaya@lin.irk.ru (Г.В. Подлесная)

Поступила: 19 октября 2023; **Принята:** 03 ноября 2023;
Опубликована online: 10 ноября 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Санитарно-бактериологическая оценка качества воды подразумевает определение совокупности санитарных показателей – критериев, отражающих санитарное состояние исследуемого водного объекта в соответствии с требованиями нормативных документов. Санитарными показателями служат фекальные индикаторные бактерии (ФИБ). Они используются во всем мире для выявления и предупреждения фекального загрязнения и связанного с ним риска для здоровья человека в связи с вероятным присутствием патогенных бактерий и вирусов. ФИБ включают такие группы бактерий, как общие колиформные бактерии (ОКБ), термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ), фекальные колиформные бактерии (fecal coliforms), *E. coli*, *энтерококки*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* spp., которые широко распространены в фекалиях людей и большинства животных. Их уровни в сточных водах и фекалиях сравнительно высоки, поэтому они обычно обнаруживаются при наличии фекального загрязнения в поверхностных водах. Поэтому поверхностные воды контролируются с использованием численности ФИБ, для которых установлены нормативы законодательными документами для оценки качества используемых вод. На озере Байкал подобные исследования качества воды были начаты значительно позже.

2. Материалы и методы

После реорганизации в 1961 г. Байкальской лимнологической станции в Лимнологический институт СО АН СССР и создания в 1972 году «лаборатории прикладной микробиологии», которую возглавила к.б.н. М.А. Мессинева, еще в 50-е годы исследовавшая на Байкале микроорганизмы грунтов озера (Мессинева, 1957), исследования микроорганизмов оз. Байкал стали плановыми, систематическими и комплексными. Поскольку цель нашей работы – анализ проведенных исследований по санитарно-бактериологическому мониторингу качества воды оз. Байкал за предыдущий период работ и разработка схемы его для уникального олиготрофного водоема, мы не приводим список всех микробиологических работ, так как он имеется на сайте Лимнологического института СО РАН, а также в монографии-сводке микробиологических исследований водоемов и водотоков Байкало-Ангара-Енисейской гидросистемы (Виноградова и др., 2004).

Правительство РФ в 2023 г. утвердило новое Постановление N 260 «Положение о государственном экологическом мониторинге уникальной экологической системы озера Байкал», в котором установило порядок осуществления его, где в п. 8 «д» и 11 «е» обязало предоставлять информацию «федеральным государственным бюджетным учреждением «Сибирское отделение Российской академии наук» в части результатов наблюдений за состоянием озера Байкал». Для оценки проведенных ранее объемов и частоты исследований по санитарно-бактериологическому мониторингу экосистемы Байкала,

а также для обсуждения использования в настоящее время конкретных стандартных и новых показателей, методов исследований, станций отбора проб воды, времён года и частоты отбора их, что необходимо для разработки и внедрения в практику схемы самого микробиологического мониторинга, мы проанализировали имеющийся опубликованный массив санитарно-бактериологических исследований озера.

3. Результаты и обсуждение

Анализ результатов проведенных санитарно-бактериологических исследований Байкала показал, что в этом научном направлении единичные работы начались в связи со строительством Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК) только в конце 60-х годов прошлого столетия. Впервые описание микробных сообществ воды и загрязненного грунта в районе влияния сточных вод БЦБК дано в 1970-1973 гг. в работах Г.А. Гомана (1973). Впоследствии в этом районе выполнены работы по оценке численности анаэробных сапрофитов, сульфатредукторов, метаногенов, установлены скорости разложения белка, целлюлозы, сульфатредукции, образования метана, сделан прогноз об ухудшении экологической обстановки при дальнейшем сбросе сточных вод (Намсараев и др., 1995; Земская и др., 1997).

Качество воды Южного Байкала и, главным образом, у пос. Бол. Коты и у г. Байкальска исследовали в этот период научные сотрудники НИИ Биологии Иркутского государственного университета (Максимова и Максимов, 1989). Многолетние результаты исследований этих авторов показали стабильные различия качества байкальской воды во все периоды: на станции «1 км от берега» пос. Бол. Коты, удаленной от промышленных и сельскохозяйственных зон, качество воды на всех глубинах оставалось высоким, в то время как у г. Байкальск в радиусе до 10 км на всех глубинах вода не соответствовала стандартам на питьевую воду, рекреационную и рыбо-хозяйственную деятельность.

Оценку качества вод всего Байкала в литоральной его части и в пелагиали до максимальных глубин по санитарно-бактериологическим показателям начали исследовать и дали в 1993 г. научные сотрудники Лимнологического института СО РАН В.В. Дрюккер, Т.Я. Косторнова, О.А. Моложавая, В.А. Афанасьев (1993). Было установлено, что пелагиаль озера имеет высокое качество воды как на поверхности, так и на всех глубинах. Прибрежные же воды у всех населенных пунктов имеют низкое качество, во многих пробах была обнаружена *E. coli*. Одновременно стал проводиться и микробиологический мониторинг крупных притоков оз. Байкал, который показал низкое качество воды в устьевых участках рр. Селенга, Баргузин, Бол. Голоустная, Турка, Тья, Переменная, Похабиха, поступающей в озеро в весенний период (Дрюккер и Масленников, 1998).

В 1997-2000 гг. сотрудниками лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН были впер-

вые целенаправленно проведены многолетние исследования в различные сезоны года по выяснению масштаба распространения и идентификации условно-патогенных бактерий в воде озера Байкал по всей его акватории (Дрюккер и Панасюк, 2002; Панасюк и Дрюккер, 2002). Пробы воды начали отбирать по стандартным гидрологическим разрезам на центральных глубинных станциях по различным горизонтам и на прибрежных станциях у западного и восточного берегов: 1. п. Маритуй – п. Солзан; 2. п. Листвянка – п. Танхой; 3. м. Кадильный – п. Мишиха; 4. пр. Харауз – м. Красный Яр; 5. р. Анга – р. Сухая; 6. р. Болдакова – прол. Ольхонские ворота; 7. м. Ухан – м. Тонкий; 8. м. Покойники – м. Ушканий; 9. м. Елохин – п. Давша; 10. м. Котельниковский – м. Амнундакан; 11. с. Байкальское – м. Турали; 12. м. Заворотный – р. Сосновка; 13. м. Крестовый – м. Хобой; 14. р. Тья – р. Немнянка.

В результате проведенных исследований в литоральной зоне озера было выделено 898 штаммов потенциально-патогенных бактерий (ППБ), являющихся представителями 31 вида, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* и неферментирующей группе бактерий. Количество изученных бактерий закономерно повышалось в воде в летне-осенний период и уменьшалось в зимние месяцы. Распределение условно-патогенных бактерий по всей акватории озера было неравномерное - закономерно отмечалось значительное повышение их численности в местах сброса неочищенных стоков разнообразного происхождения. Наибольшая численность и видовое разнообразие этой группы бактерий установлены в воде Южного Байкала: пос. Листвянка, порт Байкал, г. Байкальск; в Среднем Байкале – Баргузинский и Чивыркуйский заливы, дельта р. Селенги, Малое море; в Северном Байкале – участок Байкало-Амурской магистрали. В пелагиали озера изученная группа бактерий не обнаружена по всей толще воды на различных участках (более 30-ти станций). Доминирующими видами условно-патогенных бактерий, выделенными из вод литоральной части озера, были: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Burkholderia cepacia*. Условно-патогенные бактерии, выделенные из вод оз. Байкал, обладают множественной антибиотикорезистентностью, гемолитической активностью к эритроцитам человека, способностью к культивированию при 37° С и, следовательно, несут потенциальную эпидемиологическую опасность для здоровья населения (Drucker and Panasyuk, 2006). Авторами было предложено дополнительно использовать для санитарно-бактериологического контроля качества вод Байкала обнаруженные потенциально-патогенные бактерии, а также бактерии рода *Enterococcus*: *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*, как специфические индикаторы поступления в озеро фекальных (неочищенных) вод. Многолетними исследованиями было установлено, что основными источниками загрязнения вод Байкала являются неочищенные хозяйственно-бытовые сточные воды населенных пунктов, расположенных на берегах озера, сельскохозяйственных

предприятий, туристических комплексов, которые не имеют систем обеззараживания, утилизации и вывоза сточных вод, а также увеличивающаяся численность туристических катеров, которые не имеют емкостей для сбора бытовых и подсланевых вод.

В 2000-2009 гг. наблюдалась тенденция к увеличению санитарно-бактериологических показателей в воде в районе сброса «обеззараженных» сточных вод Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (Щетинина и др., 2013). В связи с ухудшением санитарной обстановки авторами работы были проведены исследования по изучению разнообразия и антибиотикоустойчивости бактерий, выделенных из воды, в наиболее подверженных антропогенному влиянию районах озера. Другие авторы также обнаруживали в воде различных районов Байкала представителей санитарно-бактериологического загрязнения – бактерий рода *Enterococcus* (Кравченко, 2009).

Наряду с этими микроорганизмами, впервые в России в воде озера Байкал в этот же период были обнаружены токсичные цианобактерии, опасные для человека, у которых с использованием современных методов исследования были изучены разные типы и варианты токсинов, а также гены их синтеза (Тихонова, 2006; Белых и др., 2013; Белых и др., 2015). Для санитарно-бактериологического мониторинга качества воды в Байкале этот новый аспект очень существенен, так как цианобактериальные цветения в настоящее время являются самым значимым и характерным следствием эвтрофирования водных объектов во всем мире, а оно уже происходит в разных частях Байкала. Определены концентрации микроцистинов и сакситоксинов в пробах планктона и бентоса озера и оценена степень угрозы токсичных цианобактерий здоровью человека и животных. Показано, что «цветения» бентосных цианобактерий с наличием токсинопродуцирующих видов, начавшиеся на оз. Байкал в 2011 г., сейчас приняли характер экологического кризиса, и возможно, стали причиной массовой гибели байкальских губок (Белых и др., 2017). Эти новые результаты исследований несомненно заслуживают соответствующей оценки для решения вопроса о включении этих бактерий в официальные документы по микробиологическому мониторингу качества вод Байкала.

В последние годы экосистема озера Байкал претерпевает серьезные экологические изменения. В прибрежных участках некоторых районов наблюдаются признаки эвтрофикации – интенсивное развитие неспецифических для литорали озера водорослей, отмечены массовая гибель губок и цветение токсичных цианобактерий (Timoshkin et al., 2016). Растут объемы сброса в озеро некачественно очищенных и не очищенных сточных вод из населенных пунктов, увеличивается рекреационная нагрузка, резко возросло количество туристических судов, не оборудованных емкостями для сбора хозяйственно-бытовых и подсланевых вод. Численность туристов, приезжающих на Байкал во все сезоны года, выросла многократно. Так, в 2019 г. их число дости-

гало 2.2 млн. Непосредственно на побережье озера сложилось более 40 зон рекреационного освоения, в которых сосредоточена основная часть объектов размещения туристов: турбазы, гостиницы, дома отдыха. Возникают вопросы: как эффективно работают септики в зонах отдыха туристов, не нанося ущерб экосистеме Байкала? Как часто «Росприроднадзор» проверяет утилизацию хозяйственно-бытовых и подсланевых вод на туристических теплоходах?

Начиная с начала 2000 г. в Лимнологическом институте СО РАН сложилась практика проведения комплексных экспедиций по всему Байкалу, в которых постоянно участвуют микробиологи. Конечно, экспедиционные работы по всему Байкалу проводились и раньше, но комплексность исследований ограничивалась отсутствием необходимых приборов для одновременного отбора большого количества проб воды и грунта, быстрого измерения абиотических параметров до максимальных глубин и др. В настоящее время только Лимнологический институт имеет на Байкале научно-исследовательский флот, оборудованный необходимыми приборами для проведения научных лимнологических исследований. По этой причине санитарно-бактериологический мониторинг качества вод Байкала и его притоков проводится сотрудниками лаборатории водной микробиологии института, которые имеют всё необходимое современное оборудование, отдельные помещения для проведения санитарно-бактериологического мониторинга качества воды оз. Байкал классическими и современными молекулярно-биологическими методами. Лаборатория водной микробиологии аккредитована в национальной системе Росаккредитации (№ RA.RU.21ЛИ02).

Санитарно-бактериологический мониторинг качества вод Байкала, проведенный в период 2010-2023 гг. в ежегодных весенних (вторая половина мая-начало июня), летних (август) и осенних (вто-

рая половина сентября) кругобайкальских экспедициях показал, что ФИБ постоянно присутствуют в прибрежной части озера. В литорали озера значительное количество колиформных бактерий и энтерококков было детектировано в южной части озера: пос. Листвянка, г. Байкальск, пос. Култук; в средней котловине: в акватории проливов Малое море, Ольхонские ворота, дельта р. Селенги; в северной части: г. Северобайкальск, пос. Заречный, (Штыкова и др., 2016, 20186; Суслова и др., 2017; Подлесная и др., 2022). В 2011 г. превышение регламентируемых качество вод стандартов РФ наблюдали по всей пелагиали оз. Байкал, а также в большинстве его крупных притоков. В 2012 и 2015 гг. превышение санитарно-бактериологических показателей пелагических вод отмечено только в южной части озера (Рис. 1). В сентябре 2016 г. зафиксирована максимальная доля проб воды с низким коэффициентом самоочищения как в пелагиали – 60%, так и в устьях рек – 62.5%.

В водах устьев впадающих в озеро рек численность санитарно-показательных групп бактерий в 2010-2020 гг. (Рис. 2) в среднем была на порядок выше, чем их содержание в пелагиали: рр. Голоустная, Бугульдейка, Турка, Анга, Баргузин, Сухая, дельта Селенги (Дрюккер и др., 2022). Наиболее неблагоприятный период по качеству вод установлен в августе 2011 г., мае – июне 2012 г., когда количество нестандартных проб воды было максимальным. В августе 2010 г., мае – июне 2014 г. и сентябре 2017 г. все взятые речные пробы соответствовали «удовлетворительным» показателям качества поверхностных вод.

В 2022-2023 гг. кроме стандартных исследований по санитарно-бактериологическому мониторингу, нами были апробированы дополнительные методы: выявление фекального загрязнения с помощью маркерных зондов к бактериям (обитателям кишечника человека и животных), а также на установление вирусных сообществ в воде. Кроме того, в

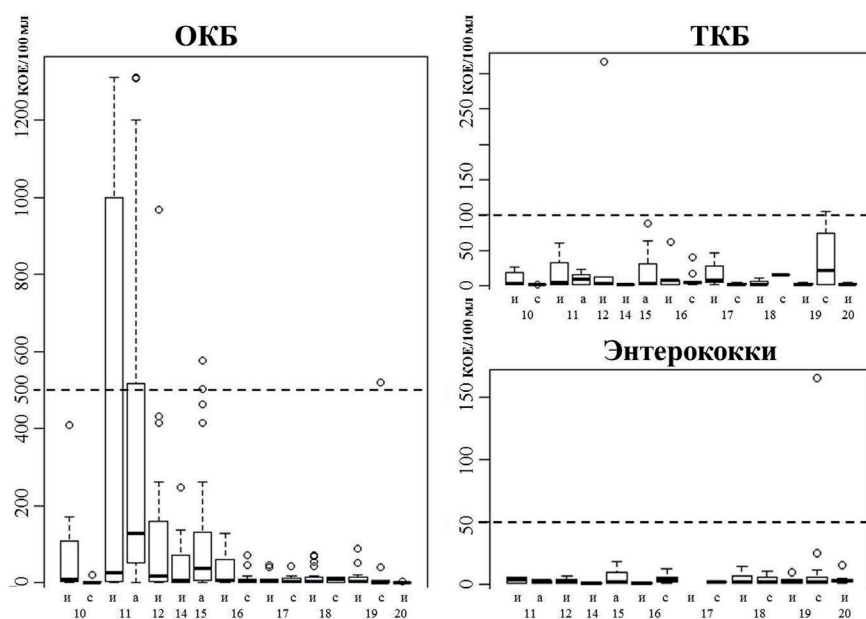


Рис.1. Численность санитарно-микробиологических показателей в пелагиали оз. Байкал по данным 2010-2020 гг. (и-июнь, а-август, с-сентябрь). Пунктирная линия – норматив.

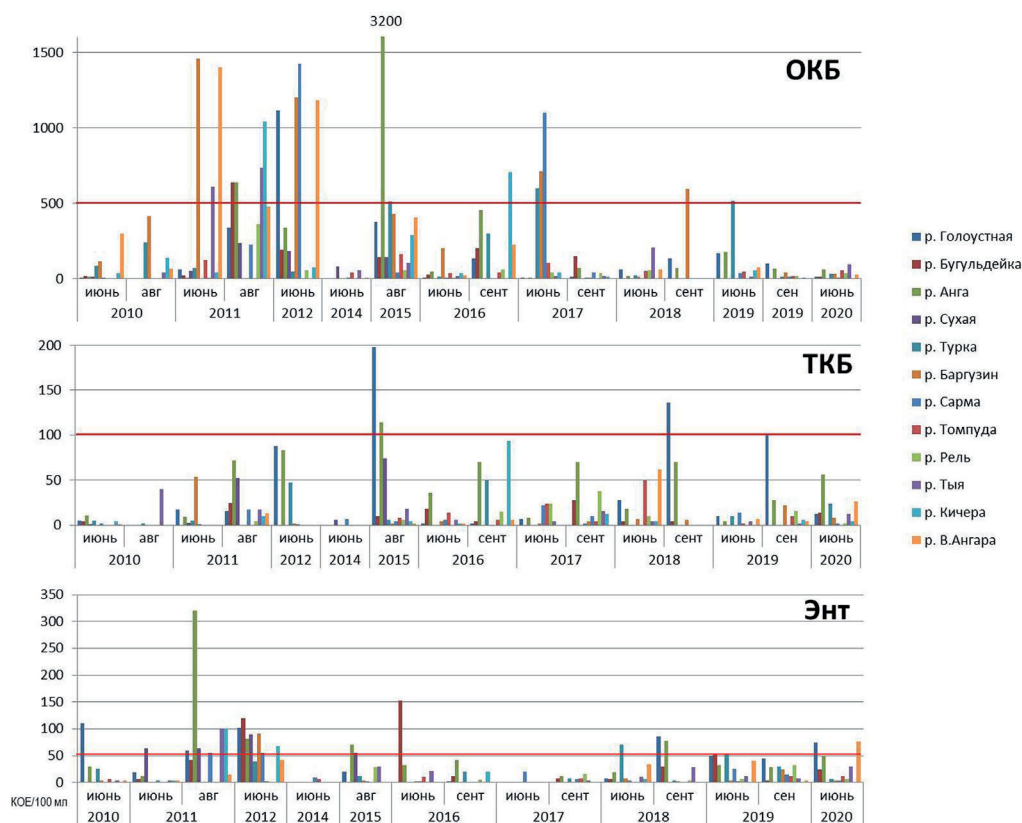


Рис.2. Численность санитарно-микробиологических показателей в водах притоков по данным 2010-2020 гг. Красная линия – норматив.

2021 г. в сетку станций отбора проб были включены сточные очищенные воды из очистных сооружений гг. Слюдянка и Северобайкальск, анализ которых проводили по СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». Также были отобраны 10 образцов грунта в прибрежной зоне на различных участках.

В оба года последних исследований на 55 (170 проб воды) и 59 (71 проба воды) станциях по основным санитарно-бактериологическим показателям результаты указывают на значительные превышения нормативов СанПиН. Так в 2023 г. это районы: гг. Байкальск, Бабушкин, пос. Листвянка, Танхой и Б. Голоустное, Посольский сор, бух. Песчаная и Ая, заливы Малого моря: Базарная, Куркутская, Мандархан, Шида, Хужирский, Чивыркуйский залив: Курбулик, Монахово, Арангатуи. Наибольшие превышения значений этих бактерий детектированы в: г. Бабушкин (*E. coli* в 1.7 раза, энтерококки в 20 раз), пос. Листвянка (*E. coli* в 4 раза, энтерококки в 4.7 раза), в Чивыркуйском заливе (*E. coli* в 5.2 раза, энтерококки в 6.4 раза), в Малом море (энтерококки в 4-6 раз). Шесть из семи притоков: рр. Переёмная, Снежная, Солзан, Горячий ключ также имели превышающие значения, особенно – рр. Похабиha (ОКБ в 11 раз, *E. coli* в 58 раз, энтерококков в 186 раз) и Медлянка (ОКБ в 1.2 раза, *E. coli* в 5 раз, энтерококков в 63 раза).

Сточные очищенные воды КОС г. Слюдянка по результатам анализов не соответствуют требованиям СанПиН 1.2.3685-21 и превышали показатели: ОКБ в 4200 раз, *E. coli* в 17000 раз, энтерококки в

3600 раз, что указывает на отсутствие этапов обеззараживания. Подобные результаты были получены нами и по сточным очищенным сточным водам КОС г. Северобайкальска в 2022 г. Исследования 10 проб прибрежного песчаного грунта из различных районов Байкала характеризовались различной степенью зараженности санитарно-показательными бактериями и позволили классифицировать эти районы по степени эпидемиологической опасности на три группы:

1. чрезвычайно опасная – г. Слюдянка;
2. опасная – пп. Култук, Максимиха, Курбулик, Сахюрта, бухты Ая и Змеиная;
3. умеренно опасная – г. Байкальск, пп. Хужир, Б. Коты.

Изучение поверхностной воды в пелагической зоне Байкала как в предыдущие годы, так и в этот период, полностью соответствуют нормативам СанПиН 1.2.3685-21 и МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов», за единичными исключениями проб на численность ОКБ в 2011-2012, 2015, 2019, 2021-2022 гг.

Создана коллекция из 172 культивируемых условно-патогенных штаммов бактерий, выделенных из планктона и эпилитона оз. Байкал, из очищенных сточных вод и прибрежных грунтов озера. С помощью современных методов идентификации (молекулярно-генетический и масс-спектрометрический анализы) исследовали 62 штамма, выделенных из придонных и поверхностных проб воды

(Штыкова и др., 2018a; Shtykova et al., 2020). Всего этим методом идентифицировано 18 родов и 21 вид условно-патогенных бактерий. Среди них представители порядка Enterobacterales рода *Yersinia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Leclercia*, *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Shigella*, порядка Pseudomonadales рода *Pseudomonas*, *Acitrobacter*, порядка Bacillales рода *Bacillus*, *Exiguobacterium* и *Staphylococcus*, семейства Aeromonadaceae род *Aeromonas*, семейства Enterococcaceae род *Enterococcus*, семейства Aerococcaceae род *Aerococcus*, семейства Comamonadaceae род *Delftia* и семейства Xanthomonadaceae род *Stenotrophomonas*.

Опасные для здоровья человека и животных виды условно-патогенных бактерий выделены из разных мест литоральной зоны оз. Байкал. Так, бактерии рода *Aeromonas* – самые распространенные, обнаружены в Малом море в бух. Базарная, в зал. Хужир-Нагайский, в зал. Хул, у пос. Хужир, пос. Листвянка, пос. Б. Коты, пос. Б. Голоустное, в бух. Ая. Во многих заливах Малого моря встречаются бактерии рода *Enterococcus*. Штаммы *E. coli* выделены в разных акваториях озера: в зал. Мухор и Хул, у пос. Б. Коты, в районе Ушканьих островов. Мы учитывали, что с 2022 г. согласно новым изменениям в СанПиН 1.2.3685-21, бактерия *E. coli* и энтерококки являются обязательными показателями при санитарно-микробиологической оценке качества воды.

В 2021-2023 гг. были взяты пробы сточных вод после прохождения очистных сооружений в гг. Слюдянке и Северобайкальске, установлена низ-

кая эффективность обеззараживания и поступление осевно-патогенных и патогенных бактерий в Байкал (Potapov et al., 2023). Проведенные исследования чувствительности к антибиотическим веществам у 70 штаммов бактерий, выделенных из воды и у 17 штаммов – из очищенных сточных вод КОС г. Слюдянки, показали антибиотикорезистентность ко всем испытуемым антибиотическим веществам широкого спектра действия, используемых для лечения инфекционных заболеваний (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, макролиды, аминогликозиды, тетрациклины нитрофураны и др.).

4. Заключение

Анализ результатов санитарно-бактериологического мониторинга за предыдущий и настоящий век достоверно указывают на снижение качества воды в прибрежной части Байкала, а также в притоках южной котловины его: увеличилось количество ОКБ, ТKB и энтерококков, превышающее требования СанПиН 1.2.3685-21. В глубоководной части озера отмечен восходящий тренд численности энтерококков за последнее десятилетие. Полученные результаты указывают на поступление в реки и само озеро неочищенных или недостаточно очищенных сточных вод. Канализационные очистные сооружения гг. Слюдянка и Северобайкальск в исследованный период работали неэффективно, как показали данные санитарно-микробиологических

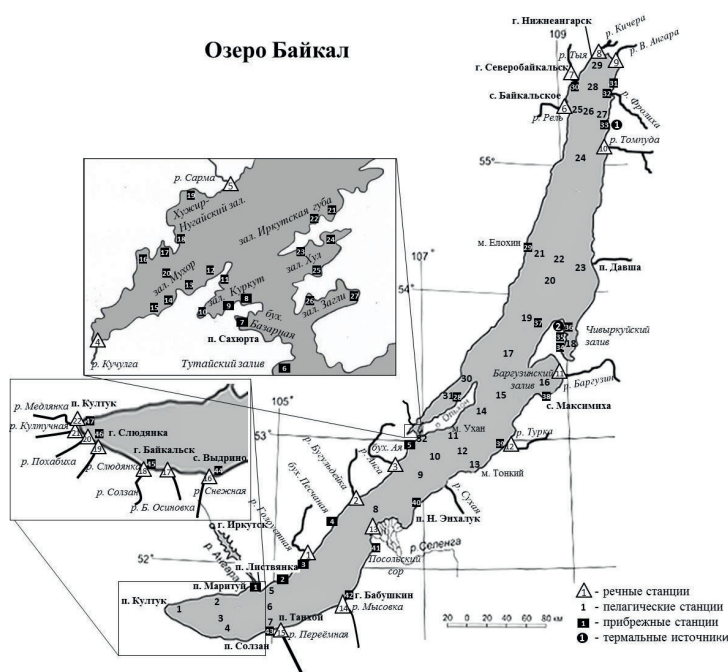


Рис.3. Схема санитарно-бактериологического мониторинга озера Байкал. Речные станции: 1 – Голоустная, 2 – Бугульдейка, 3 – Ангa, 4 – Кучулга, 5 – Сарма, 6 – Рель, 7 – Тья, 8 – Кичера, 9 – В. Ангара, 10 – Томпуда, 11 – Баргузин, 12 – Турка, 13 – Селенга, 14 – Мысовка, 15 – Переемная, 16 – Снежная, 17 – Б. Осиновка, 18 – Солзан, 19 – Слюдянка, 20 – Похабиha, 21 – Култучная, 22 – Медлянка. Пелагические станции: 1 – 12 км от п. Култук, 2 – 3 км от п. Маритуй, 3 – п. Маритуй–п. Солзан, 4 – 3

км от п. Солзан, 5 – 3 км от п. Листвянка, 6 – п. Листвянка–п. Танхой, 7 – 3 км от п. Танхой, 8 – м. Красный Яр–прот. Харауз, 9 – р. Анга–р. Сухая, 10 – п. Болдакова – пр. Малые Ольхонские ворота, 11 – 3 км от м. Ухан, 12 – м. Ухан–м. Тонкий, 13 – 3 км от м. Тонкий, 14 – 7 км от м. Ижимей, 15 – м. Хобой–м. Крестовый, 16 – Баргузинский залив, 17 – Академический хребет, 18 – Чивыркуйский залив, 19 – ст. Солнечная–Ушканьи острова, 20 – м. Заворотный–р. Сосновка, 21 – 3 км от м. Елохин, 22 – м. Елохин–п. Давша, 23 – 3 км от п. Давша, 24 – м. Котельниковский–м. Амнундакан, 25 – 3 км от с. Байкальское, 26 – с. Байкальское–м. Турали, 27 – 3 км от м. Турали, 28 – р. Тья–р. Немнянка, 29 – 7 км от г. Нижнеангарск, 30 – м. Арал–м. Хобой, 31 –Пролив Малое Море, 32 – Малые Ольхонские ворота. Береговые станции: 1 – п. Листвянка, 2 – п. Б. Коты, 3 – п. Б. Голоустное, 4 – бух. Песчаная, 5 – бух. Ая, 6 – зал. Тутайский, 7 – бух. Базарная, 8 – бух. Щучья, 9 – бух. Радость, 10 – зал. Куркут, 11 – м. Бурлюк, 12 – бух. Чукотка, 13 – бух. Мандархан, 14 – зал. Зуун-Хагун, 15 – зал. Баруун-Хагун, 16 – бух. Шида, 17 – м. Улирба, 18 – зал. Хужир-Нугайский, 19 – д. Сарма, 20 – зал. Мухор, 21 – зал. Иркутская губа, 22 – бух. Тутырхей, 23 – бух. Харин-Ирги, 24 – зал. Хул, 25 – бух. Хытырхей, 26 и 27 – зал. Загли, 28 – п. Хужир, 29 – м. Елохин, 30 – г. Северобайкальск, 31 – бух. Фролиха, 32 – бух. Ая, 33 – бух. Хакусы, 34 – п. Монахово, 35 – п. Курбулик, 36 – бух. Змеиная, 37 – бух. Пещерка (Ушканьи острова), 38 – с. Максимиха, 39 – с. Турка, 40 – п. Н. Энхалук, 41 – Посольский сор, 42 – г. Бабушкин, 43 – п. Танхой, 44 – с. Выдрино, 45 – г. Байкальск, 46 – г. Слюдянка, 47 – п. Култук. Станции термальных источников: 1 – Хакусы, 2 – Змеиный.

анализов. Сточные воды из выпускных труб КОС не соответствовали требованиям СанПиН 1.2.3685-21, количество колиформных бактерий превышало нормативные значения. Создана коллекция из 172 культивируемых условно-патогенных бактерий, выделенных из воды оз. Байкал, из очищенных сточных вод и прибрежных грунтов озера.

В результате проведенного анализа многолетних исследований санитарно-показательных микроорганизмов на оз. Байкал, мы предлагаем «Схему санитарно-бактериологического мониторинга» (Рис. 3), по которой определение качества вод литоральной и пелагиальной частей необходимо проводить во все сезоны года: зимний (март), весенний (конец мая-начало июня), летний (август), осенний (конец сентября-начало октября). Для Байкала, содержащего 20% всей пресной воды на Земле, большое практическое значение в настоящее время глобального потепления и усиливающегося антропогенного (биологического и химического) воздействия имеет проблема сохранения воды высокого качества, регулярное проведение санитарно-бактериологического мониторинга будет оперативно и достоверно показывать тренды трофности его экосистемы.

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 0279-2021-0015 (121032300269-9).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Белых О.И., Гладких А.С., Сорокикова Е.Г. и др. 2013. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины. *Химия в интересах устойчивого развития* 21: 363-378.
- Белых О.И., Гладких А.С., Сорокикова Е.Г. и др. 2015. Идентификация токсичных цианобактерий в озере Байкал. *ДАН* 463: 353-357. DOI: [10.1134/S1607672915040067](https://doi.org/10.1134/S1607672915040067)
- Белых О.И., Федорова Г.А., Кузьмин А.В. и др. 2017. Обнаружение микроцистинов в цианобактериальных обрастаниях различных субстратов прибрежной зоны озера Байкал. *Вестник Московского университета* 72(4): 262-269. DOI: [10.3103/S0096392517040022](https://doi.org/10.3103/S0096392517040022)
- Виноградова Т.П., Кербер Е.В., Дрюккер В.В. и др. 2004. Микробиологическое наследие XX века. Часть 1. Итоги изучения Байкало-Ангара-Енисейской экосистемы. Иркутск: Изд-во Инст-та Географии СО РАН.
- Гоман Г.А. 1973. Влияние сточных вод Байкальского целлюлозного завода на микробиологические процессы в воде и грунтах Южного Байкала. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Иркутск, Россия.
- Дрюккер В.В., Косторнова Т.Я., Моложавая О.А. и др. 1993. Оценка качества воды оз. Байкал по санитарно-бактериологическим показателям. *География и природные ресурсы* 1: 60-64.
- Дрюккер В.В., Масленников А.А. 1998. Микробиологический мониторинг притоков оз. Байкал. Междуна-

родн. Симпозиум: Контроль и реабилитация окружающей среды: 88.

Дрюккер В.В., Панасюк Е.Ю. 2002. Потенциально-патогенные бактерии – индикаторы качества вод Байкала. Оценка современного состояния микробиологических исследований в Вост.- Сиб. регионе: 140.

Дрюккер В.В., Штыкова Ю.Р., Суслова М.Ю. и др. 2022. Микробиологический мониторинг. В: Тахтеев В.В. (ред.), *Экологический мониторинг озера Байкал*. Иркутск: Изд-во ИГУ: 32-49.

Егорова А.А., Дерюгина З.П., Кузнецов С.И. 1952. Характеристика сапрофитной микрофлоры воды ряда озер различной степени трофии. *Тр. Ин-та микробиологии* 2:118-127.

Земская Т.И., Намсараев Б.Б., Парфенова В.В. и др. 1997. Микроорганизмы донных осадков оз. Байкал и экологические условия среды. *Экология* 1: 40-44.

Кравченко О.С. 2009. Бактерии рода *Enterococcus* в озере Байкал: распределение, видовой состав, механизм адаптации. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Улан-Удэ, Россия.

Крисс А.Е., Чеботарев Е.И. 1970. Вертикальное распределение гетеротрофных бактерий в открытых глубоководных районах озера Байкал. *Микробиология* 39(1): 146-148.

Кузнецов С.И. 1951. Сравнительная характеристика биомассы бактерий и фитопланктона в поверхностном слое воды Среднего Байкала. *Тр. Байкал. Лимнол. ст. АН СССР* 13: 217-225.

Кузнецов С.И. 1957. Микробиологическая характеристика вод и грунтов Байкала. *Тр. Байкальск. Лимнолог. ст. АН СССР* 15: 388-396.

Максимова Э.А., Максимов В.Н. 1989. Микробиология вод Байкала. Иркутск: Изд-во ИГУ.

Мессинева М.А. 1957. Биогеохимические исследования глубоководных осадков Байкала. *Тр. Байкальск. Лимнол. Ст. АН СССР* 15: 199-211.

МУК 4.2.1884-04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. Методические указания.

Намсараев Б.Б., Дулов Л.Е., Земская Т.И. и др. 1995. Антропогенная активация бактериальной деятельности в донных осадках озера Байкал. *Микробиология*. 64(4): 548-552.

Нечаева Н.Б., Салимовская-Родина А.Г. 1935. Микробиологический анализ донных отложений Байкала. *Тр. Байкал, лимнол. Ст. АН СССР* (6): 5-14.

Панасюк Е.Ю., Дрюккер В.В. 2002. Доминирующие виды потенциально-патогенных бактерий, выделенные из воды озера Байкал. В: Оценка современного состояния микробиологических исследований в Вост.- Сиб. регионе: 64.

Подлесная Г.В., Галачянц А.Д., Штыкова Ю.Р. и др. 2022. Санитарно-микробиологическая оценка качества вод залива Ливеннический в период экстремальной водности озера Байкал. *География и природные ресурсы* 43(5): 163-169. DOI: [10.15372/GIPR20220517](https://doi.org/10.15372/GIPR20220517)

Родина А.Г. 1954. Бактерии в продуктивности каменистой литорали озера Байкал. В: *Проблемы гидробиологии внутренних вод*. Л.: Изд-во АН СССР:172-201.

Романова А.П. 1958. Сезонная динамика бактериопланктона, его горизонтальное и вертикальное распределение в южной части Байкала. *Изв. СО АН СССР* 7: 28-35.

СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. М.: Минздрав России.

Суслова М.Ю., Пестунова О.С., Парфенова В.В. 2017. Оценка качества вод р. Селенги и ее дельты по санитар-

но-микробиологическим показателям. Гидробиол. журнал 53(1): 74-84. DOI: [10.1615/HydrobJ.v53.i3.70](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v53.i3.70)

Тихонова И.В. 2006. Морфологические и генетические особенности пикопланктонных цианобактерий озера Байкал. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Иркутск, Россия.

Штыкова Ю.Р., Гладких А.С., Миронова Л.В. и др. 2018a. Maldi-tof-ms анализ в ускоренной идентификации условно-патогенных бактерий в различных экотопах прибрежной зоны озера Байкал. В: Международная конференция «Пресноводные экосистемы – современные вызовы», стр. 314.

Штыкова Ю.Р., Дрюккер В.В., Сороковикова Е.Г. и др. 2018b. Санитарно-микробиологический и токсикологический мониторинг озера Байкал. часть 1: Акватория Малого моря в 2016 г. Системы контроля окружающей среды 11(31): 110-114. DOI: [10.33075/2220-5861-2018-1-110-114](https://doi.org/10.33075/2220-5861-2018-1-110-114)

Штыкова Ю.Р., Суслова М.Ю., Косторнова Т.Я. и др. 2016. Мониторинг санитарно-микробиологического состояния пелагиали озера Байкал и устьев впадающих в него крупных рек с 2010 по 2015 г. Изв. Иркут. гос. ун-та 17: 71-62.

Щетинина Е.В., Максимов В.В., Крайковская О.В. и др. 2013. Оценка состояния водных масс южного Байкала

в районе влияния БЦБК по многолетним микробиологическим показателям. Водные ресурсы 40(6): 649-656. DOI: [10.7868/S0321059613060114](https://doi.org/10.7868/S0321059613060114)

Яснитский В.А., Бланков Б.Н., Гортиков В.И. 1927. Отчет о работе Байкальской лимнологической станции. Известия Биол.-геогр. Института при ИГУ 3(3): 47-54.

Drucker V.V., Panasyuk E.Yu. 2006. Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal. Hydrobiologia 568(1): 267-271.

Potapov S., Gorshkova A., Krasnopeev A. et al. 2023. RNA-Seq Virus Fraction in Lake Baikal and Treated Wastewaters. International Journal of Molecular Sciences 24: 1-26. DOI: [10.3390/ijms241512049](https://doi.org/10.3390/ijms241512049)

Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Podlesnaya G.V. et al. 2020. Antibiotic-resistant opportunistic bacteria in the coastal zone of Lake Baikal. Limnology and Freshwater Biology. 4: 1026-1027. DOI: [10.31951/2658-3518-2020-A-4-1026](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-4-1026)

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. 2016. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? J. Great Lakes Res. 42(3): 487-497. DOI: [10.1016/j.jglr.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.011)

Changes in valve morphogenesis of *Aulacoseira islandica* by γ -tubulin inhibitor gatastatin

Bedoshvili Ye.D.*, Bayramova E.M., Zakharova Yu.R.

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

ABSTRACT. Diatom valve morphogenesis occurs under the control of microtubules. It is known that γ -tubulin is an important component of the microtubule center, which controls the polymerization of microtubules and provides their nucleation in the cell. In this work, using *Aulacoseira islandica* as an example, α -tubulin was visualized during valve formation after cytokinesis and during interphase. It was shown that inhibition of γ -tubulin in *A. islandica* cells causes the formation of valves with an abnormal structure and an increased number of death cells in culture at gatastatin concentrations of 3 and 10 μ M, with a threefold decrease in the number of dividing cells. The small number of valves formed under the influence of gatastatin suggests that γ -tubulin activity is required both for the nucleation of microtubules in the cell and for the onset of valve morphogenesis. The results obtained clarify the role of the microtubule center in the morphogenesis of diatom valves.

Keywords: cytoskeleton, valve morphogenesis, gatastatin, γ -tubulin

1. Introduction

Diatoms are unicell eukaryotes belonging to the kingdom Chromista (Cavalier-Smith, 2018); the morphology of their silica frustules is widely various (Round et al., 1990). Diatom systematics are based on the frustule structure and phylogeny of marker genes such as 18S rRNA and *rbcL* (Medlin and Kaczmarska, 2004; Theriot et al., 2010). Silica frustules consist of two valves and a ring of several overlapping girdle bands (Pickett-Heaps et al., 1990). Frustule details are synthesized sequentially during the cell cycle; after mitosis, valve morphogenesis occurs and girdle bands are formed throughout interphase.

The efforts of many researchers are aimed at searching for genetic and cell mechanisms providing species specific differences in diatom frustule symmetry and structure. It is known that valve morphogenesis is under cytoskeleton control, and the microtubule role is the most studied (Tesson and Hildebrand, 2010; Bedoshvili and Likhoshway, 2021). The correct functioning of microtubules is based on the dynamic polymerization/depolymerization of α - and β -tubulin (Mitchison and Kirschner, 1984; Caudron et al., 2005). It was shown that treatment of diatom cells with microtubule inhibitors led to various valve anomalies (Oey and Schnepf, 1970; Cohn et al., 1989; Van de Meene and Pickett-Heaps, 2002; Van de Meene

and Pickett-Heaps, 2004; Kharitonenko et al., 2015; Bedoshvili et al., 2018). It was shown that colchicine can stop nucleus division; however, for some species, valve morphogenesis still occurred; thus, under the influence of colchicine, the cells of centric *Cyclotella cryptica* and *Aulacoseira islandica* (Oey and Schnepf, 1970; Bedoshvili et al., 2018) formed “lateral” valves whose morphology was similar to that of normal valves, but their only face surface was adjacent to mature girdle bands. It is supposed that such morphology is possible when microtubules disrupt under the colchicine influence at the mitosis beginning (Bedoshvili et al., 2018). Due to the disruption of karyokinesis and cytokinesis after colchicine treatment, cells with lateral valve formation have a single irregularly shaped nucleus.

The microtubule formation (nucleation) does not occur randomly in the cells; there are specialized nucleation sites, mostly in the Microtubule Organizing Center (MTOC). Diatoms have a specific acentriolar MTOC with atypical features (De Martino et al., 2009). There are variations in the MTOC morphology; however, γ -tubulin underlies all these structures forming large complexes with other proteins (Zheng et al., 1995; Oegema et al., 1999). These complexes do not include α - or β -tubulins, and γ -tubulin is an essential condition for microtubule nucleation. Earlier, it was shown that diatom genomes contain α -, β -, and γ -tubulins (De Martino et al., 2009; Aumeier, 2012;

*Corresponding author.

E-mail address: bedoshvilied@list.ru (Ye.D. Bedoshvili)

Received: November 27, 2023; **Accepted:** December 11, 2023;

Available online: December 13, 2023

Findeisen et al., 2014). More detailed analysis allows to identify structural features of the predicted amino acid sequences of diatom γ -tubulin (Khabudaev et al., 2022), but its significance for silica valve morphogenesis was not shown.

Gatastatin is a recently synthesized anti-cancer drug, which is able to bind with γ -tubulin and block microtubule nucleation without influencing α - and β -tubulin (Hayakawa et al., 2012). The use of gatastatin makes it possible to demonstrate the role of γ -tubulin in the diatom valve morphogenesis. The freshwater diatom *Aulacoseira islandica* turned out to be a convenient model for studying abnormal valve morphology due to its valve with a high mantle and large girdle bands. The main purpose of this study was to study γ -tubulin role in the valve morphogenesis of *Aulacoseira islandica*.

2. Materials and methods

2.1. Cultivation

The *Aulacoseira islandica* Mr553 strain was isolated from a natural population in Lake Baikal and cultivated in the DM medium (Thompson et al., 1988) at 4°C with natural light and a day–night cycle. The procedure of isolation and cultivation were made according to the protocol described earlier (Zakharova et al., 2020).

2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

The frustules were cleaned according to the previously described protocol (Kharitonenko et al., 2015). Suspensions of cleaned frustules were pipetted onto cover glasses, dried, and mounted on SEM stubs with carbon double-sided adhesive tape (SPI Supplies, West Chester, USA). Morphological analysis among the 200 frustules encountered was carried out using a QUANTA 200 scanning electron microscope (FEI Company, Hillsboro, USA).

2.3. Gatastatin treatment

The *Aulacoseira islandica* culture was incubated for 48 hours in the presence of gatastatin at concentrations selected according to literature data and manufacturer's recommendations (10, 3, 0.3, and 0.03 μ M) and in the presence of PDMPO (Thermo Fisher Scientific, USA) to visualize the forming silica frustules. All experiments were carried out in triplicate. At the end of the experiment, the cells were fixed with paraformaldehyde (4% in the culture medium) for 2 hours. After fixation, the cells were washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and mounted on glass slides in Mowiol® 40-88 (Sigma-Aldrich, Germany) for fluorescent and laser scanning microscopy.

Cells forming parts of the frustules (valves immediately after division or girdle bands during interphase) were counted among 100 randomly encountered cells. Cells without internal contents and without chloroplast fluorescence or PDMPO staining were considered dead. Counting was made with an

optical microscope Axiovert 200 equipped with a blue filter for light with a wavelength of 546 nm.

2.4. Immunostaining and laser scanning microscopy (LSM)

To localize α -tubulin, a previously proposed modified protocol was used (Pasternak et al., 2015). Cell cultures were fixed with a 2% paraformaldehyde solution with the addition of 0.1% Triton X-100 in a microtubule stabilizing buffer (MTSB - PIPES 0.1M, EGTA 0.01M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01M, KOH 0.1M, pH 7.0) for 30 min, washed with the same buffer, and permeabilized with a solution of 1% Triton X-100 and 10% DMSO for 20 min at 37 °C. Blocked with 2% BSA solution in MTSB. To localize alpha-tubulin, monoclonal antibodies to the fragment 426-450 a.a. of the chicken α -tubulin were used. Antibodies were conjugated with Alexa488 (Alexa Fluor® 488 Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] (ab195887), Abcam). Cells were incubated with antibodies at a dilution of 1:200 for 2 h at 37°C, after which the cells were washed with buffer, additionally stained with DAPI (10 μ g/ml for 10 min), and mounted on glass using Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, Germany).

The samples were examined using a laser scanning microscope LSM 710 (Zeiss) equipped with a Plan-Apochromat 63 \times /1.40 Oil DIC M27 immersion lens (Zeiss). Chloroplast autofluorescence was excited with a 561 nm laser; emission was registered in the range of 650–723 nm. Alexa488 fluorescence was excited with a 488 nm laser; emission was registered in the range 496–647 nm. DAPI fluorescence was excited with a 405 nm laser; emission was registered in the ranges of 410–492 nm. Three-dimensional reconstructions were obtained from 100 optical sections (z-thickness 15–30 μ m). PDMPO fluorescence was excited by a laser with a wavelength of 405 nm, and emission was recorded in the range of 441–587 nm. The 3D reconstruction was obtained from 100 optical sections (z-thickness 15–70 μ m).

3. Results

Figure 1 shows electron microscopy of the frustules of *Aulacoseira islandica* strain 3Mr553. The strain studied was characterized by the formation of valves of different lengths in sister cells (Fig. 1A). All control valves have spatulate connecting spines and ordered rows of areoles (Fig. 1B). The girdle bands covering the valves from the beginning of formation until the next division are sometimes so densely packed on the valves that they remain there even after harsh multi-stage chemical treatment (Fig. 1C).

In the cells of the studied strain, α -tubulin was localized in interphase and at the early stage of valve formation (Fig. 2). Interphase cells are characterized by a star-shaped distribution of microtubules; large bundles of microtubules are irradiated from a center that is in close connection with the nucleus and indicate indirectly the location of the microtubule center (Fig.

2A). Microtubule strands are localized in *A. islandica* in a thin layer of cytoplasm, and often a single optical layer is sufficient to visualize them. During the early stages of valve morphogenesis, the microtubule packing was not dense enough to be visible in transmitted light, so large strands of microtubules were not observed (Fig. 2B).

3D-reconstructions of the valves and girdle bands of *Aulacoseira islandica* formed during the experiment and stained with PDMPO are presented in Figure 3. During the experiment, the cells that formed the girdle bands were able to synthesize from one to three of them. Abnormal morphology was observed among valves formed in the presence of gatastatin. Figure 3 shows the main anomalies encountered among them: anomalies of connecting spines (or their absence) and, in rare cases, disruption of striation (disordered areolae).

The studied strain was characterized by the presence of at least 30% dead cells in the culture (Fig. 4). Most cells formed actively both valves and girdle bands. At all gatastatin concentrations, the number of dead cells was higher than in the control. The number of colored valves was lowest at gatastatin concentrations of 3 and 10 μM , while at gatastatin concentrations from 0.03 to 3 μM , the number of girdle bands remained approximately the same, but less than in the control.

For *A. islandica*, it was shown that the number of forming valves and girdle bands decreased with an increase in gatastatin concentration in the medium. At gatastatin concentrations of 0.3 and 0.03 μM , the number of formed valves and girdle bands was comparable to control samples (Fig. 4). At concentrations of 3 and 10 μM , all found staining valves had changes in morphology.

4. Discussion

Earlier, it was shown that diatom γ -tubulin is present in their microtubule center (*Craticula cuspidata* – Aumeier, 2012). However, even in the large cells of some diatom species, visualization of γ -tubulin is hampered by its small size. Of all the diatom tubulins, γ -tubulin was the least conserved (Khabudaev et al., 2022), therefore poorly visualized by antibodies to γ -tubulin in other organisms. Despite the fact that the main part of the microtubule center is γ -tubulin and proteins of the γ -tubulin complex, the localization of α -tubulin allows indirect detecting of the microtubule center localization in the cells of *Aulacoseira islandica* and to show the microtubule polymerization degree. It was shown that microtubule bundles that were described earlier for large cells of *Coscinodiscus granii* (Tesson and Hildebrand, 2010) localized not so much during valve morphogenesis as in the interphase cell, when the valve was already formed. It is likely that such a difference is due to the small volume of cytoplasm in *A. islandica* cells compared to the previously studied *C. granii*.

Tubulins are highly conserved proteins, and the diatom α -tubulin sequence fragment (426-450 a.a.) is identical to the homologous sequence of chicken

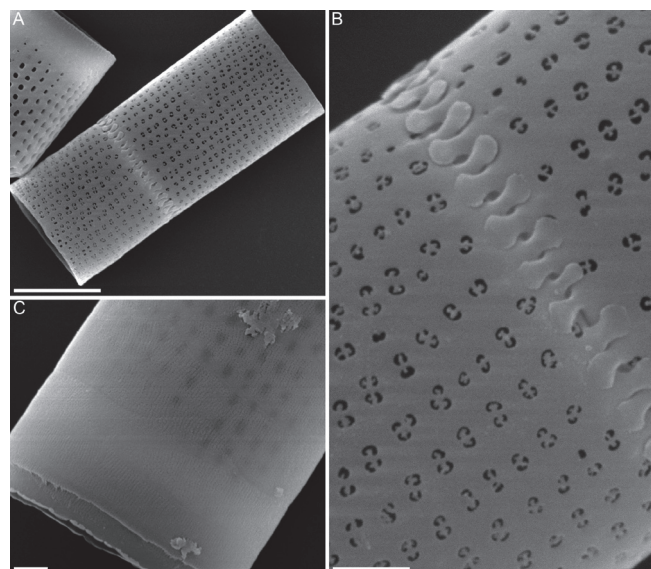


Fig.1. Fine structure of valves and girdle bands of *Aulacoseira islandica* strain 3Mr553 (SEM). Scale: A – 5 μm ; B, C – 1 μm .

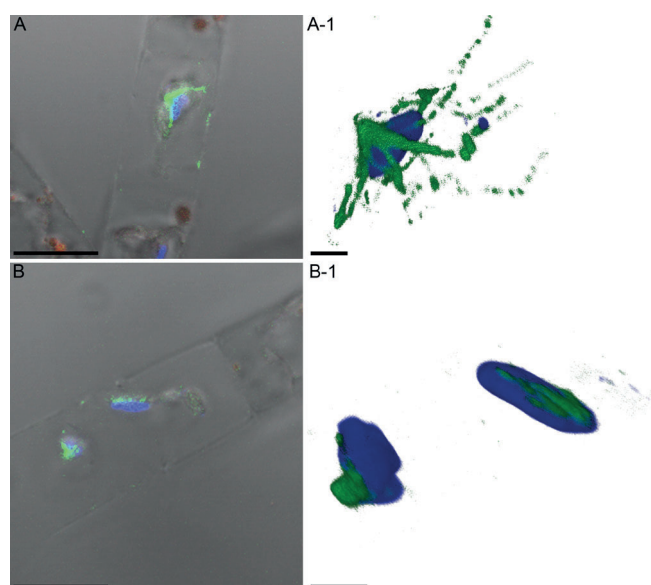


Fig.2. Visualization of α -tubulin at the early stage of valve formation and in interphase in one optical section (A, B) and 3D-reconstructions (A-1, B-1) in the cells of *A. islandica* (LSM). Green – fluorescence of Alexa-488 after staining of α -tubulin, blue – fluorescence of DAPI, red – autofluorescence of chlorophyll. Scale bar: A, B – 10 μm ; A-1, B-1 – 2 μm .

tubulin, from which the antibodies used were obtained. Thus, although the α -tubulin sequence of *A. islandica* is not available, there is no doubt about the identity of the localized protein (Fig. 2).

The structure of mature valves can be described using electron microscopy; however, different stages of valve morphogenesis remain mostly inaccessible because forming valves are closed by girdle bands during the cell cycle for research unless the cells are treated with harsh reagents to remove organic matter. Due to the short exposure time of gatastatin (48 hours), most of the valves formed under its influence remain hidden for examination using SEM. The use of intravital fluorescent dyes and laser scanning microscopy enables

to observe the developing valves as 3D-reconstructions. This method allows to determine accurately the valves formed specifically in the current experiment.

Previously it was shown that under the influence of colchicine cells of *A. islandica* formed valves with the only center of symmetry, which was the cause of the failed cytokinesis. In this case, the valve morphogenesis occurs and new forming valve is positioned like a giant girdle band (Bedoshvili et al., 2018). Colchicine did not cause high cell mortality at the high concentration of 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$, unlike gatastatin. The results of the study show that the effect of gatastatin caused not so much the formation of abnormal valves but rather a stop in cell division, accompanied by an arrest of the valve morphogenesis. Furthermore, under the influence of gatastatin, lateral valve morphogenesis did not occur indicating that valve formation in *A. islandica* was impossible without the participation of the microtubule center.

It is known that gatastatin is able to bind not only to γ -tubulin, but also to α - and β -tubulin, although, the dissociation constant with the latter is more than ten times higher (Chinen et al., 2015). It is obvious that anomalies in the structure of the valves are precisely associated with the ability of gatastatin to bind to all types of tubulins, and the formation of spines in *A. islandica* occurs throughout the entire morphogenesis of the valve; therefore, they are the most sensitive structure to various aberrations (Bedoshvili et al., 2018).

5. Conclusion

Specific staining enabled to localize α -tubulin in *Aulacoseira islandica* cells during valve morphogenesis and in interphase. The microtubule nucleation center was visualized in close association with the nucleus, which was a characteristic of a microtubule center. Inhibition of γ -tubulin using the specific inhibitor gatastatin showed a decrease in the number of valve-forming cells suggesting that a properly functioning microtubule center was required to initiate valve morphogenesis. Thus, the results obtained suggest that the microtubule center is an important structure not only for cell division, but is also necessary for the onset of valve morphogenesis.

Acknowledgements

This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-24-00080. The microscopy studies were performed at the Electron Microscopy Center of the Shared Research Facilities “Ultramicroanalysis” of Limnological Institute, <https://www.lin.irk.ru/copp/>.

References

Aumeier C. 2012. The cytoskeleton of diatoms structural and genomic analysis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany (Doctoral dissertation)

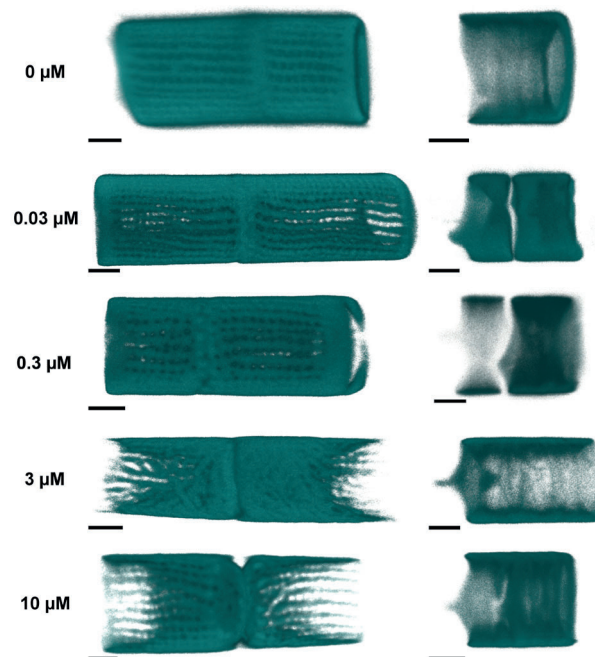


Fig.3. Valves (left) and girdle bands (right) of *A. islandica* formed under the influence of different concentrations of gatastatin (indicated on the left) (LSM, 3D-reconstruction). Scale bar – 2 μm .

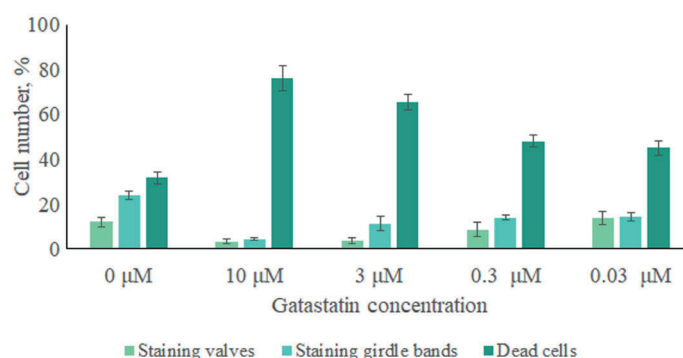


Fig.4. Morphogenesis of valves and girdle bands in the cells of *A. islandica* under the influence of gatastatin.

Bedoshvili Ye.D., Gneusheva K.V., Popova M.S., Avezova T.N., Arsentyev K.Yu., Likhoshway Ye.V. 2018. Frustule morphogenesis of raphid pennate diatom *Encyonema ventricosum* (Agardh) Grunow. *Protoplasma* 255: 911-921 DOI: [10.1007/s00709-017-1199-4](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1199-4)

Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2021. The effects of cytoskeletal inhibitors in diatom valve morphogenesis. In: Annenkov V.V., Seckbach J., Gordon R. (Eds.) *Diatom Morphogenesis*, Beverly, MA, USA, pp. 349-364. DOI: [10.1002/9781119488170.ch14](https://doi.org/10.1002/9781119488170.ch14)

Caudron M., Bunt G., Bastiaens P., Karsenti E. 2005. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* 309(5739): 1373-1376. DOI: [10.1126/science.1115964](https://doi.org/10.1126/science.1115964)

Cavalier-Smith T. 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma* 255(1): 297-357. DOI: [10.1007/s00709-017-1147-3](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3)

Cohn S., Nash J., Pickett-Heaps J. 1989. The effects of drugs on diatom valve morphogenesis. *Protoplasma* 149: 130-143

- De Martino A., Amato A., Bowler C. 2009. Mitosis in diatoms: rediscovering an old model for cell division. *Bioessays* 31(8): 874-84. DOI: [10.1002/bies.200900007](https://doi.org/10.1002/bies.200900007)
- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S. et al. 2014. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biology and Evolution* 6(9): 2274-88. DOI: [10.1093/gbe/evu187](https://doi.org/10.1093/gbe/evu187)
- Hayakawa I., Ikeda A., Chinen T. et al. 2012. Design, synthesis, and biological evaluation of the analogues of glaziovianin A, a potent antitumor isoflavone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(19): 5745-56. DOI: [10.1016/j.bmc.2012.08.005](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.005)
- Khabudaev K.V., Petrova D.P., Bedoshvili Ye.D. et al. 2022. Molecular evolution of tubulins in diatoms. *International Journal of Molecular Sciences* 23(2): 618. DOI: [10.3390/ijms23020618](https://doi.org/10.3390/ijms23020618)
- Kharitonenko K.V., Bedoshvili Ye.D., Likhoshvay Ye.V. 2015. Changes in the micro- and nanostructure of siliceous valves in the diatom *Synedra acus* under the effect of colchicine treatment at different stages of the cell cycle. *Journal of Structural Biology* 190(1): 73-80. DOI: [10.1016/j.jsb.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.12.004)
- Medlin L., Kaczmarska I. 2004. Evolution in diatoms. V. Morphological and cytological support of the major clades and taxonomic revision. *Phycologia* 43: 245-273. DOI: [10.2216/i0031-8884-43-3-245.1](https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1)
- Mitchison T., Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312(5991): 237
- Oegema K., Wiese C., Martin O.C., et al. 1999. Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *Journal of Cell Biology* 144: 721-33. DOI: [10.1083/jcb.144.4.721](https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.721)
- Oey J.L., Schnepf E. 1970. Über die Auslösung der Valvenbildung bei der Diatomee *Cyclotella cryptica*. *Archives of Microbiology* 71: 199-213
- Pasternak T., Tietz O., Rapp K. et al. 2015. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* 11: 50. DOI: [10.1186/s13007-015-0094-2](https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2)
- Pickett-Heaps J., Schmid A.-M., Edgar L. 1990. The cell biology of diatom valve formation. In: Round F.E., Chapman D.J. (Eds) *Progress in phycological research*, Vol. 7. Bristol
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The Diatoms*. Bristol: Cambridge University Press
- Tesson B., Hildebrand M. 2010. Extensive and intimate association of the cytoskeleton with forming silica in diatoms: Control overpatterning on the meso- and micro-scale. *PLoS ONE*, 5: e14300
- Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E. et al. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution* 143(3): 278-296. DOI: [10.5091/plecevo.2010.418](https://doi.org/10.5091/plecevo.2010.418)
- Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2002. Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundström. *Journal of Phycology* 38: 351-363. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x)
- Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2004. Valve morphogenesis in the centric diatom *Rhizosolenia setigera* (Bacillariophyceae, Centrales) and its taxonomic implications. *European Journal of Phycology* 39: 93-104. DOI: [10.1080/09670260310001646522](https://doi.org/10.1080/09670260310001646522)
- Zakharova Yu.R., Bedoshvili Ye.D., Petrova D.P. et al. 2020. Morphological description and molecular phylogeny of two diatom clones from the genus *Ulnaria* (Kützinger) Compère isolated from an ultraoligotrophic lake at the Pole of Cold in the Northern Hemisphere, Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Cryptogamie Algologie* 41(6): 37-45. DOI: [10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6](https://doi.org/10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6)
- Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. et al. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578-83. DOI: [10.1038/378578a0](https://doi.org/10.1038/378578a0)

Изменения в морфогенез створки *Aulacoseira islandica* под влиянием ингибитора γ -тубулина гатастатина

Бедошвили Е.Д.*, Байрамова Э.М., Захарова Ю.Р.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Морфогенез створок диатомовых водорослей происходит под контролем микротрубочек. Известно, что γ -тубулин важный компонент микротрубочкового центра, контролирующего полимеризацию микротрубочек и обеспечивающего их нуклеацию в клетке. В настоящей работе на примере *Aulacoseira islandica* был визуализирован α -тубулин при морфогенезе створки и во время интерфазы. Было показано, что ингибирование γ -тубулина в клетках *A. islandica* приводит к формированию створок с измененной структурой и увеличивает гибель клеток в культуре при концентрации гатастатина 3 и 10 мкМ, при этом количество делящихся клеток уменьшается в три раза. Малое количество створок, сформированных под влиянием гатастатина, позволяет предположить, что активность γ -тубулина требуется как для нуклеации микротрубочек в клетке, так и для начала морфогенеза створки. Полученные результаты способствуют пониманию роли микротрубочкового центра в морфогенезе створок диатомовых водорослей.

Ключевые слова: цитоскелет, морфогенез створки, гатастатин, γ -тубулин

1. Введение

Диатомовые водоросли – одноклеточные эукариоты, принадлежащие к царству Chromista (Cavalier-Smith, 2018); морфология их кремнеземных панцирей очень разнообразна (Round et al., 1990). Систематика диатомей основана на морфологии панцирей и филогении маркерных генов, таких как *18S rRNA* и *rbcL* (Medlin and Kaczmarska, 2004; Theriot et al., 2010). Их кремнеземные панцири состоят из двух створок и системы взаимно перекрывающихся кольцевых поясковых ободков (Pickett-Heaps et al., 1990). Детали панциря синтезируются последовательно в течение клеточного цикла; после митоза происходит морфогенез створки, а поясковые ободки формируются на протяжении интерфазы.

Усилия многих исследователей направлены на поиск генетических и клеточных механизмов, обеспечивающих видовые различия симметрии и строения панцирей диатомей. Известно, что морфогенез створок находится под контролем цитоскелета и роль микротрубочек наиболее изучена (Tesson and Hildebrand, 2010; Bedoshvili and Likhoshvay, 2021). Правильное функционирование микротрубочек основано на динамической полимеризации/деполимеризации α - и β -тубулина (Mitchison and Kirschner, 1984; Caudron et al., 2005). Показано, что обработ-

ка клеток диатомей ингибиторами микротрубочек приводит к различным аномалиям их створок (Oey and Schnepf, 1970; Cohn et al., 1989; Van de Meene and Pickett-Heaps, 2002; Van de Meene and Pickett-Heaps, 2004; Kharitonenko et al., 2015; Bedoshvili et al., 2018). Колхицин способен остановить деление клетки, однако, для некоторых видов было показано, что морфогенез створки все равно происходит. Так под влиянием колхицина клетки центрических диатомей *Cyclotella cryptica* и *Aulacoseira islandica* (Oey and Schnepf, 1970; Bedoshvili et al., 2018) формируют «латеральные» створки, морфология которых сходна с нормальной, однако их лицевая часть прижата к зрелым поясковым ободкам. Предполагалось, что такая морфология становится возможной при нарушении работы микротрубочек под влиянием колхицина в начале митоза (Bedoshvili et al., 2018). После обработки колхицином в клетках происходят нарушения в кариокинезе и цитокинезе, что приводит к формированию латеральной створки в клетке с единственным ядром неправильной формы.

Формирование микротрубочек (и их нуклеация) происходят в клетке не случайным образом, а под контролем специализированного сайта в клетке – микротрубочкового организующего центра (МТОЦ). Диатомовые водоросли имеют специфический ацентриольный МТОЦ с атипичными осо-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: bedoshvilied@list.ru (Е.Д. Бедошвили)

Поступила: 27 ноября 2023; Принята: 11 декабря 2023;
Опубликована online: 13 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



бенностями (De Martino et al., 2009). Морфология МТОЦ может быть разнообразной, однако, в основе его структуры лежит γ -тубулин, формирующий крупные комплексы с другими белками (Zheng et al., 1995; Oegema et al., 1999). Эти комплексы не включают в себя α - и β -тубулин, а присутствие в них γ -тубулина является обязательным условием для нуклеации микротрубочек. Ранее было показано, что геном диатомей содержит гены α -, β - и γ -тубулинов (De Martino et al., 2009; Aumeier, 2012; Findeisen et al., 2014). Более детальный анализ позволил идентифицировать структурные особенности предсказанных аминокислотных последовательностей γ -тубулина диатомовых водорослей (Khabudaev et al., 2022), но его значение для морфогенеза кремнеземных створок не было показано.

Гатастатин – недавно синтезированный антиопухолевый препарат, способный связываться с γ -тубулином и блокировать нуклеацию микротрубочек, не оказывая существенного влияния на α - и β -тубулин (Nayakawa et al., 2012). Использование гатастатина позволяет показать роль γ -тубулина в морфогенезе створки диатомовых водорослей. Пресноводная диатомея *Aulacoseira islandica* оказалась удобной моделью для исследования нарушений морфологии створок благодаря высокому загибу створки и крупным поясковым ободкам. Основной целью настоящей работы было исследование роли γ -тубулина в морфогенезе створки *A. islandica*.

2. Материалы и методы

2.1. Культивирование

Штамм *Aulacoseira islandica* Mr553 был выделен из природной популяции оз. Байкал и культивировался в среде DM (Thompson et al., 1988) при 4°C, естественном освещении и циклами день-ночь. Процедуру выделения и культивирования проводили согласно опубликованной ранее методике (Zakharova et al., 2020).

2.2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Панцири обрабатывали согласно протоколу, описанному ранее (Kharitonenko et al., 2015). Суспензию очищенных панцирей наносили на кровное стекло, высушивали и размещали на столике для СЭМ с помощью двустороннего углеродного скотча (SPI Supplies, West Chester, USA). Анализ морфологии проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа QUANTA 200 (FEI Company, Hillsboro, USA).

2.3. Обработка гатастатином

Культуру *A. islandica* инкубировали в присутствии гатастатина в течение 48 часов. Концентрации гатастатина выбирали согласно опубликованным данным литературы и рекомендациям

производителя (10, 3, 0.3 и 0.03 мкМ). Клетки инкубировали в присутствии PDMPO (Thermo Fisher Scientific, USA) для визуализации формирующихся кремнеземных панцирей. Все эксперименты проводили в трех повторностях. По окончании эксперимента клетки фиксировали параформальдегидом (конечная концентрация в среде – 4 %) в течение 2 часов, после этого отмывали фосфатным буфером (0,1 M, pH 7) и монтировали на предметном стекле в среде Mowiol® 40-88 (Sigma-Aldrich, Germany) для флуоресцентной и лазерной сканирующей микроскопии.

Клетки, формирующие детали панциря (створки сразу после деления или поясковые ободки в течение интерфазы) считали среди 100 случайно встреченных клеток. Клетки без внутреннего содержимого и флуоресценции хлоропластов или PDMPO считали в качестве погибших. Подсчет проводили на оптическом микроскопе Axiovert 200, оснащенный синим фильтром для света с длиной волны 546 нм.

2.4. Иммуноокрашивание и сканирующая лазерная микроскопия (ЛСМ)

Для локализации α -тубулина использовали протокол, предложенный ранее, с модификациями (Pasternak et al., 2015). Клетки в культуре фиксировали 2 % раствором параформальдегида с добавлением 0,1% Triton X-100 в буфере, стабилизирующем микротрубочки (МТСБ – PIPES 0,1M, EGTA 0,01M, MgSO₄·7H₂O 0,01M, КОН 0,1M, pH 7) в течение 20 мин, отмывали тем же буфером и пермеабилizировали в растворе 1% Triton X-100 и 10% DMSO в течение 20 мин при 37 °C. Блокирование проводили в 2% растворе БСА на МТСБ. Для локализации α -тубулина использовали моноклональные антитела к фрагменту α -тубулина цыпленка 426-450 а.о., конъюгированные с Alexa488 (Alexa Fluor® 488 Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] (ab195887), Abcam). Клетки инкубировали с антителами в разведении 1:200 в течение 2 ч при 37°C, после чего отмывали буфером, дополнительно окрашивали DAPI (10 мкг/мл в течение 10 мин) и монтировали на предметные стекла в среде Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, Germany).

Препараты исследовали на лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Zeiss) с иммерсионным объективом Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC M27 (Zeiss). Автофлуоресценцию хлоропластов возбуждали лазером с длиной волны 561 нм; эмиссию регистрировали в диапазоне 650-723 нм. Флуоресценцию Alexa488 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм; эмиссию регистрировали в диапазоне 496-647 нм. Флуоресценцию DAPI возбуждали лазером с длиной волны 405 нм; эмиссию регистрировали в диапазоне 410-492 нм. Трехмерные реконструкции были получены из 100 оптических срезов (толщина по оси z 15-30 мкм). Флуоресценцию PDMPO возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, эмиссию ре-

гистрировали в диапазоне 441-587 нм. Трехмерные реконструкции были получены из 100 оптических срезов (толщина по оси z 15-70 мкм).

3. Результаты

На Рисунке 1 представлена электронная микроскопия панцирей штамма *A. islandica* 3Mr553. Для исследованного штамма характерно формирование створок с разной высотой загиба у сестринских клеток (Рис. 1А). Все створки имели лопастевидные соединительные шипы и упорядоченные ряды ареол (Рис. 1Б). Поясковые ободки покрывающие створки от начала формирования до следующего деления в некоторых случаях были упакованы настолько плотно, что оставались на створках даже после многостадийной химической (Рис. 1В).

В клетках исследованного штамма α -тубулин был локализован в интерфазе и на ранней стадии формирования створки (Рис. 2). Для клеток в интерфазе было характерно звездообразное распределение микротрубочек, их крупные пучки расходились от центра, прижатого к ядру, и косвенно указывали на расположение микротрубочкового центра (Рис. 2А). Тяжи микротрубочек у *A. islandica* локализовались в тонком слое цитоплазмы и часто для их визуализации было достаточно одного оптического слоя. На ранних стадиях морфогенеза створки упаковка микротрубочек не была настолько плотной, чтобы быть видимой, и крупные тяжи микротрубочек не были обнаружены (Рис. 2Б).

Трехмерные реконструкции створок и поясковых ободков *A. islandica*, сформированных во время эксперимента и окрашенных PDMPO, представлены на Рисунке 3. За время эксперимента клетки были способны синтезировать от одного до трех поясковых ободков. Среди створок, сформированных в присутствии гатастатина, наблюдались нарушения морфологии. На Рисунке 3 представлены основные зарегистрированные аномалии строения: изменения в строении соединительных шипов (или их отсутствие) и в редких случаях нарушение стрииции (неупорядоченные ряды ареол).

Для исследованного штамма было характерно присутствие в культуре не менее 30 % погибших клеток (Рис. 4). Большинство клеток активно формировали створки и поясковые ободки. При всех концентрациях гатастатина количество мертвых клеток было выше, чем в контроле. Наиболее низким было количество сформированных створок при концентрациях гатастатина 3 и 10 мкМ, тогда как при концентрации от 0,03 до 3 мкМ количество поясковых ободков оставалось ниже, чем в контроле, но было почти одинаковым (Рис. 4). При концентрациях 3 и 10 мкМ, все сформированные створки имели изменения в морфологии.

4. Обсуждение

Ранее было показано, что γ -тубулин у диатомей представлен в их микротрубочковом центре (*Craticula cuspidata* – Aumeier, 2012). Однако даже

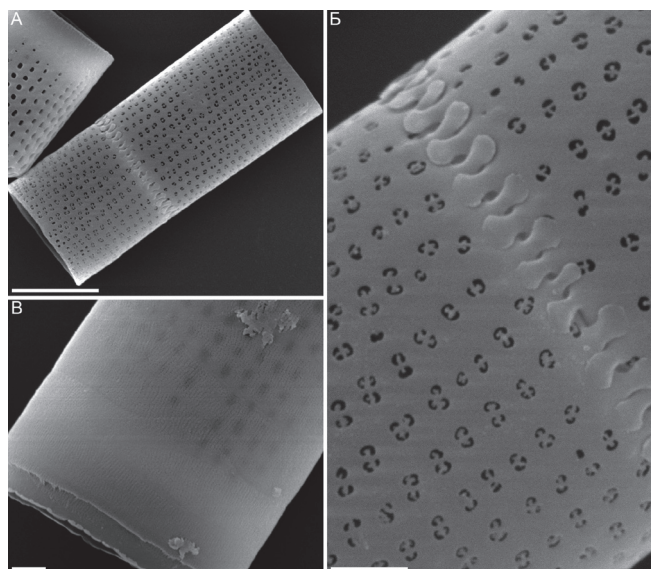


Рис.1. Тонкая структура створок и поясковых ободков *A. islandica* штамм 3Mr553 (СЭМ). Масштаб: А – 5 мкм; Б, В – 1 мкм.

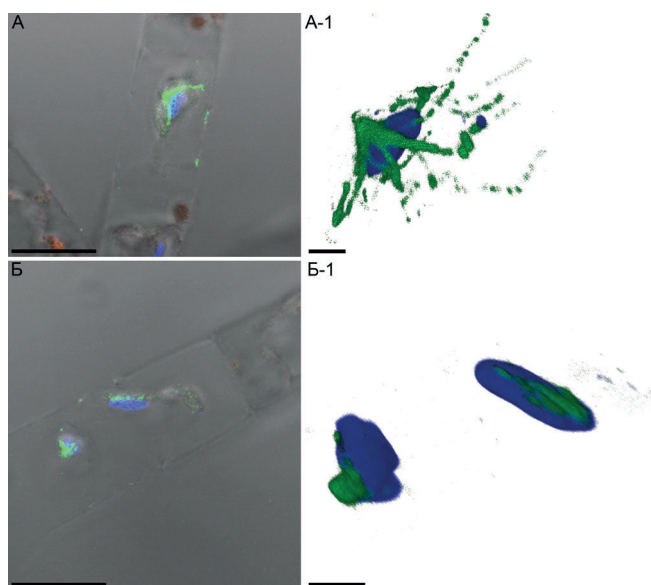


Рис.2. Визуализация α -тубулина на ранней стадии формирования створки и в интерфазе на оптических срезах (А, Б) и трехмерных реконструкциях (А-1, Б-1) в клетках *A. islandica* (ЛСМ). Зеленый – флуоресценция Alexa-488 после окрашивания α -тубулина, синий – флуоресценция DAPI, красный – автофлуоресценция хлорофилла. Масштаб: А, Б – 10 мкм; А-1, Б-1 – 2 мкм.

в крупных клетках некоторых диатомей визуализация γ -тубулина затруднена небольшими размерами микротрубочкового центра. Из всех тубулинов диатомовых водорослей γ -тубулин наименее консервативен (Khabudaev et al., 2022), по этой причине его сложно визуализировать с помощью антител к γ -тубулину других организмов. Несмотря на то, что главная часть МТОЦ представлена γ -тубулином и белками комплекса γ -тубулина, локализация α -тубулина позволяет косвенно определить расположение МТОЦ в клетках *A. islandica* и показать степень полимеризации микротрубочек. Для крупных клеток диатомовых водорослей, в том числе для *Coscinodiscus granii* (Tesson and Hildebrand, 2010), тяжи микротрубочек были описаны ранее для кле-

ток, проходящих морфогенез створки, а не для находящихся в интерфазе. Вероятно, это отличие обусловлено небольшим объемом цитоплазмы клеток *A. islandica* в сравнении с *C. granii*.

Как уже упоминалось, тубулины высоко консервативные белки, и фрагмент последовательности α -тубулина (426-450 а.о.) идентичен гомологичной последовательности α -тубулина цыпленка, к которому были получены антитела (Khabudaev et al., 2022). Таким образом несмотря на то, что последовательность α -тубулина *A. islandica* получена не была, нет сомнений в идентификации локализованного белка (Рис. 2).

Электронная микроскопия позволяет описать структуру зрелых створок, однако, различные стадии морфогенеза створки остаются в основном недоступными для исследования, даже несмотря на очистку панцирей от органического вещества, так как формирующиеся створки закрыты поясковыми ободками на протяжении морфогенеза и всего клеточного цикла. Из-за краткого времени экспозиции с гатастатином (48 ч) большинство створок сформированных под его влиянием остаются скрытыми для исследования с помощью СЭМ. Использование прижизненных красителей и лазерной сканирующей микроскопии позволяет наблюдать развивающиеся створки в виде трехмерной реконструкции. Этот метод сделал возможным точно определить створки, формирующиеся именно в текущем эксперименте.

Ранее было показано, что под влиянием колхицина клетки *A. islandica* формируют створки с единственным центром симметрии в результате нарушенного цитокинеза. В этом случае происходит морфогенез створки, которая располагается как гигантский поясковый ободок (Bedoshvili et al., 2018). Колхицин не вызывал высокую смертность в культуре при высоких концентрациях (20 и 40 мкг/мл) в отличие от гатастатина. Результаты настоящего исследования показали, что эффект гатастатина является причиной не столько формирования створок с аномальной морфологией, сколько останавливает деление, при этом блокируя морфогенез створки. Также под действием гатастатина не происходит формирование латеральных створок, что может указывать на невозможность морфогенеза створки без участия микротрубочкового центра у *A. islandica*.

Известно, что гатастатин способен связываться не только с γ -тубулином, но также с α - и β -тубулином, однако, константа диссоциации с последними выше более, чем в 10 раз (Chinen et al., 2015). Вероятно, аномалии морфологии створок связаны главным образом с этим, а так как формирование соединительных шипов у *A. islandica* происходит на протяжении всего морфогенеза (Bedoshvili et al., 2018), то эти структуры являются наиболее чувствительными к различным воздействиям.

5. Заключение

Специфическое окрашивание позволило локализовать α -тубулин в клетках *A. islandica* в время морфогенеза створки и в интерфазе. Центр нукле-

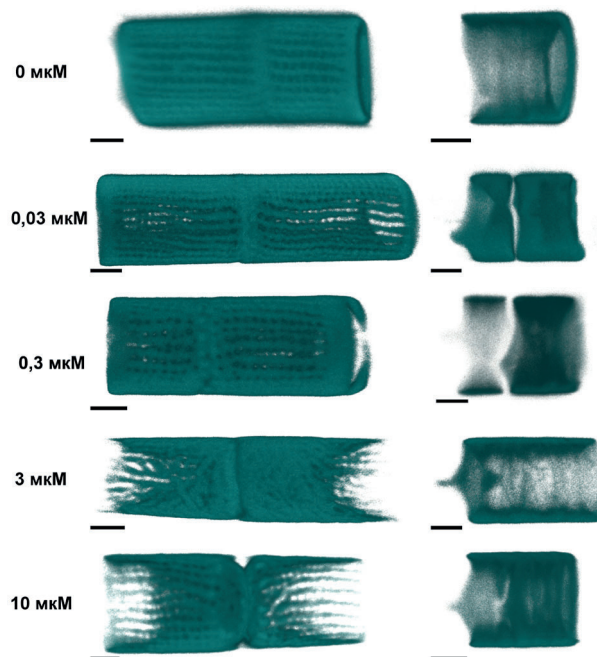


Рис.3. Створки (слева) и поясковые ободки (справа) *A. islandica*, сформированные под влиянием гатастатина в разных концентрациях (указаны слева) (ЛСМ, трехмерная реконструкция). Масштаб – 2 мкм.

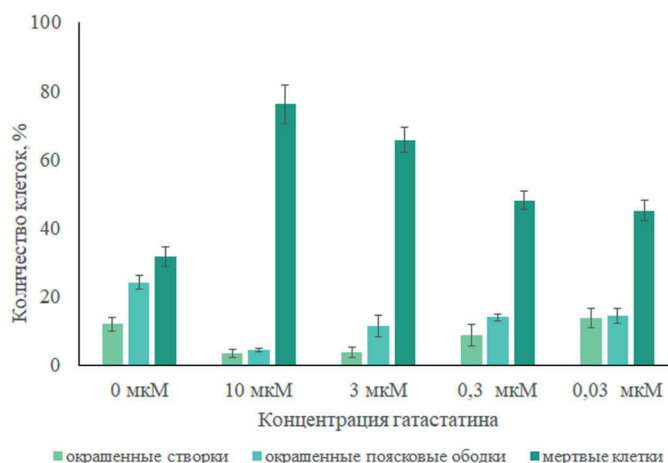


Рис.4. Морфогенез створок и поясковых ободков *A. islandica* под влиянием гатастатина.

ации микротрубочек был визуализирован рядом с ядром. Ингибирование γ -тубулина с помощью гатастатина вызывало снижение количества клеток, формирующих створки, что предполагает необходимость функционирующего микротрубочкового центра для начала морфогенеза. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что микротрубочковый центр важная структура не только в клеточном делении, но и для инициации морфогенеза створки.

Благодарности

Исследование было поддержано Российским научным фондом, проект № 22-24-00080. Микроскопия проводилась в центре коллективного пользования «Ультрамикроанализ» ЛИН СО РАН, <https://www.lin.irk.ru/copp/>.

Список литературы

- Aumeier C. 2012. The cytoskeleton of diatoms structural and genomic analysis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany (Doctoral dissertation)
- Bedoshvili Ye.D., Gneusheva K.V., Popova M.S. et al. 2018. Frustule morphogenesis of raphid pennate diatom *Encyonema ventricosum* (Agardh) Grunow. *Protoplasma* 255: 911-921 DOI: [10.1007/s00709-017-1199-4](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1199-4)
- Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2021. The effects of cytoskeletal inhibitors in diatom valve morphogenesis. In: Annenkov V.V., Seckbach J., Gordon R. (Eds.) *Diatom Morphogenesis*, Beverly, MA, USA, pp. 349-364. DOI: [10.1002/9781119488170.ch14](https://doi.org/10.1002/9781119488170.ch14)
- Caudron M., Bunt G., Bastiaens P. et al. 2005. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* 309(5739): 1373-1376. DOI: [10.1126/science.1115964](https://doi.org/10.1126/science.1115964)
- Cavalier-Smith T. 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma* 255(1): 297-357. DOI: [10.1007/s00709-017-1147-3](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3)
- Cohn S., Nash J., Pickett-Heaps J. 1989. The effects of drugs on diatom valve morphogenesis. *Protoplasma* 149: 130-143
- De Martino A., Amato A., Bowler C. 2009. Mitosis in diatoms: rediscovering an old model for cell division. *Bioessays* 31(8): 874-884. DOI: [10.1002/bies.200900007](https://doi.org/10.1002/bies.200900007)
- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S. et al. 2014. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biology and Evolution* 6(9): 2274-88. DOI: [10.1093/gbe/evu187](https://doi.org/10.1093/gbe/evu187)
- Hayakawa I., Ikeda A., Chinen T. et al. 2012. Design, synthesis, and biological evaluation of the analogues of glaziovianin A, a potent antitumor isoflavone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(19): 5745-56. DOI: [10.1016/j.bmc.2012.08.005](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.005)
- Khabudaev K.V., Petrova D.P., Bedoshvili Ye.D. et al. 2022. Molecular evolution of tubulins in diatoms. *International Journal of Molecular Sciences* 23(2): 618. DOI: [10.3390/ijms23020618](https://doi.org/10.3390/ijms23020618)
- Kharitonenko K.V., Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2015. Changes in the micro- and nanostructure of siliceous valves in the diatom *Synedra acus* under the effect of colchicine treatment at different stages of the cell cycle. *Journal of Structural Biology* 190(1): 73-80. DOI: [10.1016/j.jsb.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.12.004)
- Medlin L., Kaczmarska I. 2004. Evolution in diatoms. V. Morphological and cytological support of the major clades and taxonomic revision. *Phycologia* 43: 245-273. DOI: [10.2216/i0031-8884-43-3-245.1](https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1)
- Mitchison T., Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312(5991): 237
- Oegema K., Wiese C., Martin O.C. et al. 1999. Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *Journal of Cell Biology* 144: 721-33. DOI: [10.1083/jcb.144.4.721](https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.721)
- Oey J.L., Schnepf E. 1970. Über die Auslösung der Valvenbildung bei der Diatomee *Cyclotella cryptica*. *Archives of Microbiology* 71: 199-213
- Pasternak T., Tietz O., Rapp K. et al. 2015. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* 11: 50. DOI: [10.1186/s13007-015-0094-2](https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2)
- Pickett-Heaps J., Schmid A.-M., Edgar L. 1990. The cell biology of diatom valve formation. In: Round F.E., Chapman D.J. (Eds) *Progress in phycological research*, Vol. 7. Bristol
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The Diatoms*. Bristol: Cambridge University Press
- Tesson B., Hildebrand M. 2010. Extensive and intimate association of the cytoskeleton with forming silica in diatoms: Control overpatterning on the meso- and micro-scale. *PLoS ONE*, 5: e14300
- Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E. et al. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution* 143(3): 278-296. DOI: [10.5091/plecevo.2010.418](https://doi.org/10.5091/plecevo.2010.418)
- Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2002. Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundström. *Journal of Phycology* 38: 351-363. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x)
- Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2004. Valve morphogenesis in the centric diatom *Rhizosolenia setigera* (Bacillariophyceae, Centrales) and its taxonomic implications. *European Journal of Phycology* 39: 93-104. DOI: [10.1080/09670260310001646522](https://doi.org/10.1080/09670260310001646522)
- Zakharova Yu.R., Bedoshvili Ye.D., Petrova D.P. et al. 2020. Morphological description and molecular phylogeny of two diatom clones from the genus *Ulnaria* (Kützinger) Compère isolated from an ultraoligotrophic lake at the Pole of Cold in the Northern Hemisphere, Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Cryptogamie Algologie* 41(6): 37-45. DOI: [10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6](https://doi.org/10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6)
- Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. et al. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578-83. DOI: [10.1038/378578a0](https://doi.org/10.1038/378578a0)

Structural and functional features of the olfactory epithelium in fish

Klimenkov I.V.*, Pyatov S.K., Sudakov N.P.

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

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY
www.limnolfwbiol.com

ABSTRACT. Structural and functional peculiarities of the peripheral part of the olfactory analyzer in fish are considered. The article is devoted to the characteristics of the main types of receptor cells: their morphology, the peculiarities of their location in the olfactory epithelium, and functional specificity. Some data on the threshold values of fish chemosensitivity to chemical agents, which have an important signaling value for them are presented.

Keywords: olfactory cell, behavior, neurogenesis, chemoreception

1. Introduction

Currently, one of the most urgent problems in neuroscience is the study of the fundamental mechanisms of adaptive functioning of the olfactory analyzer in animals and humans (Smith and Bhatnagar, 2019; Dan et al., 2021; Zhu et al., 2021). First of all, these questions concern deciphering the mechanisms providing chemoreception processes at the level of the peripheral part of the olfactory system. Attempts to identify correlations between the structure of receptor neurons, their sensitivity, and the implementation of specific forms of animal behavior have not yet yielded unambiguous results. In this regard, one of the important problems is the search for morpho-functional criteria for the sensitivity levels of receptor cells in animals at different stages of their evolutionary development. In particular, this concerns the adaptive behavior of fish, which in the course of evolution have mastered various water horizons and are characterized by the high plasticity of their chemosensory apparatus (Korsching, 2020; Calvo-Ochoa et al., 2021). In this regard, one of the key tasks is to study the types of receptor cells, their molecular receptors, and the mechanisms of transduction of chemical signals from the external environment. The data obtained in fish may be important for understanding the structural and functional organization and evolution of the mechanisms that provide olfactory perception.

2. Functional specialization of olfactory receptor cells

Olfaction plays a leading role in the organisation of feeding, reproductive, social, and other complex behaviors in fish (Kasumyan, 2004; Calvo-Ochoa

and Byrd-Jacobs, 2019; Korsching, 2020; Bowers et al., 2023; Oka, 2023). Similar to other vertebrates, phylogenetically different fish have a sensory section of the olfactory analyzer that is essentially a pseudostratified neuroepithelium consisted of three types of cells: receptor, supporting, and basal. The attribution of the cells to a certain type depends on their location in the thickness of the olfactory epithelium (OE), on morphological features, and on the presence of specific antigenic determinants (markers) (Bronstein, 1977; Graziadei and Graziadei, 1979; Schwob, 2002; Villamayor et al., 2021). The OE of fish was described to contain five types of olfactory sensor neurons (OSNs): ciliated, microvillous, pear-shaped, crypt, and kappe (Ahuja et al., 2014; Yoshihara, 2014; Wakisaka et al., 2017).

Similar to other vertebrates, neurogenesis in the OE of fish is maintained throughout life by the proliferative activity of regional stem cells, which produce various types of cells (Graziadei and Graziadei, 1979; Demirler et al., 2020; Calvo-Ochoa et al., 2021; Kocagöz et al., 2022). Model experiments in fish and other animals show that various forms of sensory deprivation can tangibly increase the natural neurogenesis rate typical of intact animals. It was previously shown that neurogenesis processes in the OE can be activated after intranasal administration of toxic or neurotrophic factors, after axon transection, or as a result of bulbectomy (Graziadei et al., 1978; Carr and Farbman, 1992; Frontera et al., 2016; Cervino et al., 2017). It was found recently in fish that prolonged exposure to a non-toxic mixture of amino acids and peptides leads at first to local neurodegenerative changes in the OE and then to the development of compensatory neurogenesis processes (Klimenkov et al., 2020). Mature OSNs in fish are monospecific

*Corresponding author.

E-mail address: iklimen@mail.ru (I.V. Klimenkov)

Received: November 28, 2023; **Accepted:** December 10, 2023;
Available online: December 13, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



and express only one type of receptors (Sato et al., 2007). The axons of OSNs expressing a given olfactory receptor converge on a few defined glomeruli within the olfactory bulb (OB). This way, a topographical map of olfactory signal processing emerges in the brain (Friedrich and Korsching, 1997; Shao et al., 2017; Imamura et al., 2020).

Different fish species have a representation of several tens to over a thousand functionally active genes coding receptive proteins (Saraiva and Korsching, 2007; Alioto and Ngai, 2006; Calvo-Ochoa et al., 2019; Policarpo et al., 2022). The detection of odorous substances is mediated in fish by a superfamily of receptors associated with G protein (Korsching, 2009; Calvo-Ochoa et al., 2019; Policarpo et al., 2022). There are three types of receptors: olfactory receptors (ORs) (Alioto and Ngai, 2006; Bayramli et al., 2017); trace amine-associated receptors (TAARs) (Michel et al., 2003; Saraiva and Korsching, 2007; Dieris et al., 2021; Dewan, 2021); and vomeronasal receptors (V1R, V2R), which are thought to be able to bind pheromones (Matsunami and Buck, 1997; Pfister and Rodriguez, 2005; Kowatschew and Korsching, 2022; Kowatschew et al., 2022).

The most abundant group of receptor cells is composed of ciliated and microvillous OSNs. These are bipolar neurons whose bodies are located in the thickness of the OE. The cells are spindle-shaped with a transverse diameter of 5–8 μm . The perinuclear zone is a place of localization of granular endoplasmic reticulum channels, the Golgi apparatus, mitochondria, multivesicular bodies, free ribosomal rosettes, and other organelles. The body of the lower part of the cell narrows sharply to form an axon, which, together with other axons of similar cells, forms part of the unmyelinated olfactory nerve connecting receptor cells to the OB of the forebrain. A dendrite extends from the upper pole of the cell body; the diameter of the dendrite is 1–3 μm . The cytoplasm of the dendrite contains usually fragments of smooth endoplasmic reticulum, mitochondria, and microtubules. The apical part of the receptor cells (olfactory knob) can have processes of two types (cilia or microvilli), which have no microtubular apparatus. Based on this characteristic, they are divided into ciliated and microvillous receptor cells (Yamamoto, 1982; Zeiske et al., 1992; Belanger et al., 2003; Lazzari et al., 2007; Hansen and Zielinski, 2005; Pintos et al., 2020; Rincón-Camacho et al., 2022; Bettini et al., 2023). Ciliated OSNs use a Golf/adenylyl cyclase signaling cascade to activate CNG channels; microvillous OSNs use a Gq/phospholipase C pathway together with TRPC2 (Specia et al., 1999; Hansen et al., 2003; Sato et al., 2005). Electroolfactogram recordings were used to show that ciliated OSNs (cORNs) respond to bile salts and microvillous cells (mORNs) are sensitive to amino acids (Thommesen, 1983). Similar responses of microvillous neurons to amino acids were also recorded in (Specia et al., 1999; Lipschitz and Michel, 2002). Based on a study of olfaction in rainbow trout, Sato and Suzuki (2001) argued that cORNs are “generalists”, i.e., they respond to a wide range of odors including pheromones, while mORNs are “specialists”,

specific to amino acids. Hansen et al. (2003) conducted a study in channel catfish to show that microvillous neurons can respond to nucleotides and that amino acid odorants activate both ciliated and microvillous neurons, but via different signaling pathways.

Owing to the development of immunocytochemistry methods, intravital visualization of the functional activity of cells, and transcriptome analysis, recently researchers began to identify new morphological types of receptor neurons in fish. In addition to the ciliated and microvillous neurons mentioned above, they discovered another type of sensitive elements, i.e., crypt cells (Hansen and Zeiske, 1998; Hansen and Finger, 2000; Ferrando et al., 2010; Ahuja et al., 2014; Lazzari et al., 2022). This type of cells is the least abundant group of receptor neurons. For example, their proportion in trout and mackerel is only 2% of the total number of neurons while that of microvillous and ciliated neurons is 8 and 90%, respectively (Schmachtenberg, 2006). In some fish species, these cells are identified not only in adult specimens but also on the second or third day of their development (Camacho et al., 2010). A distinctive feature of crypt cells is that their bodies are located in the uppermost layer of the OE and are spherical or pear-shaped. They are usually completely surrounded by the bodies of one or two supporting cells, with which they form local gap contacts to ensure the sustainability of the cells to mechanical stress (Schmachtenberg, 2006). Crypt cells are thought to have no conspicuous dendrites and their receptive area has both cilia and microvilli (Hansen and Finger, 2000). Crypt cells are characterized by an unusual way of expression, i.e., “one cell type—one receptor”, where the same receptor is expressed by the entire population of crypt neurons (Ahuja et al., 2013). In order to determine the functional specialization of these cells, attempts are made to identify specific markers that do not occur in other types of olfactory neurons. They were shown to express the G proteins G α o and G α q, adenylate cyclase III, and the glial marker protein S-100 and TrkA. Nevertheless, it was noted that these proteins may not be present in all crypt cells (Hansen et al., 2003; 2004; Catania et al., 2003; Vielma et al., 2008). Subsequently, TrkA proved to be a reliable molecular marker of crypt cells in zebrafish (Bettini et al., 2016). To determine the spectrum of odorous substances perceived by crypt cells, studies are carried out to identify their odorant-binding receptors. Crypt cells were shown to express a single V1R receptor, i.e., V1R4, coupled to G α i; although their ligands are unknown, it was suggested that these receptors respond to pheromones (Ahuja et al., 2013). Cytochemical studies in crucian carp have shown that the localization of pheromone-sensitive crypt cells varies substantially throughout the year; in summer, i.e., during the transition to spawning, their bodies move to more superficial layers of the epithelium (Hamdani and Døving, 2007). The authors believe that these observations demonstrate a direct relationship between hormones circulating in the blood and the perception of sex pheromones. To determine the spectrum of olfactory sensitivity of crypt cells, it makes

sense to look at studies identifying neural projections of these cells in the central structures of the brain. Thus, it was found in crucian carp that the axons of second-order neurons (forming synapses with crypt cells) are connected to the olfactory cortex via the medial tract, which transmits sensory information relevant to reproduction (Hamdani and Døving, 2007). Based on these facts, the authors of the latter work assume that crypt cells ensure selective perception of pheromonal sex signals involved in the chemical communication in fish during spawning. Recently, the patch clamp method and intravital Ca^{2+} ion imaging were used in a study on mackerel and juvenile trout to show that different subpopulations of crypt cells respond to amino acids, bile acids, or pheromonal signals (Schmachtenberg, 2006; Vielma et al., 2008; Bazáes and Schmachtenberg, 2012). In adult trout specimens, the majority of crypt cells responded only to reproductive pheromones, suggesting that their response profile is largely dependent on the sexual maturity and sex of a given fish (Bazáes and Schmachtenberg, 2012). Moreover, experiments in zebrafish with retrograde labeling of cell crypts by injecting a fluorescent dye into the OB showed that these cells send their axons to only one OB glomerulus. This finding indicates the existence of a specialized “labeled line” that combines odor signals from all crypt cells present in the epithelium in one OB glomerulus (Ahuja et al., 2013).

In the course of studying the olfactory apparatus of zebrafish, other “crypt-like” cells were also identified within the OE, which sent their axons to a glomerulus that was different from other cell types (Braubach et al., 2012; Ahuja et al., 2014), which is contrary to the principle of convergence of axons in one glomerulus (Mombaerts, 2006). It turned out that these unusual cells, which were called kappe neurons for their characteristic shape, express $\text{G}\alpha_{\text{s/olf}}$ proteins and produce no specific markers typical of ciliated, microvillous, or crypt cells. Immunohistochemical staining of kappe cells revealed no tubulin in them, leading some authors to believe that they contain no cilia (Ahuja et al., 2014). The same study revealed positive staining for actin filaments concentrated mainly in the apical part of the cell. Since actin is an important component of microvilli, the authors are inclined to believe that kappe cells contain only microvillous processes. In our opinion, actin as a marker of crypt cells should be used with caution because it was later discovered in teleost fishes of the suborder *Cottoidei* in the dendrites and terminals of young OSNs for a short period of time during their migration and incorporation into the surface of the OE (Klimenkov et al., 2018). Particularly, in the apical side of receptor cells was shown the forming of a dense layer of actin microfilaments with the central pore. It is assumed that the functional receptors of odorants generate across this pore the first intracellular signal from environmental water-soluble odorants. At the final stage of morphogenesis, the actin perimembrane layer disappears and is preserved only at the sites of tight junctions with neighbouring supporting cells (Fig. 1). Accordingly, these data points that actin polymerisation may be temporally, what

correspond to specific stage of OSN development.

Recently, another small population of OSNs, pear-shaped neurons, was described in the surface layers of the OE in zebrafish (Wakisaka et al., 2017). These neurons were shown to express the A2c receptor, which is present in lower aquatic organisms and mediates the recognition of adenosine (Kowatschew and Korsching, 2021). The gene encoding this receptor was not found in terrestrial vertebrates. Another cell type, olfactory rods, was recently reported to be found in the OE of zebrafish larvae (Cheung et al., 2021). The bodies of these cells are located in the upper parts of the epithelium, and their apical region has an abundance of actin and a 5–10- μm rod-shaped protrusion capable of moving. These cells have no axons; however, it is assumed that they can perform mechanosensory, chemosensory, or multimodal functions.

3. Olfactory sensitivity of fish

The olfactory sensitivity of vertebrates, including fish, depends on their age and physiological state as well as ecology (Keller-Costa et al., 2014; Wakisaka et al., 2017; Doyle and Meeks, 2018; Li et al., 2023; Wagner et al., 2023).

To determine the various parameters of olfactory sensitivity in fish to biologically relevant signals, researchers apply both behavioral (Kasumyan and Marusov, 2018; Wagner et al., 2023) and

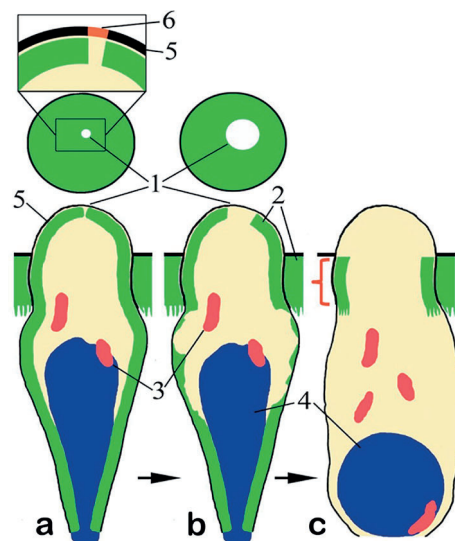


Fig.1. Young (a, b) and mature (c) stages of olfactory receptor cells morphological differentiation (by laser scanning confocal microscopy) of *Cottocomephorus inermis* Jakowlew, 1890 (*Cottoidei*). (A) – The ellipsoidal nucleus with mitochondria and thick layer of perimembrane F-actin inside the young cell. At the dendritic terminal the perimembrane F-actin layer has a pore which opens to cytoplasm. The apical fragment with the pore is highlighted and enlarged (the membrane patch upper the pore painted with red color); (b) – the hole of the pore is significantly expanded due to actin microfilaments dissociation; (c) – mature cell containing the F-actin only in the tight junctions area (pointed with brace). Notation: 1 – pore in the actin layer; 2 – F-actin; 3 – mitochondria; 4 – nucleus; 5 – plasmalemma; 6 – the membrane patch upper the pore in actin layer.

electrophysiological approaches (Valdés et al., 2015; Sato and Sorensen, 2018). Fish demonstrate high sensitivity to chemical agents that shape complex forms of their feeding and reproductive behavior. For instance, electrophysiological recordings from individual goldfish OSNs revealed that cells are specialized to detect odors associated with specific biological functions such as feeding, reproduction, and aggregation (Sato and Sorensen, 2018). It was also noted that information about sex pheromones is transmitted by individual, narrowly tuned OSNs whereas amino acids and other nutritional signals (polyamines, nucleotides) appear to be detected by a large number of OSNs (Sato and Sorensen, 2018). The sensitivity threshold to some L amino acids (alanine, arginine, glutamine acid, and methionine) associated with common feeding stimulants (Hara, 2006; Rolen et al., 2003) is 10^{-8} M (Sato and Sorensen, 2018; Rolen et al., 2003). The sensitivity threshold to polyamine (feeding stimulants) is 10^{-8} M (Rolen et al., 2003). The minimum concentration of the male sex pheromone androstenedione is 10^{-11} M (Sorensen et al., 2005). The sensitivity threshold to the sex pheromone prostoglandin 2α is 10^{-10} M (Sorensen et al., 1988). An even lower threshold of 10^{-11} M was found for putative aggregation cues (Li et al., 1995) (bile acid mixture) (Sato and Sorensen, 2018).

In recent years, a combination was used of site-directed mutagenesis and molecular modeling of the interaction of ORs with potential odorants (de March et al., 2018; Cong et al., 2019). This approach provides an opportunity to identify the type of ligands and the time profile of their interaction with the G protein-coupled receptors.

4. Conclusion

The analysis of works devoted to the study of adaptive properties of the olfactory system of fish demonstrates the multivariate features structural development of their olfactory epithelium. This is especially true of the representation of certain types of receptor cells specific to molecular receptors, the class of perceived odorants and the mechanism of their transduction. This is important not only from the point of view of studying the mechanisms of odorant-dependent behavior of hydrobionts, which is of great independent importance. The evolutionary similarity of the molecular and cellular mechanisms of olfactory reception in fish and mammals (Saraiva et al., 2015; Calvo-Ochoa et al., 2019) shows that fish can also be used as a model for studying the fundamental mechanisms of functioning of the olfactory analyzer in humans in normal and with the development of neurodegenerative diseases, the course of which is accompanied by anosmia.

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Science Foundation under grant no 23-24-00513, <https://rscf.ru/project/23-24-00513/>

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Ahuja G., Ivandic I., Saltürk M. et al. 2013. Zebrafish crypt neurons project to a single, identified mediodorsal glomerulus. *Scientific Reports* 3: 2063. DOI: [10.1038/srep02063](https://doi.org/10.1038/srep02063)
- Ahuja G., Nia S., Zapilko V. et al. 2014. Kappe neurons, a novel population of olfactory sensory neurons. *Scientific Reports* 4: 4037. DOI: [10.1038/srep04037](https://doi.org/10.1038/srep04037)
- Alioto T.S., Ngai J. 2006. The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: candidate chemosensory receptors for amino acids. *BMC Genomics*. 7: 309. DOI: [10.1186/1471-2164-7-309](https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-309)
- Bayramli X., Kocagöz Y., Sakizli U. et al. 2017. Patterned Arrangements of Olfactory Receptor Gene Expression in Zebrafish are Established by Radial Movement of Specified Olfactory Sensory Neurons. *Scientific Reports* 7: 5572. DOI: [10.1038/s41598-017-06041-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-06041-1)
- Bazáes A., Schmachtenberg O. 2012. Odorant tuning of olfactory crypt cells from juvenile and adult rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 215(Pt 10): 1740-1748. DOI: [10.1242/jeb.067264](https://doi.org/10.1242/jeb.067264)
- Belanger R.M., Smith C.M., Corkum L.D. et al. 2003. Morphology and histochemistry of the peripheral olfactory organ in the round goby, *Neogobius melanostomus* (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Morphology*. 257(1): 62-71. DOI: [10.1002/jmor.10106](https://doi.org/10.1002/jmor.10106)
- Bettini S., Lazzari M., Ferrando S. et al. 2016. Histopathological analysis of the olfactory epithelium of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to sublethal doses of urea. *Journal of Anatomy* 228(1): 59-69. DOI: [10.1111/joa.12397](https://doi.org/10.1111/joa.12397)
- Bettini S., Lazzari M., Milani L. et al. 2023. Immunohistochemical Analysis of Olfactory Sensory Neuron Populations in the Developing Olfactory Organ of the Guppy, *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Microscopy and Microanalysis* 29(5): 1764-1773. DOI: [10.1093/micmic/ozad099](https://doi.org/10.1093/micmic/ozad099)
- Bowers J.M., Li C.Y., Parker C.G. et al. 2023. Pheromone Perception in Fish: Mechanisms and Modulation by Internal Status. *Integrative and Comparative Biology* 63(2): 407-427. DOI: [10.1093/icb/icad049](https://doi.org/10.1093/icb/icad049)
- Braubach O.R., Fine A., Croll R.P. 2012. Distribution and functional organization of glomeruli in the olfactory bulbs of zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Comparative Neurology* 520(11): 2317-2339. DOI: [10.1002/cne.23075](https://doi.org/10.1002/cne.23075)
- Bronshtein A.A. 1977. Vertebrate olfactory receptors. Leningrad. Nauka. 159. (In Russian)
- Calvo-Ochoa E., Byrd-Jacobs C.A. 2019. The Olfactory System of Zebrafish as a Model for the Study of Neurotoxicity and Injury: Implications for Neuroplasticity and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20(7): 1639. DOI: [10.3390/ijms20071639](https://doi.org/10.3390/ijms20071639)
- Calvo-Ochoa E., Byrd-Jacobs C.A., Fuss S.H. 2021. Diving into the streams and waves of constitutive and regenerative olfactory neurogenesis: insights from zebrafish. *Cell and Tissue Research* 383(1): 227-253. DOI: [10.1007/s00441-020-03334-2](https://doi.org/10.1007/s00441-020-03334-2)
- Camacho S., Ostos-Garrido M.V., Domezain A. et al. 2010. Study of the olfactory epithelium in the developing sturgeon. Characterization of the crypt cells. *Chemical Senses* 35(2): 147-156. DOI: [10.1093/chemse/bjp091](https://doi.org/10.1093/chemse/bjp091)
- Carr V.M., Farbman A.I. 1992. Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces

precocious cell death in olfactory epithelium. *Experimental Neurology* 115: 55–59

Catania S., Germanà A., Laurà R. et al. 2003. The crypt neurons in the olfactory epithelium of the adult zebrafish express TrkA-like immunoreactivity. *Neuroscience Letters* 350(1): 5–8. DOI: [10.1016/s0304-3940\(03\)00751-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00751-1)

Cervino A. S., Paz D. A., Frontera J. L. 2017. Neuronal degeneration and regeneration induced by axotomy in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis*. *Developmental Neurobiology* 77: 1308–1320. DOI: [10.1002/dneu.22513](https://doi.org/10.1002/dneu.22513)

Cheung K.Y., Jesuthasan S.J., Baxendale S. et al. 2021. Olfactory Rod Cells: A Rare Cell Type in the Larval Zebrafish Olfactory Epithelium With a Large Actin-Rich Apical Projection. *Frontiers in Physiology* 12: 626080. DOI: [10.3389/fphys.2021.626080](https://doi.org/10.3389/fphys.2021.626080)

Cong X., Zheng Q., Ren W. et al. 2019. Zebrafish olfactory receptors ORAs differentially detect bile acids and bile salts. *Journal of Biological Chemistry* 294(17): 6762–6771. doi: [10.1074/jbc.RA118.006483](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006483)

Dan X., Wechter N., Gray S. et al. 2021. Olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews* 70: 101416. DOI: [10.1016/j.arr.2021.101416](https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101416)

de March C.A., Topin J., Bruguera E. et al. 2018. Odorant Receptor 7D4 Activation Dynamics. *Angewandte Chemie* 57(17): 4554–4558. DOI: [10.1002/anie.201713065](https://doi.org/10.1002/anie.201713065)

Demirler M.C., Sakizli U., Bali B. et al. 2020. Purinergic signalling selectively modulates maintenance but not repair neurogenesis in the zebrafish olfactory epithelium. *The FEBS Journal* 287(13): 2699–2722. DOI: [10.1111/febs.15170](https://doi.org/10.1111/febs.15170)

Dewan A. 2021. Olfactory signaling via trace amine-associated receptors. *Cell and Tissue Research* 383(1): 395–407. DOI: [10.1007/s00441-020-03331-5](https://doi.org/10.1007/s00441-020-03331-5)

Dieris M., Kowatschew D., Korsching S.I. 2021. Olfactory function in the trace amine-associated receptor family (TAARs) evolved twice independently. *Scientific Reports* 11(1): 7807. DOI: [10.1038/s41598-021-87236-5](https://doi.org/10.1038/s41598-021-87236-5)

Doyle W.I., Meeks J.P. 2018. Excreted Steroids in Vertebrate Social Communication. *The Journal of Neuroscience* 38(14): 3377–3387. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2488-17.2018](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2488-17.2018)

Ferrando S., Gallus L., Gambardella C. et al. 2010. Cell proliferation and apoptosis in the olfactory epithelium of the shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 40(4): 293–300. DOI: [10.1016/j.jchemneu.2010.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.08.004)

Friedrich R.W., Korsching S.I. 1997. Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18(5): 737–752. DOI: [10.1016/s0896-6273\(00\)80314-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80314-1)

Frontera J.L., Raices M., Cervino A.S. 2016. Neural regeneration dynamics of *Xenopus laevis* olfactory epithelium after zinc sulfate-induced damage. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 77: 1–9. DOI: [10.1016/j.jchemneu.2016.02.003](https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.02.003)

Graziadei G.A., Graziadei P.P. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of Neurocytology* 8: 197–213. DOI: [10.1007/BF01206454](https://doi.org/10.1007/BF01206454)

Graziadei P.P., Levine R.R., Graziadei G.A. 1978. Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 5230–5234

Hamdani el H., Døving K.B. 2007. The functional organization of the fish olfactory system. *Progress in Neurobiology* 82(2): 80–86. DOI: [10.1016/j.pneurobio.2007.02.007](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.007)

Hansen A., Anderson K.T., Finger T.E. 2004. Differential distribution of olfactory receptor neurons in goldfish:

structural and molecular correlates. *The Journal of Comparative Neurology*. 477(4): 347–359. DOI: [10.1002/cne.20202](https://doi.org/10.1002/cne.20202)

Hansen A., Finger T.E. 2000. Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes. *Brain, Behavior and Evolution* 55(2): 100–110. DOI: [10.1159/00006645](https://doi.org/10.1159/00006645)

Hansen A., Rolen S.H., Anderson K. et al. 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. *The Journal of Neuroscience*. 23: 9328–9339. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.23-28-09328.2003](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09328.2003)

Hansen A., Zeiske E. 1998. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chemical Senses* 23(1): 39–48. DOI: [10.1093/chemse/23.1.39](https://doi.org/10.1093/chemse/23.1.39)

Hansen A., Zielinski B.S. 2005. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of Neurocytology* 34(3–5): 183–208. DOI: [10.1007/s11068-005-8353-1](https://doi.org/10.1007/s11068-005-8353-1)

Hara T.J. 2006. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *Journal of Fish Biology* 68: 810–825

Imamura F., Ito A., LaFever B.J. 2020. Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Frontiers in Neural Circuits*. 14: 561822. DOI: [10.3389/fncir.2020.561822](https://doi.org/10.3389/fncir.2020.561822)

Kasumyan A.O. 2004. The olfactory system in fish: structure, function, and role in behavior. *Journal of Ichthyology* 44(2): S180

Kasumyan A.O., Marusov E.A. 2018. Odor Stimulation and Relation to Taste Stimuli in the Blind Cave Fish *Astyanax fasciatus*. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 45: 557–563. DOI: [10.1134/S1062359018060043](https://doi.org/10.1134/S1062359018060043)

Keller-Costa T., Canário A.V., Hubbard P.C. 2014. Olfactory sensitivity to steroid glucuronates in Mozambique tilapia suggests two distinct and specific receptors for pheromone detection. *The Journal of Experimental Biology* 217(Pt 23): 4203–4212. DOI: [10.1242/jeb.111518](https://doi.org/10.1242/jeb.111518)

Klimenkov I.V., Sudakov N.P., Pastukhov M.V. et al. 2018. Rearrangement of Actin Microfilaments in the Development of Olfactory Receptor Cells in Fish. *Scientific Reports* 8(1): 3692. DOI: [10.1038/s41598-018-22049-7](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22049-7)

Klimenkov I.V., Sudakov N.P., Pastukhov M.V. et al. 2020. The Phenomenon of Compensatory Cell Proliferation in Olfactory Epithelium in Fish Caused by Prolonged Exposure to Natural Odorants. *Scientific Reports* 10: 8908. DOI: [10.1038/s41598-020-65854-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65854-9)

Kocagöz Y., Demirler M.C., Eski S.E. et al. 2022. Disparate progenitor cell populations contribute to maintenance and repair neurogenesis in the zebrafish olfactory epithelium. *Cell and Tissue Research* 388(2): 331–358. DOI: [10.1007/s00441-022-03597-x](https://doi.org/10.1007/s00441-022-03597-x)

Korsching S. I. 2009. The molecular evolution of teleost olfactory receptor gene families. *Results and Problems in Cell Differentiation* 47: 37–55. DOI: [10.1007/400_2008_11](https://doi.org/10.1007/400_2008_11)

Korsching S.I. 2020. Taste and smell in zebrafish. In: Fritzsch B., Meyerhof W. (Eds.) *The senses: a comprehensive reference*. vol. 3. Cambridge: Elsevier Academic Press, p. 466–492

Kowatschew D., Bozorg Nia S., Hassan S. et al. 2022. Spatial organization of olfactory receptor gene choice in the complete V1R-related ORA family of zebrafish. *Scientific Reports* 12(1): 14816. DOI: [10.1038/s41598-022-17900-x](https://doi.org/10.1038/s41598-022-17900-x)

Kowatschew D., Korsching S.I. 2021. An Ancient Adenosine Receptor Gains Olfactory Function in Bony Vertebrates. *Genome Biology and Evolution* 13(9): evab211. DOI: [10.1093/gbe/evab211](https://doi.org/10.1093/gbe/evab211)

Kowatschew D., Korsching S.I. 2022. Lamprey possess both V1R and V2R olfactory receptors, but only V1Rs are expressed in olfactory sensory neurons. *Chemical Senses* 47: bjac007. DOI: [10.1093/chemse/bjac007](https://doi.org/10.1093/chemse/bjac007)

- Lazzari M., Bettini S., Ciani F. et al. 2007. Light and transmission electron microscopy study of the peripheral olfactory organ of the guppy, *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae). *Microscopy Research and Technique* 70(9): 782-789. DOI: [10.1002/jemt.20487](#)
- Lazzari M., Bettini S., Milani L. et al. 2022. Response of Olfactory Sensory Neurons to Mercury Ions in Zebrafish: An Immunohistochemical Study. *Microscopy and Microanalysis* 28(1): 227-242. DOI: [10.1017/S1431927621013763](#)
- Li C.Y., Lawrence K., Merlo-Coyne J. et al. 2023. Prostaglandin F2 α drives female pheromone signaling in cichlids, revealing a basis for evolutionary divergence in olfactory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120(1): e2214418120. DOI: [10.1073/pnas.2214418120](#)
- Li W., Sorensen P.W., Gallaher D.D. 1995. The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to unique bile acids released by conspecific larvae. *The Journal of General Physiology* 105(5): 569-587. DOI: [10.1085/jgp.105.5.569](#)
- Lipschitz D.L., Michel W.C. 2002. Amino acid odorants stimulate microvillar sensory neurons. *Chemical Senses* 27(3): 277-286. DOI: [10.1093/chemse/27.3.277](#)
- Matsunami H., Buck L.B. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90: 775-784
- Michel W.C., Sanderson M.J., Olson J.K. et al. 2003. Evidence of a novel transduction pathway mediating detection of polyamines by the zebrafish olfactory system. *The Journal of Experimental Biology* 206: 1697-1706
- Mombaerts P. 2006. Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 713-737. DOI: [10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915](#)
- Oka Y. 2023. Neural Control of Sexual Behavior in Fish. *Zoological Science* 40(2): 128-140. DOI: [10.2108/zs220108](#)
- Pfister P., Rodriguez I. 2005. Olfactory expression of a single and highly variable V1r pheromone receptor-like gene in fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 5489-5494
- Pintos S., Rincon-Camacho L., Pandolfi M. et al. 2020. Morphology and immunohistochemistry of the olfactory organ in the bloodfin tetra, *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). *Journal of Morphology* 281(8): 986-996. DOI: [10.1002/jmor.21227](#)
- Polcarpo M., Bemis K.E., Laurenti P. et al. 2022. Coevolution of the olfactory organ and its receptor repertoire in ray-finned fishes. *BMC Biology* 20: 195. DOI: [10.1186/s12915-022-01397-x](#)
- Rincón-Camacho L., Jungblut L.D., Pandolfi M. et al. 2022. Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of the olfactory organ cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). *Journal of Morphology* 283(6): 815-826. DOI: [10.1002/jmor.21473](#)
- Rolen S.H., Sorensen P.W., Mattson D. et al. 2003. Polyamines as olfactory stimuli in the goldfish *Carassius auratus*. *The Journal of Experimental Biology* 206(Pt 10): 1683-1696. DOI: [10.1242/jeb.00338](#)
- Saraiva L., Ahuja G., Ivandic I. et al. 2015. Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Scientific Reports* 5: 11487. DOI: [10.1038/srep11487](#)
- Saraiva L.R., Korsching S.I. 2007. A novel olfactory receptor gene family in teleost fish. *Genome Research* 17(10): 1448-1457. DOI: [10.1101/gr.6553207](#)
- Sato K., Sorensen P.W. 2018. The Chemical Sensitivity and Electrical Activity of Individual Olfactory Sensory Neurons to a Range of Sex Pheromones and Food Odors in the Goldfish. *Chemical Senses* 43(4): 249-260. DOI: [10.1093/chemse/bjy016](#)
- Sato K., Suzuki N. 2001. Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. *Chemical Senses* 26(9): 1145-1156. DOI: [10.1093/chemse/26.9.1145](#)
- Sato Y., Miyasaka N., Yoshihara Y. 2005. Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *The Journal of Neuroscience* 25: 4889-4897. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.0679-05.2005](#)
- Sato Y., Miyasaka N., Yoshihara Y. 2007. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *Journal of Neuroscience* 27(7): 1606-1615. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.4218-06.2007](#)
- Schmachtenberg O. 2006. Histological and electrophysiological properties of crypt cells from the olfactory epithelium of the marine teleost *Trachurus symmetricus*. *The Journal of Comparative Neurology* 495(1): 113-121. DOI: [10.1002/cne.20847](#)
- Schwob J.E. 2002. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *The Anatomical Record* 269(1): 33-49. DOI: [10.1002/ar.10047](#)
- Shao X., Lakhina V., Dang P. et al. 2017. Olfactory sensory axons target specific protoglomeruli in the olfactory bulb of zebrafish. *Neural Development* 12: 18. DOI: [10.1186/s13064-017-0095-0](#)
- Smith T.D., Bhatnagar K.P. 2019. Anatomy of the olfactory system. *Handbook of Clinical Neurology* 164: 17-28. doi: [10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2](#)
- Sorensen P.W., Hara T.J., Stacey N.E. et al. 1988. F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biology of Reproduction*. 39(5): 1039-1050. DOI: [10.1095/biolreprod39.5.1039](#)
- Sorensen P.W., Pinillos M., Scott A.P. 2005. Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology* 140(3): 164-175. DOI: [10.1016/j.ygcen.2004.11.006](#)
- Specia D.J., Lin D.M., Sorensen P.W. 1999. Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* 23:487-498
- Thommesen G. 1983. Morphology, distribution, and specificity of olfactory receptor cells in salmonid fishes. *Acta Physiologica Scandinavica*. 117(2): 241-249. DOI: [10.1111/j.1748-1716.1983.tb07203.x](#)
- Valdés J., Olivares J., Ponce D. et al. 2015. Analysis of olfactory sensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals their ability to detect lactic acid, pyruvic acid and four B vitamins. *Fish Physiology and Biochemistry* 41: 879-885. DOI: [10.1007/s10695-015-0054-9](#)
- Vielma A., Ardiles A., Delgado L. et al. 2008. The elusive crypt olfactory receptor neuron: evidence for its stimulation by amino acids and cAMP pathway agonists. *The Journal of Experimental Biology* 211(Pt 15): 2417-2422. DOI: [10.1242/jeb.018796](#)
- Villamayor P.R., Arana Á.J., Coppel C. et al. 2021. A comprehensive structural, lectin and immunohistochemical characterization of the zebrafish olfactory system. *Scientific Reports* 11: 8865. DOI: [10.1038/s41598-021-88317-1](#)
- Wagner C.M., Bals J.D., Byford G.J. et al. 2023. Olfactory sensitivity and threat-sensitive responses to alarm cue in an invasive fish. *Biological Invasions* 25: 3083-3101. DOI: [10.1007/s10530-023-03092-6](#)
- Wakisaka N., Miyasaka N., Koide T. et al. 2017. An Adenosine Receptor for Olfaction in Fish. *Current Biology* 27(10): 1437-1447.e4. DOI: [10.1016/j.cub.2017.04.014](#)
- Yamamoto M. 1982. Comparative morphology of the

peripheral olfactory organ in teleosts. In: Chemoreception in Fishes. Hara T.J. (Ed.). Elsevier Science, Amsterdam, pp. 39–59

Yoshihara Y. 2014. Zebrafish Olfactory System. In: The Olfactory System. Mori, K. (Ed.). Springer, Tokyo, pp. 71–96. DOI: [10.1007/978-4-431-54376-3_5](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54376-3_5)

Zeiske E., Theisen B., Breucker H. 1992. Structure, development, and evolutionary aspects of the peripheral olfactory system. In: Fish Chemoreception. Hara T.J. (Ed.). Chapman & Hall, London, pp. 13–39

Zhu P., Tian Y., Chen Y. et al. 2021. Olfactory Optogenetics: Light Illuminates the Chemical Sensing Mechanisms of Biological Olfactory Systems. *Biosensors (Basel)* 11(9): 309. DOI: [10.3390/bios11090309](https://doi.org/10.3390/bios11090309)

Структурные и функциональные особенности обонятельного эпителия у рыб

Клименков И.В. *, Пятов С.К., Судаков Н.П.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Рассматриваются структурно-функциональные особенности периферического отдела обонятельного (ольфакторного) анализатора у рыб. Преимущественно уделяется внимание основным типам рецепторных клеток: их морфологии, особенностям расположения в обонятельном эпителии и функциональная специфика. Представлены некоторые данные о пороговых значениях хемочувствительности рыб к химическим агентам, имеющим для них важное сигнальное значение.

Ключевые слова: обонятельная клетка, поведение, нейрогенез, хеморецепция

1. Введение

В настоящее время одной из актуальных проблем нейробиологии является изучение фундаментальных механизмов адаптивного функционирования обонятельного анализатора у животных и человека (Smith and Bhatnagar, 2019; Dan et al., 2021; Zhu et al., 2021). В первую очередь, эти вопросы касаются расшифровки механизмов, которые обеспечивают процессы хеморецепции на уровне периферического отдела обонятельной системы. Попытки выявить корреляции между структурой рецепторных нейронов, их чувствительностью и реализацией конкретных форм поведения животных не дали пока однозначных результатов. В связи с этим, одной из важных проблем является поиск морфо-функциональных критериев уровней чувствительности рецепторных клеток у животных, находящихся на разных ступенях их эволюционного развития. В частности, это касается адаптивного поведения рыб, которые в ходе эволюции освоили различные водные горизонты и характеризуются высокой пластичностью их хемосенсорного аппарата (Korsching, 2020; Calvo-Ochoa et al., 2021). В этом плане одна из ключевых задач состоит в изучении типов рецепторных клеток, их молекулярных рецепторов и механизмов трансдукции химических сигналов внешней среды. Данные, полученные на рыбах, могут иметь важное значение для понимания структурно-функциональной организации и эволюции механизмов, обеспечивающих обонятельное восприятие.

2. Функциональная специализация обонятельных рецепторных клеток

Обоняние выполняет ведущую роль в организации пищевого, репродуктивного, социального и других сложных форм поведения у рыб (Kasumyan, 2004; Calvo-Ochoa and Byrd-Jacobs, 2019; Korsching, 2020; Bowers et al., 2023; Oka, 2023). У филогенетически разных рыб, как и у других позвоночных, сенсорный отдел ольфакторного анализатора представляет собой псевдомногослойный нейроэпителий, состоящий из клеток трех типов: рецепторных, опорных и базальных. Принадлежность клеток к определенному типу определяется по месту их расположения в толще обонятельного эпителия (ОЭ), морфологическим особенностям и наличию тех или иных специфических антигенных детерминант (маркеров) (Bronstein, 1977; Graziadei and Graziadei, 1979; Schwob, 2002; Brann and Firestein, 2014; Doty, 2015; Glezer and Malnic, 2019; Villamayor et al., 2021). В ОЭ рыб описано пять типов обонятельных сенсорных нейронов (ОСН): жгутиковые, микровиллярные, грушевидные, крипт и каппе нейроны (Hansen et al., 1999; Ahuja et al., 2014; Yoshihara, 2014; Wakisaka et al., 2017).

Как и у других позвоночных, нейрогенез в ОЭ рыб поддерживается на протяжении всей жизни за счет пролиферативной активности региональных стволовых клеток, производящих различные типы клеток (Graziadei and Graziadei, 1979; Demirler et al., 2020; Calvo-Ochoa et al., 2021; Kocagöz et al., 2022). Модельные эксперименты, проведенные на рыбах

Автор для переписки.

Адрес e-mail: iklimen@mail.ru (И.В. Клименков)

Поступила: 28 ноября 2023; Принята: 10 декабря 2023;

Опубликована online: 13 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



и других животных, показывают, что различные формы сенсорной депривации могут существенно активировать естественную скорость нейрогенеза, свойственную интактным животным. Ранее было показано, что активация процессов нейрогенеза в ОЭ может быть вызвана интраназальным введением токсических или нейротрофических факторов, перерезкой аксонов или в результате бульбэктомии (Graziadei et al., 1978; Carr and Farbman, 1992; Frontera et al., 2016; Cervino et al., 2017). Недавно на рыбах установлено, что продолжительное воздействие нетоксичной смеси аминокислот и пептидов вначале ведет к локальным нейродегенеративным изменениям в ОЭ и далее развитию компенсаторных процессов нейрогенеза (Klimenkov et al., 2020). Зрелые ОСН рыб моноспецифичны и экспрессируют только один тип обонятельных рецепторов (ОР) (Sato et al., 2007). Нейроны, экспрессирующие данный ОР, объединяют свои аксоны в несколько определенных клубочков внутри обонятельной луковицы (ОЛ). Это формирует топографическую карту обработки обонятельных сигналов в мозгу (Friedrich and Korsching, 1997; Shao et al., 2017; Imamura et al., 2020).

У разных видов рыб представлено от нескольких десятков до более тысячи функционально активных генов, кодирующих рецепторные белки (Saraiva and Korsching, 2007; Alioto and Ngai, 2006; Calvo-Ochoa et al., 2019; Policarpo et al., 2022). Обнаружение пахучих веществ у рыб опосредуется суперсемейством рецепторов, связанных с G-белком (Korsching, 2009; Calvo-Ochoa et al., 2019; Policarpo et al., 2022). Различают три типа рецепторов: обонятельные рецепторы (Alioto and Ngai, 2006; Bayramli et al., 2017), рецепторы, ассоциированные с восприятием следов аминов (TAARs) (Michel et al., 2003; Saraiva and Korsching, 2007; Dieris et al., 2021; Dewan, 2021) и вомероназальные рецепторы (V1R, V2R), которые, как предполагается, могут связывать феромоны (Matsunami and Buck, 1997; Pfister and Rodriguez, 2005; Kowatschew and Korsching, 2022; Kowatschew et al., 2022).

Самую многочисленную группу рецепторных клеток образуют жгутиковые и микровиллярные ОСН. Они являются биполярными нейронами, тела которых находятся в толще ОЭ. Клетки имеют веретеновидную форму с поперечным диаметром 5–8 мкм. В приядерной зоне локализуются каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, аппарат Гольджи, митохондрии, мультивезикулярные тельца, свободные розетки рибосом и другие органеллы. Тело нижней части клетки, резко сужаясь, образует аксон, который в совокупности с другими аксонами аналогичных клеток входит в состав немиелинизированного обонятельного нерва, связывающего рецепторные клетки с ОЛ переднего мозга. От верхнего полюса тела клетки отходит дендрит, диаметр которого составляет 1–3 мкм. В цитоплазме дендрита обычно располагаются фрагменты гладкого эндоплазматического ретикулума, митохондрии и микротрубочки. Апикальный участок рецепторных клеток может иметь выросты двух разновидностей

– жгутики или микровиллы, не имеющие микротубулярного аппарата. По этому признаку их подразделяют на жгутиковые и микровиллярные рецепторные клетки (Yamamoto, 1982; Zeiske et al., 1992; Belanger et al., 2003; Lazzari et al., 2007; Hansen and Zielinski, 2005; Pintos et al., 2020; Rincón-Camacho et al., 2022; Bettini et al., 2023). Жгутиковые ОСН используют сигнальный каскад Golf/аденилатциклаза для активации циклических нуклеотид-управляемых (CNG) каналов, микровиллярные ОСН используют Gq/фосфолипазу C вместе с TRPC2 (Specia et al., 1999; Hansen et al., 2003; Sato et al., 2005). С помощью электрооофтограммы показано, что жгутиковые ОСН (жОСН) реагируют на жирные кислоты, а микровиллярные клетки (мОСН) чувствительны к аминокислотам (Thommesen, 1983). Похожие реакции микровиллярных нейронов на аминокислоты были зарегистрированы и в других работах (Specia et al., 1999; Lipschitz and Michel, 2002). По мнению Sato K., Suzuki N. (Sato and Suzuki, 2001), основанному на изучении обоняния у радужной форели, жОСН являются «универсалистами», которые реагируют на широкий спектр запахов, включая феромоны, тогда как мОСН являются «специалистами», специфичными для аминокислот. В исследовании (Hansen et al., 2003) на канальных сомиках показано, что нуклеотиды действуют на микровиллярные, а аминокислоты на жгутиковые и микровиллярные клетки, но через разные сигнальные пути.

В связи с развитием методов иммуноцитохимии, прижизненной визуализации функциональной активности клеток и анализа транскриптома в последнее время у рыб стали выделять новые морфологические типы рецепторных клеток. Кроме уже упомянутых жгутиковых и микровиллярных нейронов недавно была обнаружена еще одна разновидность чувствительных элементов – крипт клетки (Hansen and Zeiske, 1998; Hansen and Finger, 2000; Ferrando et al., 2010; Ahuja et al., 2014; Lazzari et al., 2022). Данный тип клеток представляет собой самую немногочисленную группу рецепторных нейронов. Например, у форели и скумбрии на их долю приходится только 2 % клеток от общего числа нейронов, тогда как микровиллярные и жгутиковые составляют 8 и 90 % соответственно (Schmachtenberg, 2006). У некоторых видов рыб эти клетки выявляются не только у взрослых особей, но и на 2–3 сутки их развития (Camacho et al., 2010). Отличительная особенность крипт клеток состоит в том, что их тела располагаются в самом верхнем слое ОЭ и имеют сферическую или грушевидную форму. Обычно они полностью окружены телами одной или двух опорных клеток, с которыми они формируют локальные плотные контакты, обеспечивающие устойчивость клеток к механическим напряжениям (Schmachtenberg, 2006). Считается, что крипт клетки не имеют выраженных дендритов, а их рецепторный участок снабжен как жгутиками, так и микровиллами. (Hansen and Finger, 2000). Крипт клетки характеризуются необычным способом экспрессии — «один тип клеток — один рецептор», причем один и тот же рецептор экспрессируется

всей популяцией крипт нейронов (Ahuja et al., 2013). Чтобы определить функциональную специализацию этих клеток, предпринимаются попытки выявить в них специфические маркеры, не встречающиеся в других типах обонятельных нейронов. Показано, что они экспрессируют G-белки G α o и G α q, аденилатциклазу III, глиальный маркерный белок S-100 и TrkA-ir. Тем не менее, отмечается, что эти белки могут быть представлены не во всех крипт клетках (Hansen et al., 2003; 2004; Catania et al., 2003; Vielma et al., 2008). Позже, в качестве надежного молекулярного маркера крипт клеток у данио зарекомендовала себя тирозиназная протеинкиназа A (Bettini et al., 2016). Для определения спектра запаховых веществ, воспринимаемых крипт клетками, в настоящее время ведутся работы по идентификации их одорант-связывающих рецепторов. Показано, что крипт клетки экспрессируют единственный рецептор типа V1R, V1R4, связанный с G α i, и хотя их лиганды неизвестны, было высказано предположение, что эти рецепторы реагируют на феромоны (Ahuja et al., 2013). В цитохимических исследованиях, проведенных на карасях, установлено, что локализация чувствительных к феромонам крипт клеток в разное время года существенно изменяется, причем, летом – при переходе к нересту – их тела перемещаются к более поверхностным слоям эпителия (Hamdani and Døving, 2007). Как полагают авторы, эти наблюдения демонстрируют наличие прямой взаимосвязи между циркулирующими в крови гормонами и восприятием половых феромонов. Для определения спектра одорантной чувствительности крипт клеток представляют интерес исследования по выявлению нейронных проекций этих клеток в центральных структурах мозга. Так, установлено, что у карася аксоны нейронов второго порядка (образующие синапсы с крипт клетками) связаны с обонятельной корой через медиальный тракт, который передает сенсорную информацию, связанную с размножением (Hamdani and Døving, 2007). На основании этих фактов авторы последней работы предполагают, что крипт клетки обеспечивают селективное восприятие половых феромональных сигналов, участвующих в химической коммуникации рыб во время нереста. Недавно с помощью метода Patch Clamp и прижизненной визуализации ионов Ca²⁺ удалось показать, что у скумбрии и молоди форели различные субпопуляции крипт клеток реагируют на аминокислоты, желчные кислоты, либо феромональные сигналы (Schmachtenberg, 2006; Vielma et al., 2008; Bazáes and Schmachtenberg, 2012). При этом у зрелых особей форели большинство крипт клеток отвечает только на репродуктивные феромоны, что говорит о том, что профиль их ответов существенно зависит от половой зрелости и пола рыбы (Bazáes and Schmachtenberg, 2012). Кроме того, эксперименты на данио с ретроградным мечением крипт клеток путем инъекции флуоресцентного красителя в ОЛ показали, что данные клетки посылают свои аксоны только в один клубочек ОЛ. Это свидетельствует о существовании специализированной «меченой линии», объединяющей запаховые сигналы

от всех представленных в эпителии крипт клеток в одной гломеруле ОЛ (Ahuja et al., 2013).

В ходе изучения ольфакторного аппарата данио в пределах ОЭ были идентифицированы также другие «крипт-подобные» клетки, которые посылали свои аксоны в отличный от других типов клеток клубочек (Braubach et al., 2012; Ahuja et al., 2014), что не соответствует принципу сходимости аксонов в одной гломеруле (Mombaerts, 2006). Оказалось, что эти необычные клетки, названные из-за их характерной формы «каппе» нейронами, экспрессируют G α s/olf белки и не производят специфических маркеров, свойственных для жгутиковых, микровиллярных и крипт клеток. Иммунохимическое окрашивание каппе клеток не выявило у них тубулина, вследствие чего по мнению некоторых авторов они не содержат ресничек (Ahuja et al., 2014). В этой же работе обнаружено позитивное окрашивание на актиновые филаменты, сосредоточенные главным образом в апикальном отделе клетки. В связи с тем, что актин является важным компонентом микровилл, авторы склоняются к тому, что каппе клетки содержат только микровиллярные отростки. По нашему мнению, нужно с осторожностью относиться к использованию актина в качестве маркера крипт клеток, так как позднее он был обнаружен у костистых рыб подотряда Cottoidei в дендритах и в терминалях у молодых ОСН на коротком отрезке времени в процессе их миграции и встраивания в поверхность ОЭ (Klimenkov et al., 2018). В частности, установлено, что по мере развития в апикальном отделе рецепторных клеток образуется плотный слой актиновых микрофиламентов, внутри которого формируется пора. Предполагается, что функциональные рецепторы одорантов генерируют через эту пору первый внутриклеточный сигнал от водорастворимых одорантов окружающей среды. На заключительной стадии морфогенеза примембранный слой актина исчезает и сохраняется лишь в местах плотных соединений с соседними опорными клетками (Рис. 1). Таким образом, эти данные показывают, что полимеризация актина может быть временной и отражать определенный этап развития ОСН.

Недавно в поверхностных слоях ОЭ данио была описана еще одна небольшая популяция нейронов – грушеподобные клетки (Wakisaka et al., 2017). Показано, что эти нейроны экспрессируют рецептор A2c, который представлен у низших водных организмов и обеспечивает восприятие аденозина (Kowatschew and Korsching, 2021). Ген, кодирующий этот рецептор, не обнаружен у позвоночных, ведущих наземный образ жизни. Недавно сообщалось об еще одной разновидности клеток, обнаруженной в ОЭ личинок данио – обонятельные палочки (Cheung et al., 2021). Тела этих клеток расположены в верхних отделах эпителия, причем, их апикальный участок содержит способный к движению палочковидный выступ длиной 5–10 мкм. У данных клеток не обнаружены аксоны, тем не менее, предполагается, что они могут выполнять механосенсорные, хемосенсорные или мультимодальные функции.

3. Обонятельная чувствительность у рыб

Обонятельная чувствительность позвоночных, включая рыб, зависит от их возраста, физиологического состояния и экологии (Keller-Costa et al., 2014; Wakisaka et al., 2017; Doyle and Meeks, 2018; Li et al., 2023; Wagner et al., 2023).

Для определения различных параметров ольфакторного восприятия рыбами биологически значимых сигналов используются как поведенческие (Kasumyan and Marusov, 2018; Wagner et al., 2023), так и электрофизиологические подходы (Valdés et al., 2015; Sato and Sorensen, 2018). Рыбы демонстрируют высокую чувствительность к химическим агентам, которые предопределяют сложные формы их пищевого и репродуктивного поведения. В частности, электрофизиологическая запись от отдельных ОЧН золотого караса показывает, что клетки специализированы на обнаружении запахов, связанных с конкретными биологическими функциями, включая питание, размножение и агрегацию (Sato and Sorensen, 2018). При этом, отмечается, что информация о половых феромонах передается отдельными узко настроенными ОЧН, в то время как аминокислоты и другие сигналы питания (полиамины, нуклеотиды), по-видимому, распознаются большим количеством ОЧН (Sato and Sorensen, 2018). Порог обнаружения отдельных L аминокислот (аланин, аргинин, глутаминовая кислота, метионин), относящихся к распространенным пищевым (Hara, 2006; Rolen et al., 2003) стимулам, составляет 10^{-8} М (Sato and Sorensen, 2018; Rolen et al., 2003). Порог чувствительности к полиаминам (пищевые стимулы) находится на таком же уровне – 10^{-8} М (Rolen et al., 2003). Минимальная концентрация мужского полового феромона, андростендиона соответствует 10^{-11} М (Sorensen et al., 2005). Порог восприятия полового феромона простагландина 2α равен 10^{-10} М (Sorensen et al., 1988). Еще более низкий порог обнаружен для предполагаемого сигнала агрегации (Li et al., 1995) (смесь желчных кислот) – 10^{-11} М (Sato and Sorensen, 2018).

В последние годы используются также методы совместного использования сайт-направленного мутагенеза и молекулярного моделирования взаимодействия обонятельных рецепторов с потенциальными одорантами (de March et al., 2018; Cong et al., 2019). Это дает возможность идентифицировать тип лигандов и динамику их взаимодействия с рецепторами, связанными с G белком.

4. Заключение

Анализ работ, посвященных изучению адаптивных свойств обонятельной системы рыб, демонстрирует многовариантные особенности структурного развития их обонятельного эпителия. Особенно это касается представительства тех или иных типов рецепторных клеток, специфичных по молекулярным рецепторам, классу воспринимаемых одорантов и путям их трансдукции. Это важно не только с позиции изучения механизмов

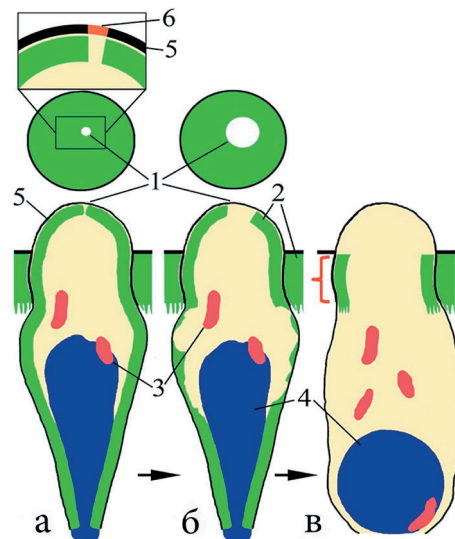


Рис.1. Ранние (а, б) и зрелая (в) стадии морфологической дифференцировки обонятельных рецепторных клеток (по данным конфокальной микроскопии) у *Cottocomephorus inermis* Jakowlew, 1890 (Cottoidei). (А) – внутри молодой клетки располагается вытянутое ядро, митохондрии и широкий слой примембранного F-актина. В толще актиновых микрофиламентов терминаль дендрита содержит пору, которая открывается в цитоплазму. Выделен и увеличен фрагмент вершины с порой (красным отмечен участок мембраны над порой); (б) – просвет поры существенно расширен вследствие разборки актиновых микрофиламентов; (в) – зрелая клетка: F-актин содержится только в области плотных контактов (показано фигурной скобкой) с соседними клетками. Обозначения: 1 – пора; 2 – F-актин; 3 – митохондрии; 4 – ядро; 5 – поверхностная мембрана; 6 – участок поверхностной мембраны над порой.

одорант-зависимого поведения гидробионтов, что имеет большое самостоятельное значение. Эволюционное сходство молекулярных и клеточных механизмов обонятельной рецепции у рыб и млекопитающих (Saraiva et al., 2015; Calvo-Ochoa et al., 2019) показывает, что рыбы могут использоваться также в качестве модели для изучения фундаментальных механизмов функционирования обонятельного анализатора у человека в норме и при развитии нейродегенеративных заболеваний, течение которых сопровождается anosmией.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00513, <https://rscf.ru/project/23-24-00513/>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Ahuja G., Ivandic I., Saltürk M. et al. 2013. Zebrafish crypt neurons project to a single, identified mediodorsal glomerulus. *Scientific Reports* 3: 2063. DOI: [10.1038/srep02063](https://doi.org/10.1038/srep02063)
- Ahuja G., Nia S., Zapilko V. et al. 2014. Kappe neurons, a novel population of olfactory sensory neurons. *Scientific Reports* 4: 4037. DOI: [10.1038/srep04037](https://doi.org/10.1038/srep04037)
- Alioto T.S., Ngai J. 2006. The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: candidate chemosensory receptors for amino acids. *BMC Genomics* 7: 309. DOI: [10.1186/1471-2164-7-309](https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-309)
- Bayramli X., Kocagöz Y., Sakizli U. et al. 2017. Patterned Arrangements of Olfactory Receptor Gene Expression in Zebrafish are Established by Radial Movement of Specified Olfactory Sensory Neurons. *Scientific Reports* 7: 5572. DOI: [10.1038/s41598-017-06041-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-06041-1)
- Bazáes A., Schmachtenberg O. 2012. Odorant tuning of olfactory crypt cells from juvenile and adult rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 215(Pt 10): 1740-1748. DOI: [10.1242/jeb.067264](https://doi.org/10.1242/jeb.067264)
- Belanger R.M., Smith C.M., Corkum L.D. et al. 2003. Morphology and histochemistry of the peripheral olfactory organ in the round goby, *Neogobius melanostomus* (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Morphology* 257(1): 62-71. DOI: [10.1002/jmor.10106](https://doi.org/10.1002/jmor.10106)
- Bettini S., Lazzari M., Ferrando S. et al. 2016. Histopathological analysis of the olfactory epithelium of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to sublethal doses of urea. *Journal of Anatomy* 228(1): 59-69. DOI: [10.1111/joa.12397](https://doi.org/10.1111/joa.12397)
- Bettini S., Lazzari M., Milani L. et al. 2023. Immunohistochemical Analysis of Olfactory Sensory Neuron Populations in the Developing Olfactory Organ of the Guppy, *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Microscopy and Microanalysis* 29(5): 1764-1773. DOI: [10.1093/micmic/ozad099](https://doi.org/10.1093/micmic/ozad099)
- Bowers J.M., Li C.Y., Parker C.G. et al. 2023. Pheromone Perception in Fish: Mechanisms and Modulation by Internal Status. *Integrative and Comparative Biology* 63(2): 407-427. DOI: [10.1093/icb/icad049](https://doi.org/10.1093/icb/icad049)
- Braubach O.R., Fine A., Croll R.P. 2012. Distribution and functional organization of glomeruli in the olfactory bulbs of zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Comparative Neurology* 520(11): 2317-2339. DOI: [10.1002/cne.23075](https://doi.org/10.1002/cne.23075)
- Bronshtein A.A. 1977. Vertebrate olfactory receptors. Leningrad. Nauka. 159. (In Russian)
- Calvo-Ochoa E., Byrd-Jacobs C.A. 2019. The Olfactory System of Zebrafish as a Model for the Study of Neurotoxicity and Injury: Implications for Neuroplasticity and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20(7): 1639. DOI: [10.3390/ijms20071639](https://doi.org/10.3390/ijms20071639)
- Calvo-Ochoa E., Byrd-Jacobs C.A., Fuss S.H. 2021. Diving into the streams and waves of constitutive and regenerative olfactory neurogenesis: insights from zebrafish. *Cell and Tissue Research* 383(1): 227-253. DOI: [10.1007/s00441-020-03334-2](https://doi.org/10.1007/s00441-020-03334-2)
- Camacho S., Ostos-Garrido M.V., Domezain A. et al. 2010. Study of the olfactory epithelium in the developing sturgeon. Characterization of the crypt cells. *Chemical Senses* 35(2): 147-156. DOI: [10.1093/chemse/bjp091](https://doi.org/10.1093/chemse/bjp091)
- Carr V.M., Farbman A.I. 1992. Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium. *Experimental Neurology* 115: 55-59
- Catania S., Germanà A., Laurà R. et al. 2003. The crypt neurons in the olfactory epithelium of the adult zebrafish express TrkA-like immunoreactivity. *Neuroscience Letters* 350(1): 5-8. DOI: [10.1016/s0304-3940\(03\)00751-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00751-1)
- Cervino A. S., Paz D. A., Frontera J. L. 2017. Neuronal degeneration and regeneration induced by axotomy in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis*. *Developmental Neurobiology* 77: 1308-1320. DOI: [10.1002/dneu.22513](https://doi.org/10.1002/dneu.22513)
- Cheung K.Y., Jesuthasan S.J., Baxendale S. et al. 2021. Olfactory Rod Cells: A Rare Cell Type in the Larval Zebrafish Olfactory Epithelium With a Large Actin-Rich Apical Projection. *Frontiers in Physiology* 12: 626080. DOI: [10.3389/fphys.2021.626080](https://doi.org/10.3389/fphys.2021.626080)
- Cong X., Zheng Q., Ren W. et al. 2019. Zebrafish olfactory receptors ORAs differentially detect bile acids and bile salts. *Journal of Biological Chemistry* 294(17): 6762-6771. doi: [10.1074/jbc.RA118.006483](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006483)
- Dan X., Wechter N., Gray S. et al. 2021. Olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews* 70: 101416. DOI: [10.1016/j.arr.2021.101416](https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101416)
- de March C.A., Topin J., Bruguera E. et al. 2018. Odorant Receptor 7D4 Activation Dynamics. *Angewandte Chemie* 57(17): 4554-4558. DOI: [10.1002/anie.201713065](https://doi.org/10.1002/anie.201713065)
- Demirler M.C., Sakizli U., Bali B. et al. 2020. Purinergic signalling selectively modulates maintenance but not repair neurogenesis in the zebrafish olfactory epithelium. *The FEBS Journal* 287(13): 2699-2722. DOI: [10.1111/febs.15170](https://doi.org/10.1111/febs.15170)
- Dewan A. 2021. Olfactory signaling via trace amine-associated receptors. *Cell and Tissue Research* 383(1): 395-407. DOI: [10.1007/s00441-020-03331-5](https://doi.org/10.1007/s00441-020-03331-5)
- Dieris M., Kowatschew D., Korsching S.I. 2021. Olfactory function in the trace amine-associated receptor family (TAARs) evolved twice independently. *Scientific Reports* 11(1): 7807. DOI: [10.1038/s41598-021-87236-5](https://doi.org/10.1038/s41598-021-87236-5)
- Doyle W.I., Meeks J.P. 2018. Excreted Steroids in Vertebrate Social Communication. *The Journal of Neuroscience* 38(14): 3377-3387. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2488-17.2018](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2488-17.2018)
- Ferrando S., Gallus L., Gambardella C. et al. 2010. Cell proliferation and apoptosis in the olfactory epithelium of the shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 40(4): 293-300. DOI: [10.1016/j.jchemneu.2010.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.08.004)
- Friedrich R.W., Korsching S.I. 1997. Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18(5): 737-752. DOI: [10.1016/s0896-6273\(00\)80314-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80314-1)
- Frontera J.L., Raices M., Cervino A.S. 2016. Neural regeneration dynamics of *Xenopus laevis* olfactory epithelium after zinc sulfate-induced damage. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 77: 1-9. DOI: [10.1016/j.jchemneu.2016.02.003](https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.02.003)
- Graziadei G.A., Graziadei P.P. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of Neurocytology* 8: 197-213. DOI: [10.1007/BF01206454](https://doi.org/10.1007/BF01206454)
- Graziadei P.P., Levine R.R., Graziadei G.A. 1978. Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 5230-5234
- Hamdani el H., Døving K.B. 2007. The functional organization of the fish olfactory system. *Progress in Neurobiology* 82(2): 80-86. DOI: [10.1016/j.pneurobio.2007.02.007](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.007)
- Hansen A., Anderson K.T., Finger T.E. 2004. Differential distribution of olfactory receptor neurons in goldfish: structural and molecular correlates. *The Journal of Comparative Neurology* 477(4): 347-359. DOI: [10.1002/cne.20202](https://doi.org/10.1002/cne.20202)
- Hansen A., Finger T.E. 2000. Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes. *Brain, Behavior and Evolution* 55(2): 100-110. DOI: [10.1159/000006645](https://doi.org/10.1159/000006645)

- Hansen A., Rolen S.H., Anderson K. et al. 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. *The Journal of Neuroscience*. 23: 9328–9339. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.23-28-09328.2003](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09328.2003)
- Hansen A., Zeiske E. 1998. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chemical Senses* 23(1): 39–48. DOI: [10.1093/chemse/23.1.39](https://doi.org/10.1093/chemse/23.1.39)
- Hansen A., Zielinski B.S. 2005. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of Neurocytology* 34(3–5): 183–208. DOI: [10.1007/s11068-005-8353-1](https://doi.org/10.1007/s11068-005-8353-1)
- Hara T.J. 2006. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *Journal of Fish Biology* 68: 810–825
- Imamura F., Ito A., LaFever B.J. 2020. Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Frontiers in Neural Circuits*. 14: 561822. DOI: [10.3389/fncir.2020.561822](https://doi.org/10.3389/fncir.2020.561822)
- Kasumyan A.O. 2004. The olfactory system in fish: structure, function, and role in behavior. *Journal of Ichthyology* 44(2): S180
- Kasumyan A.O., Marusov E.A. 2018. Odor Stimulation and Relation to Taste Stimuli in the Blind Cave Fish *Astyanax fasciatus*. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 45: 557–563. DOI: [10.1134/S1062359018060043](https://doi.org/10.1134/S1062359018060043)
- Keller-Costa T., Canário A.V., Hubbard P.C. 2014. Olfactory sensitivity to steroid glucuronates in Mozambique tilapia suggests two distinct and specific receptors for pheromone detection. *The Journal of Experimental Biology* 217(Pt 23): 4203–4212. DOI: [10.1242/jeb.111518](https://doi.org/10.1242/jeb.111518)
- Klimenkov I.V., Sudakov N.P., Pastukhov M.V. et al. 2018. Rearrangement of Actin Microfilaments in the Development of Olfactory Receptor Cells in Fish. *Scientific Reports* 8(1): 3692. DOI: [10.1038/s41598-018-22049-7](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22049-7)
- Klimenkov I.V., Sudakov N.P., Pastukhov M.V. et al. 2020. The Phenomenon of Compensatory Cell Proliferation in Olfactory Epithelium in Fish Caused by Prolonged Exposure to Natural Odorants. *Scientific Reports* 10: 8908. DOI: [10.1038/s41598-020-65854-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65854-9)
- Kocagöz Y., Demirler M.C., Eski S.E. et al. 2022. Disparate progenitor cell populations contribute to maintenance and repair neurogenesis in the zebrafish olfactory epithelium. *Cell and Tissue Research* 388(2): 331–358. DOI: [10.1007/s00441-022-03597-x](https://doi.org/10.1007/s00441-022-03597-x)
- Korsching S. I. 2009. The molecular evolution of teleost olfactory receptor gene families. *Results and Problems in Cell Differentiation* 47: 37–55. DOI: [10.1007/400_2008_11](https://doi.org/10.1007/400_2008_11)
- Korsching S.I. 2020. Taste and smell in zebrafish. In: Fritzsche B., Meyerhof W. (Eds.) *The senses: a comprehensive reference*. vol. 3. Cambridge: Elsevier Academic Press, p. 466–492
- Kowatschew D., Bozorg Nia S., Hassan S. et al. 2022. Spatial organization of olfactory receptor gene choice in the complete V1R-related ORA family of zebrafish. *Scientific Reports* 12(1): 14816. DOI: [10.1038/s41598-022-17900-x](https://doi.org/10.1038/s41598-022-17900-x)
- Kowatschew D., Korsching S.I. 2021. An Ancient Adenosine Receptor Gains Olfactory Function in Bony Vertebrates. *Genome Biology and Evolution* 13(9): evab211. DOI: [10.1093/gbe/evab211](https://doi.org/10.1093/gbe/evab211)
- Kowatschew D., Korsching S.I. 2022. Lamprey possess both V1R and V2R olfactory receptors, but only V1Rs are expressed in olfactory sensory neurons. *Chemical Senses* 47: bjac007. DOI: [10.1093/chemse/bjac007](https://doi.org/10.1093/chemse/bjac007)
- Lazzari M., Bettini S., Ciani F. et al. 2007. Light and transmission electron microscopy study of the peripheral olfactory organ of the guppy, *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae). *Microscopy Research and Technique* 70(9): 782–789. DOI: [10.1002/jemt.20487](https://doi.org/10.1002/jemt.20487)
- Lazzari M., Bettini S., Milani L. et al. 2022. Response of Olfactory Sensory Neurons to Mercury Ions in Zebrafish: An Immunohistochemical Study. *Microscopy and Microanalysis* 28(1): 227–242. DOI: [10.1017/S1431927621013763](https://doi.org/10.1017/S1431927621013763)
- Li C.Y., Lawrence K., Merlo-Coyne J. et al. 2023. Prostaglandin F2 α drives female pheromone signaling in cichlids, revealing a basis for evolutionary divergence in olfactory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120(1): e2214418120. DOI: [10.1073/pnas.2214418120](https://doi.org/10.1073/pnas.2214418120)
- Li W., Sorensen P.W., Gallaher D.D. 1995. The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to unique bile acids released by conspecific larvae. *The Journal of General Physiology* 105(5): 569–587. DOI: [10.1085/jgp.105.5.569](https://doi.org/10.1085/jgp.105.5.569)
- Lipschitz D.L., Michel W.C. 2002. Amino acid odorants stimulate microvillar sensory neurons. *Chemical Senses* 27(3): 277–286. DOI: [10.1093/chemse/27.3.277](https://doi.org/10.1093/chemse/27.3.277)
- Matsunami H., Buck L.B. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90: 775–784
- Michel W.C., Sanderson M.J., Olson J.K. et al. 2003. Evidence of a novel transduction pathway mediating detection of polyamines by the zebrafish olfactory system. *The Journal of Experimental Biology* 206: 1697–1706
- Mombaerts P. 2006. Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 713–737. DOI: [10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915)
- Oka Y. 2023. Neural Control of Sexual Behavior in Fish. *Zoological Science* 40(2): 128–140. DOI: [10.2108/zs220108](https://doi.org/10.2108/zs220108)
- Pfister P., Rodriguez I. 2005. Olfactory expression of a single and highly variable V1r pheromone receptor-like gene in fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 5489–5494
- Pintos S., Rincon-Camacho L., Pandolfi M. et al. 2020. Morphology and immunohistochemistry of the olfactory organ in the bloodfin tetra, *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). *Journal of Morphology* 281(8): 986–996. DOI: [10.1002/jmor.21227](https://doi.org/10.1002/jmor.21227)
- Policarpo M., Bemis K.E., Laurenti P. et al. 2022. Coevolution of the olfactory organ and its receptor repertoire in ray-finned fishes. *BMC Biology* 20: 195. DOI: [10.1186/s12915-022-01397-x](https://doi.org/10.1186/s12915-022-01397-x)
- Rincón-Camacho L., Jungblut L.D., Pandolfi M. et al. 2022. Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of the olfactory organ cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). *Journal of Morphology* 283(6): 815–826. DOI: [10.1002/jmor.21473](https://doi.org/10.1002/jmor.21473)
- Rolen S.H., Sorensen P.W., Mattson D. et al. 2003. Polyamines as olfactory stimuli in the goldfish *Carassius auratus*. *The Journal of Experimental Biology* 206(Pt 10): 1683–1696. DOI: [10.1242/jeb.00338](https://doi.org/10.1242/jeb.00338)
- Saraiva L., Ahuja G., Ivandic I. et al. 2015. Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Scientific Reports* 5: 11487. DOI: [10.1038/srep11487](https://doi.org/10.1038/srep11487)
- Saraiva L.R., Korsching S.I. 2007. A novel olfactory receptor gene family in teleost fish. *Genome Research* 17(10): 1448–1457. DOI: [10.1101/gr.6553207](https://doi.org/10.1101/gr.6553207)
- Sato K., Sorensen P.W. 2018. The Chemical Sensitivity and Electrical Activity of Individual Olfactory Sensory Neurons to a Range of Sex Pheromones and Food Odors in the Goldfish. *Chemical Senses* 43(4): 249–260. DOI: [10.1093/chemse/bjy016](https://doi.org/10.1093/chemse/bjy016)
- Sato K., Suzuki N. 2001. Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. *Chemical Senses* 26(9): 1145–1156. DOI: [10.1093/chemse/26.9.1145](https://doi.org/10.1093/chemse/26.9.1145)
- Sato Y., Miyasaka N., Yoshihara Y. 2005. Mutually

exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *The Journal of Neuroscience* 25: 4889–4897. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.0679-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0679-05.2005)

Sato Y., Miyasaka N., Yoshihara Y. 2007. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *Journal of Neuroscience* 27(7): 1606–1615. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.4218-06.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4218-06.2007)

Schmachtenberg O. 2006. Histological and electrophysiological properties of crypt cells from the olfactory epithelium of the marine teleost *Trachurus symmetricus*. *The Journal of Comparative Neurology* 495(1): 113–121. DOI: [10.1002/cne.20847](https://doi.org/10.1002/cne.20847)

Schwob J.E. 2002. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *The Anatomical Record* 269(1): 33–49. DOI: [10.1002/ar.10047](https://doi.org/10.1002/ar.10047)

Shao X., Lakhina V., Dang P. et al. 2017. Olfactory sensory axons target specific protoglomeruli in the olfactory bulb of zebrafish. *Neural Development* 12: 18. DOI: [10.1186/s13064-017-0095-0](https://doi.org/10.1186/s13064-017-0095-0)

Smith T.D., Bhatnagar K.P. 2019. Anatomy of the olfactory system. *Handbook of Clinical Neurology* 164: 17–28. doi: [10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2)

Sorensen P.W., Hara T.J., Stacey N.E. et al. 1988. F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biology of Reproduction*. 39(5): 1039–1050. DOI: [10.1095/biolreprod39.5.1039](https://doi.org/10.1095/biolreprod39.5.1039)

Sorensen P.W., Pinillos M., Scott A.P. 2005. Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology* 140(3): 164–175. DOI: [10.1016/j.ygcen.2004.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.006)

Specia D.J., Lin D.M., Sorensen P.W. 1999. Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* 23:487–498

Thommesen G. 1983. Morphology, distribution, and specificity of olfactory receptor cells in salmonid fishes. *Acta*

Physiologica Scandinavica. 117(2): 241–249. DOI: [10.1111/j.1748-1716.1983.tb07203.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1983.tb07203.x)

Valdés J., Olivares J., Ponce D. et al. 2015. Analysis of olfactory sensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals their ability to detect lactic acid, pyruvic acid and four B vitamins. *Fish Physiology and Biochemistry* 41: 879–885. DOI: [10.1007/s10695-015-0054-9](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0054-9)

Vielma A., Ardiles A., Delgado L. et al. 2008. The elusive crypt olfactory receptor neuron: evidence for its stimulation by amino acids and cAMP pathway agonists. *The Journal of Experimental Biology* 211(Pt 15): 2417–2422. DOI: [10.1242/jeb.018796](https://doi.org/10.1242/jeb.018796)

Villamayor P.R., Arana Á.J., Coppel C. et al. 2021. A comprehensive structural, lectin and immunohistochemical characterization of the zebrafish olfactory system. *Scientific Reports* 11: 8865. DOI: [10.1038/s41598-021-88317-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-88317-1)

Wagner C.M., Bals J.D., Byford G.J. et al. 2023. Olfactory sensitivity and threat-sensitive responses to alarm cue in an invasive fish. *Biological Invasions* 25: 3083–3101. DOI: [10.1007/s10530-023-03092-6](https://doi.org/10.1007/s10530-023-03092-6)

Wakisaka N., Miyasaka N., Koide T. et al. 2017. An Adenosine Receptor for Olfaction in Fish. *Current Biology* 27(10): 1437–1447.e4. DOI: [10.1016/j.cub.2017.04.014](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.014)

Yamamoto M. 1982. Comparative morphology of the peripheral olfactory organ in teleosts. In: *Chemoreception in Fishes*. Hara T.J. (Ed.). Elsevier Science, Amsterdam, pp. 39–59

Yoshihara Y. 2014. Zebrafish Olfactory System. In: *The Olfactory System*. Mori, K. (Ed.). Springer, Tokyo, pp. 71–96. DOI: [10.1007/978-4-431-54376-3_5](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54376-3_5)

Zeiske E., Theisen B., Breucker H. 1992. Structure, development, and evolutionary aspects of the peripheral olfactory system. In: *Fish Chemoreception*. Hara T.J. (Ed.). Chapman & Hall, London, pp. 13–39

Zhu P., Tian Y., Chen Y. et al. 2021. Olfactory Optogenetics: Light Illuminates the Chemical Sensing Mechanisms of Biological Olfactory Systems. *Biosensors (Basel)* 11(9): 309. DOI: [10.3390/bios11090309](https://doi.org/10.3390/bios11090309)

Summer phytoplankton species composition and abundance in the southern basin of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir

Firsova A.*, Galachyants Yu., Bessudova A., Mikhailov I., Titova L., Marchenkov A., Hilkanova D., Nalimova M., Buzevich V., Likhoshway Ye.

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

ABSTRACT. Phytoplankton has higher species richness in summer, when water temperatures are higher than in other seasons in aquatic ecosystems. Here, we characterized phytoplankton communities using microscopy and environmental parameters (temperature, pH, transparency) in the southern basin of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir, which is directly connected with the lake as it is the upper part of Angara River, the Lake Baikal outlet. Surface water temperature was 10.1-18.4 °C in the southern basin of Lake Baikal and 14.9-20.0 °C was in Irkutsk Reservoir, pH values were similar both in the lake and the reservoir (8.09-8.44 and 7.96-8.28, respectively), and Secchi disc water transparency was 4.5-9.0 m in the lake and 2.5-4.5 m in the reservoir. The phytoplankton community included 104 species from 7 high-rank taxa such as Chrysophyta (36), Chlorophyta (30), Bacillariophyta (22), Cyanobacteria (11), Cryptophyta (2), Dinophyta (2), and Haptophyta (1). Species composition of summer phytoplankton communities of the Irkutsk Reservoir and the southern basin of Lake Baikal were different, however the community composition in terms of high-level phylotypes was very similar. At the same time, a large number of small-cell cyanobacteria were identified in the lake. A high species richness of Chrysophyta, genus *Dinobryon* (11 species) and silica-scaled chrysophytes (22) was founded. The composition of dominant species of the southern basin of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir became wider compared to data published earlier, and included *Cyanodictyon planctonicum*, *Cyanodictyon* sp., *Microcystis* sp., *Dinobryon sociale*, *Dinobryon sociale* var. *americanum*, *Chlorella vulgaris* and *Mychonastes homosphaera*.

Keywords: Lake Baikal, Irkutsk Reservoir, phytoplankton

1. Introduction

Phytoplankton is the basis of the food web in aquatic ecosystems and a sensitive indicator of environmental changes. During the formation of reservoirs, changes occur in the composition of its phytoplankton community (Shchur, 2009; Korneva, 2015; Nogueira et al., 2010; Mikhailov, 2020). The reservoir, located within the city, is under anthropogenic influence. Therefore, monitoring of its condition is very important. An increase in water temperature in the reservoir causes an increase in the diversity of summer phytoplankton species, including due to cyanobacteria and green microalgae (Vorobyova, 1995; Popovskaya and Firsova, 2005; Shchur, 2009; Popovskaya et al., 2012; Korneva, 2015; Mikhailov, 2020; Obertegger et al., 2022). Studies of the phytoplankton were carried out both before formation of the Irkutsk Reservoir, in Angara River (Yasnitsky, 1926), and after (Vasilyeva and

Kozhova, 1960; Vasilyeva and Kozhova, 1963; Kozhova, 1964; Vorobyova, 1981; 1985; 1995; Popovskaya et al., 2012). These studies show that the dominant composition of phytoplankton in the Irkutsk Reservoir depends on the phytoplankton of Lake Baikal. Recent studies conducted in June 2023 (Firsova et al., 2023; Bessudova et al., 2023b) showed that since the creation of the reservoir, there has been a slight increase in the species richness of the phytoplankton community. The main part of the dominant phytoplankton complex remained the same, and still depended on Baikal waters, however richness increased at the expense of other species. Additionally, communities sampled in June 2023 (Firsova et al., 2023), were shown to divide into two groups. One of the groups included all Baikal communities and the Burduguz sample of the Irkutsk Reservoir. All other phytoplankton communities from the Irkutsk Reservoir fell into the second group.

*Corresponding author.

E-mail address: adfir71@yandex.ru (A. Firsova)

Received: December 02, 2023; **Accepted:** December 12, 2023;
Available online: December 18, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



The Irkutsk Reservoir had the highest diversity of chrysophytes compared to other reservoirs of the Angara cascade, since it is the coldest and less trophic (Vorobyova, 1995). In summer, the temperature in the reservoir averaged 8.3–16.2 °C, species diversity increased, and biomass rarely exceeded 1 g/m³. As a rule, species of the genus *Dinobryon* Ehrenberg, *Asterionella formosa* Hassall, *Chroomonas acuta* Utermöhl, *Stephanodiscus minutulus* (Kützing) Cleve & Möller, *Nitzschia graciliformis* Lange-Bertalot & Simonsen dominate during this period.

In the second half of August, intensive bloom of *Anabaena lemmermannii* P.G. Richter was previously observed (Vorobyova, 1995; Popovskaya et al., 2012). The purpose of this study is to determine the species composition, structure, abundance and biomass of summer phytoplankton in the southern basin of Lake Baikal and in the Irkutsk Reservoir.

2. Methods

Samples were collected in August 17–20, 2023, from the board of a research vessel “Papanin” at 9 stations in the southern basin of Lake Baikal (South Baikal) and at 8 stations in Irkutsk Reservoir, including bays (Fig. 1, Table 1), at the same stations as in June 2023 (Firsova et al., 2023). Water transparency (S) was measured with a Secchi disc. Water samples were collected with a 5 L Niskin bottle (Volta, Moscow, Russia). Water temperature, redox potential (Eh) and pH were measured with a pH-410 field device (Aquilon, Moscow, Russia) at each sampling depth. Values from each depth were then averaged and phytoplankton was studied by light and scanning electron microscopy as described previously (Bessudova et al., 2023b; Firsova et al., 2023).

Exploratory analysis of community composition was performed using R package *vegan* v.2.5-6 (Oksanen et al., 2022). For exploratory analyses, the phytoplankton species abundance and biomass data were transformed with the Hellinger procedure (Legendre and Gallagher, 2001). Environmental factors and summarized numerical values of biomass and abundance of phytoplankton were analyzed for collinearity. Pearson correlation coefficients and their *p*-values were computed for each pair of explanatory variables using R packages *rcorr* and *Hmisc*. The correlation matrix was visualized with R package *rcorr* using hierarchical clustering to group variables. Next, data on biomass and abundance of phytoplankton were excluded from the analysis, and environmental variables were centered and scaled to have zero means and standard deviations of one. This standardized environmental matrix was used for the constrained ordination of phytoplankton species abundance and biomass using redundancy analysis (RDA). Species presence/absence data was also analyzed by constrained correspondence analysis (CCA). Both forward selection and backward elimination approaches were tested to produce a model.

3. Results

3.1. Environmental parameters

In August 2023, environmental parameters of South Baikal and Irkutsk Reservoir changed (Table 1) relative to June 2023 (Firsova et al., 2023). Thus, in August, surface water temperature was 10.1–18.4 °C in the lake and 14.9–20.0 °C in the reservoir (3.6–5.0 °C and 6.0–12.7 °C in June, respectively). In August, pH values were similar both in the lake and the reservoir, 8.09–8.44 and 7.96–8.28, respectively, in contrast with June when water was higher in the reservoir (8.0 до 8.7) than in the lake (7.0–8.0). Water transparency in South Baikal decreased in August (4.5–9.0 m) compared to June (10–22 m), the same was for Irkutsk Reservoir (3.0–5.0 m in June, 2.5–4.5 m in August).

3.2. General characteristics of summer phytoplankton

We found in South Baikal and Irkutsk Reservoir in total 104 species from 7 high-rank taxa of phytoplankton (Fig. 2, Table 2). Chrysophyta (36 species) and Chlorophyta (30) had the highest species richness, compared with Bacillariophyta (22), Cyanobacteria (11), Cryptophyta (2) and Dinophyta (2), and Haptophyta (1).

The total abundance and biomass of phytoplankton in South Baikal varied significantly from 190×10^3 to 2779×10^3 cells/L and 26 to 427 mg/m³, respectively (Fig. 2). The highest abundance was recorded at St. 1 (12 km from Kultuk) due to a bloom of three small-cell species such as *Cyanodictyon planctonicum*, *Cyanodictyon* sp. и *Microcystis* sp., therefore, the total biomass did not exceed 107×10^3 cells/L despite the highest abundance. At St. 3, the highest biomass was determined by *Dinobryon* species. The total abundance and biomass of phytoplankton in Irkutsk Reservoir were lower than in South Baikal, 186×10^3 to 310×10^3 cells/L and 41 to 140 mg/m³, respectively (Fig. 3).

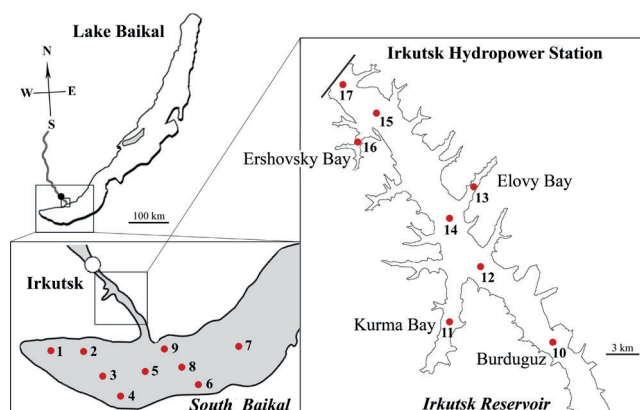


Fig.1. Sampling scheme.

Table 1. Sampling sites and environmental parameters in August 2023.

St. No.	Station Name	Date, dd.mm.yy	Coordinates N/E	Max depth, m	S, m	Eh	Depth, m	Water T, °C	pH
South Baikal									
1	12 km from Kultuk	17.08.23	51 ° 40.578' / 103 ° 52.309'	1252	6.5	-65,9	0	17.3	8.25
							5	17.3	8.37
							10	17.2	8.34
							15	17.0	8.33
							20	15.0	8.25
							25	10.0	8.44
2	3 km from Marituy	17.08.23	51 ° 45.546' / 104 ° 13.222'	1337	7.5	-66,0	0	16.9	8.33
							5	16.0	8.36
							10	15.2	8.30
							15	11.6	8.47
							20	7.7	8.50
							25	5.6	8.17
3	Marituy-Solzan	17.08.23	51 ° 38.710' / 104 ° 13.715'	1243	5.5	-72,6	0	17.5	8.40
							5	16.6	8.42
							10	10.3	8.85
							15	6.1	8.83
							20	5.0	8.25
							25	4.4	8.16
4	3 km from Solzan	17.08.23	51 ° 31.428' / 104 ° 14.417'	350	5.0	-68,2	0	18.4	8.44
							5	18.0	8.42
							10	17.3	8.36
							15	14.4	8.30
							20	12.1	8.44
							25	9.6	8.37
5	Cape Tolsty-Snezhnaya River	18.08.23	51 ° 36.402' / 104 ° 44.147'	1120	6.5	-19,5	0	16.0	8.26
							5	15.8	8.44
							10	13.9	8.57
							15	6.0	8.78
							20	5.0	8.34
							25	4.6	8.19
6	3 km from Tankhoi	18.08.23	51 ° 35.440' / 105 ° 06.968'	1402	8.5	-86,9	0	18.0	8.40
							5	17.7	8.40
							10	17.2	8.41
							15	16.7	8.07
							20	15.0	8.40
							25	13.0	8.43
7	Cape Kadilny-Mishikha	18.08.23	51 ° 46.731' / 105 ° 22.528'	1424	4.5	-58,4	0	17.7	8.37
							5	16.0	8.42
							10	12.5	8.34
							15	6.5	8.10
							20	5.7	8.00
							25	5.2	8.03

St. No.	Station Name	Date, dd.mm.yy	Coordinates N/E	Max depth, m	S, m	Eh	Depth, m	Water T, °C	pH
8	Listvyanka-Tankhoi	18.08.23	51 ° 42.262′/ 105 ° 00.720′	700	6.5	-39,5	0	17.4	8.29
							5	17.1	8.39
							10	15.8	8.32
							15	13.3	8.29
							20	10.5	8.27
							25	6.6	8.01
9	3 km from Listvyanka	18.08.23	51 ° 49.033′/ 104 ° 54.616′	1434	9.0	-46,5	0	10.1	8.09
							5	8.2	8.09
							10	5.9	8.06
							15	4.8	8.00
							20	4.6	7.93
							25	4.5	7.97
Irkutsk Reservoir									
10	Burduguz	19.08.23	52 ° 04.105′/ 104 ° 59.451′	15.5	4.5	-43,6	0	14.9	7.96
							5	10.5	7.96
							10	8.5	7.96
11	Kurma Bay	19.08.23	52 ° 06.845′/ 104 ° 45.926′	9.7	3.0	-58,6	0	18.7	8.12
							5	18.0	8.23
12	center against Kurma Bay	19.08.23	52 ° 10.874′/ 104 ° 47.935′	17	3.5	-58,2	0	17.7	8.16
							5	17.4	8.29
							10	14.9	8.19
13	Elovy Bay	19.08.23	52 ° 09.906′/ 104 ° 29.172′	10	2.5	-47,4	0	18.5	7.98
							5	16.4	8.03
14	center against Elovy Bay	19.08.23	52 ° 14.548′/ 104 ° 45.243′	25	3.5	-65,5	0	20.0	8.27
							5	18.5	8.42
							10	16.0	8.22
15	center against Ershovsky Bay	20.08.23	52 ° 21.511′/ 104 ° 37.550′	27	3.5	-55,8	0	18.0	8.13
							5	17.3	8.20
							10	16.4	8.13
16	Ershovsky Bay	20.08.23	52 ° 20.851′/ 104 ° 34.439′	16	3.0	-53,0	0	18.9	8.28
							5	17.9	8.08
							10	16.6	7.93
17	head water	20.08.23	52 ° 23.478′/ 104 ° 33.722′	25	3.5	-56,1	0	18.6	8.16
							5	17.6	8.25
							10	15.8	8.07

Table 2. Distribution of phytoplankton species in South Baikal and Irkutsk Reservoir in August 2023. “+” — the presence of this species. Species whose abundance exceeded 10, 50, 100 × 10³ cells/L are highlighted in colors corresponding. The color gradation is darker as the number increases. Station names in Fig. 1

Species	South Baikal									Irkutsk Reservoir							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Cyanobacteria																	
<i>Anabaena</i> sp.																	+
<i>Aphanothece</i> sp.	+		+	+	+		+			+	+		+			+	
<i>Cyanodictyon</i> sp.	+			+									+				
<i>Cyanodictyon planctonicum</i> B.A. Mayer	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> (Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Hoffmann & Komárek						+	+			+	+				+	+	+
<i>Dolichospermum lemmermannii</i> (Richter) P. Wacklin, L. Hoffmann & J. Komárek	+		+	+	+		+	+			+	+	+	+	+		+
<i>Dolichospermum scheremetieviae</i> (Elenkin) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek														+	+		
<i>Limnococcus limneticus</i> (Lemmermann) Komárková, Jezberová, O. Komárek & Zapomelová						+											
<i>Microcystis</i> sp.	+	+	+	+	+							+					
<i>Microcystis pulverea</i> (H.C.Wood) Forti											+		+				
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher				+								+					
Cryptophyta																	
<i>Komma caudata</i> (L. Geitler) D.R.A. Hill	+	+	+	+	+		+										
<i>Rhodomonas pusilla</i> (Bachmann) Javornický		+	+				+			+			+				
Dinophyta																	
<i>Ceratium hirundinella</i> (O.F. Müller) Dujardin				+						+	+	+		+		+	+
<i>Glenodinium</i> sp.	+		+	+		+	+			+							
Haptophyta																	
<i>Chrysochromulina parva</i> Lackey				+													
Chrysophyta																	
<i>Chrysosphaerella coronacircumspina</i> Wujek & Kristiansen	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Chrysosphaerella brevispina</i> Korshikov															+		
<i>Dinobryon bavaricum</i> Imhof	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
<i>Dinobryon crenulatum</i> West & G.S. West	+		+														
<i>Dinobryon cylindricum</i> O.E. Imhof		+	+	+	+	+	+										
<i>Dinobryon cylindricum</i> var. <i>palustre</i> Lemmermann		+	+			+											
<i>Dinobryon divergens</i> O.E. Imhof		+		+							+			+		+	+
<i>Dinobryon korshikovii</i> Matvienko ex Kapustin	+	+		+	+		+			+	+	+		+	+	+	+
<i>Dinobryon pediforme</i> (Lemmermann) Steinecke	+			+	+	+	+										
<i>Dinobryon sociale</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Dinobryon sociale</i> var. <i>americanum</i> (Brunnthal) Bachmann	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Dinobryon stipitatum</i> Stein	+		+		+	+											

Species	South Baikal									Irkutsk Reservoir							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Dinobryon suecicum</i> var. <i>longispinum</i> Lemmermann		+				+	+	+				+					
<i>Kephyrion</i> sp.					+												
<i>Kephyrion littorale</i> J.W.G. Lund	+			+	+		+	+									
<i>Kephyrion spirale</i> (Lackey) Conrad				+		+	+										
<i>Paraphysomonas gladiata</i> Preisig & Hibberd	+		+	+	+	+		+		+	+			+	+	+	+
<i>Paraphysomonas uniformis</i> subsp. <i>hemiradia</i> Scoble & Cavalier-Smith														+	+		+
<i>Paraphysomonas</i> sp.								+		+				+	+	+	
<i>Lepidochromonas butcheri</i> (Pennick & Clarke) Kapustin & Guiry																+	
<i>Spiniferomonas abrupta</i> Nielsen					+		+		+						+		
<i>Spiniferomonas cornuta</i> Balonov	+		+	+		+	+	+		+	+			+	+	+	
<i>Spiniferomonas bourrellyi</i> Takahashi	+		+	+		+		+		+		+	+		+	+	+
<i>Spiniferomonas takahashii</i> (Nicholls) Preisig & Hibberd				+			+	+		+	+	+			+		
<i>Spiniferomonas trioralis</i> (E. Takahashi) Preisig & Hibberd	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Spiniferomonas trioralis</i> f. <i>cuspidata</i> Balonov	+		+			+			+	+							
<i>Spiniferomonas septispina</i> Nicholls				+						+				+	+		
<i>Spiniferomonas silverensis</i> Nicholls											+			+	+	+	
<i>Mallomonas acaroides</i> Perty							+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mallomonas alpina</i> Pascher & Ruttner		+		+		+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Mallomonas crassisquama</i> (Asmund) Fott											+						
<i>Mallomonas tonsurata</i> Teiling	+		+		+	+				+	+	+	+	+	+	+	
<i>Mallomonas vannigera</i> Asmund																+	
<i>Synura</i> sp. 1					+	+					+			+		+	
<i>Synura</i> sp. 2											+					+	
<i>Synura</i> cf. <i>glabra</i>											+		+	+	+		+
Bacillariophyta																	
<i>Acanthoceras zachariasii</i> (Brun) Simonsen										+	+					+	+
<i>Asterionella formosa</i> Hassall	+						+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aulacoseira baicalensis</i> (K.I. Meyer) Simonsen			+	+	+	+			+	+			+	+	+		+
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (O. Müller) Simonsen					+		+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aulacoseira islandica</i> (O. Müller) Simonsen						+					+	+	+	+		+	+
<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grunow) Simonsen										+					+	+	
<i>Cyclostephanos dubius</i> (Hustedt) Round	+		+	+	+		+	+		+	+			+	+	+	+
<i>Cyclostephanos makarovae</i> (S.I. Genkal) K. Schultz	+	+		+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Discostella pseudostelligera</i> (Hustedt) Houk & Klee				+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières										+	+	+		+	+	+	+
<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton																+	
<i>Fragilaria radians</i> (Kützing) D.M. Williams & Round		+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hannaea baicalensis</i> Genkal, Popovskaya & Kulikovskiy										+				+		+	+

Species	South Baikal									Irkutsk Reservoir							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Lindavia baicalensis</i> (Skvortsov & K.I.Meyer) Nakov, Guillory, M.L. Julius, E.C. Theriot & A.J. Alverson	+	+		+	+	+											
<i>Lindavia minuta</i> (Skvortzov) T. Nakov & al.	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nitzschia graciliformis</i> Lange-Bertalot & Simonsen	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grunow										+						+	
<i>Stephanodiscus meyeri</i> Genkal & Popovskaya			+								+					+	+
<i>Stephanodiscus minutulus</i> (Kützing) Cleve & Möller	+	+		+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle & Heimdal				+		+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Ulnaria acus</i> (Kützing) Aboal							+		+	+				+	+	+	
<i>Urosolenia eriensis</i> (H.L. Smith) Round & R.M. Crawford										+					+	+	
Chlorophyta																	
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> Korshikov	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chlamydomonas</i> sp.		+															
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck		+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Coenococcus planctonicus</i> Korshikov	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+				
<i>Coenocystis</i> sp.										+		+		+	+	+	+
<i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchner) E.H. Hegewald	+				+												+
<i>Desmodesmus armatus</i> (Chodat) E.H. Hegewald											+						
<i>Desmodesmus bicaudatus</i> (Dedusenko) P.M. Tsarenko	+						+				+						
<i>Desmodesmus communis</i> (E. Hegewald) E. Hegewald	+									+	+	+		+		+	+
<i>Desmodesmus intermedius</i> (Chodat) E. Hegewald																+	+
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> Nägeli					+												
<i>Elakatothrix genevensis</i> (Reverdin) Hindák	+		+			+	+	+		+	+		+	+	+	+	+
<i>Franceia ovalis</i> (Francé) Lemmermann												+					
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) Möbius						+	+				+			+	+	+	
<i>Koliella longiseta</i> (Vischer) Hindák	+		+							+	+		+	+		+	+
<i>Koliella variabilis</i> (Nygaard) Hindák	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
<i>Lagerheimia genevensis</i> (Chodat) Chodat				+						+	+	+			+		+
<i>Monoraphidium circinale</i> (Nygaard) Nygaard	+	+	+	+													
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+
<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+
<i>Monoraphidium minutum</i> (Nägeli) Komárková-Legnerová	+	+		+			+	+		+		+		+		+	+
<i>Mychonastes homosphaera</i> (Skuja) Kalina & Puncová	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
<i>Pseudopediastrium</i> aff. <i>integrum</i> (Nägeli) M. Jena & C.Bock			+														
<i>Stauridium tetras</i> (Ehrenberg) E. Hegewald				+						+		+			+		

Species	South Baikal									Irkutsk Reservoir							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Scenedesmus</i> sp.	+						+						+				
<i>Scenedesmus ecornis</i> (Ehrenberg) Chodat	+		+		+	+	+	+		+		+		+	+		+
<i>Scenedesmus obtusus</i> Meyen														+			
<i>Sphaerocystis</i> sp.	+	+		+							+						
<i>Tetraëdron minimum</i> (A. Braun) Hansgirg							+					+					
<i>Tetraëdron trigonum</i> f. <i>gracile</i> (Reinsch) De Toni														+		+	
Total	45	32	37	48	35	39	44	31	21	50	50	40	29	48	47	55	46

Note:
Approximate concentration, $\times 10^3$ cells/L

Cyanobacteria	10	50	100
Chrysophyta	10	50	100
Bacillariophyta	10	+	+
Chlorophyta	10	50	+

3.3. Phytoplankton species composition of South Baikal

The species richness of phytoplankton at South Baikal varied within 21-48 species (Fig. 2, Table 2). Chrysophyta included 27 species and intraspecies of which 15 were silica-scaled chrysophytes. Chlorophyta included 24 species followed by diatoms (15), Cyanobacteria (8), Cryptophyta (2), Dinophyta (2), and Haptophyta (1) (Fig. 2, Table 2).

The most abundant were cyanobacteria such as *Cyanodictyon planctonicum* (840×10^3 cells/L at St. 1), *Microcystis* sp. (833×10^3 cells/L at St. 1), *Cyanodictyon* sp. (768×10^3 cells/L at St. 1) and *Dolichospermum lemmermannii* (25×10^3 cells/L at St. 1). As for large-cell chrysophycean species, *Dinobryon bavaricum* (109×10^3 cells/L at St. 4), *Dinobryon cylindricum* var. *palustre* (54×10^3 cells/L at St. 3), *Dinobryon sociale* (80×10^3 cells/L at St. 6), *Dinobryon sociale* var. *americanum* (93×10^3 cells/L at St. 3), *Dinobryon cylindricum* (27×10^3 cells/L at St. 3) (Figs 4, 5) played a prominent role. Among Chlorophyta, three species, *Ankistrodesmus arcuatus* (42×10^3 cells/L at St. 4), *Monoraphidium griffithii* (30×10^3 cells/L at St. 7) and *Mychonastes homosphaera* (42×10^3 cells/L at St. 4) prevailed both in abundance and biomass (Figs 4, 5). Bacillariophyta had a low abundance (less than 10×10^3 cells/L).

Warm-water diatom *Asterionella formosa* (12×10^3 cells/L) was only on St. 1 (Fig. 4).

3.4. Phytoplankton species composition of Irkutsk Reservoir

Phytoplankton species composition of Irkutsk Reservoir was similar to South Baikal, but its abundance is lower and its species richness is higher (29–50 species) (Fig. 2, Table 2). Chrysophyta included 27

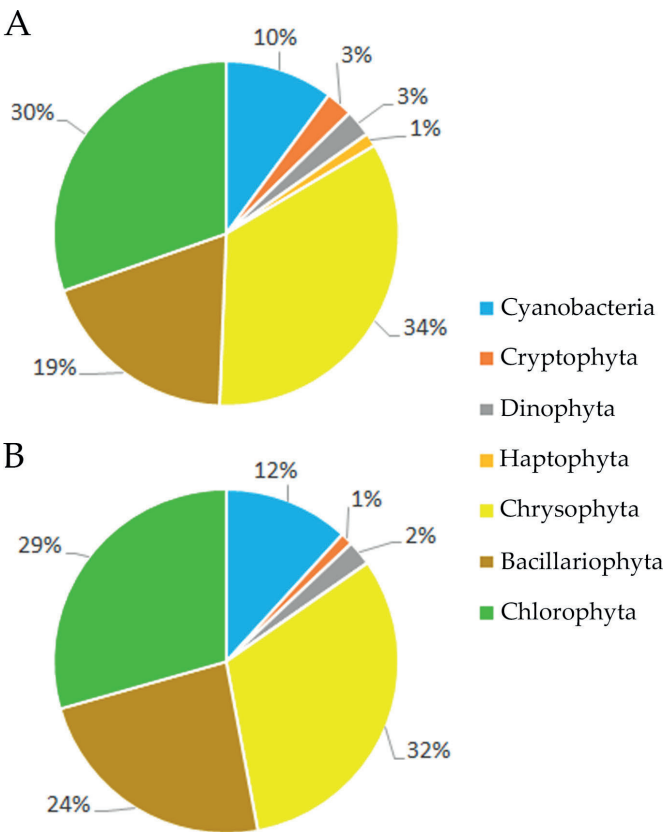


Fig.2. Relative abundance of high-rank phytoplankton taxa based on number of their species and intraspecies in South Baikal (A) and Irkutsk Reservoir (B) in August 2023.

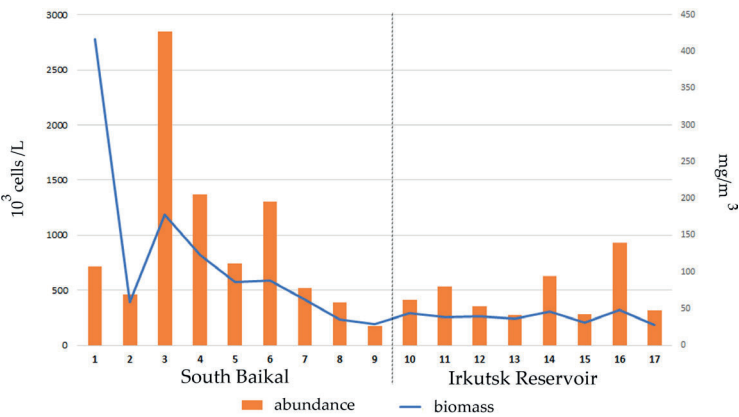


Fig.3. Distribution of phytoplankton abundance and biomass in South Baikal and Irkutsk Reservoir in August 2023.

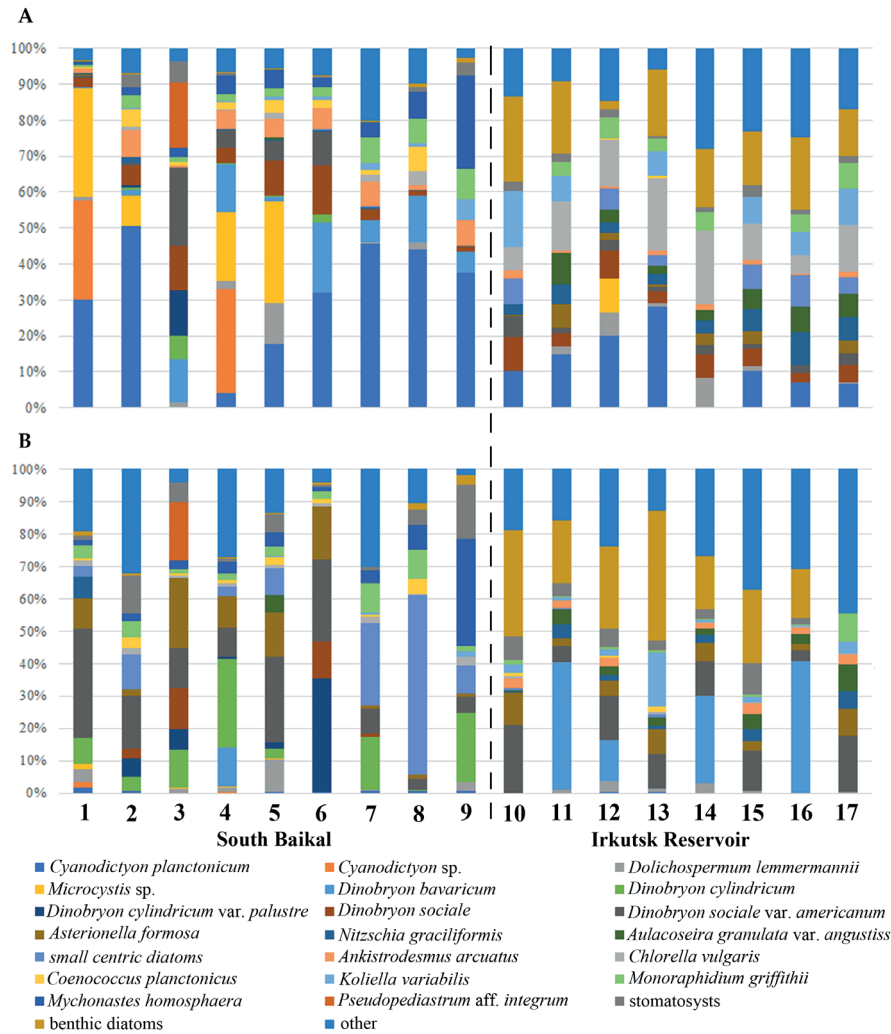


Fig.4. Distribution of relative abundance (A) and relative biomass (B) of dominant phytoplankton species in South Baikal and Irkutsk Reservoir in August 2023.

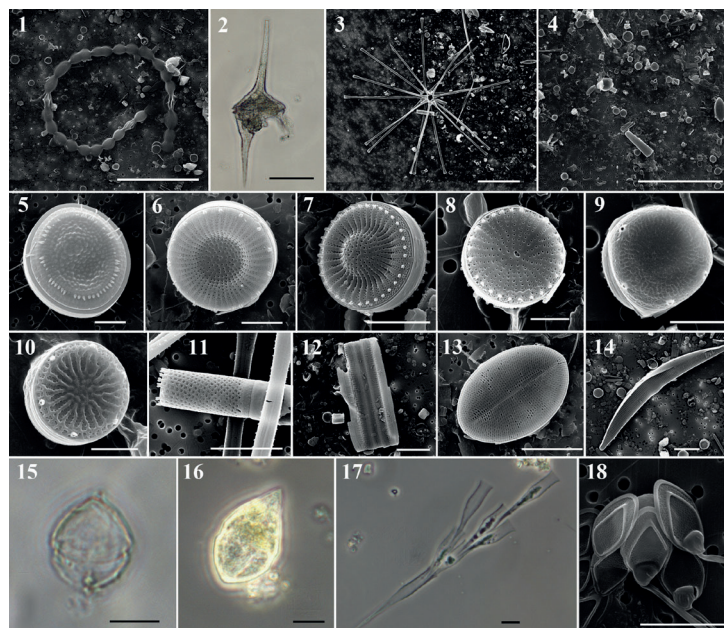


Fig.5. Representatives of phytoplankton in South Baikal and Irkutsk Reservoir: 1 – *Dolichospermum flos-aquae*; 2 – *Ceratium hirundinella*; 3 – *Asterionella formosa*; 4 – general view of a sample from Irkutsk Reservoir (in front of Elovoy Bay); 5 – *Lindavia minuta*; 6 – *Cyclostephanos dubius*; 7 – *Cyclostephanos makarovae*; 8 – *Stephanodiscus minutulus*; 9 – *Thalassiosira pseudonana*; 10 – *Discostella pseudostelligera*; 11 – *Aulacoseira granulata* var. *angustissima*; 12 – *Fragilaria capucina*; 13 – *Cocconeis placentula*; 14 – *Hannaea baicalensis*; 15 – *Peridinium* sp.; 16 – *Gyrodinium helveticum*; 17 – *Dinobryon bavaricum*; 18 – *Mallomonas alpina*. Scale bars: 1, 3, 4 – 50 μ m; 2, 12, 14–17 – 10 μ m; 5–7, 11, 13, 18 – 5 μ m; 8–10 – 2 μ m.

species and intraspecies, as in lake, with prevalence of silica-scaled chrysophytes (22 species). Cyanobacteria such as *Cyanodictyon planctonicum* (42×10^3 cells/L at St. 12), *Microcystis* sp. (20×10^3 cells/L at St. 12), *Dolichospermum lemmermannii* (25×10^3 cells/L at St. 14), green algae such as *Chlorella vulgaris* (59×10^3 cells/L at St. 14), *Koliella longiseta* (41×10^3 cells/L at St. 10) and *Monoraphidium griffithii* (15×10^3 cells/L at St. 14) were the most abundant as well as in Lake Baikal. The abundance of large-cell species significantly decreased, only *Dinobryon sociale* (24×10^3 cells/L at St. 10) and *Dinobryon sociale* var. *americanum* (16×10^3 cells/L at St. 10) was dominant. Among Bacillariophyta, *Asterionella formosa* (10×10^3 cells/L at St. 14), *Aulacoseira granulata* var. *angustissima* (11×10^3 cells/L at St. 15) and *Nitzschia graciliformis* (13×10^3 cells/L at St. 15) had low abundances. Small centric species such as *Cyclotella choctawhatcheeana*, *Stephanodiscus minutulus*, *Cyclotella choctawhatcheeana*, *Discostella pseudostelligera* and *Thalassiosira pseudonana* also had low abundances. Their highest abundance of 19×10^3 cells/L was at St. 10 (Figs 4, 5).

3.5. Phytoplankton species composition of Irkutsk Reservoir bays

Phytoplankton species composition of the bays and the central part of Irkutsk Reservoir was similar. Benthic diatoms had large abundance ($45\text{--}64 \times 10^3$ cells/L in the bays due to their shallowness. The total abundance and biomass varied between 242×10^3 and 321×10^3 cells/L, 41 and 140 mg/m³, respectively (Fig. 3). The highest species richness was in Ershovsky Bay (St. 16) (55 species) due to diatoms (19) and silica-scaled chrysophytes (18). In Kurma Bay (St. 11) 50 species were identified, and in Elovoy Bay (St. 13), there were 29 (Fig. 2, Table 2). Cyanobacteria *Cyanodictyon planctonicum* ($22\text{--}68 \times 10^3$ cells/L) and chlorophyte *Chlorella vulgaris* ($16\text{--}48 \times 10^3$ cells/L) prevailed in all three bays. The dominating species included diatoms *Nitzschia graciliformis* (up to 29×10^3 cells/L), *Aulacoseira granulata* var. *angustissima* (up to 23×10^3 cells/L) and small centric species (up to 28×10^3 cells/L), among which *Stephanodiscus minutulus* and *Thalassiosira pseudonana* were the most abundant. Microphotographs of summer phytoplankton species are shown in Fig. 5.

3.6. Comparison of phytoplankton communities and impact of environmental factors

South Baikal and Irkutsk Reservoir communities clearly split into two groups as revealed by exploratory analysis (Fig. 6). Importantly, similar patterns were obtained using all three types of community composition data: species abundance, species biomass and presence/absence matrices (Fig. 6A-C). Explanatory power was the highest for RDA-based model inferred from species abundance data (Fig. 5A), its adjusted R² was as high as 31%. This model included two environmental variables, namely water transparency and pH, acting

in similar direction. Explanatory power of the models generated from species biomass (Fig. 6B) and presence/absence (Fig. 6C) data were 19% and 9%, respectively. In this case, models retained single environmental factor, water transparency.

There was good positive correlation of abundance and biomass of small centric and benthic diatoms (Fig. 6D). Additionally, abundance and biomass of stomatocysts had also prominent positive correlation with total biomass. Considering hydrophysical/chemical parameters, water transparency and pH had negative impact to abundance and biomass of small centric and benthic diatoms. Water transparency and temperature were also negatively correlated.

4. Discussion

Our study showed that in summer, surface water temperatures in South Baikal and Irkutsk Reservoir were similar compared to June 2023 (Firsova et al., 2023). The composition of dominant species of Irkutsk Reservoir and South Baikal phytoplankton communities were similar (Fig. 2, Table 2). However, similarly with June 2023, the community composition revealed significant differences between South Baikal and Irkutsk Reservoir (Fig. 6A-C). The main indicator of this effect was revealed to be such simple hydrophysical parameter as water transparency, that was significantly decreased at Irkutsk Reservoir station. The only intriguing difference between the results of exploratory analyses of the June and August phytoplankton assemblages was the shift of the Burduguz community to the group of Irkutsk Reservoir samples (Firsova et al., 2023). This effect can be explained by the move of the Baikal/Reservoir transition upstream Angara in late summer. In summer, an increase of surface water temperature (Table 1) promotes the growth of warm-water phytoplankton species in both South Baikal and Irkutsk Reservoir. Small-cell colonial cyanobacteria dominated at all stations. Among these cyanobacteria, *Cyanodictyon planctonicum* had the highest abundance in South Baikal at St. 1 near Kultuk. We found that the abundance and biomass of summer phytoplankton in the Irkutsk Reservoir were low, which is similar to the results of previous studies (Vorobyova, 1995; Popovskaya et al., 2012). As in previous years (Vorobyova, 1995; Popovskaya et al., 2012), the dominant species included the cyanobacterium *Dolichospermum lemmermannii* and its abundance was below 25×10^3 cells/L. Whereas, in the second half of August and early September 1985, the number of *Dolichospermum lemmermannii* cells reached 7.2×10^6 cells/L (Vorobyova, 1995). *Nitzschia graciliformis* dominated the South Baikal and Irkutsk Reservoir in June 2023 (Firsova et al., 2023). In August 2023, this species remained one of the dominant ones (Figure 3), but its numbers decreased significantly compared to June.

The dominant species of summer phytoplankton identified in our study were similar to previous studies of the 60s and 80s (Vorobyova, 1995), and of 2008 (Popovskaya et al., 2012), which indicates the stability of the species composition. Compared to

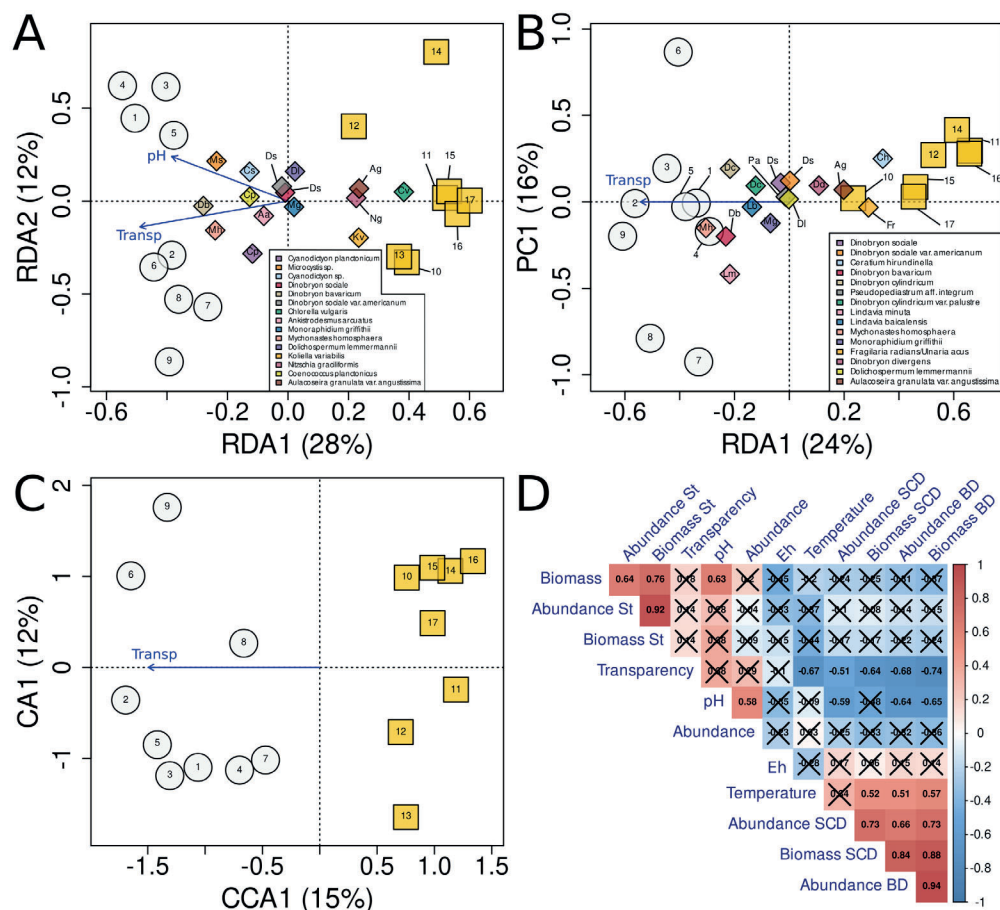


Fig.6. Correlation of environmental parameters and constrained ordination of species abundance, biomass, and presence/absence data. (A) – Redundancy analysis of species abundance; (B) – Redundancy analysis of species biomass; (C) – Constrained correspondence analysis of species presence/absence; Gray circles – sampling sites in the south basin of Lake Baikal. Yellow squares – sampling sites across the Irkutsk water reservoir. Diamonds – top-15 dominant phytoplankton species. Blue arrows – explanatory variables, used in the model. (D) – Analysis of correlation of environmental parameters and summary numerical variables. Values are Pearson correlation coefficients with the color legend on the right. Strikeout cells are non-significant correlations ($p > 0.05$). Hydrophysical and hydrochemical parameters (water transparency, water temperature, pH, and redox potential) were used as explanatory matrix in constrained ordination analysis. BD – benthic diatoms, SCD – small centric diatoms, St – stomatocysts.

previous studies (Kozhova, 1964; Vorobyova, 1995; Popovskaya et al., 2012), some changes have occurred: the phytoplankton species richness and the number of dominant species have increased. *Chlorella vulgaris* and *Mychonastes homosphaera* are the most abundant among Chlorophyta, while *Dinobryon sociale* prevails among Chrysophyta. The high Chrysophyta richness of the Irkutsk Reservoir has already been reported as it is the coldest and has the lowest nutrient concentrations among other reservoirs in the Angara Cascade (Vorobyova, 1995; Bessudova et al., 2023b). We noted a high richness of species of the genus *Dinobryon* (11 taxa) in South Baikal, including taxa not described here earlier such as *Dinobryon crenulatum* and *Dinobryon suecicum* var. *longispinum*. These species were likely brought into the Lake from tributaries, and bloomed in South Baikal due to more favorable conditions such as high water transparency, lack of currents and low abundance of diatoms competing Chrysophytes for silicon. It was previously shown that such factors play an important role to increase the diversity of Chrysophytes in the Gulf of the Ob River (Bessudova et al., 2023a). The species composition was also enriched with dominating species *Dinobryon sociale* and *Dinobryon sociale* var.

americanum. The species composition of silica-scaled chrysophytes changed in regard to the vernal complex of species (Bessudova et al., 2023b), being enriched with species typical of warmer waters (Bessudova et al., 2021) such as *Paraphysomonas gladiata*, *Paraphysomonas uniformis* subsp. *hemiradia*, *Lepidochromonas butcheri*, *Spiniferomonas septispina*.

5. Conclusion

Despite the similar environmental parameters such as water temperature and pH as well as high number of common taxa, the total abundance and biomass of summer phytoplankton were higher in the southern basin of Baikal than in Irkutsk Reservoir. There were discrepancies in the species composition and in the list of dominant species. Cyanobacteria bloomed in South Baikal, although their growth in Irkutsk Reservoir was limited. Concerning previous studies, including that of June 2023, the overall richness increased due to Chrysophyta species. The total abundance and biomass of phytoplankton corresponded to summer periods of the previous years.

Acknowledgements

We are very thankful to the team of a research vessel “Papanin” for well-coordinated work. Microscopy studies were performed at the Electron Microscopy Center of the Shared Research Facilities “Ultramicroanalysis” of the Limnological Institute, <https://www.lin.irk.ru/copp/>. This work was performed with financial support from the Russian Science Foundation, project No. 23-14-00028, <https://rscf.ru/en/project/23-14-00028/>.

Conflict of interests

The authors hereby state that this research work and manuscript production complied with ethical standards, and none of the authors have any potential conflict of interests. We further declare that this research was not funded by any agency except RSF.

References

- Bessudova A.Yu., Gabyshev V.A., Firsova A.D. et al. 2021. Diversity of silica-scaled chrysophytes and physicochemical parameters of their environment in the estuaries of rivers in the Arctic watershed of Yakutia, Russia. *Sustainability* 13(24): 13768. DOI: [10.3390/su132413768](https://doi.org/10.3390/su132413768)
- Bessudova A., Likhoshway Y., Firsova A. et al. 2023. Small Organisms in a Large River: What Provides the High Diversity of Scaled Chrysophytes in the Ob River? *Water* 15(17): 1-29. DOI: [10.3390/w15173054](https://doi.org/10.3390/w15173054)
- Bessudova A.Y., Galachyants Y., Firsova A.D. et al. 2023. Changes in diversity of silica-scaled Chrysophytes during lake–river–reservoir transition (Baikal–Angara–Irkutsk Reservoir). *Life* 13(10): 1-17. DOI: [10.3390/life13102052](https://doi.org/10.3390/life13102052)
- Firsova A.D., Galachyants Y.P., Bessudova A.Y. et al. 2023. Environmental factors affecting distribution and diversity of phytoplankton in the Irkutsk Reservoir ecosystem in June 2023. *Diversity* 15(10): 1-20. DOI: [10.3390/d15101070](https://doi.org/10.3390/d15101070)
- Kozhova O.M. 1964. *Phytoplankton of the Irkutsk Reservoir*. Moscow: Science. (in Russian)
- Korneva L.G. 2015. *Phytoplankton of reservoirs of the Volga Basin*. Kostroma: Kostroma Printing House. (in Russian)
- Legendre P., Gallagher E.D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129: 271-280. DOI: [10.1007/s004420100716](https://doi.org/10.1007/s004420100716)
- Mikhailov V.V. 2020. Assessment of the current ecological state of the Novosibirsk Reservoir by indicators of phytoplankton development. Cand. Sci. Dissertation, Northern Trans-Ural State Agricultural University, Tyumen, Russia. (in Russian)
- Nogueira M.G., Ferrareze M., Moreira M.L. et al. 2010. Phytoplankton assemblages in a reservoir cascade of a large tropical – subtropical river (SE, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 70(3): 781-793.
- Obertegger U., Flaim G., Corradini S. et al. 2022. Multi-annual comparisons of summer and under-ice phytoplankton communities of a mountain lake. *Hydrobiologia* 849: 4613-4635. DOI: [10.1007/s10750-022-04952-3](https://doi.org/10.1007/s10750-022-04952-3)
- Oksanen J., Simpson G.L., Blanchet G.F. et al. 2022. *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.5-6. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Popovskaya G.I., Firsova A.D. 2005. Phytoplankton of the Kharanor Reservoir. In: Kirillov V.V. (Ed.), *The cooling reservoir of the Kharanorskaya GRES and its life*. Novosibirsk, pp. 58-71. (in Russian)
- Popovskaya G.I., Firsova A.D., Bessudova A.Yu. et al. 2012. Phytoplankton of the Irkutsk Reservoir as an indicator of water quality. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 41(2): 29-38. DOI: [10.2478/s13545-012-0014-2](https://doi.org/10.2478/s13545-012-0014-2)
- Shchur L.A. 2009. Phytoplankton as an indicator of the state of the ecosystem of the cooling reservoir of Berezovskaya GRES-1 (Krasnoyarsk Territory). *Water Resources* 36(5): 597-605. (in Russian)
- Vasilyeva G.L., Kozhova O.M. 1960. Some data on the bacterio-, phyto- and zooplankton of the Irkutsk Reservoir during the years of its formation (1957-1958). *Bulletin. Institute of Reservoir Biology* 8-9: 6-8. (in Russian)
- Vasilyeva G.L., Kozhova O.M. 1963. *Plankton of the Irkutsk Reservoir*. Trudy VGO 13: 25-55. (in Russian)
- Vorobyova S.S. 1981. Phytoplankton of the Angara reservoirs. Cycle of matter and energy in reservoirs 1: 50-52. (in Russian)
- Vorobyova S.S. 1985. Interannual changes in phytoplankton in the Angara reservoirs. Cycle of matter and energy in reservoirs 2: 20-22. (in Russian)
- Vorobyova S.S. 1995. *Phytoplankton of Angara Reservoirs*. Novosibirsk: Siberian publishing company “Nauka”. (in Russian)
- Yasnitsky V.N. 1926. Materials for the knowledge of rivers of the Irkutsk region. *Izvestiya Vostochno-Sibirskogo Otdela Imperatorskogo Russkogo Geograficheskogo Obshchestva* 9(2): 104-114. (in Russian)

Видовой состав, численность и биомасса летнего фитопланктона южной котловины оз. Байкал и Иркутского водохранилища

Фирсова А.*, Галачянц Ю., Бессудова А., Михайлов И., Титова Л.,
Марченков А., Хилханова Д., Налимова М., Бузевич В., Лихошвай Е.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Фитопланктон в водных экосистемах имеет более высокое видовое богатство летом, когда температура воды выше, чем в другие сезоны года. Охарактеризовано сообщество фитопланктона с помощью микроскопии и определены параметры воды (температура, pH, прозрачность) в южной котловине озера Байкал и Иркутском водохранилище. Температура поверхностных вод в южной котловине озера Байкал составляла 10,1-18,4 °С, в Иркутском водохранилище 14,9-20,0 °С. Значения pH как в озере, так и в водохранилище были сходными (8,09-8,44 и 7,96-8,28 соответственно), а прозрачность воды по диску Секки составляла 4,5-9,0 м в озере и 2,5-4,5 м в водохранилище. Сообщество фитопланктона включало 104 вида из 7 таксонов высокого ранга, таких как Chrysophyta (36), Chlorophyta (30), Bacillariophyta (22), Cyanobacteria (11), Cryptophyta (2), Dinophyta (2) и Haptophyta (1). Видовой состав летних сообществ фитопланктона Иркутского водохранилища и южной котловины оз. Байкал различался, однако состав сообществ по филотипам высокого уровня был весьма сходным. Так, в озере выявлено более высокая численность мелкоклеточных цианобактерий. Обнаружено высокое видовое богатство Chrysophyta, рода *Dinobryon* (11 видов) и кремнистых чешуйчатых хризифитовых (22). Состав доминирующих видов южной котловины оз. Байкал и Иркутского водохранилища стал шире по сравнению с опубликованными ранее данными и включил *Cyanodictyon planctonicum*, *Cyanodictyon* sp., *Microcystis* sp., *Dinobryon sociale*, *Dinobryon sociale* var. *americanum*, *Chlorella vulgaris* и *Mychonastes homosphaera*.

Ключевые слова: озеро Байкал, Иркутское водохранилище, фитопланктон

1. Введение

Фитопланктон является основой пищевой сети водных экосистем и чувствительным индикатором изменений окружающей среды. В процессе формирования водохранилища происходят изменения в составе фитопланктонного сообщества (Щур, 2009; Корнева, 2015; Nogueira et al., 2010; Михайлов, 2020). Водоохранилище, расположенное в черте города, находится под антропогенным воздействием, поэтому очень важно следить за его состоянием. Повышение температуры воды в водохранилищах вызывает увеличение разнообразия более теплолюбивых видов фитопланктона, в том числе за счет цианобактерий и зеленых микроводорослей (Воробьева, 1995; Поповская и Фирсова, 2005; Щур, 2009; Popovskaya et al., 2012; Корнева, 2015; Михайлов, 2020; Obertegger et al., 2022).

Исследования фитопланктона проводились в реке Ангара до образования Иркутского водохранилища (Ясницкий, 1926), так и после (Васильева и Кожова, 1960; Васильева и Кожова, 1963; Кожова, 1964; Воробьева, 1981; 1985; 1995; Popovskaya et al., 2012). Эти исследования показали, что доминирующий состав фитопланктона Иркутского водохранилища зависит от фитопланктона озера Байкал. Недавние исследования, проведенные в июне 2023 г. (Firsova et al., 2023; Bessudova et al., 2023b), показали, что с момента создания водоема произошло некоторое увеличение видового богатства фитопланктона. Основная часть доминирующего комплекса фитопланктона осталась прежней и по-прежнему зависела от байкальских вод, однако богатство увеличилось за счет других видов. Кроме того, при анализе проб, отобранных в июне 2023 г. (Firsova et al., 2023) было показано, что по составу

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: adfir71@yandex.ru (А.Д. Фирсова)

Поступила: 02 декабря 2023; Принята: 12 декабря 2023;
Опубликована online: 18 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



сообщества фитопланктона делятся на две группы. В одну из групп входят все байкальские сообщества и проба Бурдугуз Иркутского водохранилища. Во вторую группу попадают все остальные пробы Иркутского водохранилища. Иркутское водохранилище отличалось наибольшим разнообразием Chrysophyta по сравнению с другими водоемами Ангарского каскада, поскольку оно наиболее холодное и менее трофное (Воробьева, 1995). Летом температура в водоеме составляла в среднем 8,3–16,2 °C, видовое разнообразие увеличивалось, биомасса редко превышала 1 г/м³. Как правило, в этот период доминировали виды рода *Dinobryon* Ehrenberg, *Asterionella formosa* Hassall, *Chroomonas acuta* Utermöhl, *Stephanodiscus minutulus* (Kützing) Cleve & Möller, *Nitzschia graciliformis* Lange-Bertalot & Simonsen. Во второй половине августа наблюдалось интенсивное развитие *Anabaena lemmermannii* P.G. Richter (Воробьева, 1995; Popovskaya et al., 2012).

Цель работы – определение видового состава, структуры, численности и биомассы летнего фитопланктона Южной котловины оз. Байкал и Иркутского водохранилища.

2. Методы

Пробы были отобраны 17–20 августа 2023 г. с борта научно-исследовательского судна «Папанин» на 9 станциях в южной котловине оз. Байкал (Южный Байкал) и на 8 станциях Иркутского водохранилища, включая заливы (Рис.1, Таблица 1), на тех же станциях, что и в июне 2023 г. (Фирсова и др., 2023). Прозрачность воды (S) измеряли с помощью диска Секки. Пробы воды отбирали батометром Нискина емкостью 5 л («Вольта», Москва, Россия). Температуру, ОВП и pH воды измеряли полевым прибором pH-410 («Аквилон», Москва, Россия) на каждой глубине отбора проб. Затем пробы с каждой глубины усредняли и фитопланктон изучали методами световой и сканирующей электронной микроскопии, как описано ранее (Фирсова et al., 2023; Bessudova et al., 2023b).

Поисковый анализ состава сообществ проводили с использованием языка программирования R и пакета *vegan* v.2.5-6 (Oksanen et al., 2022). Для разведочного анализа данные о численности видов и биомассе фитопланктона были преобразованы с помощью процедуры Хеллингера (Legendre and Gallagher, 2001). Факторы окружающей среды и суммарные значения биомассы и численности фитопланктона были проанализированы на предмет коллинеарности. Коэффициенты корреляции Пирсона и их *p*-значения были рассчитаны для каждой пары объясняющих переменных с использованием пакетов *R* *corr* и *Hmisc*. Корреляционную матрицу визуализировали с помощью пакета *Rcorr* с использованием иерархической кластеризации для группировки переменных. Затем данные о биомассе и численности фитопланктона были исключены из анализа, а переменные окружающей среды были центрированы и масштабированы так, чтобы иметь нулевое среднее значение и стандартное откло-

нение, равное единице. Эта стандартизированная матрица окружающей среды использовалась для ограниченной ординации численности и биомассы видов фитопланктона путем анализа избыточности (RDA). Данные о присутствии/отсутствии видов также анализировали с помощью ограниченного анализа соответствия (ССА). Для создания модели были протестированы подходы как прямого отбора, так и обратного исключения объясняющих переменных.

3. Результаты

3.1. Параметры водной среды

В августе 2023 г. экологические параметры Южного Байкала и Иркутского водохранилища изменились (Таблица 1) относительно июня 2023 г. (Фирсова et al., 2023). Так, в августе температура поверхностных вод составляла 10,1–18,4 °C в озере и 14,9–20,0 °C в водохранилище (3,6–5,0 °C и 6,0–12,7 °C в июне соответственно). В августе значения pH как в озере, так и в водохранилище были сходными – 8,09–8,44 и 7,96–8,28 соответственно, в отличие от июня, когда значения pH воды в водохранилище были выше (8,0–8,7), чем в озере (7,0–8,0). Прозрачность воды по диску Секки в Южном Байкале существенно снизилась в августе (4,5–9,0 м) по сравнению с июнем (10–22 м), то же самое отмечено и в Иркутском водохранилище (3,0–5,0 м в июне, 2,5–4,5 м в августе).

3.2. Общая характеристика летнего фитопланктона

В Южном Байкале и Иркутском водохранилище нами обнаружено всего 104 вида из 7 отделов (Рис.2, Таблица 2). Наибольшее видовое богатство имели Chrysophyta (36 видов) и Chlorophyta (30) по сравнению с Bacillariophyta (22), Cyanobacteria (11), Cryptophyta (2), Dinophyta (2) и Nartophyta (1).

Общая численность и биомасса фитопланктона Южного Байкала существенно варьировали от 190×10^3 до 2779×10^3 кл./л и от 26 до 427 мг/м³ соответственно (Рис.3). Наибольшая численность отмечена на ст. 1 (12 км от Култука) за счет цветения трех мелкоклоточных видов: *Cyanodictyon*

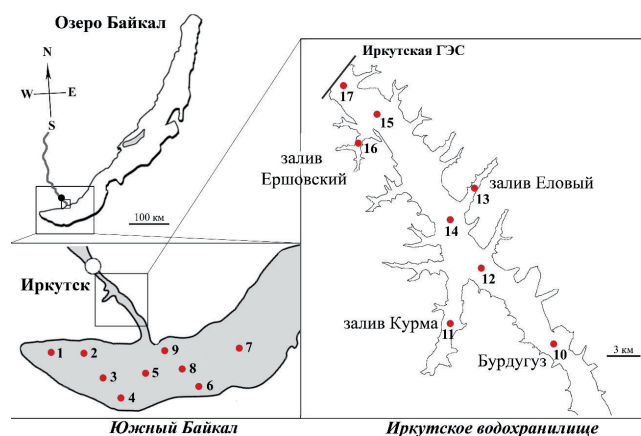


Рис.1. Схема отбора проб.

Таблица 1. Места отбора проб и параметры окружающей среды в августе 2023.

№	Название станции	Дата	Координаты N/E	Максимальная глубина, м	S, m	ОВП	Глубина, м	Т воды, °C	pH
Южный Байкал									
1	12 км от Култука	17.08.23	51 ° 40.578' / 103 ° 52.309'	1252	6.5	-65,9	0	17.3	8.25
							5	17.3	8.37
							10	17.2	8.34
							15	17.0	8.33
							20	15.0	8.25
							25	10.0	8.44
2	3 км от Маритуя	17.08.23	51 ° 45.546' / 104 ° 13.222'	1337	7.5	-66,0	0	16.9	8.33
							5	16.0	8.36
							10	15.2	8.30
							15	11.6	8.47
							20	7.7	8.50
							25	5.6	8.17
3	Маритуй-Солзан	17.08.23	51 ° 38.710' / 104 ° 13.715'	1243	5.5	-72,6	0	17.5	8.40
							5	16.6	8.42
							10	10.3	8.85
							15	6.1	8.83
							20	5.0	8.25
							25	4.4	8.16
4	3 км от Солзана	17.08.23	51 ° 31.428' / 104 ° 14.417'	350	5.0	-68,2	0	18.4	8.44
							5	18.0	8.42
							10	17.3	8.36
							15	14.4	8.30
							20	12.1	8.44
							25	9.6	8.37
5	Мыс Толстый-р. Снежная	18.08.23	51 ° 36.402' / 104 ° 44.147'	1120	6.5	-19,5	0	16.0	8.26
							5	15.8	8.44
							10	13.9	8.57
							15	6.0	8.78
							20	5.0	8.34
							25	4.6	8.19
6	3 км от Танхоя	18.08.23	51 ° 35.440' / 105 ° 06.968'	1402	8.5	-86,9	0	18.0	8.40
							5	17.7	8.40
							10	17.2	8.41
							15	16.7	8.07
							20	15.0	8.40
							25	13.0	8.43
7	Мыс Кадильный- Мишиха	18.08.23	51 ° 46.731' / 105 ° 22.528'	1424	4.5	-58,4	0	17.7	8.37
							5	16.0	8.42
							10	12.5	8.34
							15	6.5	8.10
							20	5.7	8.00
							25	5.2	8.03

№	Название станции	Дата	Координаты N/E	Максимальная глубина, м	S, m	ОВП	Глубина, м	Т воды, °C	pH
8	Листвянка-Танхой	18.08.23	51 ° 42.262′/ 105 ° 00.720′	700	6.5	-39,5	0	17.4	8.29
							5	17.1	8.39
							10	15.8	8.32
							15	13.3	8.29
							20	10.5	8.27
							25	6.6	8.01
9	3 км от Листвянки	18.08.23	51 ° 49.033′/ 104 ° 54.616′	1434	9.0	-46,5	0	10.1	8.09
							5	8.2	8.09
							10	5.9	8.06
							15	4.8	8.00
							20	4.6	7.93
							25	4.5	7.97
Иркутское водохранилище									
10	Бурдугуз	19.08.23	52 ° 04.105′/ 104 ° 59.451′	15.5	4.5	-43,6	0	14.9	7.96
							5	10.5	7.96
							10	8.5	7.96
11	залив Курма	19.08.23	52 ° 06.845′/ 104 ° 45.926′	9.7	3.0	-58,6	0	18.7	8.12
							5	18.0	8.23
12	центр напротив залива	19.08.23	52 ° 10.874′/ 104 ° 47.935′	17	3.5	-58,2	0	17.7	8.16
							5	17.4	8.29
							10	14.9	8.19
13	залив Еловый	19.08.23	52 ° 09.906′/ 104 ° 29.172′	10	2.5	-47,4	0	18.5	7.98
							5	16.4	8.03
14	центр напротив залива Еловый	19.08.23	52 ° 14.548′/ 104 ° 45.243′	25	3.5	-65,5	0	20.0	8.27
							5	18.5	8.42
							10	16.0	8.22
15	центр напротив залива Ершовский	20.08.23	52 ° 21.511′/ 104 ° 37.550′	27	3.5	-55,8	0	18.0	8.13
							5	17.3	8.20
							10	16.4	8.13
16	залив Ершовский	20.08.23	52 ° 20.851′/ 104 ° 34.439′	16	3.0	-53,0	0	18.9	8.28
							5	17.9	8.08
							10	16.6	7.93
17	верхний бьеф	20.08.23	52 ° 23.478′/ 104 ° 33.722′	25	3.5	-56,1	0	18.6	8.16
							5	17.6	8.25
							10	15.8	8.07

Таблица 2. Распределение видов фитопланктона в Южном Байкале и Иркутском водохранилище в августе 2023 г. «+» — наличие этого вида. Соответствующими цветами выделены виды, численность которых превышала 10, 50, 100 тыс. кл/л. Градация цвета темнее по мере увеличения номера. Названия станций на Рисунке 1.

Таксоны	Южный Байкал									Иркутское водохранилище							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Cyanobacteria																	
<i>Anabaena</i> sp.																	+
<i>Aphanothece</i> sp.	+		+	+	+		+			+	+		+			+	
<i>Cyanodictyon</i> sp.	+			+									+				
<i>Cyanodictyon planctonicum</i> B.A. Mayer	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> (Bornet & Flahault) P.Wacklin, L.Hoffmann & Komárek						+	+			+	+				+	+	+
<i>Dolichospermum lemmermannii</i> (Richter) P. Wacklin, L. Hoffmann & J.Komárek	+		+	+	+		+	+			+	+	+	+	+		+
<i>Dolichospermum scheremetieviae</i> (Elenkin) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek														+	+		
<i>Limnococcus limneticus</i> (Lemmermann) Komárková, Jezberová, O.Komárek & Zapomelová						+											
<i>Microcystis</i> sp.	+	+	+	+	+							+					
<i>Microcystis pulverea</i> (H.C.Wood) Forti											+		+				
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher				+								+					
Cryptophyta																	
<i>Komma caudata</i> (L. Geitler) D.R.A. Hill	+	+	+	+	+		+										
<i>Rhodomonas pusilla</i> (Bachmann) Javornický		+	+				+			+			+				
Dinophyta																	
<i>Ceratium hirundinella</i> (O.F. Müller) Dujardin				+						+	+	+		+		+	+
<i>Glenodinium</i> sp.	+		+	+		+	+			+							
Haptophyta																	
<i>Chrysochromulina parva</i> Lackey				+													
Chrysophyta																	
<i>Chrysosphaerella coronacircumspina</i> Wujek & Kristiansen	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Chrysosphaerella brevispina</i> Korshikov															+		
<i>Dinobryon bavaricum</i> Imhof	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
<i>Dinobryon crenulatum</i> West & G.S. West	+		+														
<i>Dinobryon cylindricum</i> O.E. Imhof		+	+	+	+	+	+										
<i>Dinobryon cylindricum</i> var. <i>palustre</i> Lemmermann		+	+			+											
<i>Dinobryon divergens</i> O.E. Imhof		+		+							+			+	+	+	+
<i>Dinobryon korshikovii</i> Matvienko ex Kapustin	+	+		+	+		+			+	+	+		+	+	+	+
<i>Dinobryon pediforme</i> (Lemmermann) Steinecke	+			+	+	+	+										
<i>Dinobryon sociale</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Dinobryon sociale</i> var. <i>americanum</i> (Brunnthal) Bachmann	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Dinobryon stipitatum</i> Stein	+		+		+	+											

Таксоны	Южный Байкал									Иркутское водохранилище							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Dinobryon suecicum</i> var. <i>longispinum</i> Lemmermann		+				+	+	+				+					
<i>Kephyrion</i> sp.																	
<i>Kephyrion littorale</i> J.W.G. Lund	+			+	+		+	+									
<i>Kephyrion spirale</i> (Lackey) Conrad				+		+	+										
<i>Paraphysomonas gladiata</i> Preisig & Hibberd	+		+	+	+	+		+		+	+			+	+	+	+
<i>Paraphysomonas uniformis</i> subsp. <i>hemiradia</i> J.M.Scoble & T.Cavalier-Smith														+	+		+
<i>Paraphysomonas</i> sp.								+		+				+	+	+	
<i>Lepidochromonas butcheri</i> (Pennick & Clarke) Kapustin & Guiry																+	
<i>Spiniferomonas abrupta</i> Nielsen					+		+		+						+		
<i>Spiniferomonas cornuta</i> Balonov	+		+	+		+	+	+		+	+			+	+	+	
<i>Spiniferomonas bourrellyi</i> Takahashi	+		+	+		+		+		+		+	+		+	+	+
<i>Spiniferomonas takahashii</i> (Nicholls) Preisig & Hibberd				+			+	+		+	+	+			+		
<i>Spiniferomonas trioralis</i> (E. Takahashi) Preisig & Hibberd	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Spiniferomonas trioralis</i> f. <i>cuspidata</i> Balonov	+		+			+			+	+							
<i>Spiniferomonas septispina</i> Nicholls				+						+				+	+		
<i>Spiniferomonas silverensis</i> Nicholls											+			+	+	+	
<i>Mallomonas acaroides</i> Perty							+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mallomonas alpina</i> Pascher & Ruttner		+		+		+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Mallomonas crassisquama</i> (Asmund) Fott											+						
<i>Mallomonas tonsurata</i> Teiling	+		+		+	+				+	+	+	+	+	+	+	
<i>Mallomonas vannigera</i> Asmund																+	
<i>Synura</i> sp. 1					+	+					+			+		+	
<i>Synura</i> sp. 2											+					+	
<i>Synura</i> cf. <i>glabra</i>											+		+	+	+		+
Bacillariophyta																	
<i>Acanthoceras zachariasii</i> (Brun) Simonsen										+	+					+	+
<i>Asterionella formosa</i> Hassall	+						+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aulacoseira baicalensis</i> (K.I. Meyer) Simonsen			+	+	+	+			+	+			+	+	+		+
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (O. Müller) Simonsen					+		+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aulacoseira islandica</i> (O. Müller) Simonsen						+					+	+	+	+		+	+
<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grunow) Simonsen										+					+	+	
<i>Cyclostephanos dubius</i> (Hustedt) Round	+		+	+	+		+	+		+	+			+	+	+	+
<i>Cyclostephanos makarovae</i> (S.I. Genkal) K. Schultz	+	+		+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Discostella pseudostelligera</i> (Hustedt) Houk & Klee				+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières										+	+	+		+	+	+	+
<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton																+	
<i>Fragilaria radians</i> (Kützing) D.M.Williams & Round		+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таксоны	Южный Байкал									Иркутское водохранилище							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Hannaea baicalensis</i> Genkal, Popovskaya & Kulikovskiy										+				+		+	+
<i>Lindavia baicalensis</i> (Skvortsov & K.I.Meyer) Nakov, Guillory, M.L. Julius, E.C. Theriot & A.J. Alverson	+	+		+	+	+											
<i>Lindavia minuta</i> (Skvortsov) T.Nakov & al.	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nitzschia graciliformis</i> Lange-Bertalot & Simonsen	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grunow										+						+	
<i>Stephanodiscus meyeri</i> Genkal & Popovskaya			+								+					+	+
<i>Stephanodiscus minutulus</i> (Kützing) Cleve & Möller	+	+		+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle & Heimdal				+		+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Ulnaria acus</i> (Kützing) Aboal							+		+	+				+	+	+	
<i>Urosolenia eriensis</i> (H.L. Smith) Round & R.M. Crawford										+					+	+	
Chlorophyta																	
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> Korshikov	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chlamydomonas</i> sp.		+															
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck		+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Coenococcus planctonicus</i> Korshikov	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+				
<i>Coenocystis</i> sp.										+		+		+	+	+	+
<i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchner) E.H. Hegewald	+				+												+
<i>Desmodesmus armatus</i> (Chodat) E.H. Hegewald											+						
<i>Desmodesmus bicaudatus</i> (Dedusenko) P.M. Tsarenko	+						+				+						
<i>Desmodesmus communis</i> (E. Hegewald) E. Hegewald	+									+	+	+		+		+	+
<i>Desmodesmus intermedius</i> (Chodat) E. Hegewald																+	+
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> Nägeli					+												
<i>Elakatothrix genevensis</i> (Reverdin) Hindák	+		+			+	+	+		+	+		+	+	+	+	+
<i>Franceia ovalis</i> (Francé) Lemmermann												+					
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) Möbius					+	+					+			+	+	+	
<i>Koliella longiseta</i> (Vischer) Hindák	+		+							+	+		+	+		+	+
<i>Koliella variabilis</i> (Nygaard) Hindák	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
<i>Lagerheimia genevensis</i> (Chodat) Chodat				+						+	+	+			+		+
<i>Monoraphidium circinale</i> (Nygaard) Nygaard	+	+	+	+													
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+
<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+
<i>Monoraphidium minutum</i> (Nägeli) Komárková-Legnerová	+	+		+			+	+		+		+		+		+	+
<i>Mychonastes homosphaera</i> (Skuja) Kalina & Puncová	+	+	+	+	+	+	+	+	+								

Таксоны	Южный Байкал									Иркутское водохранилище							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Pseudopediastrum</i> aff. <i>integrum</i> (Nägeli) M. Jena & C. Bock			+														
<i>Stauridium tetras</i> (Ehrenberg) E. Hegewald				+						+		+			+		
<i>Scenedesmus</i> sp.	+						+						+				
<i>Scenedesmus ecornis</i> (Ehrenberg) Chodat	+		+		+	+	+	+		+		+		+	+		+
<i>Scenedesmus obtusus</i> Meyen														+			
<i>Sphaerocystis</i> sp.	+	+		+							+						
<i>Tetraëdron minimum</i> (A. Braun) Hansgirg							+					+					
<i>Tetraëdron trigonum</i> f. <i>gracile</i> (Reinsch) De Toni														+		+	
Total	45	32	37	48	34	39	44	31	21	50	50	40	29	48	47	55	46

Примечание:
Примерная концентрация, $\times 10^3$ кл./л

Цианобактерия	10	50	100
Chrysophyta	10	50	100
Bacillariophyta	10		
Chlorophyta	10	50	

planctonicum, *Cyanodictyon* sp. и *Microcystis* sp., при этом, несмотря на самую высокую численность, общая биомасса не превышала 107 мг/м³. На ст. 3 наибольшую биомассу определили виды *Dinobryon*. Общая численность и биомасса фитопланктона в Иркутском водохранилище были ниже, чем в Южном Байкале, и изменялись от 186×10^3 до 310×10^3 кл./л и от 41 до 140 мг/м³ соответственно (Рис.3).

3.3. Видовой состав фитопланктона Южного Байкала

Видовое богатство фитопланктона Южного Байкала варьировало в пределах 21-48 видов (Рис.2, Таблица 2). Chrysophyta включали в себя 27 видов и внутривидовых таксонов, из которых 15 были чешуйчатыми хризифитовыми. Chlorophyta состояли из 24 видов, за которыми следовали диатомовые водоросли (15), Cyanobacteria (8), Cryptophyta (2), Dinophyta (2) и Haptophyta (1) (Рис.2, Таблица 2).
Наиболее высокую численность имели цианобактерии, такие как *Cyanodictyon planctonicum* (840×10^3 кл./л на ст. 1), *Microcystis* sp. (833×10^3 кл./л на ст. 1), *Cyanodictyon* sp. (768×10^3 кл./л на ст. 1) и *Dolichospermum lemmermannii* (25×10^3 кл./л на ст. 1). Что касается крупноклеточных видов хризифитовых, то *Dinobryon bavaricum* (109×10^3 кл./л на ст. 4), *Dinobryon cylindricum* var. *palustre* (54×10^3 кл./л на ст. 3), *Dinobryon sociale* (80×10^3 кл./л на ст. 6), *Dinobryon sociale* var. *americanum* (93×10^3 кл./л на ст. 3), *Dinobryon cylindricum* (27×10^3 кл./л на ст. 3) играли заметную роль (Рис.3, 4). Среди зеленых

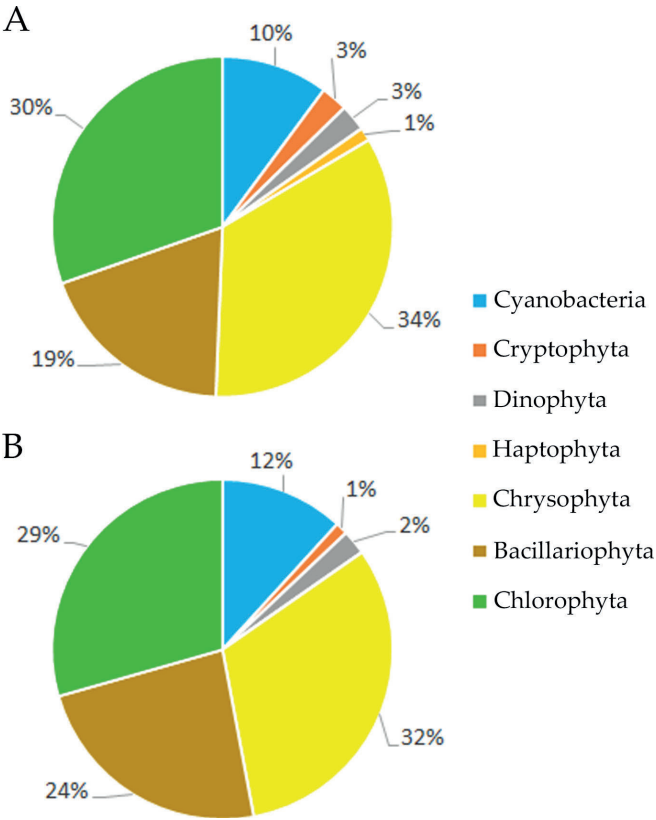


Рис.2. Процентное соотношение разных групп водорослей в Южном Байкале (А) и в Иркутском Водохранилище (В) в августе 2023 г.

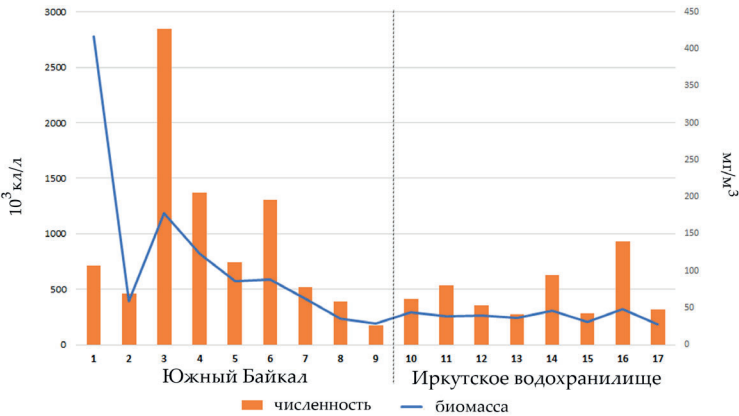


Рис.3. Распределение численности и биомассы фитопланктона Южного Байкала и Иркутского водохранилища в августе 2023 г.

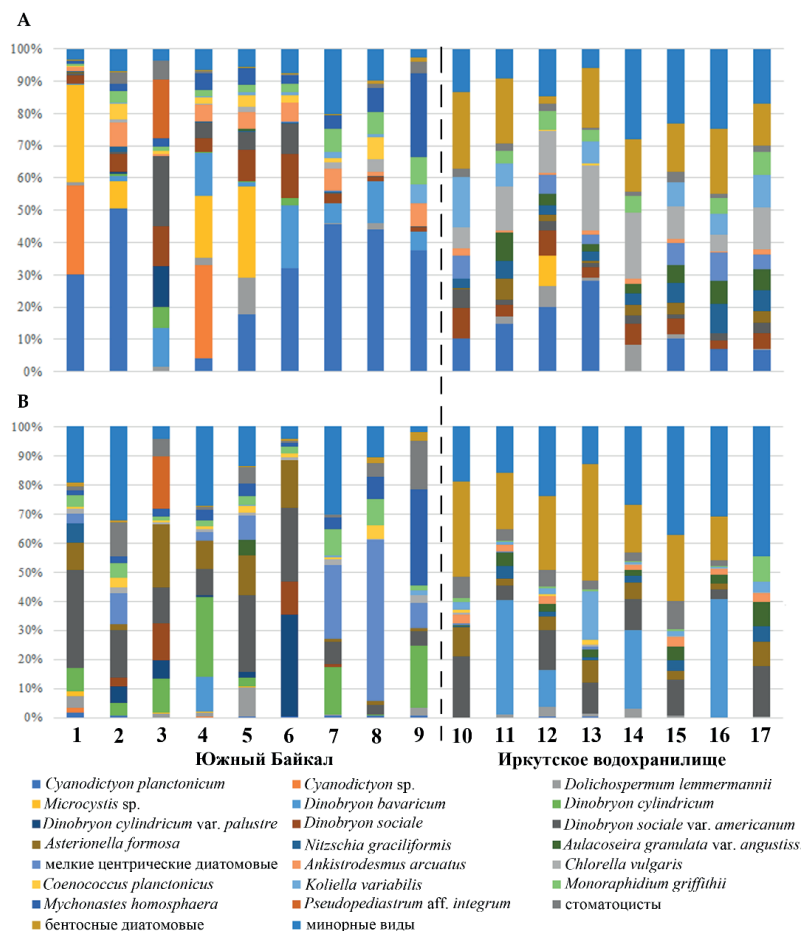


Рис.4. Распределение численности и биомассы доминирующих видов фитопланктона в Южном Байкале и Иркутском водохранилище в августе 2023 г.

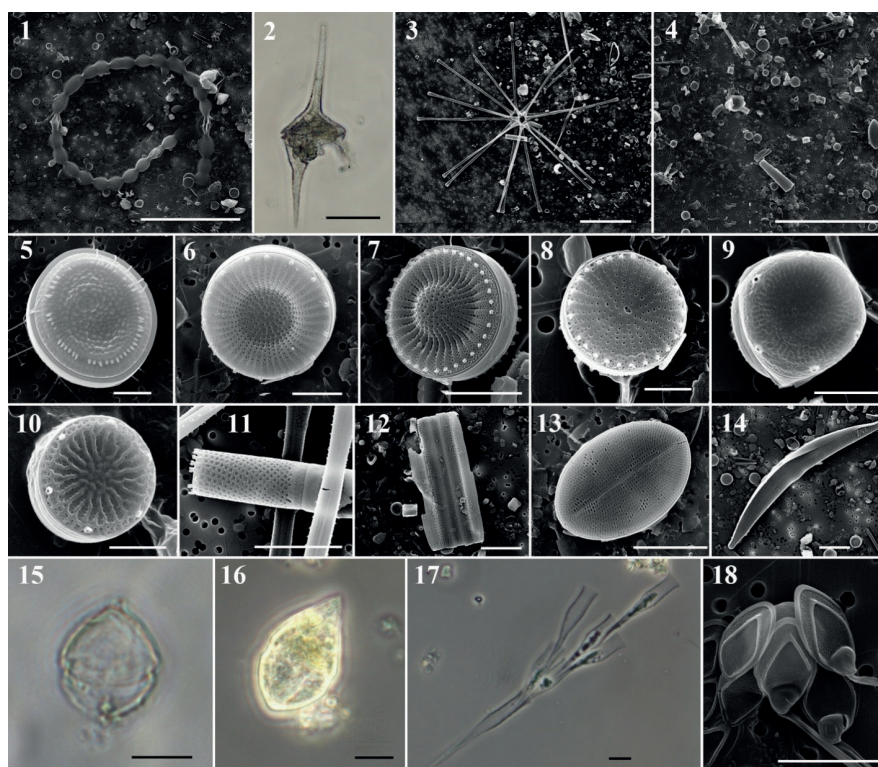


Рис.5. Представители Южного Байкала и Иркутского Водохранилища: 1 – *Dolichospermum flos-aquae*; 2 – *Ceratium hirundinella*; 3 – *Asterionella formosa*; 4 – общий план пробы из Иркутского водохранилища (напротив залива Еловый); 5 – *Lindavia minuta*; 6 – *Cyclostephanos dubius*; 7 – *Cyclostephanos makarovae*; 8 – *Stephanodiscus minutulus*; 9 – *Thalassiosira pseudonana*; 10 – *Discostella pseudostelligera*; 11 – *Aulacoseira granulata* var. *angustissima*; 12 – *Fragilaria capucina*; 13 – *Cocconeis placentula*; 14 – *Hannaea baicalensis*; 15 – *Peridinium* sp.; 16 – *Gyrodinium helveticum*; 17 – *Dinobryon bavaricum*; 18 – *Mallomonas alpina*. Масштабная линейка: 1, 3, 4 – 50 μm ; 2, 12, 14–17 – 10 μm ; 5–7, 11, 13, 18 – 5 μm ; 8–10 – μm .

выделялись три вида - *Ankistrodesmus arcuatus* (42×10^3 кл./л на ст. 4), *Monoraphidium griffithii* (30×10^3 кл./л на ст. 7) and *Mychonastes homosphaera* (42×10^3 кл./л на ст. 4) которые преобладали как по численности, так и по биомассе (Рис.4, 5). Диатомовые имели низкие количественные показатели и не превышали 10×10^3 кл./л.

Тепловодная диатомовая водоросль *Asterionella formosa* (12×10^3 кл./л) присутствовала только на ст. 1 (Рис.4).

3.4. Видовой состав фитопланктона Иркутского водохранилища

Фитопланктон Иркутского водохранилища имел сходство с байкальским, но его численность была ниже, а видовое богатство выше (29–50 видов) (Рис.2, Таблица 2). Хризифитовые включали 27 видов и внутривидовых таксона, также как и в оз. Байкал, из которых преобладали кремнистые чешуйчатые хризифитовые (22 вида). Также, как и в озере, к доминирующим относились цианобактерии, такие как *Cyanodictyon planctonicum* (42×10^3 кл./л на ст. 12), *Microcystis* sp. (20×10^3 кл./л на ст. 12), *Dolichospermum lemmermannii* (25×10^3 кл./л на ст. 14), зеленые водоросли, такие как *Chlorella vulgaris* (59×10^3 кл./л на ст. 14), *Koliella longiseta* (41×10^3 кл./л на ст. 10) и *Monoraphidium griffithii* (15×10^3 кл./л на ст. 14). Численность крупноклеточных видов хризифитовых существенно снизилась, из них *Dinobryon sociale* (24×10^3 кл./л на ст. 10) и *Dinobryon sociale* var. *americanum* (16×10^3 кл./л на ст. 10) были доминирующими. Среди Bacillariophyta *Asterionella formosa* (10×10^3 кл./л на ст. 14), *Aulacoseira granulata* var. *angustissima* (11×10^3 кл./л на ст. 15) и *Nitzschia graciliformis* (13×10^3 кл./л на ст. 15) имели низкую численность. Мелкие центрические виды диатомовых водорослей, такие как *Cyclostephanos makarovae*, *Stephanodiscus minutulus*, *Cyclostephanos makarovae*, *Discostella pseudostelligera* и *Thalassiosira pseudonana*, также имели низкую численность. Самая высокая численность мелких центрических диатомей – 19×10^3 кл./л – была на ст. 10.

3.5. Видовой состав фитопланктона заливов Иркутского водохранилища

Видовой состав фитопланктона заливов и центральной части Иркутского водохранилища был сходным. Бентосные диатомеи имели большую численность ($45-64 \times 10^3$ кл./л в заливах из-за их мелководности. Общая численность и биомасса варьировали от 242×10^3 до 321×10^3 кл./л, 41 и 140 мг/м^3 соответственно (Рис.3). Наибольшее видовое богатство было в Ершовском заливе (ст. 16) (55 видов) за счет диатомовых водорослей (19) и кремнистых чешуйчатых хризифитовых (18). В заливе Курма (ст. 11) выявлено 50 видов, и в заливе Еловый (ст. 13) — 29 (Рис.2, Таблица 2). Во всех трех заливах преобладали цианобактерии *Cyanodictyon*

planctonicum ($22-68 \times 10^3$ кл./л и зеленые *Chlorella vulgaris* ($16-48 \times 10^3$ кл./л) (Рис.3). Доминирующими видами были диатомовые водоросли *Nitzschia graciliformis* (до 29×10^3 кл./л), *Aulacoseira granulata* var. *angustissima* (до 23×10^3 кл./л) и мелкие центрические виды (до 28×10^3 кл./л), среди которых наиболее многочисленными были *Stephanosculus minutulus* и *Thalassiosira pseudonana*. Микрофотографии летних видов фитопланктона представлены на рисунке 5.

3.6. Сравнение сообществ фитопланктона и влияния факторов окружающей среды

Как показывает анализ, сообщества Южного Байкала и Иркутского водохранилища четко разделились на две группы (Рис.6). Важно отметить, что аналогичные закономерности были получены с использованием всех трех типов данных о составе сообществ: численности видов, биомассы видов и матрицы присутствия/отсутствия (Рис.6А-С). Объяснительная сила была самой высокой для модели, полученной методом RDA на основе данных о численности видов (Рис.6А); ее скорректированный коэффициент детерминации (adjusted R²) достигал 31%. Эта модель включала две переменные окружающей среды, а именно прозрачность воды и pH, действующие и влияющие на состав сообществ в сходном направлении. Объяснительная сила моделей, полученных на основе данных о биомассе видов (Рис.6В) и присутствии/отсутствии (Рис.6С), составила 19% и 9% соответственно. При этом в моделях сохранялся единственный экологический фактор – прозрачность воды.

Установлена хорошая положительная корреляция численности и биомассы мелких центрических и бентосных диатомей (Рис.6D). Кроме того, численность и биомасса стоматоцист также имели выраженную положительную корреляцию с общей биомассой. Рассматривая гидрофизические и гидрохимические параметры, можно видеть, что прозрачность воды и pH оказали негативное влияние на численность и биомассу мелких центрических и донных диатомей. Прозрачность воды и температура также отрицательно коррелировали между собой.

4. Обсуждение

Наши исследования показали, что летом температура поверхностных вод в Южном Байкале и Иркутском водохранилище были сходными в отличие от июня 2023 г. (Firsova et al., 2023). Состав доминирующих видов сообществ фитопланктона Иркутского водохранилища и Южного Байкала был сходным (Рис.2, Таблица 2). Однако, как и в июне 2023 г., в составе сообществ Южно-Байкала и Иркутского водохранилища выявлены существенные различия (Рис.6А-С). Выявлено, что основным показателем этого эффекта является такой простой

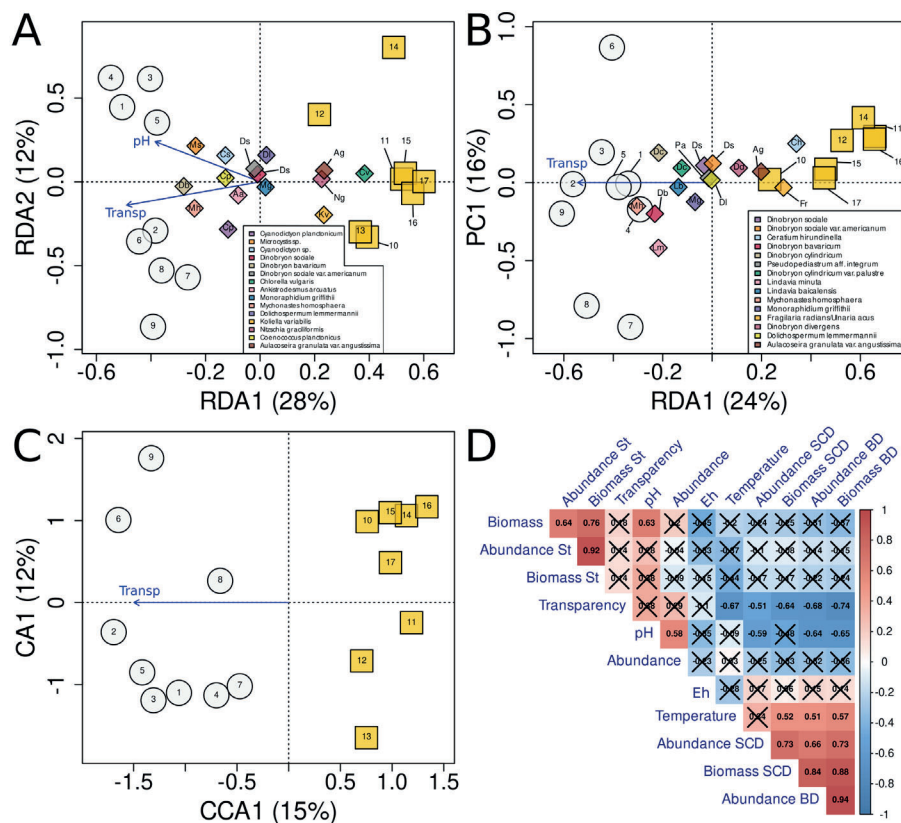


Рис.6. Корреляция параметров окружающей среды и ограниченная ординация численности видов, биомассы и данных о присутствии/отсутствии. (A) – Анализ избыточности на основе данных о численности видов; (B) – Анализ избыточности на основе данных о биомассе видов; (C) – Ограниченный анализ соответствия на основе данных о присутствия/отсутствия видов; Серые кружки – места отбора проб в Южном Байкале. Желтые квадраты – точки отбора проб в Иркутском водохранилище. Ромбы – топ-15 доминирующих видов фитопланктона. Синие стрелки – объясняющие переменные, используемые в модели. (D) – Анализ корреляции параметров окружающей среды и суммарных числовых переменных. Значения представляют собой коэффициенты корреляции Пирсона с цветовой маркировкой справа. Зачеркнутые ячейки представляют незначимые корреляции ($p > 0,05$). Гидрофизические и гидрохимические параметры (прозрачность воды, температура воды, pH и окислительно-восстановительный потенциал) использовались в качестве объясняющих переменных при ограниченной ординации. БД – донные диатомеи, SCD – мелкие центрические диатомеи, St – столетоцисты.

гидрофизический параметр, как прозрачность воды, который в пробах Иркутского водохранилища значительно снижен. Единственным интригующим отличием результатов поисковых анализов июньских и августовских комплексов фитопланктона стал сдвиг бурдугузского сообщества в группу проб Иркутского водохранилища, по сравнению с июнем (Firsova et al., 2023). Этот эффект можно объяснить смещением в конце лета границы перехода температуры Байкал/водохранилище вверх по течению Ангары. Летом повышение температуры поверхностных вод (Таблица 1) способствует росту тепловодных видов фитопланктона как в озере, так и в водохранилище. На всех станциях доминировали мелкоклеточные колониальные цианобактерии. Среди этих цианобактерий наибольшую численность в Южном Байкале имел вид *Cyanodictyon planctonicum* на ст. 1 (12 км от Култука). Установлено, что численность и биомасса летнего фитопланктона Иркутского водохранилища невысоки, что аналогично результатам предыдущих исследований (Воробьева, 1995; Popovskaya et al., 2012). Как и в предыдущие годы (Воробьева, 1995; Popovskaya et al., 2012), доминирующим видом была цианобактерия *Dolichospermum lemmermannii*, численность

которой была ниже 25×10^3 кл./л. Тогда как во второй половине августа и начале сентября 1985 г. численность достигала *Dolichospermum lemmermannii* $7,2 \times 10^6$ кл./л (Воробьева, 1995). В июне 2023 г. *Nitzschia graciliformis* доминировала как в Южном Байкале, так и в Иркутском водохранилище (Firsova et al., 2023). В августе 2023 г. этот вид также оставался одним из доминирующих, но его численность значительно снизилась по сравнению с июнем.

Выявленные в наших исследованиях доминирующие виды летнего фитопланктона были аналогичны предыдущим исследованиям 60-х и 80-х годов (Воробьева, 1995), и 2008 г. (Popovskaya et al., 2012), что свидетельствует о стабильности видового состава. По сравнению с предыдущими исследованиями (Кожова, 1964; Воробьева, 1995; Popovskaya et al., 2012) произошли некоторые изменения: увеличилось видовое богатство фитопланктона и число доминирующих видов. Среди Chlorophyta были наиболее распространены *Chlorella vulgaris* и *Mychonastes homosphaera*, а среди Chrysophyta преобладала *Dinobryon sociale*. О высоком богатстве хризифитовых Иркутского водохранилища уже сообщалось, поскольку оно является самым холодным и имеет самые низкие концентрации питательных

веществ среди других водоемов Ангарского каскада (Воробьева, 1995; Bessudova et al., 2023b). Мы отметили также высокое видовое богатство рода *Dinobryon* (11 таксонов) в Южном Байкале, включая ранее не указанные здесь таксоны, такие как *Dinobryon crenulatum* и *Dinobryon suecicum* var. *longispinum*. Эти виды, вероятно, были вынесены в озеро из притоков, и для их развития в Южном Байкале сложились более благоприятные условия, включающие более высокую прозрачность, отсутствие течения и минимальное развитие диатомей, конкурирующих с ними за кремний. Ранее было показано, что эти факторы играют важную роль в формировании высокого видового разнообразия хризифитовых в заливе реки Обь (Bessudova et al., 2023a). Видовой состав доминирующих также пополнился видами *Dinobryon sociale* и *Dinobryon sociale* var. *americanum*. Видовой состав кремнистых чешуйчатых хризифитовых изменился по отношению к весеннему комплексу видов (Bessudova et al., 2023b), обогатившись видами, типичными для более теплых вод (Bessudova et al., 2021), такими как *Paraphysomonas gladiata*, *Paraphysomonas uniformis* subsp. *hemiradia*, *Lepidochromonas butcheri*, *Spiniferomonas septispina*.

5. Заключение

Несмотря на сходные параметры среды, такие как температура и pH воды, а также большое количество общих таксонов, общая численность и биомасса летнего фитопланктона в Южном Байкале выше, чем в Иркутском водохранилище. Имелись расхождения в видовом составе и списке доминирующих видов. В Южном Байкале цианобактерии имели высокую численность, хотя в Иркутском водохранилище их рост был ограниченным. Что касается предыдущих исследований, в том числе проведенных в июне 2023 г., общее богатство увеличилось за счет видов Chrysophyta. Общая численность и биомасса фитопланктона соответствовали летнему периоду предыдущих лет.

Благодарности

Выражаем благодарность команде научно-исследовательского судна «Папанин» за слаженную работу. Микроскопические исследования выполнены в Центре электронной микроскопии ЦКП «Ультрамикроанализ» Лимнологического института, <https://www.lin.irk.ru/copp/>. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-14-00028, <https://rscf.ru/project/23-14-00028/>.

Конфликт интересов

Авторы настоящим заявляют, что данная исследовательская работа и выпуск рукописи соответствуют этическим стандартам и ни у кого из авторов нет потенциального конфликта интересов.

Мы также заявляем, что это исследование не финансировалось каким-либо агентством помимо РФ.

Список литературы

- Васильева Г.Л., Кожова О.М. 1960. Некоторые данные о бактерио-, фито- и зоопланктоне Иркутского водохранилища в годы его образования (1957-1958 гг.). Бюллетень Института биологии водохранилищ 8-9:6-8.
- Васильева Г.Л., Кожова О.М. 1963. Планктон Иркутского водохранилища. Труды ВГБО 13:25-55.
- Воробьева С.С. 1981. Фитопланктон Приангарских водоемов. Круговорот вещества и энергии в водоемах 1: 50-52.
- Воробьева С.С. 1985. Межгодовые изменения фитопланктона в водоемах Ангары. Круговорот вещества и энергии в водоемах 2: 20-22.
- Воробьева С.С. 1995. Фитопланктон Ангарских водохранилищ. Новосибирск: Сибирское издательство «Наука».
- Кожова О.М. 1964. Фитопланктон Иркутского водохранилища. Москва: Наука.
- Корнева Л.Г. 2015. Фитопланктон водоемов Волжского бассейна. Кострома: Костромская типография.
- Михайлов В.В. 2020. Оценка современного экологического состояния Новосибирского водохранилища по показателям развития фитопланктона. канд. наук. Диссертация, Северный Зауральский государственный аграрный университет, Тюмень, Россия.
- Поповская Г.И., Фирсова А.Д. 2005. Фитопланктон Харанорского водохранилища. В: Кириллов В.В. (Ред.), Водоем-охладитель Харанорской ГРЭС и его жизнь. Новосибирск, стр. 58-71.
- Шур Л.А. 2009. Фитопланктон как индикатор состояния экосистемы водоема-охладителя Березовской ГРЭС-1 (Красноярский край). Водные ресурсы 36(5): 597-605.
- Ясницкий В.Н. 1926. Материалы для познания рек Иркутской области. Известия Восточно-Сибирского Отдела Императорского Русского Географического Общества 9(2): 104-114.
- Bessudova A.Yu., Gabyshev V.A., Firsova A.D. et al. 2021. Diversity of silica-scaled chrysophytes and physicochemical parameters of their environment in the estuaries of rivers in the Arctic watershed of Yakutia, Russia. Sustainability 13(24): 13768. DOI: [10.3390/su132413768](https://doi.org/10.3390/su132413768)
- Bessudova A., Likhoshway Y., Firsova A. et al. 2023. Small Organisms in a Large River: What Provides the High Diversity of Scaled Chrysophytes in the Ob River? Water 15(17): 1-29. DOI: [10.3390/w15173054](https://doi.org/10.3390/w15173054)
- Bessudova A.Y., Galachyants Y., Firsova A.D. et al. 2023. Changes in diversity of silica-scaled Chrysophytes during lake-river-reservoir transition (Baikal-Angara-Irkutsk Reservoir). Life 13(10): 1-17. DOI: [10.3390/life13102052](https://doi.org/10.3390/life13102052)
- Firsova A.D., Galachyants Y., Bessudova A.Y. et al. 2023. Environmental factors affecting distribution and diversity of phytoplankton in the Irkutsk Reservoir ecosystem in June 2023. Diversity 15(10): 1-20. DOI: [10.3390/d15101070](https://doi.org/10.3390/d15101070)
- Legendre P., Gallagher E.D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. Oecologia 129: 271-280. DOI: [10.1007/s004420100716](https://doi.org/10.1007/s004420100716)
- Nogueira M.G., Ferrareze M., Moreira M.L. et al. 2010. Phytoplankton assemblages in a reservoir cascade of a large tropical – subtropical river (SE, Brazil). Brazilian Journal of Medical and Biological Research 70(3): 781-793.
- Obertegger U., Flaim G., Corradini S. et al. 2022. Multi-annual comparisons of summer and under-ice phytoplankton communities of a mountain lake. Hydrobiologia 849: 4613-4635. DOI: [10.1007/s10750-022-04952-3](https://doi.org/10.1007/s10750-022-04952-3)

Oksanen J., Simpson G.L., Blanchet G.F. et al. 2022. Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-6. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Popovskaya G.I., Firsova A.D., Bessudova A.Yu. et al. 2012. Phytoplankton of the Irkutsk Reservoir as an indicator of water quality. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 41(2): 29-38. DOI: [10.2478/s13545-012-0014-2](https://doi.org/10.2478/s13545-012-0014-2)

Bacterial diversity and metabolism in microbial consortium of non-axenic culture *Tychonema* sp. BBK16

Krasnopeev A.Yu.*, Tikhonova I.V., Podlesnaya G.V., Potapov S.A., Gladkikh A.S., Suslova M.Yu., Lipko I.A., Sorokovikova E.G., Belykh O.I.

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

ABSTRACT. We performed high-throughput sequencing of microbial community with cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 and heterotrophic bacteria *in vitro*. Representatives of the phylum Pseudomonadota/Proteobacteria, the bacteria *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, and *Bosea* dominate and coexist with the cyanobacterium for a long period of cultivation. It was found that this cyanobacterium is an edificator of this community providing the microbiome with organic matter. Metabolic features of heterotrophic bacteria based on reconstructed genomes are presented. The main processes of carbon and nitrogen metabolism in the biofilm are carbohydrate and amino acid metabolism, as well as processes regulating the relationships between members of this consortium. *Hydrogenophaga* sp. and *Tychonema* sp. BBK16 show carbon autotrophy due to the Calvin–Benson–Bassham (CBB) cycle, while *Sphingomonas* sp. due to the glyoxylate pathway of metabolism. The biofilm also contains the anoxygenic photoheterotroph *Bosea* sp. using light energy to transform organic matter. *Aminobacter* sp. is an active degrader of complex organics, which possesses methylotrophy and supplies hydrogen for oxidation by *Hydrogenophaga* sp., *Paucibacter* sp., also supplies hydrogen for this community. *Sphingomonas*, *Tychonema* and *Paucibacter* release phosphate from organic compounds providing phosphorus to this consortium.

Keywords: cyanobacteria, heterotrophic bacteria, biofilm, functional genes, metabolism

1. Introduction

Interactions occurring between algae and bacteria represent a particular circulation of organic matter (Azam et al., 1983). Cyanobacteria, as primary producers, form a specific habitat environment by forming organic matter and synthesizing biologically active metabolites (Woodhouse et al., 2018). Heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria are more often species with flexible universal metabolism, most of the strains belong to Proteobacteria (Berg et al., 2009). High-throughput sequencing allows a detailed inventory of cyanobacteria-heterotrophic bacteria associations without cultivating (Shaw et al., 2020). For example, *Nostoc* macrocolony communities from lakes have been found to repeat partly a plankton-lake motif, but members of Shingomonadaceae, Rhodobacteriaceae, Comamonadaceae become distinctive (Aguilar et al., 2019). These bacteria are frequent companions of cyanobacteria in natural conditions (Chun et al., 2017; Park et al., 2021; Thorat et al., 2022). Metagenomic studies of the non-axenic cultures' microbiome of subpolar cyanobacteria showed the occurrence of

representatives of Proteobacteria and Bacteroidetes in the community and ruled out the possibility of external contamination confirming the co-evolution of cyanobacteria and their companions (Cornet et al., 2018). Non-axenic algal cultures are suitable model objects for studying interactions between algae and heterotrophic bacteria because they demonstrate *in situ* relationships. The presence of different bacteria in cyanobacterial cultures allows the study of their genomes using bioinformatics tools for nucleotide fragment separation (Tan et al., 2016).

The genome of the filamentous cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 isolated from benthic biofilms revealed its ecology and genomic characteristics (Tikhonova et al., 2022; Evseev et al., 2023). Analysis of DNA isolated from a non-axenic culture of cyanobacterium revealed heterotrophic bacteria inhabiting the mucous cover during autotrophic biofilm growth *in vitro*. The aim of this work is to study the bacteria-companions of *Tychonema* sp. BBK16 and the metabolic characterization of this microbial consortium based on DNA barcoding and metagenomics data.

*Corresponding author.

E-mail address: krasnopeev@lin.irk.ru (A.Yu. Krasnopeev)

Received: December 05, 2023; **Accepted:** December 17, 2023;
Available online: December 19, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2. Material and methods

Sample collection and DNA sequencing

Obtaining a non-axenic culture of cyanobacterium and isolation of DNA was previously described (Tikhonova et al., 2022). The strain was cultured in vitro for seven years on autotrophic Z-8 medium containing nitrate, sulfate, carbonate, and phosphate as nutrients. Illumina Miseq sequencing of the V3-V4 region of 16S rRNA gene was performed according to the manufacturer's instructions with primers 343F (CTCCTACGGRRSGCAG) and 806R (GGACTACNVVGGGTWTCTAAT) in Evrogen (Moscow). Shotgun sequencing was performed by different methods using the DNBSEQ-400 sequencer (MGI, China) by PCR-free protocol with enzymatic fragmentation (MGI, China) and using the Illumina MiSeq platform (Illumina, USA) by the paired-end reads in the case of MGI - 150 bp, in the case of Illumina - 300 bp. The quality of V3-V4 amplicon libraries and metagenomic sequencing results were assessed using the program MultiQC v. 1.12 (Ewels et al., 2016), and adapters were removed using the Trim Galore v. 0.6.5 program (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/, date last accessed: 12 December 2023). A phylogenetic tree was constructed using the BEAST v. 1.8.4 (Drummond and Rambaut, 2007). Raw data deposited PRJNA1042932 (two metagenomic sequencing pools), SRR11929492 (16S rRNA gene sequencing data).

DNA metabarcoding data processing

The DADA2 v. 1.16 package for the R programming language was used for further processing, which included filtering out non-target and chimeric sequences, and clustering into ASVs (Amplicon Sequence Variants) (Callahan et al., 2016; R Core Team, 2021). Nearest homologues were selected by BLASTn searches using the NCBI nr/nt reference sequence databases. ASVs and nearest homologues were aligned using the ClustalO algorithm (Sievers et al., 2011).

Shotgun data processing

Assembly of reads into contigs was performed using the SPAdes v. 3.15.4 (Prjibelski et al., 2020). Mapping of reads to the produced contigs was performed with BWA v. 0.7.17 and the Samtools v. 1.18 package (Heng and Durbin, 2009; Danecek et al., 2021). Metagenomic binning and genome isolation was performed using MetaBAT2 v. 2.15 (Kang et al., 2019). Completeness and contamination of the final MAGs were evaluated using CheckM2 v. 1.0.2 based on a machine learning algorithm (Chklovski et al., 2022).

Open reading frames (ORFs) in contigs were detected using Prodigal v. 2.6.3 (Hyatt et al., 2010). KEGG annotation and assignment of KO numbers to proteins were performed using the BlastKOALA service (Kanehisa et al., 2016) and semi-automatically using DIAMOND v. 2.1.8 (Buchfink et al., 2021) against the NCBI nr protein sequence database. Ribosomal RNA genes were isolated using Barrnap v. 0.9 (Seemann, 2013). Taxonomic annotation of contigs and MAGs was performed using the Kaiju service (Menzel et al., 2016) and manually improved using author scripts based on

metabolic annotation obtained previously.

The functional characteristics of microorganisms were established based on the presence of marker genes for metabolic processes in the genome, similar to the methodology described by Garner et al. (2023). Carbon autotrophy was established by the presence of genes in the CBB cycle - *rbcL*, *prkB*; glyoxylate assimilation pathway - *mct*; ammonia transport into the cell - *amt*, and its assimilation - *glnA*; transport of nitrite/nitrate - *nrtABC*, assimilation of nitrates/nitrites - *narB*, *nirA*, *nasABED*; denitrification genes - *narGHI*, *nirK*, *norB*, *nosZ*; urea transport - *urtABCDE* and its decomposition to ammonia - *ureABC*; carboxylation of urea - *E6.3.4.6* urea carboxylase; ammonium production from glutamate - *asnB*; phosphonate transport *phnCDE*; phosphonate decomposition - *phnAB*; decomposition and modification of phosphonates - *phnIJKLMPWXY*; assimilation of phosphate from organic compounds - *phoD*; transport of inorganic phosphate - *pstBS*; hydrolytic enzymes for polysaccharides - *argH*, *glgX*, *susACD*; sulfate and thiosulphate transport system - *cysAPUW*; oxidation of sulfates and thiosulphates in periplasm - *soxABCDXZ*; degradation of aromatic compounds - *vanA*, *dmpB*, *xylE*; assimilation of carbon monoxide with the release of hydrogen - *coxMLS*, *cutML*; permeases for facilitated transport of oligopeptides and oligosaccharides - *oppABCDF*, *mppA*; methylamine utilisation (methylotrophy)- *gmaS*, *mgsABC*, *mgdABCD*; use of carbon monoxide - *coxMLS*, *cutML*; synthesis of bacteriochlorophylls - *bchMO*; light-gathering polypeptides, photosystem II - *pufML*.

3. Results and discussion

Phylogenetic diversity and bacterial genomes in a non-axenic culture *Tychonema* sp. BBK16

Sequencing of the V3-V4 amplicon library of 16S rRNA gene resulted in 62,028 paired-end reads. From this set, 21 ASVs were isolated, the annotation of which revealed representatives of three phyla: Cyanobacteria (66.1%), Pseudomonadota/Proteobacteria (33.7%), and Actinobacteriota (0.2%). The most represented genera are *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Pseudomonas*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, *Bosea*, *Methylophilus*, *Rhodopseudomonas*, *Ensifer*, *Tabrizicola*, *Acidovorax*, *Caulobacter*; minor genera are *Rhodococcus* and *Iamia* (Table 1).

Shotgun sequencing generated 18,4421,914 paired-end reads; taxonomic annotation of which revealed representatives of three phyla: Cyanobacteria (50.2%), Proteobacteria (49.6%), and Actinobacteriota (0.2%). Metagenomic binning of the contigs obtained after assembly identified 12 bacterial genomes of different quality (Table 2). The most complete genomes according to CheckM2 completeness and contamination statistics (given in parentheses, %), were the following: *Tychonema* sp. BBK16 (bin.4 — 99.15 / 2.42), *Tahibacter* sp. (bin.3 — 99.3 / 0.09), *Aminobacter* sp. (bin.8 — 97.44 / 1.83), *Paucibacter* sp. (bin.9 — 100 / 0.26), *Sphingomonas* sp. (bin.11 — 99.76 / 8.07). Also noteworthy is the high percentage of assembly of the *Devosia*, *Bosea*, and *Hydrogenophaga* genomes.

Table 1. Abundance of ASVs in the biofilm of *Tychonema* sp. BBK16 sample

ID	Phylum	Class	Genus	Count	Value, %
ASV001	Cyanobacteriota	Cyanobacteria	<i>Tychonema</i> CCAP 1459-11B	41016	66.12
ASV003	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>	10959	17.66
ASV005	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	5116	8.24
ASV012	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Paucibacter</i>	1041	1.67
ASV009	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	840	1.35
ASV016	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Aminobacter</i>	789	1.27
ASV017	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	669	1.08
ASV004	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Tahibacter</i>	635	1.02
ASV020	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	433	0.7
ASV037	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	147	0.24
ASV041	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Bosea</i>	81	0.13
ASV047	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	71	0.11
ASV049	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Methylophilus</i>	60	0.01
ASV050	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodopseudomonas</i>	58	0.094
ASV051	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Ensifer</i>	52	0.084
ASV056	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Tabrizicola</i>	36	0.058
ASV027	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	14	0.023
ASV093	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	3	0.005
ASV092	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Caulobacter</i>	3	0.005
ASV091	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	<i>Iamia</i>	3	0.005
ASV095	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	2	0.003

Table 2. Metagenome-assembled genomes isolated from the *Tychonema* sp. BBK16 biofilm sample. Bins with >50% completeness and <5% contamination are in bold.

bin ID	Compl. *	Cont.*	Contig N50	Genome Size	GC Content	Total CDS	Genus
bin.1	20.8	0.35	3434	1190380	0.63	1405	<i>Rhodococcus</i>
bin.2	7.19	0.01	149685	412532	0.6	443	<i>Aminobacter</i>
bin.3	99.3	0.09	214065	6110546	0.66	4716	<i>Tahibacter</i>
bin.4	99.15	2.42	108947	5876576	0.44	5150	<i>Tychonema</i>
bin.5	65.82	0.01	39311	2077122	0.69	1999	<i>Hydrogenophaga</i>
bin.6	84.19	2.56	14881	4250091	0.64	4320	<i>Devosia</i>
bin.8	97.44	1.83	134644	5591995	0.63	5427	<i>Aminobacter</i>
bin.9	100	0.26	214794	4356207	0.67	3973	<i>Paucibacter</i>
bin.10	84.96	3.7	10883	5032618	0.66	5129	<i>Bosea</i>
bin.11	99.76	8.07	90952	3846091	0.69	3710	<i>Sphingomonas</i>
bin.12	15.11	0.04	3530	797961	0.67	888	<i>Stenotrophomonas</i>

Note: * Compl. – Completeness, Cont. - Contamination

To assess the convergence of the targeting and metagenomic sequencing results, a phylogenetic tree was constructed based on the DNA alignment of the fragment 16S rRNA gene (Fig. 1). According to the BLASTn search, the tree also contains the nearest homologues. As shown in the figure, in most cases, it is possible to find a pair of sequences from ASVs and metagenomes belonging to the same genus/species that indicate sufficient sequencing depth for both methods.

Even when no 16S rRNA marker gene was detected in the metagenome, other coding sequences and genome fragments were annotated as taxa represented in the tree.

Metabolic functions of bacteria in the *Tychonema* sp. BBK16 biofilm

According to the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, a total of 2387 different functional orthologs (KO) were identified in the

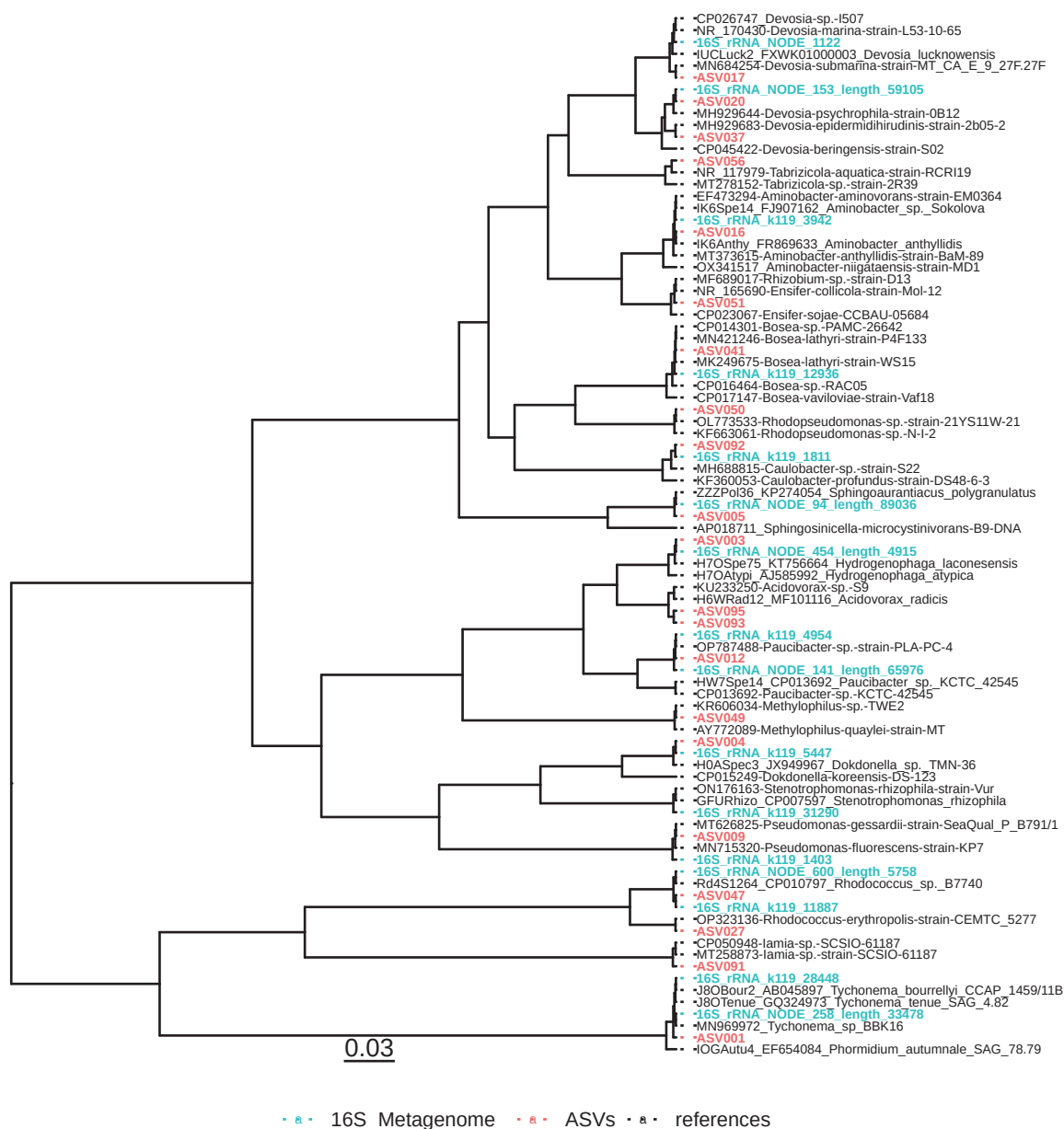


Fig.1. Phylogenetic tree based on DNA alignment of the fragment of the 16S rRNA gene. ASVs obtained from DNA-metabarcoding data are highlighted in red, fragments of 16S rRNA gene from the metagenome are in blue, and nearest neighbors by BLASTn-search are in black color

biofilm-consortium. We presented 8 bins to describe the bacterial functions (Fig.2). The analysis of the main pathways of carbon metabolism showed that the most significant participants in the biofilm community are the metabolism of carbohydrates and amino acids; a large part is represented by the categories of signaling and cellular processes, nucleotide and energy metabolism, membrane transport, and the metabolism of cofactors and vitamins. See Supplementary material (S1) for additional analysis - comparison of predicted functions of microorganisms and actual functional genes.

Functional annotation of the assembled genomes identified key metabolic markers of biofilm community members (Table 3). The ability to fix inorganic carbon was confirmed by the presence of the enzymes of the CBB cycle in the microorganisms *Tychonema* sp. BBK16 and *Hydrogenophaga* sp., although in the latter this process is facultative and occurs when there is a deficit of organic matter in the medium. The ability to use solar energy

is confirmed by the presence of bacteriochlorophyll, carotenoid synthesis genes, and photosystem II reaction center enzymes in the bacterium *Bosea* sp.

A complex cycle of biogenic elements – phosphorus, nitrogen, and sulfur – occurs in the biofilm. Thus, the source of phosphorus is phosphates, which in a closed ecosystem are produced by the activity of the enzyme alkaline phosphatase of the microorganisms *Tychonema*, *Paucibacter*, and *Sphingomonas*. Most bacteria have phosphonate transport systems. These organic phosphorus compounds are common in natural ecosystems and were once the first sources of phosphorus for ancient microorganisms (McGrath et al., 2013). Phosphonate transport systems can also serve as phosphate transporters (Stasi et al., 2019).

Traditionally, the relationship between autotroph and heterotrophic bacteria is considered as a metabolic symbiosis “carbon in exchange for nitrogen” implying that bacteria fix atmospheric nitrogen. Thus,

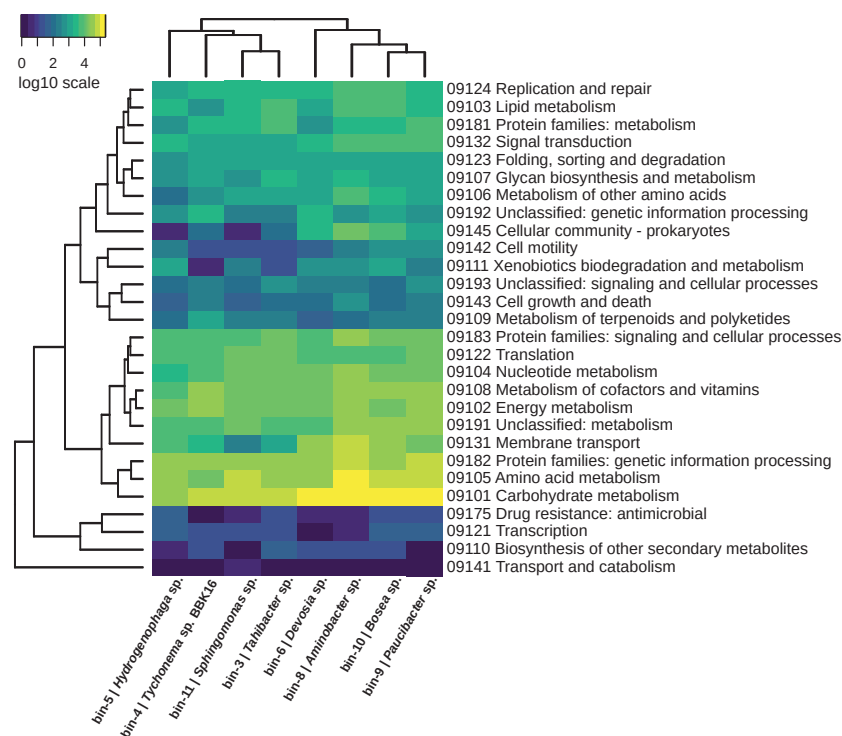


Fig.2. Abundance heatmap of different metabolic processes in the biofilm of *Tychonema* sp. BBK16

a microbial community represented by the filamentous cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* and strains of Actinobacteria and Proteobacteria, many of which were atmospheric nitrogen fixers, was isolated from arid soils (Nelson et al., 2021). In our case, nitrogen fixation was not detected, which was confirmed by the predictive method (PICRUSt2) and the absence of marker genes for the process in the genome (Supplementary materials, S2, S3). Genes responsible for denitrification (nitrogen removal) were identified in three members of a consortium related to Proteobacteria (*Aminobacter*, *Tahibacter*, and probably *Paucibacter*). According to genomic characteristics, the main sources of nitrogen for all members of the consortium may be ammonium, nitrate, nitrite, and urea (as a metabolite and as a decomposition product of dead biomass). Genes related to ammonium transport and ammonium assimilation enzymes were detected in all consortium members. Genes coding for urea transport and its degradation to ammonium were revealed in cyanobacteria and heterotrophic bacteria, except *Sphingomonas*, *Paucibacter*, and *Tahibacter*.

Thus, all metabolic processes are necessary to keep the whole community alive. The autotrophic cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16, as well as the facultative autotrophs *Hydrogenophaga* and *Sphingomonas*, forms organic matter for bacteria. However, it has genes for organic matter assimilation being a mixotroph (Evseev et al., 2023). Facultative autotrophy of hydrogen-oxidizing bacteria is an inducible process; they are successful organotrophs in the presence of simple organic matter (Zavarzin, 1972). Bacteria *Aminobacter*, *Tahibacter*, *Devosia*, and *Paucibacter* are able to consume polysaccharide substances, which are abundant in cyanobacterial biofilm. *Aminobacter*

has the most extensive metabolism being an active polysaccharide degrader, methylotroph, denitrifier, and, as well as *Paucibacter*, a supplier of hydrogen for the hydrogen-oxidizing bacteria. Hydrogen is also released during the anoxygenic photosynthesis of the bacterium *Bosea*. *Devosia* are able to inhabit places rich in organic compounds, such as wastewater and biofilms, due to transport proteins - permeases, which uptake short peptides of various amino acid compositions serving as a source of carbon and nitrogen (Talwar et al., 2020). During the phosphate depletion period, *Sphingomonas*, *Tychonema*, and *Paucibacter* additionally produce alkaline phosphatase to hydrolyze phosphate-containing organic matter. Cyanobacteria *Tychonema* sp. BBK16 is dependent on other bacteria because the system is closed and nitrate and nitrite cannot be provided from outside, while ammonium is released by the bacterial decomposition of nitrogen-containing polysaccharides and glycosides, proteins and amino acids.

It was previously suggested that the microbiome associated with cyanobacteria represents an “ecological footprint” of the habitat (Cornet et al., 2018). We assume that the microbial consortium studied with *Tychonema* is represented by typical inhabitants of substrates rich in organic and has all necessary for this purpose: enzymes of denitrification, methylotrophy, hydrolysis of aromatic compounds and complex polysaccharides, as well as organic compounds of nitrogen, phosphorus, and sulfur. Some of the genera have been described such as *Hydrogenophaga*, *Methylophilus* and *Pseudomonas* are found in the cultivated diatoms of Lake Baikal (Mikhailov et al., 2018). In the article also showed that the Nocardioideae are satellites of Baikal cultivated diatom algae.

Table 3. Microbial processes in the biofilm of *Tychonema* sp. BBK16

Bacterium	Metabolism	Confirmative genes
<i>Tychonema</i> sp. BBK16	Autotroph. Uses nitrate, nitrite, ammonia and urea. Assimilates phosphates of inorganic and organic compounds, synthesizes alkaline phosphatase. Utilizes sulfates and thiosulphates.	rbcl, prkB, amt, nrtA, narB, nirA, glnA, ureABC, urtABCE, pstB, pstS, phoD, cysU, cysW
<i>Tahibacter</i> sp.	Organotroph. Uses phosphates, phosphonates, and ammonia, hydrolyses glycans. Denitrification.	argH, amt, phnA, pstBS, nirK, norB
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	Chemoorganotroph/chemolithoautotroph. Oxidises hydrogen as a source of energy and CO ₂ or simple organic matter as a carbon source. Preferred nitrogen source is urea, glutamate. Able to degrade oligosaccharides. Transports nitrate and phosphate. Participates in thiosulfate oxidation by the periplasmic SOX enzyme complex.	rbcl, prkB, soxABCDXZ, urtABCE, ureABC, urea carboxylase, amt, asnB, cysU, cysW
<i>Devosia</i> sp.	Organotroph. Utilizes organic and inorganic sources of nitrogen and phosphorus, detoxifies urea by decomposition or incorporation into organic compounds. Contains a large number of transporters of oligopeptides and simple organic matter, modifies aromatic compounds. Possesses a powerful chemotaxis system.	glgX, nasC, nasABED, nrtABC, oppABCDF, mppA, phnCIJMP, pstBS, urtAE, ureaABC, urea carboxylase, vanA
<i>Aminobacter</i> sp.	Organotroph. Mobile due to pili, hydrolyses polysaccharides, catechols, glycogen, urea, assimilates nitrate, phosphate, sulfate, thiosulphate, denitrifier. Oxidizes carbon monoxide to carbon dioxide. Methylotroph involved in the degradation of methylamines (serine pathway).	amt, argH, glgX, dmpB, xylE, nasABED, nosZ, nrtABC, pstBS, phnACDIJKLMPWY; soxABG, cysU, cysW, urtABCE, ureABC, gmaS, mgsABC, mgdABCD, coxMLS, cutML
<i>Paucibacter</i> sp.	Aerobic heterotroph capable of hydrolysing complex polysaccharides, a companion bacterium to cyanobacteria in nature and cultures, utilizes nitrate, phosphate, sulfate, thiosulphate. Possible denitrification.	amt, argH, narGHI, nasABED, nrtABC, phoD, pstBS, phnDEX, soxBCDXZ, cysU, cysW, susA, coxMLS, cutML
<i>Bosea</i> sp.	Anoxygenic aerobic phototroph, contains bacteriochlorophyll a and photosystem II. Assimilates nitrate and phosphate.	amt, glgX, argH, bchM, chlM, bchO, bchX,Y,Z, pufM,L, nrtAC, nasDF, urtABC, pstBS, phnCIJKMPXY
<i>Sphingomonas</i> sp.	Universal organotroph capable of carbon autotrophy, fixes carbon dioxide using an alternative carbon pathway, the glyoxylate cycle. Hydrolyses polysaccharides. Assimilates phosphates and phosphonates, produces alkaline phosphatase for phosphorus production from organic compounds.	amt, argH, mct, phoD, pstBS

4. Conclusion

We have demonstrated that Proteobacteria are the main symbionts of the filamentous cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 *in vitro*. The dominant genera were *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, and *Tahibacter*. The studied biofilm community showed processes of oxygenic and anoxygenic photosynthesis (phototrophy and photoheterotrophy), facultative carbon dioxide fixation involving the glyoxylate pathway and SBB, methylotrophy, degradation of polysaccharides and aromatic compounds to oligosaccharides, organic acids, aldehydes, peptides, and monosaccharides, and organic polymers of nitrogen and phosphorus.

Acknowledgments

The authors are grateful to Y.S. Bukin, O.N. Pavlova, S.V. Bukin, I.S. Mikhailov, Y.R. Zakharova for their valuable discussions and help. Metagenomic sequencing using DNA nanoball sequencing (MGI)

technology was supported by Helicon Company (Moscow). The research is funded by State Project 0279-2021-0015, “Viral and bacterial communities as the basis for the stable functioning of freshwater ecosystems...”.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interests.

References

- Aguilar P., Dorador C., Vila I. et al. 2019. Bacterial Communities associated With Spherical Nostoc Macrocolonies. *Frontiers in Microbiology* 10: 483. DOI:[10.3389/fmicb.2019.00483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00483)
- Azam F., Fenchel T., Field J. et al. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology – Progress Series* 10: 257-263. DOI:[10.3354/meps010257](https://doi.org/10.3354/meps010257)
- Berg K., Lyra C., Sivonen K. et al. 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME Journal* 3:314–325. DOI:[10.1038/ismej.2008.110](https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110)

- Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods* 18: 366–368. DOI: [10.1038/s41592-021-01101-x](https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x)
- Callahan B., McMurdie P., Rosen M. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583. DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)
- Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2022. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20:1203–1212. DOI: [10.1101/2022.07.11.499243](https://doi.org/10.1101/2022.07.11.499243)
- Chun S.J., Cui Y., Ko S.R. et al. 2017. *Acidovorax lacteus* sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* sp. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1199–1205. DOI: [10.1007/s10482-017-0892-9](https://doi.org/10.1007/s10482-017-0892-9)
- Cornet L., Bertrand A., Hanikenne M. et al. 2018. Metagenomic assembly of new subpolar Cyanobacteria and their associated microbiome from non-axenic cultures. *Microbial Genomics* 4:e000212. 1. DOI: [10.1099/mgen.0.000212](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000212)
- Danecek P., Bonfield J., Liddle J. et al. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 10:1-4. DOI: [10.1093/gigascience/giab008](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008)
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214. DOI: [10.1186/1471-2148-7-214](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214)
- Evseev P., Tikhonova I., Krasnopeev A. et al. 2023. *Tychonema* sp. BBK16 characterisation: lifestyle, phylogeny and related phages. *Viruses* 15: 442. DOI: [10.3390/v15020442](https://doi.org/10.3390/v15020442)
- Ewels Ph., Magnusson M., Lundin S. et al. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32:3047–3048. DOI: [10.1093/bioinformatics/btw354](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354)
- Garner R.E., Kraemer S.A., Onana V.E. et al. 2023. A genome catalogue of lake bacterial diversity and its drivers at continental scale. *Nature Microbiology* 8:1920–1934. DOI: [10.1038/s41564-023-01435-6](https://doi.org/10.1038/s41564-023-01435-6)
- Heng L., Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)
- Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F. et al. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Molecular Biology* 428(4): 726–731. DOI: [10.1016/j.jmb.2015.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006)
- Kang D.D., Li F., Kirton E. et al. 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 26:7:e7359. DOI: [10.7717/peerj.7359](https://doi.org/10.7717/peerj.7359)
- McGrath J., Chin J., Quinn J. 2013. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Microbiology* 11:412–419. DOI: [10.1038/nrmicro3011](https://doi.org/10.1038/nrmicro3011)
- Menzel P., Ng K., Krogh A. 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications* 7:11257. DOI: [10.1038/ncomms11257](https://doi.org/10.1038/ncomms11257)
- Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Volokitina N.A. et al. 2018. Bacteria associated with planktonic diatoms from Lake Baikal. *Acta Biologica Sibirica*, 4(4):89–94. DOI: [10.14258/abs.v4.i4.4880](https://doi.org/10.14258/abs.v4.i4.4880)
- Nelson C., Giraldo-Silva A., Garcia-Pichel F. 2021. A symbiotic nutrient exchange within the cyanosphere microbiome of the biocrust cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *ISME Journal* 15: 282–292. DOI: [10.1038/s41396-020-00781-1](https://doi.org/10.1038/s41396-020-00781-1)
- Park M., Kim M., Park T. 2021. Effect of cryopreservation on the bacterial community structure of filamentous cyanobacteria *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Cryobiology* 98:87–95. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.003)
- Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current protocols in bioinformatics* 70(1): 102. DOI: [10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Seemann T. 2013. Barrnap 0.9: rapid ribosomal RNA prediction.
- Shaw C., Brooke C., Hawley E. et al. 2020. Phototrophic co-cultures from extreme environments: community structure and potential value for fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology* 11: 572131. DOI: [10.3389/fmicb.2020.572131](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572131)
- Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539. DOI: [10.1038/msb.2011.75](https://doi.org/10.1038/msb.2011.75)
- Stasi R., Neves H.I., Spira B. 2019. Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology* 19:79. DOI: [10.1186/s12866-019-1445-3](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1445-3)
- Talwar C., Nagar S., Kumar R. et al. 2020. Defining the environmental adaptations of genus *Devosia*: insights into its expansive short peptide transport system and positively selected genes. *Scientific Reports* 10: 1151. DOI: [10.1038/s41598-020-58163-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58163-8)
- Tan B.F., Te S.H., Boo C.Y. et al. 2016. Insights from the draft genome of the subsection V (Stigonematales) cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. Strain MRB220 associated with 2-MIB production. *Stand in Genomic Science* 11: 58. DOI: [10.1186/s40793-016-0175-5](https://doi.org/10.1186/s40793-016-0175-5)
- Thorat V., Tiwarekar B., Kirdat K. et al. 2022. *Hydrogenophaga crocea* sp. nov. associated with cyanobacterial mat isolated from farmland mud. *Archives of Microbiology* 204: 265. DOI: [10.1007/s00203-022-02865-2](https://doi.org/10.1007/s00203-022-02865-2)
- Tikhonova I.V., Kuzmin A.V., Sorokovikova E.G. et al. 2022. Microcystin-producing cyanobacteria *Tychonema* sp. from Biofilms of Lake Baikal. *Chemistry for Sustainable Development*. 30: 415–423. DOI: [10.15372/CSD2022399](https://doi.org/10.15372/CSD2022399)
- Woodhouse J.N., Ziegler J., Grossart H.-P. et al. 2018. Cyanobacterial community composition and bacteria–bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 9:777. DOI: [10.3389/fmicb.2018.00777](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777)
- Zavarzin G.A. 1972. Hydrogen bacteria. In: *Lithotrophic microorganisms*. Moscow. pp. 54–99. (in Russian)

Разнообразие бактерий и путей их метаболизма в неаксеничной культуре *Tychonema* sp. BVK16

Краснопеев А.Ю., Тихонова И.В., Подлесная Г.В., Потапов С.А., Гладких А.С., Суслова М.Ю., Липко И.А., Сороковикова Е.Г., Белых О.И.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Проведено высокопроизводительное секвенирование микробного консорциума, образованного культивируемой цианобактерией *Tychonema* sp. BVK16 и гетеротрофными бактериями. Представители филы Pseudomonadota/Proteobacteria – бактерии родов *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, *Bosea* – доминируют и сосуществуют с цианобактерией на протяжении длительного периода культивирования. Цианобактерия является эдификатором этого сообщества, обеспечивая весь микробиом органическим веществом. Приведены метаболические особенности бактерий, исходя из восстановленных геномов. Главными процессами метаболизма углерода и азота в биопленке являются метаболизм углеводов и аминокислот, а также процессы регуляции взаимоотношений между участниками консорциума. Углеродной автотрофией обладают *Tychonema* sp. BVK16 и *Hydrogenophaga* sp. за счет цикла Кальвина – Бенсона – Бассама (КББ) и *Sphingomonas* sp. за счет глиоксилатного пути метаболизма. Также в биопленке присутствует аноксигенный фотогетеротроф *Bosea* sp., который использует энергию света для преобразования органических веществ. Метилотрофией обладает активный деструктор сложной органики *Aminobacter* sp., который поставляет водород для окисления бактериями *Hydrogenophaga* sp. Также водород выделяется бактерией *Paucibacter* sp. Микроорганизмы *Tychonema*, *Sphingomonas*, *Paucibacter* осуществляют высвобождение фосфатов из органических соединений, обеспечивая фосфором весь консорциум.

Ключевые слова: цианобактерия, бактерии, биопленки, функциональные гены, метаболизм

1. Введение

Взаимодействия, происходящие между водорослями и бактериями представляют собой особый круговорот органического вещества (Azam et al., 1983). Цианобактерии, как первичные продуценты, создают специфическую среду местообитания, образуя органические вещества и синтезируя биологически активные метаболиты (Woodhouse et al., 2018). Ассоциированные с цианобактериями гетеротрофные бактерии чаще являются культивируемыми видами с пластичным универсальным метаболизмом, большая часть штаммов принадлежит Proteobacteria (Berg et al., 2009). Высокопроизводительное секвенирование дает возможность провести детальную инвентаризацию ассоциаций цианобактерий с гетеротрофами без получения штаммов бактерий (Shaw et al., 2020). Например, выявлено, что сообщества макроколоний цианобактерии *Nostoc* из озерной прибрежной зоны в целом похожи на планктонные, но в них выше представ-

ленность бактерий семейств Shingomonadaceae, Rhodobacteriaceae, Comamonadaceae (Aguilar et al., 2019). Эти бактерии частые спутники цветений цианобактерий в естественных условиях, а также в неаксеничных культурах (Chun et al., 2017; Park et al., 2021; Thorat et al., 2022). Метагеномные исследования состава микробиома неаксеничных культур полярных цианобактерий показали преобладание Proteobacteria и Bacteroidetes в составе сообщества, предполагая совместную эволюцию цианобактерий и их спутников (Cornet et al., 2018). Неаксеничные культуры водорослей являются модельными объектами для изучения взаимодействий водоросли и гетеротрофных бактерий, поскольку демонстрируют взаимоотношения *in situ*. Присутствие различных бактерий в культурах цианобактерий позволяет исследовать их геномы благодаря биоинформатическим инструментам разделения фрагментов нуклеотидных последовательностей и генов (Tan et al., 2016).

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: krasnopeev@lin.irk.ru (А.Ю. Краснопеев)

Поступила: 05 декабря 2023; **Принята:** 17 декабря 2023;
Опубликована online: 19 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Ранее при анализе генома нитчатой цианобактерии *Tychoneta* sp. BVK16, выделенной из бентосных биопленок оз. Байкал, показаны ее экологические и геномные особенности (Tikhonova et al., 2022; Evseev et al., 2023). При анализе ДНК неаксеничной культуры *Tychoneta* sp. выявлены многочисленные последовательности гетеротрофных бактерий. Целью работы является изучение бактерий-спутников *Tychoneta* sp. BVK16 и метаболическая характеристика этого микробного консорциума на основе данных ДНК-штрихкодирования и метагеномики.

2. Материалы и методы

Секвенирование ДНК культуры

Получение неаксеничной культуры цианобактерии и выделение ДНК описано ранее (Tikhonova et al., 2022). Штамм *Tychoneta* sp. BVK16 культивируется на автотрофной среде Z-8, содержащей нитраты, сульфаты, карбонаты и фосфаты в качестве биогенов, в течение семи лет. Секвенирование участка V3-V4 16S рРНК гена проведено по инструкции производителя с праймерами 343F (CTCCTACGGRRSGCAG) и 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) в компании Евроген (Москва) на платформе Illumina Miseq. Шотган секвенирование проведено разными методами – с использованием секвенатора DNBSEQ-400 (MGI, Китай) по протоколу без ПЦР с ферментативной фрагментацией (MGI, Китай) и с использованием платформы Illumina MiSeq (Illumina, USA) методом парно-концевых прочтений (paired-end reads). Длина полученных фрагментов в случае MGI составила 150 п.н., в случае Illumina – 300 п.н. Оценку качества библиотек V3-V4 ампликонов и результатов метагеномного секвенирования проводили с помощью программы MultiQC v. 1.12 (Ewels et al., 2016), адаптеры удалены с помощью программы Trim Galore v. 0.6.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/, дата последнего доступа: 12 декабря 2023 г.). Филогенетическое дерево реконструировано с использованием BEAST v. 1.8.4 (Drummond and Rambaut, 2007). Сырые данные депонированы в Genbank под номерами доступа PRJNA1042932 (два пула метагеномного секвенирования) и SRR11929492 (данные секвенирования ампликонов участка V3-V4 16S rRNA гена).

Анализ фрагментов 16S рРНК гена

Пакет DADA2 v. 1.16 для языка программирования R использован для дальнейшей обработки, включающей в себя фильтрацию нецелевых и химерных последовательностей, а также кластеризацию последовательностей в ASVs (Exact Sequence Variants) (Callahan et al., 2016; R Core Team, 2021). Ближайшие гомологи выбраны путем BLASTn-поиска по базам референсных последовательностей NCBI nr/nt. ASVs и ближайшие гомологи выровнены с помощью алгоритма ClustalO (Sievers et al., 2011).

Обработка результатов шотган секвенирования

Сборку ридов в контиги проводили с использованием SPAdes v. 3.15.4 (Prjibelski et al., 2020).

Картирование ридов на полученные контиги выполнено в BWA v. 0.7.17 и пакетом Samtools v. 1.18 (Heng and Durbin, 2009; Danecsek et al., 2021). Метагеномный биннинг и выделение геномов проведены с помощью MetaBAT2 v. 2.15 (Kang et al., 2019). Вычитанность и контаминация полученных геномов оценены с использованием CheckM2 v. 1.0.2 на основе алгоритма машинного обучения (Chklovski et al., 2022).

Открытые рамки считывания (ORFs) в контигах обнаружены с помощью Prodigal v. 2.6.3 (Hyatt et al., 2010). Аннотация по KEGG и присвоение КО номеров белкам выполнены с помощью сервиса BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016) и в полуавтоматическом режиме с помощью DIAMOND 2.1.8 (Buchfink et al., 2021) против базы белковых последовательностей NCBI nr. Гены рибосомных РНК выделены с использованием Barrnap 0.9 (Seemann, 2013). Таксономическая аннотация контигов и геномов выполнена с помощью сервиса Kaiju (Menzel et al., 2016) и уточнена вручную с помощью авторских скриптов на основе метаболической аннотации.

Функциональные особенности микроорганизмов установлены на основании присутствия в геноме маркерных генов метаболических процессов в соответствии с методикой, описанной Гарнером и др. (2023). Углеродная автотрофия устанавливалась по присутствию генов цикла КББ – *rbcl*, *prkB*; путь ассимиляции глиоксилата – *mct*; транспорт аммония в клетку – *amt*, и его ассимиляция – *glnA*; транспорт нитритов/нитратов – *nrtABC*, ассимиляция нитратов/нитритов – *narB*, *nirA*, *nasABED*; денитрификация – *narGHI*, *nirK*, *norB*, *nosZ*; транспорт мочевины – *urtABCDE* и её разложение до аммония – *ureABC*; карбоксилирование мочевины – карбоксилаза мочевины *E6.3.4.6*; получение аммония из глутамата – *asnB*; транспорт фосфонатов – *phnCDE*; разложение фосфонатов – *phnAB*; разложение и модификация фосфонатов – *phnIJKLMPWXY*; усвоение фосфата из органических соединений – *phoD*; транспорт неорганического фосфата – *pstBS*; гидролитические ферменты для полисахаридов – *argH*, *glgX*, *susACD*; транспортная система сульфатов и тиосульфатов – *cysAPUW*; окисление сульфатов и тиосульфатов в периплазме – *soxABCDXZ*; деградация ароматических соединений – *vanA*, *dmpB*, *xylE*; усвоение монооксида углерода с выделением водорода – *soxMLS*, *cutML*; пермеазы для облегченного транспорта олигопептидов и олигосахаров – *oppABCDF*, *mppA*; утилизация метиламинов (метилотрофия) – *gmaS*, *mgsABC*, *mgdABCD*; использование монооксида углерода – *soxMLS*, *cutML*; синтез бактериохлорофиллов – *bchMO*; светособирающие полипептиды фотосистемы II – *pufML*.

3. Результаты и обсуждение

Филогенетическое разнообразие бактерий и их геномов в неаксеничной культуре *Tychoneta* sp. BVK16

В результате секвенирования библиотеки ампликонов V3-V4 16S рРНК гена было получено

62 028 парно-концевых ридов. Из этого набора выделено 21 ASV, при аннотации которых обнаружены представители трех филумов: Cyanobacteria (66,1%), Pseudomonadota/Proteobacteria (33,7%) и Actinobacteriota (0,2%). Наиболее представленные рода – *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Pseudomonas*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*, *Bosea*, *Methylophilus*, *Rhodopseudomonas*, *Ensifer*, *Tabrizicola*, *Acidovorax*, *Caulobacter*, минорные – *Rhodococcus* и *Iamia* (Таблица 1).

В результате секвенирования тотальной ДНК методом дробовика было получено 18 4421 914 парно-концевых ридов, при таксономической аннотации которых обнаружены представители трех филумов: Cyanobacteria (50,2%), Proteobacteria (49,6%) и Actinobacteriota (0,2%). В ходе метагеномного биннинга полученных после сборки контигов было выделено 12 бактериальных геномов разного качества (Таблица 2). Наиболее полными по показателям вычитанности и контаминации, согласно

Таблица 1. Представленность последовательностей (ASVs) фрагментов 16S рРНК гена бактерий в биопленке *Tychonema* sp. BVK16

Номер	Филум	Класс	Род	Количество ридов	Доля, %
ASV001	Cyanobacteriota	Cyanobacteria	<i>Tychonema</i>	41016	66,125
ASV003	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>	10959	17,668
ASV005	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	5116	8,248
ASV012	Pseudomonadota/Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Paucibacter</i>	1041	1,678
ASV009	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	840	1,354
ASV016	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Aminobacter</i>	789	1,272
ASV017	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	669	1,079
ASV004	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Tahibacter</i>	635	1,024
ASV020	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	433	0,698
ASV037	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	147	0,237
ASV041	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Bosea</i>	81	0,131
ASV047	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	71	0,114
ASV049	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Methylophilus</i>	60	0,097
ASV050	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodopseudomonas</i>	58	0,094
ASV051	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Ensifer</i>	52	0,084
ASV056	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Tabrizicola</i>	36	0,058
ASV027	Actinobacteriota	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	14	0,023
ASV093	Pseudomonadota/Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	3	0,005
ASV092	Pseudomonadota/Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Caulobacter</i>	3	0,005
ASV091	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	<i>Iamia</i>	3	0,005
ASV095	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	2	0,003

Таблица 2. Характеристика геномов, восстановленных из метагеномных данных секвенирования неаксичной культуры *Tychonema* sp. BVK16. Жирным показаны геномы имеющие более 90% вычитанности и менее 5% контаминации.

Тег генома	Вычитанность, %	Контаминация, %	Статистика N50	Размер генома, пн	Доля GC-пар	Число рамок считывания	Род
bin.1	20,8	0,35	3434	1190380	0,63	1405	<i>Rhodococcus</i>
bin.2	7,19	0,01	149685	412532	0,6	443	<i>Aminobacter</i>
bin.3	99,3	0,09	214065	6110546	0,66	4716	<i>Tahibacter</i>
bin.4	99,15	2,42	108947	5876576	0,44	5150	<i>Tychonema</i>
bin.5	65,82	0,01	39311	2077122	0,69	1999	<i>Hydrogenophaga</i>
bin.6	84,19	2,56	14881	4250091	0,64	4320	<i>Devosia</i>
bin.8	97,44	1,83	134644	5591995	0,63	5427	<i>Aminobacter</i>
bin.9	100	0,26	214794	4356207	0,67	3973	<i>Paucibacter</i>
bin.10	84,96	3,7	10883	5032618	0,66	5129	<i>Bosea</i>
bin.11	99,76	8,07	90952	3846091	0,69	3710	<i>Sphingomonas</i>
bin.12	15,11	0,04	3530	797961	0,67	888	<i>Stenotrophomonas</i>

CheckM2 статистике (дано в скобках), были геномы: *Tychonema* sp. BVK16 (bin.4 — 99.15 / 2.42), *Tahibacter* sp. (bin.3 — 99.3 / 0.09), *Aminobacter* sp. (bin.8 — 97.44 / 1.83), *Paucibacter* sp. (bin.9 — 100 / 0.26), *Sphingomonas* sp. (bin.11 — 99.76 / 8.07). Также следует отметить высокий процент сборки геномов *Devosia*, *Bosea* и *Hydrogenophaga*.

Для оценки сходимости результатов таргетного и метагеномного секвенирования было построено филогенетическое дерево, основанное на выравнивании последовательностей 16S рРНК гена (Рис. 1). В древо также включены ближайшие гомологи согласно BLASTn-поиску. Как показано на рисунке 1, в большинстве случаев удаётся найти пару последовательностей из ASVs и метагенома, принадлежащих одному роду/виду, что говорит о достаточной глубине секвенирования для обоих методов. Даже в случае, если в метагеноме не обнаруживалось маркерного гена 16S рРНК, другие

кодирующие последовательности и фрагменты геномов были аннотированы как представленные на древе таксоны.

Метаболические функции бактериальной составляющей биопленки *Tychonema* sp. BVK16

Суммарно в биопленке-консорциуме выявлено 2387 различных функциональных ортологов (KO) по базе данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Для описания функций бактерий мы представили 8 бинов (Рис. 2). Анализ основных путей метаболизма углерода выявил акцент основных участников сообщества биопленки на метаболизме углеводов и аминокислот, большую долю представляют категории сигнальных и клеточных процессов, нуклеотидного, энергетического метаболизма, транспорта веществ через мембрану, метаболизма кофакторов и витаминов. Дополнительный анализ – сравнение предсказанных функций микроорганизмов и реально

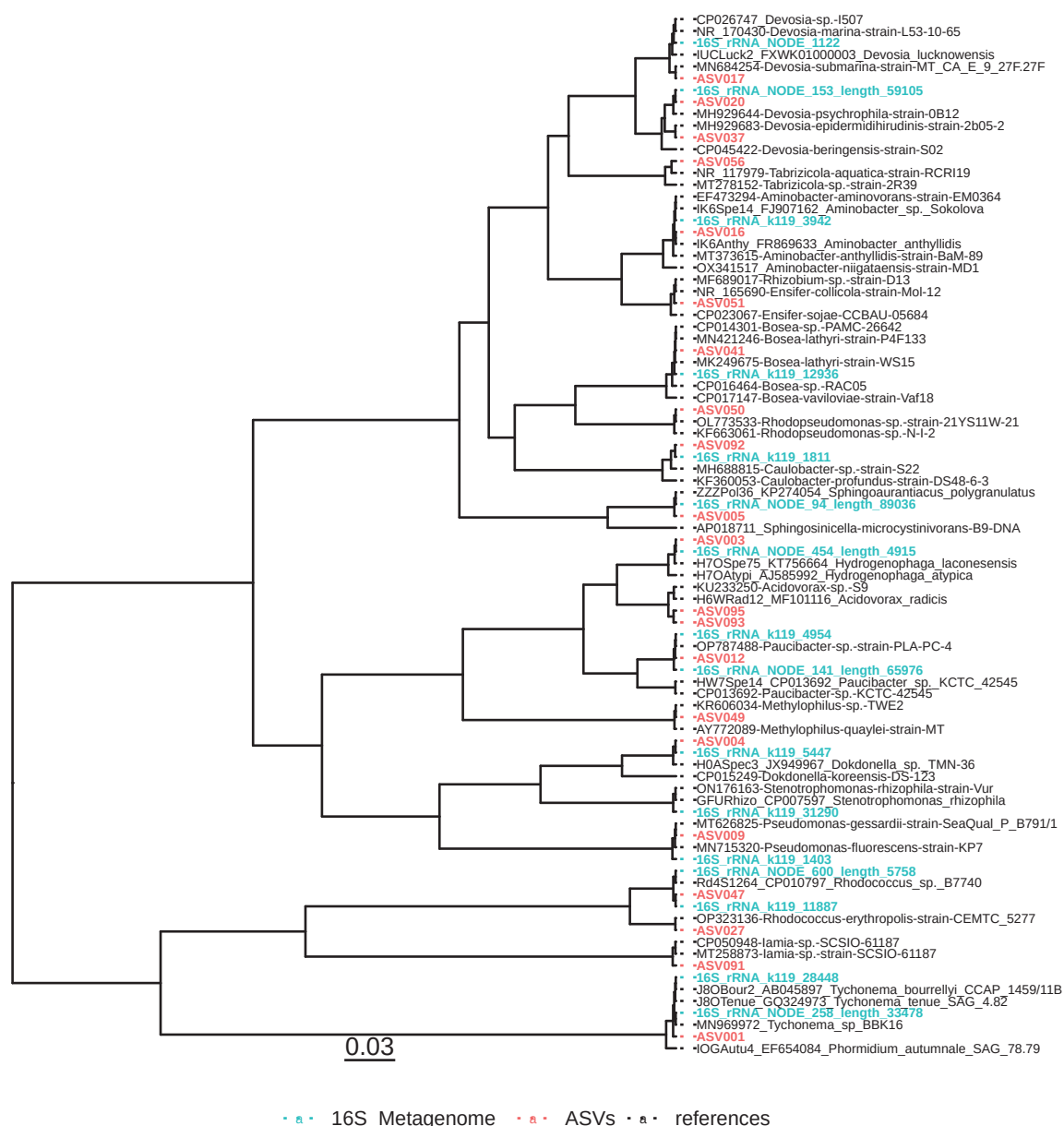


Рис.1. Ультраматрическое филогенетическое дерево, основанное на выравнивании ДНК фрагмента 16S рРНК гена. Красным выделены ASV последовательности, синим – фрагменты гена 16S рРНК из метагенома, черным – ближайшие соседи по данным BLASTn-поиска

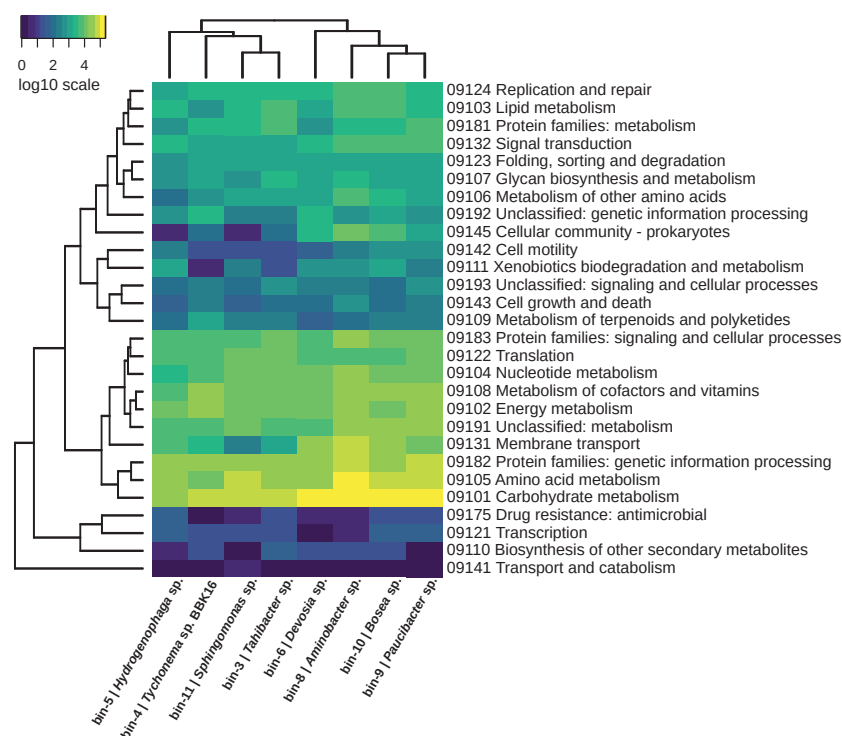


Рис.2. Тепловая карта представленности метаболических путей по базе данных KEGG в метагеноме *Tychonema* sp. BVK16. Цветом обозначено количество генов, аннотированных в каждом из геномов.

присутствующих функциональных генов приведен в Дополнительных Материалах (S1).

При функциональной аннотации собранных геномов выделены белки основных метаболических путей в сообществе биопленки (Таблица 3). Способность к фиксации неорганического углерода подтверждается присутствием ферментов цикла Кальвина – Бенсона – Бассама у микроорганизмов *Tychonema* sp. BVK16 и *Hydrogenophaga* sp., однако для последней этот процесс является факультативным и реализуется при дефиците органических веществ в среде. Способность бактерии *Bosea* sp. использовать энергию солнечного света подтверждается присутствием генов синтеза бактериохлорофилла, каротиноидов, а также ферментов реакционного центра фотосистемы II.

В биопленке происходят процессы образования и разложения соединений биогенных элементов – фосфора, азота и серы. Так, источником фосфора являются фосфаты, которые в замкнутой экосистеме поступают за счет активности щелочной фосфатазы микроорганизмов *Tychonema*, *Paucibacter*, *Sphingomonas*. У большинства бактерий найдены транспортные системы для фосфонатов. Эти органические соединения фосфора часто присутствуют в природных экосистемах и когда-то были первыми источниками фосфора для древних микроорганизмов (McGrath et al., 2013). Показано, что фосфонатные транспортные системы могут служить переносчиками фосфатов (Stasi et al., 2019).

Традиционно взаимоотношения автотрофа и гетеротрофных бактерий рассматриваются как метаболический симбиоз «углерод в обмен на азот», подразумевая, что бактерии фиксируют атмос-

ферный азот. Такое сообщество микроорганизмов выделено из почв пустынь и представлено нитчатой цианобактерией *Microcoleus vaginatus* и штаммами Actinobacteria и Proteobacteria, многие из которых являлись фиксаторами атмосферного азота (Nelson et al., 2021). В нашем случае фиксация азота не обнаружена, что подтверждено предиктивным методом (PICRUST2) и отсутствием в геноме маркерных генов процесса (Дополнительные материалы, S2, S3). Гены, отвечающие за денитрификацию (удаление азота), выявлены у родов *Tahibacter*, *Aminobacter* и *Paucibacter* (Proteobacteria). По геномным характеристикам, основными источниками азота для всех участников консорциума могут являться аммоний, нитраты, нитриты и мочевины (как метаболит и как продукт разложения отмершей биомассы). Гены, связанные с транспортом аммония и ферментами его ассимиляции, выявлены у всех членов консорциума. Гены, кодирующие транспорт мочевины и ее разложение до аммония выявлены у цианобактерии и гетеротрофных бактерий, кроме *Sphingomonas*, *Paucibacter* и *Tahibacter*.

Таким образом, все метаболические процессы необходимы для поддержания жизни всего сообщества. Автотроф цианобактерия *Tychonema* sp. BVK16 образует органическое вещество для бактерий, наряду с факультативными автотрофами *Hydrogenophaga* и *Sphingomonas*. Однако одновременно она имеет гены для усвоения органических веществ, являясь миксотрофом (Evseev et al., 2023). Факультативная автотрофия водородных бактерий является индуцируемым процессом, они являются успешными органотрофами при наличии простых органических веществ (Заварзин, 1972). Бактерии

Таблица 3. Микробные процессы в биопленке *Tychonema* sp. BVK16

Род	Особенности метаболизма	Подтверждающие гены
<i>Tychonema</i> sp. BVK16	Автотроф. Использует нитраты, нитриты, аммоний и мочевины. Усваивает фосфаты неорганических и органических соединений, синтезирует щелочную фосфатазу. Ассимилирует сульфаты и тиосульфаты.	rbcL, prkB, amt, nrtA, narB, nirA, glnA, ureABC, urtABCE, pstB, pstS, phoD, cysU, cysW
<i>Tahibacter</i> sp.	Органотроф, использующий фосфаты, фосфонаты, аммоний, гидролизует гликаны. Денитрификатор	argH, amt, phnA, pstBS, nirK, norB
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	Хемоорганотроф/хемолитоавтотроф, окисляет водород в качестве источника энергии и CO ₂ или простые органические вещества в качестве источника углерода. Предпочтительный источник азота – мочевина, глутамат. Способна к деградации олигосахаридов. Транспортирует нитраты и фосфаты. Участвует в окислении тиосульфата с помощью периплазматического ферментного комплекса SOX.	rbcL, prkB, soxABCDXZ, urtABCE, ureABC, urea carboxylase, amt, asnB, cysU, cysW
<i>Devosia</i> sp.	Органотроф, использующий органические и неорганические источники азота и фосфора, детоксифицирует мочевину разложением или включением в органические соединения. Ассимилирует олигопептиды и простые органические вещества, модифицирует ароматические соединения. Обладатель мощной системы хемотаксиса.	glgX, nasC, nasABED, nrtABC, oppABCD, mppA, phnCIJMP, pstBS, urtAE, ureaABC, urea carboxylase, vanA
<i>Aminobacter</i> sp.	Органотроф, подвижный за счет пилей, гидролизует полисахариды, катехолы, гликоген, мочевину, ассимилирует нитраты, фосфаты, сульфаты, тиосульфаты. Денитрификатор. Окисляет монооксид углерода до углекислого газа. Метилотроф, участвует в деградации метиламинов	amt, argH, glgX, dmpB, xylE, nasABED, nosZ, nrtABC, pstBS, phnACDIJKLMPWY; soxABG, cysU, cysW, urtABCE, ureABC, gmaS, mgsABC, mgdABCD, coxMLS, cutML
<i>Paucibacter</i> sp.	Аэробный гетеротроф, способный гидролизовать сложные полисахариды, бактерия-спутник цианобактерий в природе и культурах, использует нитраты, фосфаты, сульфаты, тиосульфаты. Денитрификатор?	amt, argH, narGHI, nasABED, nrtABC, phoD, pstBS, phnDEX, soxBCDXZ, cysU, cysW, susA, coxMLS, cutML
<i>Bosea</i> sp.	Аноксигенный аэробный фототроф, содержит бактериохлорофилл а и фотосистему II. Ассимилирует нитраты и фосфаты	amt, glgX, argH, bchM, chlM, bchO, bchX,Y,Z, pufM,L, nrtAC, nasDF, urtABC, pstBS, phnCIJKMPXY
<i>Sphingomonas</i> sp.	Универсальный органотроф, способный к углеродной автотрофии, фиксирует углекислый газ с помощью альтернативного углеродного пути – глиоксилатного цикла. Гидролизует полисахариды. Ассимилирует фосфаты и фосфонаты, имеет щелочную фосфатазу для получения фосфора из органических соединений	amt, argH, mct, phoD, pstBS

Aminobacter, *Tahibacter*, *Devosia* и *Paucibacter* способны потреблять полисахариды, которые в избытке присутствуют в цианобактериальной биопленке. *Aminobacter* имеет самый разветвленный обмен веществ, являясь активным деструктором полисахаридов, метилотрофом, денитрификатором, и, вместе с *Paucibacter*, поставщиком водорода для водородных бактерий. Также водород выделяется при аноксигенном фотосинтезе бактерии *Bosea*. Бактерии рода *Devosia* способны выживать в средах, богатых органическими соединениями, таких как сточные воды, биопленки, благодаря транспортным белкам – пермеазам, которые позволяют усваивать короткие пептиды различного аминокислотного состава и удовлетворять их потребности в углероде и азоте (Talwar et al., 2020) В период истощения фосфатов *Tychonema*, *Sphingomonas*, *Paucibacter* дополнительно выделяют щелочную фосфатазу для гидролиза фосфат-содержащих органических

веществ. Цианобактерия зависит от других участников сообщества, поскольку, когда в замкнутой системе нитраты и нитриты не поступают извне, аммоний высвобождается в результате разложения бактериями азотсодержащих полисахаридов и гликозидов, белков и аминокислот.

Ранее высказано утверждение, что ассоциированный с цианобактериями микробиом представляет собой «экологический след» их среды обитания (Cornet et al., 2018). Мы показали, что микробный консорциум цианобактерии *Tychonema* представлен типичными обитателями богатых органикой субстратов, которые имеют все необходимое для их преобразования и ассимиляции: ферменты денитрификации, метилотрофии, гидролиза ароматических соединений и сложных полисахаридов, а также органических соединений азота, фосфора и серы. Некоторые из описанных видов также встречаются в культурах диатомовых водорослей озера Байкал

(Mikhailov et al., 2018). Обнаружены бактерии-ассоцианты *Hydrogenophaga*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*, которые также выявлены и в нашей работе. Также показали, что актинобактерии порядка *Nocardioides* являются спутниками байкальских культивируемых водорослей.

4. Заключение

Нами показано, что *Proteobacteria* – главные симбионты нитчатой цианобактерии *Tychonema* sp. ВВК16. Доминантными являются рода *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Paucibacter*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Tahibacter*. В исследуемом сообществе протекали процессы оксигенного и аноксигенного фотосинтеза (фототрофия и фотогетеротрофия), факультативная фиксация углекислого газа с помощью глиоксилатного пути и КББ, метилотрофия, деструкция полисахаридов и ароматических соединений до олигосахаридов, органических кислот, альдегидов, пептидов и моносахаров, а также органических полимеров азота и фосфора.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Букину Ю.С., Павловой О.Н., Букину С.В., Михайлову И.С., Захаровой Ю.Р. за конструктивные замечания и помощь в обсуждении материалов работы. Метагеномное секвенирование по технологии DNA nanoball sequencing (MGI) проведено при поддержке компании Хеликон (Москва). Исследования проведены за счет государственной бюджетной темы № 0279-2021-0015 «Вирусные и бактериальные сообщества как основа устойчивого функционирования пресноводных экосистем...».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Заварзин Г.А. 1972. Водородные бактерии Литотрофные микроорганизмы. Москва, Наука: 54-99

Aguilar P., Dorador C., Vila I. et al. 2019. Bacterial Communities associated With Spherical Nostoc Macrocolonies. *Frontiers in Microbiology* 10: 483. DOI:[10.3389/fmicb.2019.00483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00483)

Azam F., Fenchel T., Field J. et al. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology – Progress Series* 10: 257–263. DOI:[10.3354/meps010257](https://doi.org/10.3354/meps010257)

Berg K., Lyra C., Sivonen K. et al. 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME Journal* 3: 314–325. DOI:[10.1038/ismej.2008.110](https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110)

Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods* 18: 366–368. DOI:[10.1038/s41592-021-01101-x](https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x)

Callahan B., McMurdie P., Rosen M. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583. DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)

[nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)

Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J. et al. 2022. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods* 20:1203–1212. DOI: [10.1101/2022.07.11.499243](https://doi.org/10.1101/2022.07.11.499243)

Chun S.J., Cui Y., Ko S.R. et al. 2017. *Acidovorax lacteus* sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* sp. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1199–1205. DOI: [10.1007/s10482-017-0892-9](https://doi.org/10.1007/s10482-017-0892-9)

Cornet L., Bertrand A., Hanikenne M. et al. 2018. Metagenomic assembly of new subpolar Cyanobacteria and their associated microbiome from non-axenic cultures. *Microbial Genomics* 4: e000212. 1. DOI: [10.1099/mgen.0.000212](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000212)

Danecek P., Bonfield J., Liddle J. et al. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools, *GigaScience*. 10:1-4. DOI:[10.1093/gigascience/giab008](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008)

Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214. DOI: [10.1186/1471-2148-7-214](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214)

Evseev P., Tikhonova I., Krasnopeev A. et al. 2023. *Tychonema* sp. ВВК16 characterisation: lifestyle, phylogeny and related phages. *Viruses* 15: 442. DOI:[10.3390/v15020442](https://doi.org/10.3390/v15020442)

Ewels Ph., Magnusson M., Lundin S. et al. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32:3047–3048. DOI:[10.1093/bioinformatics/btw354](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354)

Garner R.E., Kraemer S.A., Onana V.E. et al. 2023. A genome catalogue of lake bacterial diversity and its drivers at continental scale. *Nature Microbiology* 8:1920–1934. DOI:[10.1038/s41564-023-01435-6](https://doi.org/10.1038/s41564-023-01435-6)

Heng L., Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics* 25:1754–1760. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)

Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F. et al. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119

Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Molecular Biology* 428(4): 726–731. DOI:[10.1016/j.jmb.2015.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006)

Kang D.D., Li F., Kirton E. et al. 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 26:7:e7359. DOI:[10.7717/peerj.7359](https://doi.org/10.7717/peerj.7359)

McGrath J., Chin J., Quinn J. 2013. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Microbiology* 11:412–419. DOI:[10.1038/nrmicro3011](https://doi.org/10.1038/nrmicro3011)

Menzel P., Ng K., Krogh A. 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications* 7:11257. DOI:[10.1038/ncomms11257](https://doi.org/10.1038/ncomms11257)

Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Volokitina N.A. et al. 2018. Bacteria associated with planktonic diatoms from Lake Baikal. *Acta Biologica Sibirica*, 4(4):89–94. DOI: [10.14258/abs.v4.i4.4880](https://doi.org/10.14258/abs.v4.i4.4880)

Nelson C., Giraldo-Silva A., Garcia-Pichel F. 2021. A symbiotic nutrient exchange within the cyanosphere microbiome of the biocrust cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *ISME Journal* 15: 282–292. DOI:[10.1038/s41396-020-00781-1](https://doi.org/10.1038/s41396-020-00781-1)

Park M., Kim M., Park T. 2021. Effect of cryopreservation on the bacterial community structure of filamentous cyanobacteria *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Cryobiology* 98:87–95. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.003)

Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D. et al. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current protocols in bioinformatics* 70(1): 102. DOI:[10.1002/cpbi.102](https://doi.org/10.1002/cpbi.102)

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Seemann T. 2013. Barrnap 0.9: rapid ribosomal RNA prediction.

Shaw C., Brooke C., Hawley E. et al. 2020. Phototrophic co-cultures from extreme environments: community structure and potential value for fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology* 11: 572131. DOI:[10.3389/fmicb.2020.572131](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572131)

Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539. DOI: [10.1038/msb.2011.75](https://doi.org/10.1038/msb.2011.75)

Stasi R., Neves H.I., Spira B. 2019. Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology* 19:79. DOI:[10.1186/s12866-019-1445-3](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1445-3)

Talwar C., Nagar S., Kumar R. et al. 2020. Defining the environmental adaptations of genus *Devosia*: insights into its expansive short peptide transport system and positively selected genes. *Scientific Reports* 10: 1151. DOI:[10.1038/s41598-020-58163-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58163-8)

Tan B.F., Te S.H., Boo C.Y. et al. 2016. Insights from the draft genome of the subsection V (Stigonematales) cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. Strain MRB220 associated with 2-MIB production. *Stand in Genomic Science* 11: 58. DOI:[10.1186/s40793-016-0175-5](https://doi.org/10.1186/s40793-016-0175-5)

Thorat V., Tiwarekar B., Kirdat K. et al. 2022. *Hydrogenophaga crocea* sp. nov. associated with cyanobacterial mat isolated from farmland mud. *Archives of Microbiology* 204: 265. DOI:[10.1007/s00203-022-02865-2](https://doi.org/10.1007/s00203-022-02865-2)

Tikhonova I.V., Kuzmin A.V., Sorokovikova E.G. et al. 2022. Microcystin-producing cyanobacteria *Tychonema* sp. from Biofilms of Lake Baikal. *Chemistry for Sustainable Development*. 30: 415-423. DOI: [10.15372/CSD2022399](https://doi.org/10.15372/CSD2022399)

Woodhouse J.N., Ziegler J., Grossart H.-P. et al. 2018. Cyanobacterial community composition and bacteria-bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 9:777. DOI:[10.3389/fmicb.2018.00777](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777)

Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S., Pal'shin V.A., Annenkov V.V.*

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

ABSTRACT. Vital fluorescence staining of calcium-containing structures in calcifying organisms is a powerful tool for the study of biocalcification. The main dyes used in this field have green or red fluorescence, which may be overlapped with the fluorescence of chlorophyll and other organic substances. We synthesized a novel coumarin-based fluorescent dye QA2 that stains calcium carbonate and calcium phosphate. The fluorescence of this dye depends from environment, it is enhanced in non-polar medium with a shift of the emission maximum to the blue spectrum region. Small vaterite and calcium phosphate particles adsorb QA2 on the surface and exhibit predominantly green fluorescence, while low surface area calcite crystals are stained in bulk and show additional intense blue fluorescence. The ability of the QA2 dye to generate blue fluorescence of calcium carbonate may be useful for tracking calcium carbonate formation at living organisms in the presence of green and red fluorescent organic substances.

Keywords: fluorescence, vital dye, coumarin, calcite, vaterite

1. Introduction

Vital fluorescence staining of calcium-containing structures in calcifying organisms allows us to measure their growth rates and study biocalcification processes (Ramesh et al., 2017; Tambutte et al., 2012). Various fluorescent dyes that fluoresce in the green and red spectrum are used for this purpose (Liao et al., 2021; Tada et al., 2014). Calcein (Mount et al., 2004; Vidavsky et al., 2015) and alizarin red (González-Pabón et al., 2021; Wannakajeepiboon et al., 2023) have found the greatest use among such dyes. Calcein is considered more reliable and widely used due to its potential non-toxicity and ease of use in contrast to alizarin red, thus calcein can be added directly to the environment of organisms (Serguenco et al., 2018). However, the presence of autofluorescence in mollusk shells (Delvene et al., 2022; Spires et al., 2021) as well as in algae (Donaldson, 2020; Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007) can cause difficulties for the interpretation of fluorescence images because there is an overlap fluorescence spectra of calcein or alizarin red with the structures autofluorescing in the yellow-green or red region. Using dyes with fluorescence in the blue region of the spectrum can be the solution for this problem. We recently developed dye QN2 based on coumarin to stain growing siliceous frustules of

diatom algae (Annenkov et al., 2019). This dye exhibits emission in the blue range of the spectrum with the addition of green fluorescence upon incorporation into silica. The ability of QN2 to enter siliceous structures is attributed the presence of amine groups capable interacting with silica. Calcium-based biominerals are bound to carboxyl-containing substances (Nudelman et al., 2006; Rao et al., 2015), so calcium-targeted dyes (alizarin red and calcein) contain several acidic groups.

The aim of this work is to synthesize a new coumarin dye QA2 with two carboxyl groups, to study its spectral properties and ability to stain *in situ* obtained calcium carbonate and phosphate.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

All solvents and reagents were purchased from Vekton JSC (St. Petersburg, Russia). Ethyl acetate was washed with a sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride followed by distillation. Dimethylformamide (DMF) was shaken for 30 minutes with anhydrous CuSO₄, filtered through a Büchner funnel, distilled in vacuum and kept with 3A molecular sieves. Triethylamine was dried with CaH₂ and distilled. L-aspartic acid was kept over P₄O₁₀ in an evacuated desiccator for 48 hours before

*Corresponding author.

E-mail address: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (V.V. Annenkov)

Received: December 03, 2023; **Accepted:** December 18, 2023;

Available online: December 20, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



use. 7-(Diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid and succinimidyl ester of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid were synthesized according to (Berthelot et al., 2005).

2.2. Synthesis of N-[[7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl]carbonyl]-L-aspartic acid (QA2)

Mixture of 40.6 mg (0.305 mmole) of L-aspartic acid, 74.8 mg (0.739 mmole) of triethylamine, 90.3 mg (0.252 mmole) of succinimidyl ester of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid and 3 mL of dry DMF was magnetically stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for four hours and at 55°C for five hours. Then the volatiles were evaporated in vacuum of an oil rotary vane pump (35°C heating bath) and the residue was taken up in a mixture of 3 mL of distilled water and 5 mL of ethyl acetate followed by filtration through a cotton plug. The aqueous layer was separated, extracted with ethyl acetate (2 mL × 2), acidified with concentrated hydrochloric acid and extracted again with ethyl acetate (2 mL × 3). The latter combined ethyl acetate extracts were dried over MgSO₄, rotary evaporated and kept in vacuum of an oil rotary vane pump at 40°C for three hours to give a yellow-brown product. ESI-MS, found: [M + H]⁺ 377.1340, molecular formula C₁₈H₂₀N₂O₇ requires [M + H]⁺ 377.1343.

2.3. Synthesis of calcium carbonate and calcium phosphate in the presence of dyes

Stained calcium carbonate precipitates were obtained by coprecipitation using stock solutions of Na₂CO₃ (24 mM, pH = 9), CaCl₂ (24 mM) and QA2 (4 mM). The precipitates were formed in 10 ml glass vials at 25°C. Total solution volume was 4 ml. Solutions of sodium carbonate, dye and the required amount of water were mixed, shaken well and after 1 min, calcium chloride solution was added, while stirring. Concentrations in the final mixture were 6 mM for Ca²⁺, 6 mM for CO₃²⁻, 0.01 mM for dye. The vial was capped and left at room temperature. The precipitate that formed after 2 h was separated by centrifugation (1000 g, 10 min), washed with water (4°C) and studied with microscopy.

Stained calcium phosphate precipitates were obtained by coprecipitation using stock solutions of

(NH₄)₂HPO₄ (24 mmol, pH = 10) and CaCl₂ (24 mmol) and QA2 (4 mM). The precipitates were generally formed in 10 ml glass vials at 25°C. Total solution volume was 4 ml. Solutions of diammonium hydrogen phosphate, dye and the required amount of water were mixed, shaken well and after 1 min, calcium chloride solution was added, while stirring. Concentrations in the final mixture were 6 mM for Ca²⁺, 3.6 mM for HPO₄²⁻, 0.01 mM for dye. The vial was capped and left at room temperature. The precipitate that formed after 2 h was separated by centrifugation (1000 g, 10 min), washed with water (4°C) and studied with microscopy.

2.4. Instrumentation

HRMS analysis was performed on an Agilent 6210 TOF (time-of-flight) LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) System. Sample was dissolved in a mixture of deionized water and acetonitrile (2/1 (v/v)). Water and acetonitrile with 0.1% (v/v) heptafluorobutyric acid were used as eluting solvents A and B, respectively. The conditions for TOF MS were as follows: the mass range was m/z 60 to 500, and scan time was 1 s with an interscan delay of 0.1 s; mass spectra were recorded under electrospray ionization (ESI)⁺, V mode, centroid, normal dynamic range, capillary voltage 3500 V, desolvation temperature 325 °C, and nitrogen flow 5 L/min.

Absorption, excitation and emission spectra were measured with SM-2203 spectrofluorimeter (CJSC Spectroscopy, Optics and Lasers – Modern Developments, Republic of Belarus, Minsk) in 10 mm quartz cuvette. A pulsed xenon lamp was used as an excitation source in the device.

Light and fluorescent microscopy was performed with MOTIC AE-31T inverted microscope with a HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for green and yellow emission and 365 nm for blue emission.

3. Results and discussion

QA2 dye was prepared by the reaction of succinimidyl ester of 7-(diethylamino) coumarin-3-carboxylic acid with L-aspartic acid (Fig. 1). Absorbance spectra of the new dye (Fig. 2) contain three peaks at 216, 265 and 430 (water), 253 and 410 (dioxane) nm. The shape of the emission spectra (Fig. 3) does not strongly depend on the excitation wavelength, but the

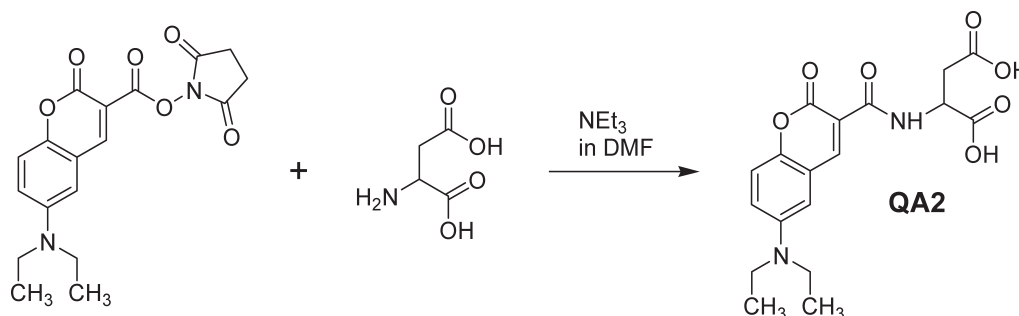


Fig.1. Synthesis of QA2 dye.

fluorescence intensity in water is much lower than in dioxane, and its maximum (475 nm) is shifted to red compared to the fluorescence in dioxane (455 nm). Similar effects were observed and discussed for the dye QN2 (Annenkov et al., 2019).

Calcium carbonate obtained from the reaction of calcium chloride and sodium carbonate (Fig. 4) is characterized by particles of two forms: cubic crystals and aggregated small rounded particles. The cubic crystals and aggregates were calcite and vaterite, respectively. Vaterite is metastable form of calcium carbonate which transforms into calcite in aqueous media by dissolving and recrystallization (Ogino et al., 1987). Calcite particles show green and blue fluorescence, while vaterite shows only green-yellow emission. This difference in fluorescence color is similar to the difference in emission spectra of QA2 in water and in a nonpolar solvent such as dioxane. We hypothesize that small vaterite particles with high surface area adsorb QA2 on the surface and the fluorescence of the dye is similar to that in aqueous medium. The dye is incorporated into calcite crystals at the transformation of vaterite in calcite, as result its fluorescence becomes similar to emission in a non-aqueous medium, with a shift to the blue range. Precipitation of calcium phosphate in the presence of QA2 dye results in the formation of small green-fluorescent particles with weak blue emission (Fig. 5). Probably the dye in small calcium phosphate particles is not as isolated from water as in calcite crystals, which reduces fluorescence in the blue range.

4. Conclusions

We synthesized a novel coumarin-based fluorescent dye QA2 that stains calcium carbonate and calcium phosphate. The fluorescence of the dye depends on the environment, it is enhanced in non-

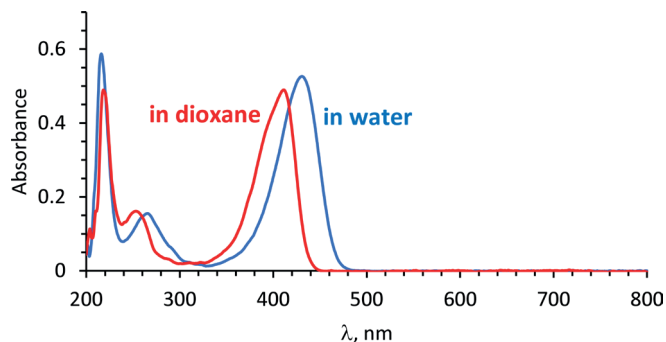


Fig.2. Absorbance spectra of 10 μ M QA2 solutions in water and 1,4-dioxane.

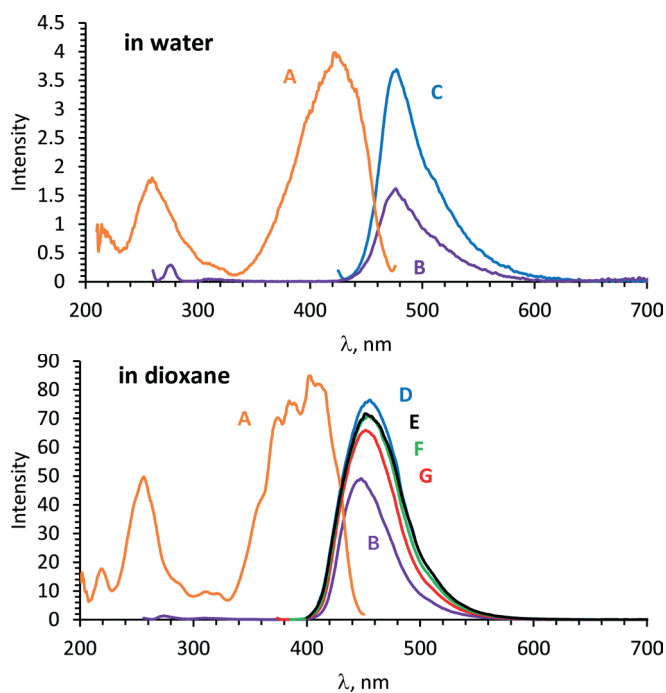


Fig.3. Excitation and emission spectra of QA2 in water and 1,4-dioxane. Concentration 5 μ M. A – excitation spectra at emission 452 nm, B – emission spectra at excitation 256 nm, C – 425 nm, D – 410 nm, E – 400 nm, F – 385 nm, G – 374 nm. Emission and excitation slits 5 nm.

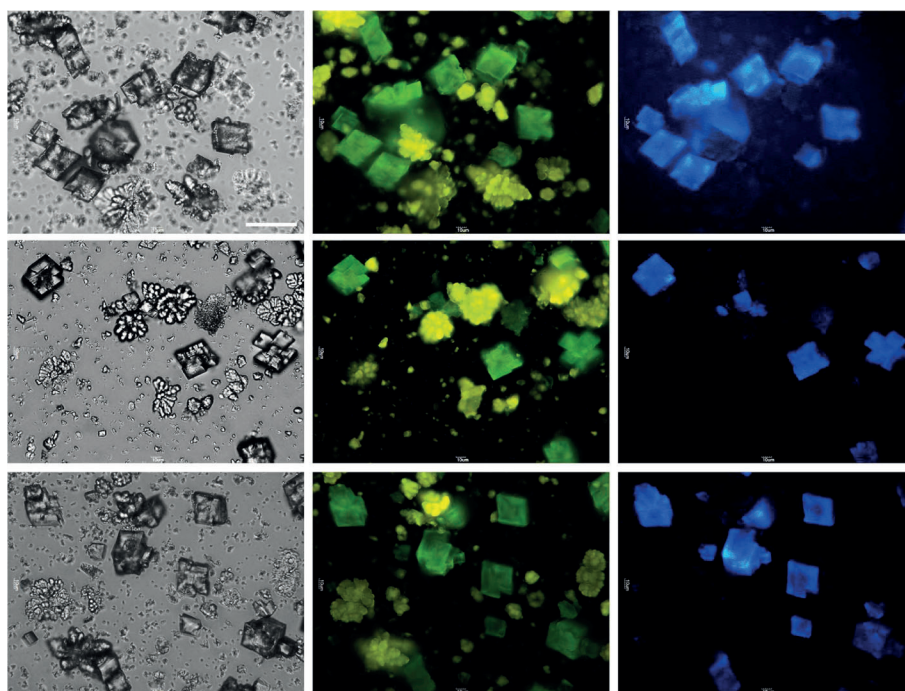


Fig.4. Visible light microphotographs and epifluorescence of calcium carbonate particles obtained in the presence of dye QA2. Scale bar represents 50 μ m.

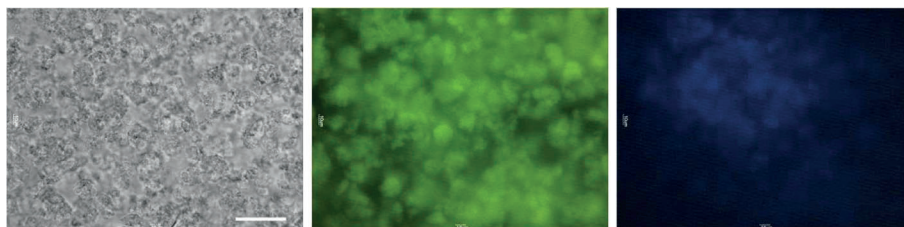


Fig.5. Visible light microphotographs and epifluorescence of calcium phosphate particles obtained in the presence of QA2 dye. Scale bar represents 50 μm .

polar medium and the emission maximum shifts to the blue region of the spectrum. Small vaterite and calcium phosphate particles adsorb QA2 on the surface and exhibit predominantly green fluorescence, while low surface area calcite crystals are stained in bulk and show also intense blue fluorescence. The ability of the QA2 dye to generate blue fluorescence of calcium carbonate may be useful for tracking calcium carbonate formation in living organisms in the presence of green and red fluorescent organic substances.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project # 122012600070-9. The authors wish to thank the Center of Ultramicroanalysis (Limnological Institute) for providing equipment.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160:336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Berthelot T., Talbot J.C., L  n G. et al. 2005. Synthesis of N  -(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and N  -(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11:153–60. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)
- Delvene G., Lozano R.P., Pi  uela L. et al. 2022. Autofluorescence of microborings in fossil freshwater bivalve shells. *Lethaia* 55(4):1-12. DOI: [10.18261/let.55.4.7](https://doi.org/10.18261/let.55.4.7)
- Donaldson L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25:2393. DOI: [10.3390/molecules25102393](https://doi.org/10.3390/molecules25102393)
- González-Pab  n M.A., Tortolero-Langarica J.J.A., Calderon-Aguilera L.E. et al. 2021. Low calcification rate, structural complexity, and calcium carbonate production of *Pocillopora* corals in a biosphere reserve of the central Mexican Pacific. *Marine Ecology* 42(6):e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)
- Liao J., Patel D., Zhao Q. et al. 2021. A novel Ca^{2+} indicator for long-term tracking of intracellular calcium flux. *Biotechniques* 70(5):271-277. DOI: [10.2144/btn-2020-0161](https://doi.org/10.2144/btn-2020-0161)
- Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304:297. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)
- Nudelman F., Gotliv B.A., Addadi L. et al. 2006. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *Journal of Structural Biology* 153:176–187. DOI: [10.1016/j.jsb.2005.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.009)
- Ogino T., Suzuki T., Sawada K. 1987. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51(10):2757–2767. DOI: [10.1016/0016-7037\(87\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90155-4)
- Ramesh K., Hu M.Y., Thomsen J. et al. 2017. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications* 8:1709. DOI: [10.1038/s41467-017-01806-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8)
- Rao A., Fernández M.S., C  lfen H. et al. 2015. Distinct effects of avian egg derived anionic proteoglycans on the early stages of calcium carbonate mineralization. *Crystal Growth & Design* 15:2052 – 2056. DOI: [10.1021/acs.cgd.5b00342](https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00342)
- Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent Staining of Living Plant Cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M., Huang B. (Eds) *Plant Microtechniques and Protocols*. Springer, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)
- Serguienko A., Wan M.Y., Myklebost O. 2018. Real-time vital mineralization detection and quantification during in vitro osteoblast differentiation. *Biological Procedures Online* 20:14. DOI: [10.1186/s12575-018-0079-4](https://doi.org/10.1186/s12575-018-0079-4)
- Spires J.E., Dungan C.F., North E.W. 2021. Marking the shells of pediveliger eastern oysters *Crassostrea virginica*, with a calcein fluorochrome dye. *Journal of Shellfish Research* 40(3):479–487. DOI: [10.2983/035.040.0304](https://doi.org/10.2983/035.040.0304)
- Tada M., Takeuchi A., Hashizume M. et al. 2014. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience* 39(11):1720-8. DOI: [10.1111/ejn.12476](https://doi.org/10.1111/ejn.12476)
- Tambutte E., Tambutte S., Segonds N. et al. 2012. Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification. *Proceedings of the Royal Society* 279:19–27. DOI: [10.1098/rspb.2011.0733](https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733)
- Tang Y.Z., Dobbs F.C. 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7):2306-2313. DOI: [10.1128/AEM.01741-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01741-06)
- Vidavsky N., Admir M., Schertel A. et al. 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *Journal of Structural Biology* 192:358–365. DOI: [10.1016/j.jsb.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.017)
- Wannakajeepiboon M., Sathorn C., Kornuthisophon C. et al. 2023. Evaluation of the chemical, physical, and biological properties of a newly developed bioceramic cement derived from cockle shells: an in vitro study. *BMC Oral Health* 23:354. DOI: [10.1186/s12903-023-03073-0](https://doi.org/10.1186/s12903-023-03073-0)

Кислотный краситель на основе кумарина для флуоресцентного окрашивания частиц карбоната кальция

Зелинский С.Н., Даниловцева Е.Н., Стрелова М.С., Пальшин В.А., Анненков В.В.*

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 3 ул. Улан-Баторская, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Витальное флуоресцентное окрашивание кальцийсодержащих структур в кальцифицирующих организмах - мощный инструмент для изучения биокальцификации. Основные красители, используемые в этой области, обладают зеленой или красной флуоресценцией, которая может перекрываться с флуоресценцией хлорофилла и других органических веществ. Мы синтезировали новый флуоресцентный краситель QA2 на основе кумарина, который окрашивает карбонат и фосфат кальция. Флуоресценция красителя зависит от среды, она усиливается в неполярной среде, а максимум эмиссии смещается в синюю область спектра. Мелкие частицы ватерита и фосфата кальция адсорбируют QA2 на поверхности и демонстрируют преимущественно зеленую флуоресценцию, в то время как кристаллы кальцита с низкой площадью поверхности окрашиваются в массе и демонстрируют также интенсивную синюю флуоресценцию. Способность красителя QA2 генерировать синюю флуоресценцию карбоната кальция может быть полезна для отслеживания образования карбоната кальция в живых организмах в присутствии органических веществ с зеленой и красной флуоресценцией.

Ключевые слова: флуоресценция, витальный краситель, кумарин, кальцит, ватерит

1. Введение

Витальное флуоресцентное окрашивание кальцийсодержащих структур в кальцифицирующих организмах позволяет измерять скорость их роста и изучать процессы биокальцификации (Ramesh et al., 2017; Tambutte et al., 2012). Для этого используются различные флуоресцентные красители, флуоресцирующие в зеленом и красном спектре (Liao et al., 2021; Tada et al., 2014). Наибольшее применение среди таких красителей нашли кальцеин (Mount et al., 2004; Vidavsky et al., 2015) и ализариновый красный (González-Pabón et al., 2021; Wannakajeeeriboon et al., 2023). Кальцеин считается более надежным и широко используемым благодаря своей потенциальной нетоксичности и простоте применения - в отличие от ализаринового красного, кальцеин можно добавлять непосредственно в среду обитания организмов (Serguienko et al., 2018). Однако наличие автофлуоресценции в раковинах моллюсков (Delvene et al., 2022; Spires et al., 2021), а также в водорослях (Donaldson, 2020; Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007) может вызвать трудности в интерпретации флуоресцентных изображений из-за перекрытия спектров флуорес-

ценции кальцеина или ализаринового красного и структур, автофлуоресцирующих в желто-зеленой или красной области. Решением проблемы может стать использование красителей с флуоресценцией в синей области спектра. Недавно (Annenkov et al., 2019) мы разработали краситель QN2 на основе кумарина для окрашивания растущих кремнистых фрустул диатомовых водорослей. Этот краситель демонстрирует эмиссию в синей области спектра с добавлением зеленой флуоресценции при встраивании в кремнезем. Способность QN2 проникать в кремнистые структуры объясняется наличием аминных групп, способных взаимодействовать с кремнеземом. Биоминералы на основе кальция способны связываться с карбоксилсодержащими веществами (Nudelman et al., 2006; Rao et al., 2015), поэтому красители, нацеленные на кальций (ализариновый красный и кальцеин), содержат несколько кислотных групп.

Цель данной работы - синтез нового кумаринового красителя QA2 с двумя карбоксильными группами, изучение его спектральных свойств и способности окрашивать *in situ* полученные карбонат и фосфат кальция.

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (В.В. Анненков)

2. Материалы и методы

2.1. Химические реактивы

Все растворители и реактивы были приобретены в ЗАО «Вектон» (Санкт-Петербург, Россия). Этилацетат промывали раствором бикарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция с последующей отгонкой. Диметилформамид (ДМФА) встряхивали в течение 30 минут с безводным CuSO_4 , фильтровали через воронку Бюхнера, перегоняли в вакууме и выдерживали на молекулярных ситах 3А. Триэтиламин сушили CaH_2 и отгоняли. Перед использованием L-аспарагиновую кислоту выдерживали над P_4O_{10} в вакуумированном эксикаторе в течение 48 часов. 7-(Диэтиламино)кумарин-3-карбоновая кислота и сукцинимидиловый эфир 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты были синтезированы в соответствии с (Berthelot et al., 2005).

2.2. Синтез of N-[[7-(диэтиламино)-2-оксо-2H-1-бензопиран-3-ил]карбонил]-L-аспарагиновой кислоты (QA2)

Смесь 40.6 мг (0.305 ммоль) L-аспарагиновой кислоты, 74.8 мг (0.739 ммоль) триэтиламина, 90.3 мг (0.252 ммоль) сукцинимидилового эфира 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты и 3 мл сухого ДМФА перемешивали на магнитной мешалке в атмосфере азота при комнатной температуре в течение четырех часов и при 55°C пять часов. Затем летучие компоненты выпарили в вакууме масляного насоса (нагрев на бане 35°C), а остаток растворили в смеси 3 мл дистиллированной воды и 5 мл этилацетата и профильтровали через слой ваты. Водный слой отделили, проэкстрагировали этилацетатом (2 мл \times 2), подкислили концентрированной соляной кислотой и снова проэкстрагировали этилацетатом (2 мл \times 3). Последние объединенные этилацетатные экстракты высушили MgSO_4 , выпарили на ротаторном испарителе и выдержали в вакууме масляного насоса при 40°C в течение трех часов, получив желто-коричневый продукт. ESI-MS, найдено: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 377.1340, молекулярной формуле $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$ соответствует $[\text{M} + \text{H}]^+$ 377.1343.

2.3. Синтез карбоната и фосфата кальция в присутствии красителей

Окрашенные осадки карбоната кальция получали соосаждением из исходных растворов Na_2CO_3 (24 mM, pH = 9), CaCl_2 (24 mM) и QA2 (4 mM). Осадки получали в стеклянных флаконах емкостью 10 мл при 25°C. Общий объем раствора составлял 4 мл. Растворы карбоната натрия, красителя и необходимого количества воды смешивали, хорошо встряхивали и через 1 минуту при перемешивании добавляли раствор хлорида кальция. Концентрации в конечной смеси составили 6 mM Ca^{2+} , 6 mM CO_3^{2-} , 0,01 mM красителя. Флакон закрывали крышкой и оставляли при комнатной температуре. Выпавший

через 2 ч осадок отделяли центрифугированием (1000 g, 10 минут), промывали водой (4°C) и исследовали микроскопически.

Окрашенные осадки фосфата кальция получали соосаждением из маточных растворов $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (24 ммоль, pH = 10), CaCl_2 (24 ммоль) и QA2 (4 mM). Осадки получали в стеклянных флаконах емкостью 10 мл при 25°C. Общий объем раствора составлял 4 мл. Растворы гидрофосфата диамония, красителя и необходимого количества воды смешивали, хорошо встряхивали и через 1 мин при перемешивании добавляли раствор хлорида кальция. Концентрации в конечной смеси составляли 6 mM Ca^{2+} , 3,6 mM HPO_4^{2-} , 0,01 mM красителя. Флакон закрывали крышкой и оставляли при комнатной температуре. Выпавший через 2 ч осадок отделяли центрифугированием (1000 g, 10 минут), промывали водой (4°C) и исследовали микроскопически.

2.4. Приборы

Анализ HRMS проводили при помощи системы Agilent 6210 TOF (времяпролетная) LC/MS (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия). Образец растворяли в смеси деионизированной воды и ацетонитрила 2/1 (по объему). В качестве элюирующих растворителей А и В использовали воду и ацетонитрил с 0,1% добавкой (по объему) гептафтормасляной кислоты. Условия проведения TOF MS были следующими: диапазон масс m/z от 60 до 500, время сканирования 1 секунда с задержкой между сканированиями 0,1 с; масс-спектры записывали при ионизации электрораспылением (ESI)+, режим V, центрийд, нормальный динамический диапазон, капиллярное напряжение 3500 В, температура десольватации 325 °C и поток азота 5 л/мин.

Спектры поглощения, возбуждения и эмиссии измеряли на спектрофлуориметре CM-2203 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры - современные разработки», республика Беларусь, Минск) в 10 мм кварцевой кювете. В качестве источника возбуждения в приборе использовалась импульсная ксеноновая лампа.

Световая и флуоресцентная микроскопия проводилась на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Возбуждение проводилось при 470 нм для зеленой и желтой эмиссии и 365 нм для синей эмиссии.

3. Результаты и обсуждение

Краситель QA2 был получен в реакции сукцинимидилового эфира 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты с L-аспарагиновой кислотой (Рис. 1). Спектры поглощения нового красителя (Рис. 2) содержат три пика при 216, 265 и 430 (вода), 253 и 410 (диоксан) нм. Форма спектров эмиссии (Рис. 3) не сильно зависит от длины волны возбуждения, но интенсивность флуорес-

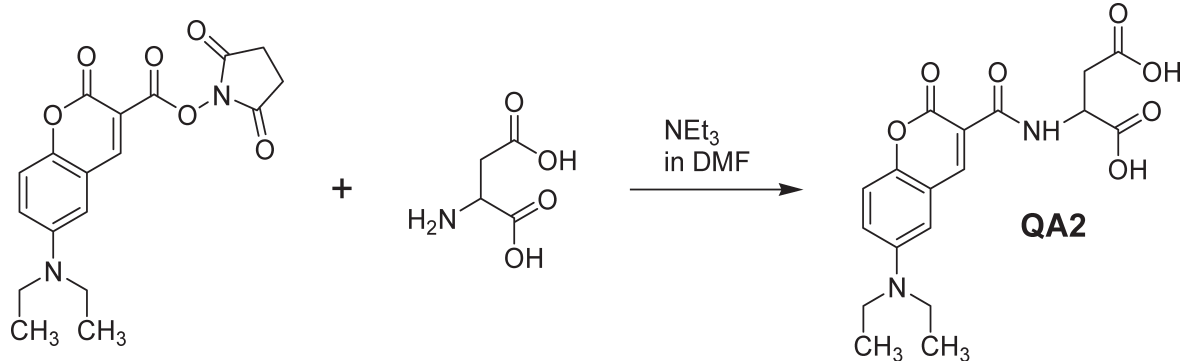


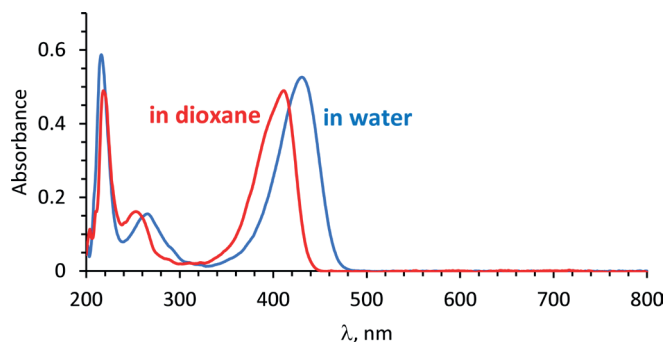
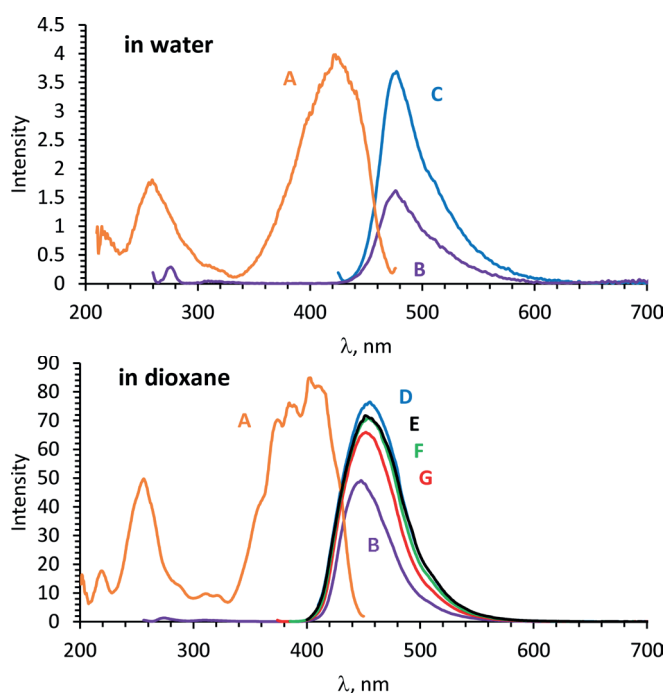
Рис.1. Синтез красителя QA2.

ценции в воде значительно ниже, чем в диоксане, а ее максимум (475 нм) сдвинут в красную область по сравнению с флуоресценцией в диоксане (455 нм). Аналогичные эффекты наблюдались и обсуждались для красителя QN2 (Annenkov et al., 2019).

Карбонат кальция, получаемый в результате реакции хлорида кальция и карбоната натрия (Рис. 4), содержит частицы двух форм: кубические кристаллы и агрегированные мелкие округлые частицы. Кубические кристаллы представляют собой кальцит, а мелкие частицы - ватерит - метастабильную форму карбоната кальция, которая в водной среде превращается в кальцит путем растворения и перекристаллизации (Ogino et al., 1987). Частицы кальцита проявляют зеленую и синюю флуоресценцию, в то время как ватерит демонстрирует только зелено-желтую эмиссию. Это различие в цвете флуоресценции аналогично различию в спектрах эмиссии в воде и в неполярном растворителе, таком как диоксан. Мы предполагаем, что мелкие частицы ватерита с высокой площадью поверхности адсорбируют QA2 на поверхности, и флуоресценция красителя аналогична флуоресценции в водной среде. Превращение ватерита в кальцит приводит к захоронению красителя в кристалле кальцита, и его флуоресценция становится похожей на эмиссию в неводной среде, со сдвигом в синий диапазон. Осаждение фосфата кальция в присутствии красителя QA2 приводит к образованию мелких зелено-флуоресцирующих частиц, которые демонстрируют слабую синюю эмиссию (Рис. 5). Вероятно, краситель в мелких частицах фосфата кальция не так изолирован от воды, как в кристаллах кальцита, что снижает флуоресценцию в синем диапазоне.

4. Выводы

Мы синтезировали новый флуоресцентный краситель QA2 на основе кумарина, который окрашивает карбонат и фосфат кальция. Флуоресценция красителя зависит от среды, она усиливается в неполярной среде, а максимум эмиссии смещается в синюю область спектра. Мелкие частицы ватерита и фосфата кальция адсорбируют QA2 на поверхности и демонстрируют преимущественно зеленую флуоресценцию, в то время как кристаллы кальцита с низкой площадью поверхности окрашиваются в массу и демонстрируют также интенсивную синюю

Рис.2. Спектры поглощения 10 μ M растворов QA2 в воде и 1,4-диоксане.Рис.3. Спектры возбуждения и эмиссии QA2 в воде и 1,4-диоксане. Концентрация 5 μ M. А - спектры возбуждения при эмиссии 452 нм, В - спектры эмиссии при возбуждении 256 нм, С - 425 нм, D - 410 нм, Е - 400 нм, F - 385 нм, G - 374 нм. Щели для эмиссии и возбуждения 5 нм

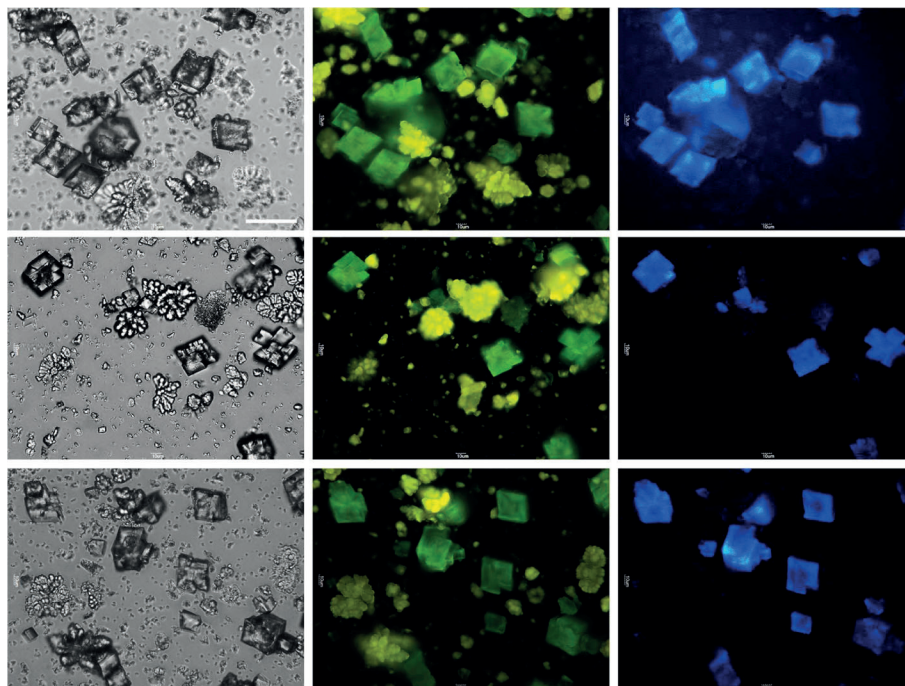


Рис.4. Микрофотографии в видимом свете и эпифлуоресценция частиц карбоната кальция, полученных в присутствии красителя QA2. Масштабная линейка 50 µm.

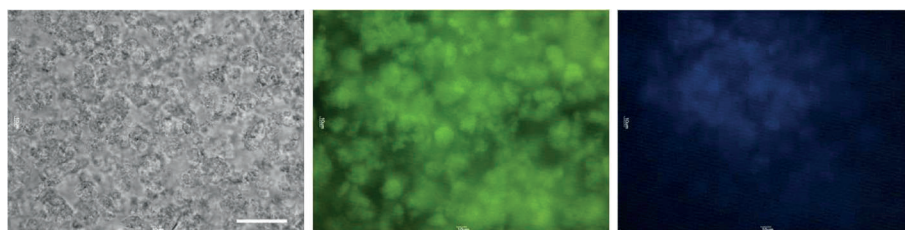


Рис.5. Микрофотографии в видимом свете и эпифлуоресценция частиц фосфата кальция, полученных в присутствии красителя QA2. Масштабная линейка 50 µm.

флуоресценцию. Способность красителя QA2 генерировать синюю флуоресценцию карбоната кальция может быть полезна для отслеживания образования карбоната кальция в живых организмах в присутствии органических веществ с зеленой и красной флуоресценцией.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9. Авторы выражают благодарность Центру ультрамикроскопии (Лимнологический институт) за предоставленное оборудование.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160:336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)

Berthelot T., Talbot J.C., Lain G. et al. 2005. Synthesis of Ne-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Ne-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11:153–60. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)

Delvene G., Lozano R.P., Piñuela L. et al. 2022. Autofluorescence of microborings in fossil freshwater bivalve shells. *Lethaia* 55(4):1-12. DOI: [10.18261/let.55.4.7](https://doi.org/10.18261/let.55.4.7)

Donaldson L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25:2393. DOI: [10.3390/molecules25102393](https://doi.org/10.3390/molecules25102393)

González-Pabón M.A., Tortolero-Langarica J.J.A., Calderon-Aguilera L.E. et al. 2021. Low calcification rate, structural complexity, and calcium carbonate production of *Pocillopora* corals in a biosphere reserve of the central Mexican Pacific. *Marine Ecology* 42(6):e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)

Liao J., Patel D., Zhao Q. et al. 2021. A novel Ca^{2+} indicator for long-term tracking of intracellular calcium flux. *Biotechniques*. 70(5):271-277. DOI: [10.2144/btn-2020-0161](https://doi.org/10.2144/btn-2020-0161)

Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304:297. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)

Nudelman F., Gotliv B.A., Addadi L. et al. 2006. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *Journal of Structural Biology* 153:176–187. DOI: [10.1016/j.jsb.2005.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.009)

Ogino T., Suzuki T., Sawada K. 1987. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51(10):2757–2767. DOI: [10.1016/0016-7037\(87\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90155-4)

Ramesh K., Hu M.Y., Thomsen J. et al. 2017. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications* 8:1709. DOI: [10.1038/s41467-017-01806-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8)

Rao A., Fernández M.S., Cölfen H. et al. 2015. Distinct effects of avian egg derived anionic proteoglycans on the early stages of calcium carbonate mineralization. *Crystal Growth & Design* 15:2052–2056. DOI: [10.1021/acs.cgd.5b00342](https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00342)

Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent Staining of Living Plant Cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M., Huang B. (Eds) *Plant Microtechniques and Protocols*. Springer, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)

Serguienko A., Wan M.Y., Myklebost O. 2018. Real-time vital mineralization detection and quantification during in vitro osteoblast differentiation. *Biological Procedures Online* 20:14. DOI: [10.1186/s12575-018-0079-4](https://doi.org/10.1186/s12575-018-0079-4)

Spires J.E., Dungan C.F., North E.W. 2021. Marking the shells of pediveliger eastern oysters *Crassostrea virginica*, with a calcein fluorochrome dye. *Journal of Shellfish Research* 40(3):479–487. DOI: [10.2983/035.040.0304](https://doi.org/10.2983/035.040.0304)

Tada M., Takeuchi A., Hashizume M. et al. 2014. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging

of neural activity in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience* 39(11):1720-8. DOI: [10.1111/ejn.12476](https://doi.org/10.1111/ejn.12476)

Tambutte E., Tambutte S., Segonds N. et al. 2012. Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification. *Proceedings of the Royal Society* 279:19–27. DOI: [10.1098/rspb.2011.0733](https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733)

Tang Y.Z., Dobbs F.C. 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7):2306-2313. DOI: [10.1128/AEM.01741-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01741-06)

Vidavsky N., Admir M., Schertel A. et al. 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *Journal of Structural Biology* 192:358–365. DOI: [10.1016/j.jsb.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.017)

Wannakajeepiboon M., Sathorn C., Kornsutthisopon C. et al. 2023. Evaluation of the chemical, physical, and biological properties of a newly developed bioceramic cement derived from cockle shells: an in vitro study. *BMC Oral Health* 23:354. DOI: [10.1186/s12903-023-03073-0](https://doi.org/10.1186/s12903-023-03073-0)

Nanoplastic influence on the siliceous sponge *Lubomirskia baicalensis*

Danilovtseva E.N., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N., Annenkov V.V.*

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

ABSTRACT. Effects of plastic nanoparticles on the Baikal siliceous sponge *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), including the whole organism and primmorphs, were studied. A vital fluorescence dye was applied to visualize the spicules formed during the experiment. Polystyrene, polyvinyl chloride, and poly(methyl methacrylate) nanoparticles were found to be able to penetrate into the sponge body and cause toxic effects (decreased spicule production) starting from concentrations of 0.005-0.01 mg/L. This is a relatively high concentration, unthinkable in normal water bodies. On the other hand, the duration of the experiment (three months) is negligible compared to the life span of the sponge. Further experiments should aim to elucidate the fate of nanoplastics within sponges, the balance between plastic consumption, excretion and degradation, possibly involving sponge symbionts.

Keywords: siliceous sponge, primmorphs, nanoplastics, polystyrene, polyvinyl chloride, poly(methyl methacrylate)

1. Introduction

Plastic pollution is considered a formidable threat to humanity in this century. Nanoplastic is the least studied substance due to the great difficulty in its determination in the environment and living organisms. These small particles (less than 500 nm) are not visible under optical microscopy and can be tightly mixed with a variety of organic and inorganic compounds. Nanoplastics, especially particles smaller than 200 nm, are considered very dangerous due to their potential ability to penetrate living cells by endocytosis (Manzanares and Ceña, 2020). We recently estimated how much nanoplastic can be formed when commercial plastics such as polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC), and poly(methyl methacrylate) (PMMA) are mechanically broken down (Annenkov et al., 2021). Nanoparticles were a minor fraction in this process compared to microplastics. Certainly, microplastics in water bodies can break down into smaller particles by photo- and chemodestruction, but the same factors should break down nanoparticles to a greater extent, since smaller particles are more active in any reactions. Thus, we estimated the actual amount of nanoplastics in water bodies to be many times lower than 0.01 mg/L.

Since it is difficult to study nanoplastics in the field, there are many works focusing on laboratory experiments with commercial or specially synthesized nanoparticles. In a study of the heterotrophic dinoflagellate *Gymnodinium corollarium* Sundström,

Kremp et Daugbjerg (Annenkov et al., 2023), we found that 0.01 mg/L of nanoplastic was a nontoxic concentration; moreover, these organisms can assimilate and degrade nanoparticles of plastic. On the other hand, the filtering organisms, such as sponges, can accumulate significant amounts of nanoplastic even at low concentrations in the environment.

There are few works on the effect of nanoplastics on sponges. Recently, it was found that microplastics of 2-10 µm in size are expelled from the sponge body in 1-2 hours (Funch et al., 2023). Microplastic particles of 1 µm size at a concentration of 1 mg/L were non-toxic to temperate zone sponge species (*Tethya bergquistae* and *Crella incrustans*) (Baird, 2016). Nanoparticles of 100-500 nm can penetrate the sponge (Willenz and Van de Vyver, 1982; Turon et al., 1997; Leys and Eerkes-Medrano, 2006), but these were short-term experiments (no more than 4 h), and no information about the state of the sponge under the action of plastic was possible to obtain.

We have developed several vital fluorescent dyes that stain growing siliceous spicules (Annenkov et al., 2017; Annenkov et al., 2019; Danilovtseva et al., 2019). These dyes allow the growth of spicules in sponges and sponge primmorphs (3D cell culture) to be monitored and thus provide information on the sponge health. In this work, we evaluated the effects of plastic nanoparticles on the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), including the whole organism and primmorphs.

*Corresponding author.

E-mail address: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (V.V. Annenkov)

Received: December 08, 2023; **Accepted:** December 19, 2023;
Available online: December 20, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2. Materials and methods

2.1. Sponge samples and cultivation of primmorphs

Experiments with sponge samples were carried out according to (Annenkov et al., 2014). Samples of *L. baicalensis* were collected near the settlement of Bolshiye Koty, in the southwestern part of Lake Baikal, at a depth of 10 meters. Sponge specimens (4-5 cm in length) were grown in 3 L aquariums at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ under air barbotage with daily 2/3 water changes. Luminescent lamps (color temperature 6500 K) were used for illumination of the aquariums in 12h/12h light/dark cycle.

Primmorphs were obtained similar to (Custodio et al., 1998). Briefly, sponge samples were cut under Baikal water (3°C) into $\approx 1\text{-}2$ mm particles. The particles and water were transferred into 50 mL conical plastic tubes (sponge to water ratio $\approx 1:20$) and gently shaken for 15 min on a rotary shaker. The suspension was then filtered through $100\ \mu\text{m}$ nylon mesh, and the resulting cells were harvested by sedimentation (1 h, 3°C) and washed again with Baikalian water. The cell suspension was placed in 400 ml plastic containers with 200 ml of Baikal water containing 0.002 % ampicillin. The containers were kept under the same conditions as the sponge samples when cultured. Every day for two weeks, 75% of the water was replaced with fresh water containing the antibiotic. After two weeks, the obtained primmorphs (1 mm or more in diameter) were transferred to new containers with water and antibiotic, and a 75% water change was performed weekly throughout the experiment.

Additives (plastic nanoparticles, dye) were added at each water change.

2.2. Chemical reagents

Bottled Baikalian water was used for sponge cultivation. The chemical composition of this water is described in (Suturin et al., 2002). NBD-N2 dye was obtained according to (Annenkov et al., 2010). Fluorescent nanoparticles were synthesized according our previous articles (Annenkov et al., 2021; Annenkov et al., 2023). Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher or Acros Chemicals and used without further treatment.

2.3. Study of the primmorphs and sponge tissues

Primmorphs were placed on a coverslip, cut into 2-4 pieces (depending on the size of the primmorph), each piece was transferred to a separate coverslip, flattened with a glass slide, and examined using epifluorescence microscopy. When the experiment was designed to count the number of spicules per dry weight of the primmorph, two pre-weighed coverslips were used. After counting the spicules by epifluorescence microscopy, the sample was dried over anhydrous CaCl_2 for two weeks and in vacuo to constant weight. Counting experiments were performed in at least four repetitions. Sponge samples for microscopy were prepared by cutting ≈ 1 mm slices from the sponge apex or middle of the sponge body.

Light and fluorescent microscopy was performed with MOTIC AE-31T inverted microscope with a HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for green and yellow emission and 365 nm for blue emission.

3. Results and discussion

Two series of sponge experiments were carried out. The first short-term experiment consisted of an 8-day cultivation at extremely high concentrations of nanoplastic (0.1 and 1 mg/L, Fig. 1). PS and PVC nanoparticles entered the sponge body at a concentration of 1 mg/L, with a tendency to concentrate into 10-20 μm clusters similar to sponge cell size (Fig 1A). In the case of 0.1 mg/L, only single clusters of plastic were detected (Fig. 1C). In the second experiment, 0.01 and 0.1 mg/L PS and PVC nanoparticles were added to the culture medium for two months. The sponges with 0.01 mg/L nanoparticles looked healthy after two months, while the sponges with 0.1 mg/L plastic turned partially white after one month of experiment and completely collapsed after two months.

It should be mentioned that *L. baicalensis* is a very difficult organism for laboratory experiments. Long-term experiments are unlikely, as the sponge may die after 1-2 months of cultivation without exposure to any harmful factors. In addition, the moment of death of a sponge is difficult to record. Primmorphs, a 3D culture of self-organizing sponge cells, are a good model for

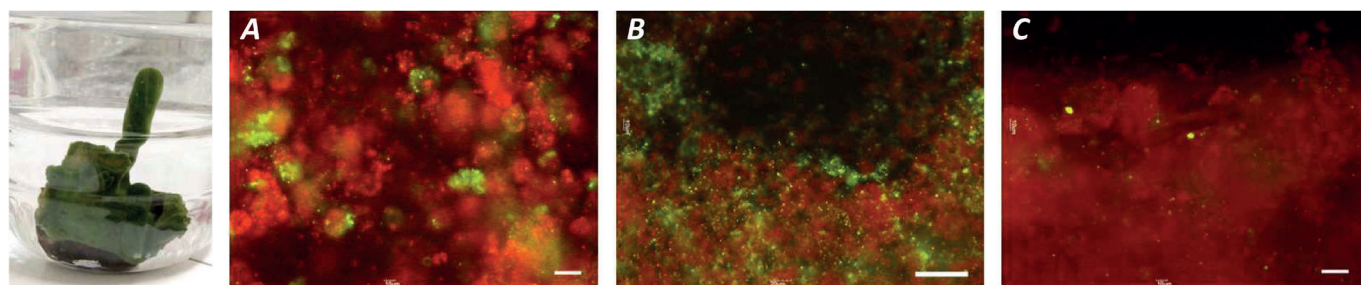


Fig.1. The sponge *L. baicalensis* in an aquarium and fluorescence images of sponge slices after 8 days of culturing in the presence of nanoplastics. Red fluorescence – chloroplasts, green – plastic nanoparticles. A - PS 200 nm, B and C -PVC 85 nm particles. Particles were stained with dibenzylfluorescein. Plastic concentration was 1 (A and B) and 0.1 (C) mg/L. Scale bars represent 25 (A), 50(B) and 75 (C) μm .

long-term experiments. *L. baicalensis* primmorphs can live as spherical structures of 1-8 mm in size for up to nine months. Spicules are formed in primmorphs, and the death of a primmorph is easily detected by its destruction.

We performed two series of experiments with primmorphs of *L. baicalensis*. First (Fig. 2), PVC and PS nanoparticles were added at a concentration of 0.01-10 mg/L. The fluorescent dye NBD-N2 was added to detect the spicules formed during the experiment. After one month, we found a more than threefold reduction in the number of new spicules in the presence of plastic at any concentration tested. The following experiment (Fig. 3) shows no effect of nanoplastics at a concentration of 0.001 mg/L for three months. Sub-micrometer PS particles of 600 nm reduced spicule formation at a concentration of 0.001 mg/L. All three plastics were toxic at a concentration of 0.005 mg/L.

4. Conclusions

Our experiments showed that polystyrene, polyvinyl chloride, and poly(methyl methacrylate) nanoparticles can penetrate into the sponge body and cause toxic effects (decreased spicule production) starting from concentrations of 0.005-0.01 mg/L. This is a relatively high concentration, unthinkable in normal water bodies. On the other hand, three months of experiment is negligible compared to the life span of a sponge. Further experiments should aim to elucidate the fate of nanoplastics within sponges, the balance between plastic consumption, excretion and degradation, possibly involving sponge symbionts.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project # 122012600070-9.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407:44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Glyzina O.Yu., Verkhovzina O.N. et al. 2014. Fluorescent amines as a new tool for study of siliceous sponges. *Silicon* 6(4):227–231 DOI: [10.1007/s12633-014-9220-4](https://doi.org/10.1007/s12633-014-9220-4)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160:336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2021. Submicro- and nanoplastics: how much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution* 278:116910, DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116910](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910)

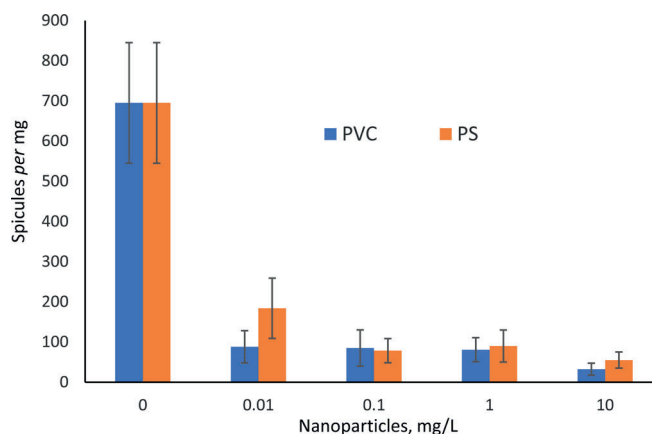


Fig.2. Dependence of the number of spicules *per* dry weight of primmorph (mg) on nanoplastic concentration. NBD-N2 dye (0.5 μ M) was added to the culture medium as a vital dye for new spicules. PVC particle size was 65 nm and PS – 200 nm. The cultivation time was one month.

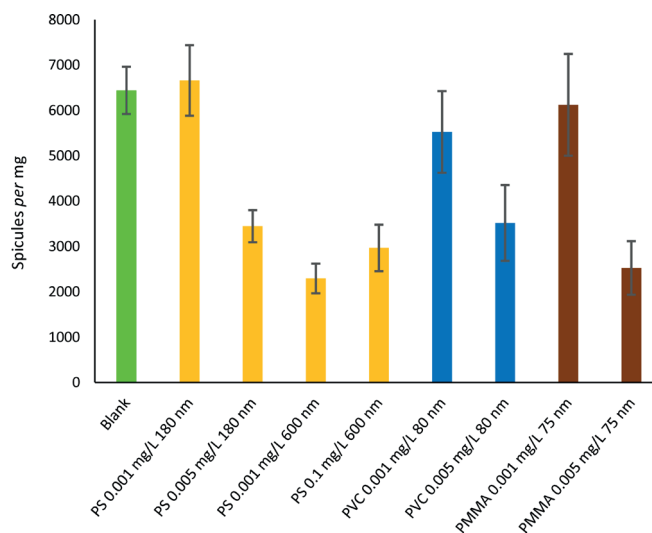


Fig.3. Dependence of the number of spicules *per* dry weight of primmorph (mg) on nanoplastic concentration. NBD-N2 dye (0.5 μ M) was added to the culture medium as a vital dye for new spicules. The cultivation time was three months.

- Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Annenkova N.V. et al. 2023. Uptake and Effects of Nanoplastics on the Dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(5):1124–1133. DOI: [10.1002/etc.5604](https://doi.org/10.1002/etc.5604)
- Baird C.A. 2016. Measuring the effects of microplastics on sponges. A thesis for the degree of Master of Science in Marine Biology. Wellington, Victoria University. <http://researcharchive.vuw.ac.nz/handle/10063/6749>
- Custodio M.R., Prokic I., Steffen R. et al. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* 105, 45–59. DOI: [10.1016/S0047-6374\(98\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00078-5)
- Danilovtseva E.N., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N. et al. 2019. Fluorescent dyes for the study of siliceous sponges. *Limnology and Freshwater Biology* 5:302–307. DOI: [10.31951/2658-3518-2019-A-5-302](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-5-302)

Funch P., Kealy R.A., Goldstein J. et al. 2023. Fate of microplastic captured in the marine demosponge *Halichondria panicea*. Marine Pollution Bulletin 194A:115403, DOI: [10.1016/j.marpolbul.2023.115403](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115403)

Leys S.P., Eerkes-Medrano D.I. 2006. Feeding in a Calcareous Sponge: Particle Uptake by Pseudopodia. The Biological Bulletin 211(2):157–171, DOI: [10.2307/4134590](https://doi.org/10.2307/4134590)

Manzanares D., Ceña V. 2020. Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. Pharmaceutics 12:371. DOI: [10.3390/pharmaceutics12040371](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371)

Suturin A.N., Paradina L.F., Epov V.N. et al. 2002. Development of a standard sample of composition of deep Baikalian water. Chemistry for Sustainable Development 10:473–482.

Turon X., Galera J., Uriz M. J. 1997. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. The Journal of Experimental Zoology 278(1): 22-36. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19970501\)278:1 <22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19970501)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8)

Willenz P., Van de Vyver G. 1982. Endocytosis of latex beads by the exopinacoderm in the fresh water sponge *Ephydatia fluviatilis*: an in vitro and in situ study in SEM and TEM. Journal of Ultrastructure Research 79(3):294–306, DOI: [10.1016/S0022-5320\(82\)90005-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90005-3)

Влияние нанопластика на кремнистую губку *Lubomirskia baicalensis*

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

www.limnolfwbiol.com

Даниловцева Е.Н., Пальшин В.А., Зелинский С.Н., Анненков В.В.*

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Изучено воздействие наночастиц пластика на байкальскую кремнистую губку *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), включая весь организм и примморфы. Для визуализации спикул, образовавшихся в ходе эксперимента, применялся витальный флуоресцентный краситель. Было установлено, что наночастицы полистирола, поливинилхлорида и полиметилметакрилата способны проникать в тело губки и вызывать токсические эффекты (снижение продукции спикул), начиная с концентраций 0,005-0,01 мг/л. Это относительно высокая концентрация, немислимая в обычных водоемах. С другой стороны, продолжительность эксперимента (три месяца) ничтожно мала по сравнению с продолжительностью жизни губки. Дальнейшие эксперименты должны быть направлены на выяснение судьбы нанопластика в губках, баланса между потреблением, выведением и деградацией пластика, возможно, с участием симбионтов.

Ключевые слова: кремнистая губка, примморфы, нанопластики, полистирол, поливинилхлорид, полиметилметакрилат

1. Введение

Загрязнение пластиком считается большой угрозой для человечества в этом веке. Нанопластик - наименее изученный компонент из-за большой сложности его определения в окружающей среде и живых организмах. Эти мелкие частицы (менее 500 нм) не видны при оптической микроскопии и могут быть плотно смешаны с различными органическими и неорганическими соединениями. Нанопластики, особенно частицы размером менее 200 нм, считаются очень опасными из-за их потенциальной способности проникать в живые клетки путем эндоцитоза (Manzanares and Ceña, 2020). Недавно мы оценили, сколько нанопластика может образоваться при механическом разрушении коммерческих пластмасс, таких как полистирол (ПС), поливинилхлорид (ПВХ) и полиметилметакрилат (ПММА) (Annenkov et al., 2021). Наночастицы составляют незначительную долю в этом процессе по сравнению с микропластиком. Конечно, микропластик в водоемах может распадаться на более мелкие частицы путем фото- и хемодеструкции, но те же факторы должны в большей степени разрушать наночастицы, поскольку мелкие частицы более активны в любых реакциях. Таким образом, по нашим оценкам, реальное количество нанопластика в водоемах во много раз меньше, чем 0,01 мг/л.

Поскольку изучать нанопластики в полевых условиях сложно, существует множество работ,

посвященных лабораторным экспериментам с коммерческими или специально синтезированными наночастицами. В исследовании гетеротрофных динофлагеллят *Gymnodinium corollarium* Sundström, Kremp et Daugbjerg, (Annenkov et al., 2023) мы обнаружили, что 0,01 мг/л нанопластика является нетоксичной концентрацией. Более того, эти организмы могут ассимилировать и разлагать наночастицы пластика. С другой стороны, фильтрующие организмы, такие как губки, могут накапливать значительные количества нанопластика даже при низких концентрациях в окружающей среде.

Работы по изучению влияния нанопластиков на губки немногочисленны. Недавно было установлено, что микропластик размером 2-10 μm выводится из тела губки за 1-2 часа (Funch et al., 2023). Частицы микропластика размером 1 μm в концентрации 1 мг/л оказались нетоксичными для губок умеренной зоны (*Tethya bergquistae* и *Crella incrustans*) (Baird, 2016). Наночастицы размером 100-500 нм могут проникать в губку (Willenz and Van de Vyver, 1982; Turon et al., 1997; Leys and Eerkes-Medrano, 2006), но это были краткосрочные эксперименты (не более 4 ч), и о состоянии губки под действием пластика было невозможно получить никакой информации.

Мы разработали несколько витальных флуоресцентных красителей, которые окрашивают растущие кремнистые спикулы (Annenkov et al.,

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (В.В. Анненков)



2017; Annenkov et al., 2019; Danilovtseva et al., 2019). Эти красители позволяют отслеживать рост спикул в губках и примморфах губок (3D-культурах клеток) и тем самым получать информацию о состоянии здоровья губки. В данной работе мы оценили влияние наночастиц пластика на байкальскую губку *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), включая весь организм и примморфы.

2. Материалы и методы

2.1. Образцы губок и выращивание примморфов

Эксперименты с образцами губок проводились в соответствии с методикой (Annenkov et al., 2014). Образцы *L. baicalensis* были собраны в районе поселка Большие Коты, в юго-западной части озера Байкал, на глубине 10 м. Образцы губок (длиной 4-5 см) выращивали в аквариумах объемом 3 л при температуре $3 \pm 1^\circ\text{C}$ в условиях воздушного барботажа с ежедневной сменой 2/3 воды. Для освещения аквариумов использовались люминесцентные лампы (цветовая температура 6500 К) с циклом свет/темнота 12 ч/12 ч.

Примморфы получали аналогично (Custodio et al., 1998). Вкратце, образцы губки измельчали в байкальской воде (3°C) на частицы размером $\approx 1-2$ мм. Частицы и воду переносили в конические пластиковые пробирки объемом 50 мл (соотношение губки и воды $\approx 1:20$) и осторожно встряхивали в течение 15 мин на ротационном шейкере. Затем суспензию фильтровали через нейлоновую сетку 100 мкм, полученные клетки собирали методом седиментации (1 ч, 3°C) и снова промывали байкальской водой. Суспензию клеток помещали в пластиковые контейнеры объемом 400 мл с 200 мл байкальской воды, содержащей 0,002 % ампициллина. Контейнеры содержались в тех же условиях, что и образцы губки при культивировании. Ежедневно в течение двух недель 75 % воды заменяли свежей водой, содержащей антибиотик. Через две недели полученные примморфы (диаметром 1 мм и более) переносили в новые контейнеры с водой и антибиотиком, а смену 75 % воды проводили еженедельно в течение всего эксперимента.

Добавки (наночастицы пластика, краситель) добавлялись при каждой смене воды.

2.2. Химические реагенты

Для культивирования губки использовали бутилированную байкальскую воду. Химический состав этой воды описан в (Suturin et al., 2002). Краситель NBD-N2 был получен согласно (Annenkov et al., 2010). Флуоресцентные наночастицы были синтезированы в соответствии с нашими предыдущими статьями (Annenkov et al., 2021; Annenkov et al., 2023). Другие химические вещества были приобретены в Sigma-Aldrich, Fisher или Acros Chemicals и использовались без дополнительной обработки.

2.3. Исследование примморфов и тканей губок.

Примморфы помещали на покровное стекло, разрезали на 2-4 части (в зависимости от размера приморфа), каждую часть переносили на отдельное покровное стекло, сплющивали стеклянным предметным стеклом и изучали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии. В экспериментах по подсчёту количества спикул в единице сухого веса примморфа, использовали две предварительно взвешенные покровные пластинки. После подсчета спикул методом эпифлуоресцентной микроскопии образец высушивали над безводным CaCl_2 в течение двух недель и в вакууме до постоянного веса. Эксперименты по подсчёту проводили не менее чем в четырех повторностях. Образцы губки для микроскопии готовили, делая ≈ 1 мм срезы из вершины или середины тела губки.

Световая и флуоресцентная микроскопия проводилась на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Для возбуждения зеленой и желтой эмиссии использовали свет 470 нм, а для синей 365 нм.

3. Результаты и обсуждение

Было проведено две серии экспериментов с губками. Первый краткосрочный эксперимент состоял из 8-дневного культивирования при чрезвычайно высоких концентрациях нанопластика (0,1 и 1 мг/л, Рис. 1). Наночастицы ПС и ПВХ проникали в тело губки при концентрации 1 мг/л с тенденцией к концентрации в кластеры размером 10-20

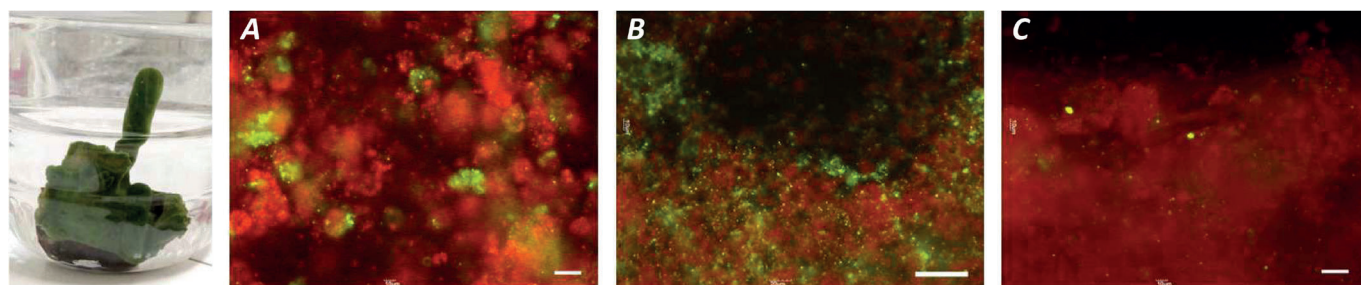


Рис.1. Губка *L. baicalensis* в аквариуме и флуоресцентные изображения срезов губки после 8 дней культивирования в присутствии нанопластиков. Красная флуоресценция - хлоропласты, зеленая - наночастицы пластика. А – частицы ПС 200 нм, В и С – частицы ПВХ 85 нм. Частицы окрашивали дибензилфлуоресцеином. Концентрация пластика составляла 1 (А и В) и 0,1 (С) мг/л. Масштабные линейки составляют 25 (А), 50 (В) и 75 (С) μm .

мкм, близкие к размеру клеток губки (Рис. 1А). В случае 0,1 мг/л были обнаружены только отдельные кластеры пластика (Рис. 1С). Во втором эксперименте в течение двух месяцев в культуральную среду добавляли 0,01 и 0,1 мг/л наночастиц ПС и ПВХ. Губки с наночастицами 0,01 мг/л выглядели здоровыми через два месяца, в то время как губки с 0,1 мг/л пластика частично побелели через месяц эксперимента и полностью разрушились через два месяца.

Следует отметить, что *L. baicalensis* - очень сложный организм для лабораторных экспериментов. Длительные эксперименты маловероятны, так как губка может погибнуть через 1-2 месяца культивирования без воздействия каких-либо вредных факторов. Кроме того, момент смерти губки сложно зафиксировать. Приморфы, 3D-культура самоорганизующихся клеток губки, являются хорошей моделью для долгосрочных экспериментов. Приморфы *L. baicalensis* могут жить в виде сферических структур размером 1-8 мм до девяти месяцев. В приморфах формируются спикулы, а гибель приморфа легко обнаружить по его разрушению.

Мы провели две серии экспериментов с приморфами *L. baicalensis*. Сначала (Рис. 2) добавляли наночастицы ПВХ и ПС в концентрации 0,01-10 мг/л. Флуоресцентный краситель NBD-N2 (0,5 μ M) был добавлен для обнаружения спикул, образовавшихся в ходе эксперимента. Через месяц мы обнаружили более чем трехкратное снижение количества новых спикул в присутствии пластика в любой концентрации. Следующий эксперимент (Рис. 3) показывает отсутствие влияния нанопластика в концентрации 0,001 мг/л в течение трех месяцев. Субмикрометровые частицы PS размером 600 нм снижали образование спикул при концентрации 0,001 мг/л. Все три пластика были токсичны при концентрации 0,005 мг/л.

4. Выводы

Наши эксперименты показали, что наночастицы полистирола, поливинилхлорида и поли(метилметакрилата) могут проникать в тело губки и вызывать токсические эффекты (снижение продукции спикул), начиная с концентраций 0,005-0,01 мг/л. Это относительно высокая концентрация, немислимая в обычных водоемах. С другой стороны, три месяца эксперимента ничтожно малы по сравнению с продолжительностью жизни губки. Дальнейшие эксперименты должны быть направлены на выяснение судьбы нанопластика в губках, баланса между потреблением, выведением и деградацией пластика, возможно, с участием симбионтов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9.

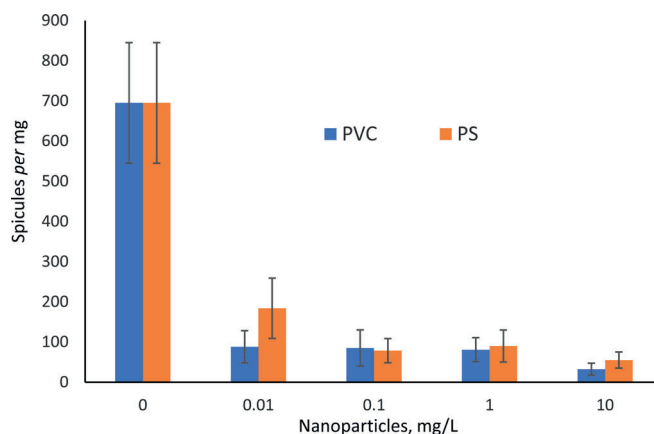


Рис.2. Зависимость количества спикул, приходящихся на 1 мг сухого веса приморфа, от концентрации нанопластика. В культуральную среду добавляли краситель NBD-N2 (0,5 μ M) в качестве витального красителя для новых спикул. Размер частиц ПВХ составлял 65 нм, а ПС - 200 нм. Время культивирования составляло три месяца.

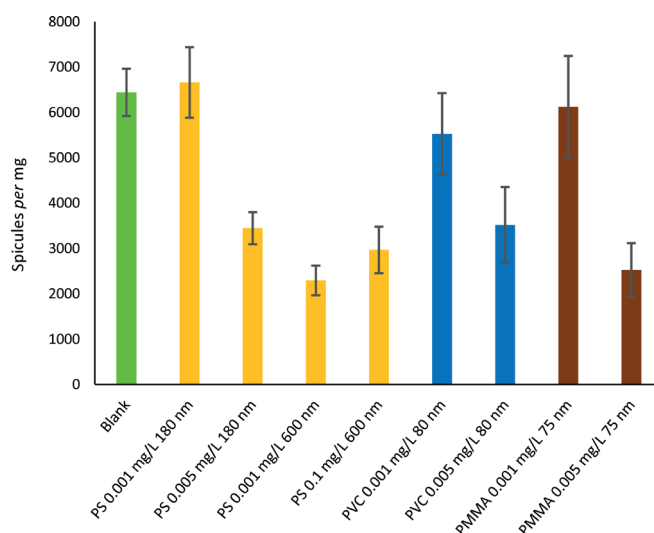


Рис.3. Зависимость количества спикул, приходящихся на 1 мг сухого веса приморфа, от концентрации нанопластика. В культуральную среду добавляли краситель NBD-N2 (0,5 μ M) в качестве витального красителя для новых спикул. Время культивирования составляло три месяца.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407:44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Glyzina O.Yu., Verkhovskaya O.N. et al. 2014. Fluorescent amines as a new tool for study of siliceous sponges. *Silicon* 6(4):227–231 DOI: [10.1007/s12633-014-9220-4](https://doi.org/10.1007/s12633-014-9220-4)

Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160:336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)

Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2021. Submicro- and nanoplastics: how much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution* 278:116910, DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116910](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910)

Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Annenkova N.V. et al. 2023. Uptake and Effects of Nanoplastics on the Dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(5):1124-1133. DOI: [10.1002/etc.5604](https://doi.org/10.1002/etc.5604)

Baird C.A. 2016. Measuring the effects of microplastics on sponges. A thesis for the degree of Master of Science in Marine Biology. Wellington, Victoria University. <http://researcharchive.vuw.ac.nz/handle/10063/6749>

Custodio M.R., Prokic I., Steffen R. et al. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* 105, 45–59. DOI: [10.1016/S0047-6374\(98\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00078-5)

Danilovtseva E.N., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N. et al. 2019. Fluorescent dyes for the study of siliceous sponges. *Limnology and Freshwater Biology* 5:302-307. DOI: [10.31951/2658-3518-2019-A-5-302](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-5-302)

Funch P., Kealy R.A., Goldstein J. et al. 2023. Fate of microplastic captured in the marine demosponge *Halichondria panicea*. *Marine Pollution Bulletin* 194A:115403, DOI: [10.1016/j.marpolbul.2023.115403](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115403)

Leys S.P., Eerkes-Medrano D.I. 2006. Feeding in a Calcareous Sponge: Particle Uptake by Pseudopodia. *The Biological Bulletin* 211(2):157–171, DOI: [10.2307/4134590](https://doi.org/10.2307/4134590)

Manzanares D., Ceña V. 2020. Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics* 12:371. DOI: [10.3390/pharmaceutics12040371](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371)

Suturin A.N., Paradina L.F., Epov V.N. et al. 2002. Development of a standard sample of composition of deep Baikalian water. *Chemistry for Sustainable Development* 10:473–482.

Turon X., Galera J., Uriz M. J. 1997. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *The Journal of Experimental Zoology* 278(1): 22-36. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19970501\)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19970501)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8)

Willenz P., Van de Vyver G. 1982. Endocytosis of latex beads by the exopinacoderm in the fresh water sponge *Ephydatia fluviatilis*: an in vitro and in situ study in SEM and TEM. *Journal of Ultrastructure Research* 79(3):294–306, DOI: [10.1016/S0022-5320\(82\)90005-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90005-3)

Impact of climate change on occurrence and characteristics of coastal upwelling in Listvennichny Bay (Southern Baikal) from 1941 to 2023

Troitskaya E.S.^{1,2,*}, Shimaraev M.N.¹, Aslamov I.A.¹

¹ Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

² Irkutsk State University, Karl Marx Str., 1, Irkutsk, 664003, Russia

ABSTRACT. The paper presents the results of analysis about relationship between climate changes and coastal upwellings in Listvennichny Bay (Southern Baikal) from 1941 to 2023. A decrease in both full and partial upwellings has been shown since the late 1950s. In addition, an increase in the proportion of upwelling events in August compared to other months during 1970-2023 were found. It also showed tendencies for longer upwelling durations and greater temperature drops during upwelling after 1970 compared to the previous period. Inferred from the analysis of the ERA5-Land data, it was determined that the cause of the observed changes was a global course of decreasing wind activity and a particular redistribution of the proportion of northerly and southwesterly winds in the Bay during the study period. Two cases of full and intermittent upwellings were described and compared. Possible ecological impacts on the Listvennichny Bay due to the combined effects of increasing anthropogenic pressure and less frequent upwellings have been hypothesized.

Keywords: Baikal, Listvennichny Bay, upwelling, water temperature, wind, climate change

1. Introduction

Upwelling is the organized upward movement of waters toward the surface of a water body. It is one of the mechanisms of vertical water exchange that affects the distribution of physical and chemical parameters of water (temperature, salinity, density, chemical composition, pollutants etc.) as well as biological processes (for example, the life cycles of bacteria, phyto- and zooplankton). It is known that upwelling can develop in the coastal and pelagic zones. Coastal upwelling in large lakes is quite well studied (e.g., Boyarinov and Petrov, 1991; Bell and Eadie, 1983; Corman et al., 2010; Plattner et al., 2006).

The coastal upwelling in Baikal was first described by G. Yu. Vereshchagin about a hundred years ago (1927). He measured water temperature and dissolved oxygen concentrations in the coastal surface waters, which corresponded to the values observed in the pelagic zones at 50-200 m depth. Later, upwellings were identified in the coastal zones of Northern Baikal using NOAA/AVHRR satellite imagery (Semovski et al., 2001). Katz and co-authors (2011) suggested that variability of currents is one of the factors influencing water dynamics in the lake, especially

the development of the coastal upwelling. The first quantitative assessments (water temperature decrease, duration and depth of upwelling development, vertical water velocities) of the coastal upwelling in the Southern Baikal have been obtained relatively recently (Shimaraev et al., 2012).

Some biological studies have reported the effect of upwelling on plankton distribution in Lake Baikal. For example, M.M. Kozhov (1962) observed upwelling in the Maloye More Strait and its adjacent areas of the lake after a strong NW storm on September 4-9, 1951. The water surface temperature dropped from 12-13°C to 7-7.5°C in the Maloye More Strait and to 8-9°C near the eastern shore of Olkhon Island. After this upwelling, plankton “was very sparse and rather equally distributed in the upper 100-meter layer”. In August 1963 (Kozhov et al., 1970), a strong NW wind was over the Southern Baikal near the Bolshiye Koty settlement, in result the water surface temperature decreased to 5-6°C. The zooplankton biomass decreased to 1.2 g/m² compared to the average annual value of 40-50 g/m². Further, E.L. Afanasyeva (1977) also showed that vertical water movements in the upwelling zone could transport nauplii of the copepod *Epishura baikalensis* from deep water layers to the surface.

*Corresponding author.

E-mail address: elena.troitskaya@lin.irk.ru (E.S. Troitskaya)

Received: December 15, 2023; **Accepted:** December 27, 2023;

Available online: December 28, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Based on phytoplankton measurements and satellite SeaWiFS observations in 2001-2003, B. Heim et al. (2005) concluded that reductions in concentration of chlorophyll *a* along the eastern shore of the Northern Baikal were associated with upwelling events. Complex studies at the testing site near Cape Elokhin (the western shore of the Northern Baikal) in August 1988 showed that the concentration of chlorophyll *a* could increase after upwelling relaxation (Verbolov et al., 1992).

In the past several decades, Baikal, as well as the entire Northern Hemisphere, has been experiencing changes in the thermal and ice regimes. (Livingstone, 1999; Magnuson et al., 2000; Shimaraev et al., 2002; Todd and Mackay, 2003; Kouraev et al., 2007; Hampton et al., 2008; Shimaraev et al., 2018; Sharma et al., 2021). The under-ice period has been shortened by almost three weeks (Livingstone, 1999; Magnuson et al., 2000; Shimaraev et al., 2002). This resulted in earlier dates of summer stratification and gradual increase of water surface temperature. The transition to winter stratification was shifted correspondingly to later dates (Aslamov et al., 2024). Recent studies of water temperature in individual lake basins (Shimaraev et al., 2009) and water column heat content in the Southern Baikal (Troitskaya et al., 2022) indicate the transformation of the temperature field and redistribution of heat content under climate change conditions. Consequently, this should be reflected in the intensity of vertical heat and water exchange processes in Baikal, which are of particular importance for the littoral, which is the habitat of the largest number of hydrobionts.

The aim of this work was to quantify the characteristics of the coastal upwelling in Listvennichny Bay, and their correlation with the wind activity and climate change for the last 80 years.

2. Materials and methods

Water temperature data obtained in the period of 1941-2023 at the pier of LIN SB RAS in the settlement of Listvyanka, located on the shore of Listvennichny Bay in the Southern Baikal (Fig. 1), were used to identify upwelling events and assess their characteristics. From 1941 to 2005, temperature was measured with a mercury thermometer (accuracy $\pm 0.02^{\circ}\text{C}$) at 8, 14, and 20 h, from 2006 to the present time with electronic temperature sensors (accuracy $\pm 0.002^{\circ}\text{C}$, measurement discreteness from 1 s to 2 min). The study analyzes only the period of summer stratification, when the surface water is warmer than the deep layers and upwellings cause a sharp temperature drop, which makes them easier to identify. Daily average water temperatures were used to analyze the development of the coastal upwelling. The start and end dates of upwelling, its duration, and the value of the temperature decrease were determined.

Upwelling was considered in those cases when temperature dropped sharply by one or more degrees and it persisted for more than 3 days. The upwelling start date was taken as the day when the water temperature dropped. The date of its end was considered to be the



Fig.1. Map of Listvennichny Bay and measurement locations (<https://earth.google.com/web> – accessed 29.11.2023). The inset shows the location of Listvennichny Bay in the Southern Baikal.

day when the water surface temperature became close to that before the upwelling. The difference between these dates determines the duration of upwelling. The value of water temperature decrease was calculated as the difference between the water temperature before upwelling and at the moment when it reached the minimum value during upwelling.

Depending on the depth from which the water rises to the surface of a water body, full and partial upwelling events are distinguished. Full upwelling is formed by subthermocline waters rising towards the surface, i.e. hypolimnion waters. The subthermocline waters does not reach the surface at partial upwelling. In this regard, we identified full upwellings, determined their characteristics and analyzed the conditions of their development.

To analyze wind conditions, we used daily data on wind speed and direction from 1954 to 2010 from the Angara River Head meteorological station and from 2011 to the present time from an automatic weather station installed on the pier of LIN SB RAS (Listvyanka settlement). As the distance between them is about 4 km and the morphometric conditions are similar, the wind data series are likely uniform. We determined the directionally stable wind with a speed of at least 3 m/s and a duration of at least 6 h observed during the day before the development of upwelling and on the day of its beginning. The average wind direction and speed at which the upwelling started to develop were then calculated. In 2011-2023, modern data enabled us to determine the maximum values of wind speed at wind gusts.

3. Results

Taking into account the influence of climate on Baikal's ice-thermal regime (Livingstone, 1999; Magnuson et al., 2000; Shimaraev et al., 2002; Todd, Mackay, 2003; Kouraev et al., 2007; Hampton et al., 2008; Shimaraev et al., 2018; Sharma et al., 2021), we divided the available water temperature over the observation period into two intervals: 1941-1969 and 1970-2023. The period of 1941-1969 is characterized by a decrease in water surface temperature, while the period from 1970 to the present is characterized by its increase (Fig. 2). The value of the trends in 1941-1969

was $-0.39^{\circ}\text{C}/10$ years ($r = 0.38$, $p = 0.04$), and it was $+0.26^{\circ}\text{C}/10$ years ($r = 0.38$, $p = 0.009$) in 1970-2023.

A total of 285 upwelling events were identified and treated between May and October 1941-2023. Up to four upwelling events were recorded in each individual month. During the year, 1-3 upwelling events were most often recorded (Fig. 3). The maximum number of upwelling events was 13 within one year (in 1943).

A total of 129 upwelling events (an average of 4.5 events per year) were recorded for the period of 1941 to 1969, and 157 upwelling events (an average of 2.9 events per year) were detected from 1970 to 2023. Figure 4 shows the frequencies of upwelling events for selected months in two periods. Comparison of the two periods revealed a change in the distribution of upwellings by month: compared to the 1941-1969, 1970-2023 shows a greater concentration of upwelling in August (from 38.0% to 46.5%), neighboring July and September showed minor changes in the number of upwellings, and in all other months the number of upwelling decreased significantly (from 0.8% to 0% in May, from 7.0% to 0.6% in June, and from 7% to 3% in October).

Figure 5 shows the frequency of upwelling events with different durations for the two analyzed periods. With the same average duration of upwellings (7 days), a shift in duration to a greater extent since 1970 was revealed (Fig. 5). In the period of 1941-1969, upwellings lasting 4-6 days were more frequent (57.7%), whereas in the period of 1970-2023, the duration of upwellings increased to 5-8 days (56.1%). The number of upwellings with durations of 10 days or more has increased one and a half times in recent decades (from 11.5% to 17.8%).

The magnitude of water temperature drop during upwelling has also changed. Thus, in 1941-1969 and 1970-2023, the mean values were 4.2 and 5.3°C , and the maximum was 12.0 and 13.5°C , respectively. The pattern of the frequency distribution of upwellings by temperature drops has also undergone a transformation

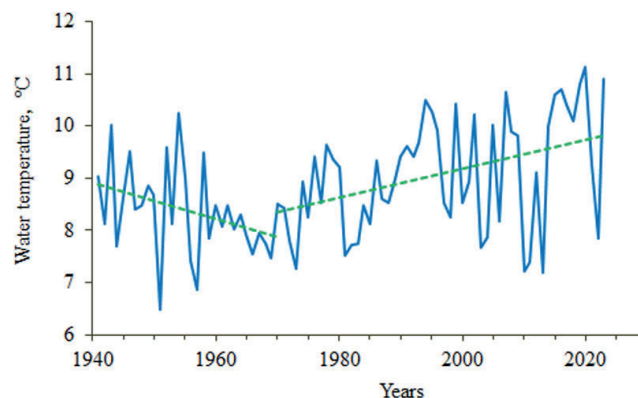


Fig.2. The average values of water temperature for the period of summer stratification at the pier of LIN SB RAS in the Listvyanka settlement for 1941-2023 (solid blue line) and linear trends for 1941-1969 and 1970-2023 (dotted green lines).

(Fig. 6). While, in 1941-1969, 60% of upwellings were characterized by a $1-4^{\circ}\text{C}$ temperature drop, in 1970-2023, 61% of upwellings showed a temperature drop of $3-7^{\circ}\text{C}$.

Analyses of available wind data (since 1954) also enabled us to assess changes in wind characteristics. In 1954-1969 (Fig. 7), upwelling most often developed under N and SW winds (64% of events), and from 1970 under W and SW winds (55% of events). The mean and maximum wind speeds for the considered periods differ a little and are 6 (12) m/s during 1954-1969 and 5 (14) m/s during 1970-2023.

There were 42 full upwelling events identified from 1941 to 2023; of these, 29 occurred from 1941 to 1969 and 13 occurred from 1970 to 2023. The maximum number of full upwelling events 18 and 13 occurred in August and September, respectively, while 7 events were detected in October. Two full upwellings each were recorded in June and July, and one in May. The distribution of full upwelling by decades is shown in Fig. 8.

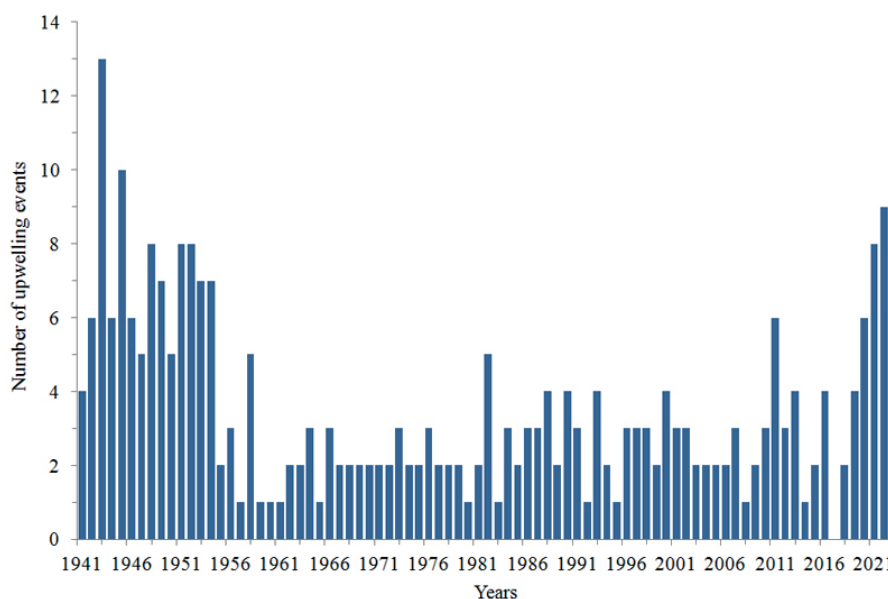


Fig.3. The number of identified upwellings in individual years for 1941-2023.

Analysis of available wind data for 24 total upwelling events showed that full upwellings occurred most often (10 cases) with SW winds blowing at 4-7 m/s. Four events of full upwellings were connected with W winds at wind speeds of 5-9 m/s.

4. Discussion

Thus, we identified summer upwellings in Listvennichny Bay, ranked them by duration, water temperature drop and direction and speed of accompanying winds. Cases of full upwellings were processed individually. The resulting data were divided into two time periods corresponding to observed climatic trends.

Analyzing the morphometry of Listvennichny Bay, it can be concluded that nearshore upwellings can develop under N-NW winds causing the runoff, or due to the Ekman transfer of surface water under W-SW winds and formation of anticyclonic eddy in the bay. At the development of the anticyclonic vortex, there is a sinking of water in its center and a compensating rise of water at the periphery near the bay shores. The analyzed data of winds accompanying upwelling confirm the above assumptions (Fig. 7).

Analysis of upwelling distribution by years showed that until 1960 there was a gradual decrease in the number of upwellings per year. Then, until 2016 their average number remained constant at the rate of about 2.5 upwellings per year, and in the last 8 years there was a certain increase (Fig. 3). Of particular interest was the narrowing of the frequency distribution of upwelling events by month and the concentration of upwellings in August in 1970-2023 (Fig. 4). A redistribution of upwellings toward longer duration and a larger temperature drop after 1970 compared to the previous period was also noted (Fig. 5, 6).

The number of full upwellings has decreased with each decade, from 12 in the 40s to only one in the 2010s. After 2020, no full upwellings have been observed yet.

To understand the possible reasons for these tendencies, it is necessary to analyze how the winds changed during these periods. It should be noted that wind speeds in recent decades have become noticeably lower than in the mid-40s-50s of the last century (Atlas ..., 1977). Comparison of average wind speeds for individual months in 1959-1968 and in 2000-2022 revealed their decrease in June-August by 0.8-1.1 m/s, and by 1.1-2.0 m/s in September-November. Such changes are observed over most territory of Russia (Bulygina et al., 2013) and are probably caused by the rapid warming in the Arctic and a decrease in the poleward temperature gradient which could influence mid-latitude atmospheric circulation and intensity of winds (Coumou et al., 2015).

Since the initial wind data were available only for the upwelling dates, we utilized the well-known reanalysis of the European Centre for Medium-Range Weather Forecasts, in its latest detailed release ERA5-Land (Muñoz-Sabater et al., 2021), which aims to summarize the global meteorological monitoring

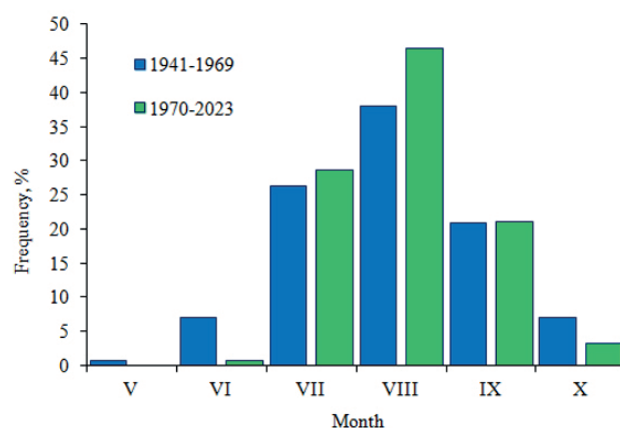


Fig.4. The frequencies of upwelling events for selected months in 1941-1969 and 1970-2023.

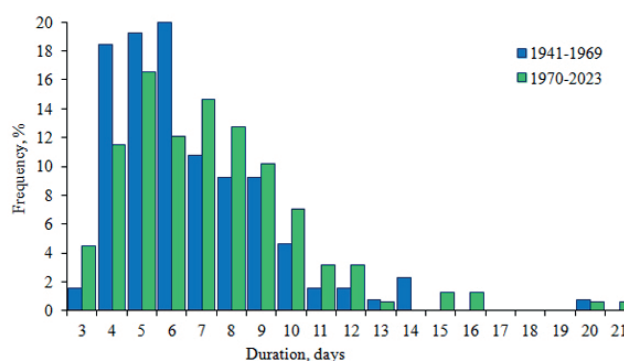


Fig.5. The frequency of upwelling events with different durations for 1941-1969 and 1970-2023.

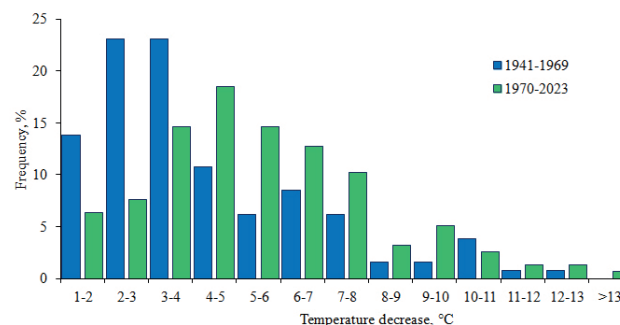


Fig.6. The frequency of upwelling events with different temperature decreases in 1941-1969 and 1970-2023.

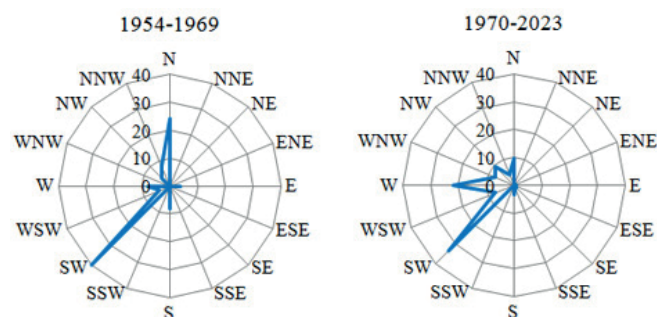


Fig.7. The frequency of upwelling events (%) that developed under winds of a certain direction during two periods.

network based on a four-dimensional variational assimilation system of retrospective data collected in the most complete database (with a grid spacing of 0.1 degree and a temporal resolution of 1 h).

A homogeneous hourly series of winds in Listvyanka from 1950 to 2022 was sampled and obtained. Then a daily averaging was carried out, and the temporal variability of wind frequencies during summer months was plotted for 8 main directions with a step of 45 degrees, as well as the average vector and scalar velocities and wind stability were calculated. Since in recent years there has been an increase in the frequency of upwellings, it was decided to analyze this period separately.

The study of winds for July-September (when most of the upwellings occurs) showed that the average monthly wind speed gradually increases from July to September (2.2, 2.5 and 3 m/s, respectively), wind stability also rises (0.27, 0.33 and 0.52, respectively). At the same time, there is a reorganization of the main wind directions: in July, westerly winds prevail, in August the share of north-westerly winds increases significantly, and by September they become dominant. At the same time, a gradual transformation of the wind rose for August was noted. If in the 50-60s of the last century, westerly winds accounted for 33.5% and north-westerly winds for 20.1% of the total number of winds, then in the last decade, due to climatic changes, the timing of wind reorganization was shifted, and, accordingly, the frequency of occurrence of these winds in August has changed: 28.6% and 29.4%, respectively.

An examination of the proportion of the two main wind directions in August causing upwelling in Listvennichny Bay (Fig. 7) revealed a slight gradual increase in the proportion of northerly winds causing runoff (from 1% in the 1950s, 2% in the 1960s-2010s and 3% in the last decade). The frequency of southwesterly winds also slightly increased (from 2% in the 1950s to 3.1% in the last decade), but dropped to 1.7% during the 1960-2010s, which is likely one of the reasons for the reduced amount of upwellings during this period (Fig. 3).

If one calculates the total frequency of N and SW winds in August for two periods: before 1969 and since 1970, one can note that it increased from 3.6% to 5%, respectively. The observed rise in the proportion of winds causing upwellings coincides with the growth in the number of recorded upwelling events in August 1970-2023 compared to the previous period (Fig. 4). The smaller number of upwellings in July are explained by the fact that this month is characterized by minimum wind speeds for the whole summer-autumn period and minimum wind stability. The share of upwellings in September is also less in spite of the general wind intensification. The reason for this is a significant increase in the stability of north-westerly winds (> 0.5), and a reduced share of SW winds to 2% (compared to 4-5% in August).

The observed redistribution of upwellings towards longer duration and with a larger temperature drop in 1970-2023 compared to the previous period (Figs. 5, 6) has a common reason. This is directly related to the

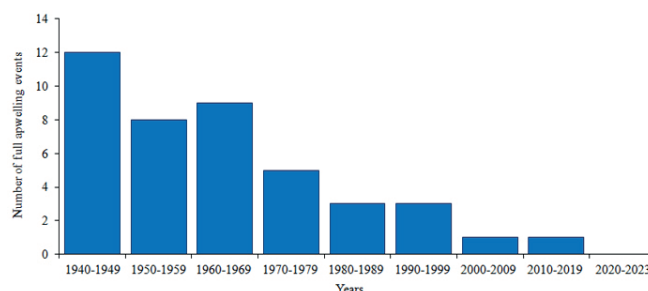


Fig.8. The number of full upwellings by decades.

increasing share of upwellings around August. August is characterized by the warmest water in the littoral, and, accordingly, the upwelling that occurs, with the same temperature of rising waters, will cause a greater temperature drop in August than in other months. And, accordingly, the incoming cold water, due to its high heat capacity, will need much more time to warm up to its initially high temperature values.

The influence of wind parameters on the development of full upwellings can be judged by analyzing the meteorological data during the full upwelling on September 11-21, 2011, when the wind parameters were measured with high discreteness by an automatic weather station. Sustained winds of W-NW direction began in the evening of September 11 and lasted for three days. Wind speeds reached 17 m/s and averaged 8.7 m/s. Water temperature at the beginning of the upwelling was 10.6°C, dropped to 4.0°C by September 15 and after relaxation of the upwelling was 6.8°C on September 21. It should be noted that not only wind strength and duration, but also its stability is necessary for the full upwelling development. For example, on August 16-27, 2023, at the maximum observed western wind speeds (average speed of 14 m/s, gusts up to 35 m/s), the water temperature dropped from 19.4°C to 4°C. However, since the wind decreased and increased again many times during 10 days, water temperature fluctuations from 4 to 10-15°C with a period of 12 to 24 hours were registered, forming a so-called intermittent upwelling. Despite the fact that water from hypolimnion was coming to the surface, the unstable winds did not allow large water masses to be involved in this movement, and the water was immediately replaced by warm surface water at the slightest wind attenuation. Therefore, we did not refer this case to a full upwelling.

The revealed regularities of changes in conditions of the formation and existence of upwellings in Listvennichny Bay allow us to state the following suggestions. On the one hand, reduction in the number of full upwellings should influence the amount of biogens transport from the hypolimnion to the littoral. On the other hand, a decrease in the frequency of upwellings should be accompanied by an increase in the average surface temperature in the coastal zone during the summer season, which increases vertical density gradients in the upper layers and may cause eutrophication of littoral. As a consequence, the sharp growth spike of *Spirogyra* algae in Listvennichny Bay observed in recent years (Kravtsova et al., 2012; Timoshkin et al., 2014; Timoshkin et al., 2018) may

be related to the complex influence of increasing anthropogenic pressure (and rich input of biogens with wastewaters) and climatic changes (Shimaraev and Troitskaya, 2018). The latter, in turn, have a twofold effect on the increase of littoral temperature, both through greater warming due to higher air temperatures and less frequent water exchange (and consequent cooling) with the deep waters of Lake Baikal. Thus, more favorable physical and trophic conditions may be formed, for the development of algae not typical for the littoral of Baikal.

5. Conclusions

As a result of the presented work, we analyzed data on coastal water temperature and winds in Listvennichny Bay. We identified summer coastal upwellings, ranked them by duration, water temperature drops and direction and strength of accompanying winds. The obtained data were divided into two periods corresponding to the observed climatic trends.

It was found, that the main winds causing upwelling are from north and southwest directions, which is confirmed by the morphometry of the bay. Analysis of upwellings distribution by years showed that until 1960 there was a gradual decrease in the number of upwellings per year. From 1960 until 2016 the average number of events roughly constant at about 2.5 upwellings per year, with a slight increase in the last 8 years. The maximum number of upwellings (13) was recorded in 1943. The duration of upwellings averages 7 days, with a maximum of 21 days in 1979. Water temperature usually drops by about 5°C, with a maximum of 13.5°C recorded in 2016.

An increase in the proportion of upwellings in August compared to other months during 1970-2023 was found. A redistribution of upwelling events toward their longer duration and greater temperature drops after 1970 compared to the previous period was also revealed. The cause of these changes was the global course of decreasing wind activity associated with observed climatic changes, and a particular redistribution of the proportion of N and SW winds in the bay during the study period.

The number of full upwellings has decreased with each decade, from 12 in the 40s to just one in the 2010s. After 2020, no full upwellings have been observed yet. Two cases of full and intermittent upwellings were described and compared. Possible ecological impacts on the Listvennichny Bay due to the combined effects of increasing anthropogenic pressure and less frequent upwellings have been hypothesized.

6. Acknowledgments

The authors thank all the staff members of the Laboratory of Hydrology and Hydrophysics of LIN SB RAS for their participation in the expeditionary works and data collection as well as for productive discussions of the study results. Special thanks to Ruslan Gnatovsky for preparation of ERA5-Land data for analysis.

The study was carried out within the State Assignment of LIN SB RAS (0279-2021-0004).

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Afanasyeva E.L. 1977. Biology of baikalian Epishura. Novosibirsk: Nauka. (In Russian)
- Aslamov I., Troitskaya E., Gnatovsky R. et al. 2024. Study of Interannual Variability of the Winter Mesothermal Temperature Maximum Layer in Southern Baikal. *Water* 16(21):1-19. DOI: [10.3390/w16010021](https://doi.org/10.3390/w16010021)
- Atlas of waves and winds of Lake Baikal: Reference and navigation manual. 1977. Leningrad: Gidrometeoizdat. (In Russian)
- Bell G.L., Eadie B.J. 1983. Variations in the distribution of suspended particles during an upwelling event in Lake Michigan in 1980. *Journal of Great Lakes Research* 9(4):559-567.
- Boyarinov M.P., Petrov P.M. 1991. Thermal regime forming processes of deep fresh water reservoirs. Leningrad: Nauka. (In Russian)
- Bulygina O.N., Korshunova N.N., Razuvaev V.N. 2013. Changes in the wind regime over Russia in the last decades. In: *Proceedings of the Main Geophysical Observatory named after A. I. Voeikov*, pp. 156-172.
- Corman J.R., McIntyre P.B., Kuboja B. et al. 2010. Upwelling couples chemical and biological dynamics across the littoral and pelagic zones of Lake Tanganyika, East Africa. *Limnology and Oceanography* 55(1):214-224. DOI: [10.4319/lo.2010.55.1.0214](https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.1.0214)
- Coumou D., Lehmann J., Beckmann J. 2015. The weakening summer circulation in the Northern Hemisphere mid-latitudes. *Science* 348:324-327. DOI: [10.1126/science.1261768](https://doi.org/10.1126/science.1261768)
- Hampton S.E., Izmet'eva L.R., Moore M.V. et al. 2008. Sixty years of environmental change in the world's largest freshwater lake - Lake Baikal, Siberia. *Global Change Biology* 14:1-12. DOI: [10.1111/j.1365-2486.2008.01616.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01616.x)
- Heim B., Oberhaensli H., Fietz S. et al. 2005. Variation in Lake Baikal's phytoplankton distribution and fluvial input assessed by SeaWiFS satellite data. *Global and Planet Change* 46: 9-27. DOI: [10.1016/j.gloplacha.2004.11.011](https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2004.11.011)
- Katz S.L., Hampton S.E., Izmet'eva L.R. et al. 2011. Influence of long-distance climate teleconnection on seasonality of water temperature in the World's largest lake - Lake Baikal, Siberia. *PLoS ONE* 6(2):e14688. DOI: [10.1371/journal.pone.0014688](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014688)
- Kouraev A.V., Semovski S.V., Shimaraev M.N. et al. 2007. The ice regime of Lake Baikal from historical and satellite data: Relation to air temperature, dynamical, and other factors. *Limnology and Oceanography* 52(3):1268-1286. DOI: [10.4319/lo.2007.52.3.1268](https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.3.1268)
- Kozhov M.M. 1962. Biology of Lake Baikal. Moscow: AS USSR Publ. (In Russian)
- Kozhov M.M., Pomazkova G.I., Ustyuzhin Yu.A. 1970. Distribution of zooplankton in Southern Baikal. *Proceedings of Biological-Geographical Institute of Irkutsk State University* 23(1):87-94. (In Russian)
- Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V. et al. 2012. Disturbances of the Vertical Zoning of Green Algae in the Coastal Part of the Listvennichnyi Gulf of Lake Baikal. *Doklady Biological Sciences* 448:227-229. DOI: [10.1134/S0012496612060026](https://doi.org/10.1134/S0012496612060026)

Livingstone D.M. 1999. Ice break-up on southern Lake Baikal and its relationship to local and regional air temperatures in Siberia and to the North Atlantic Oscillation. *Limnology and Oceanography* 44(6):1486-1497. DOI: [10.4319/lo.1999.44.6.1486](https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.6.1486)

Magnuson J.J., Robertson D.M., Benson B.J. et al. 2000. Historical Trends in Lake and River Ice Cover in the Northern Hemisphere. *Science* 289:1743-1746. DOI: [10.1126/science.289.5485.1743](https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1743)

Muñoz-Sabater J., Dutra E., Agustí-Panareda A. et al. 2021. ERA5-Land: a state-of-the-art global reanalysis dataset for land applications. *Earth System Science Data* 13:4349-4383. DOI: [10.5194/essd-13-4349-2021](https://doi.org/10.5194/essd-13-4349-2021)

Plattner S., Mason D.M., Leshkevich G.A. et al. 2006. Classifying and forecasting coastal upwellings in Lake Michigan using satellite derived temperature images and buoy data. *Journal of Great Lakes Research* 32:63-76. DOI: [10.3394/0380-1330\(2006\)32\[63:CAFCUI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3394/0380-1330(2006)32[63:CAFCUI]2.0.CO;2)

Semovski S.V., Shimaraev M.N., Minko N.P. et al. 2001. Use of satellite observations to study thermal fronts of Lake Baikal. *Earth Observation and Remote Sensing* 16(5):773-787.

Sharma S., Richardson D.C., Woolway R.I. et al. 2021. Loss of ice cover, shifting phenology, and more extreme events in northern hemisphere lakes. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 126(10):1-12. DOI: [10.1029/2021JG006348](https://doi.org/10.1029/2021JG006348)

Shimaraev M., Troitskaya E., Gnatovskii R. 2009. Modern climate changes and deep water temperature of Lake Baikal. *Doklady of Earth Sciences* 427:804-808.

Shimaraev M.N., Troitskaya E.S., Blinov V.V. et al. 2012.

On upwellings in Lake Baikal. *Doklady of Earth Sciences* 442(2):272-276. DOI: [10.1134/S1028334X12020183](https://doi.org/10.1134/S1028334X12020183)

Shimaraev M.N., Troitskaya E.S. 2018. Current trends in upper water layer temperature in coastal zones of Baikal. *Geography and Natural Resources* 39(4):349-357. DOI: [10.1134/S187537281804008X](https://doi.org/10.1134/S187537281804008X)

Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Volkova E.A. et al. 2014. Mass development of green filamentous algae of the genera *Spirogyra* Link and *Stigeoclonium* Kutz. (CHLOROPHYTA) in the coastal zone of Southern Baikal. *Hydrobiological Journal* (5):15-26.

Timoshkin O.A., Moore M.V., Kulikova N.N. et al. 2018. Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia). *Journal of Great Lakes Research* 44(2):230-244. DOI: [10.1016/j.jglr.2018.01.008](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.01.008)

Todd M.C., Mackay A.W. 2003. Large-scale climate controls on Lake Baikal ice cover. *Journal of Climate* 16:3186-3199. DOI: [10.1175/1520-0442\(2003\)016<3186:LCCOLB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(2003)016<3186:LCCOLB>2.0.CO;2)

Troitskaya E., Budnev N., Shimaraev M. 2022. Changes in the heat content of water column in the slope area of the southern basin of Lake Baikal in the 21st Century. *Water* 14:348. DOI: [10.3390/w14030348](https://doi.org/10.3390/w14030348)

Verbolov V.I., Granin N.G., Zhdanov A.A., et al. 1992. Estimation of hydrophysics state of active layer for polygon observation materials on Lake Baikal. *Water Resources* (5):74-86 (In Russian)

Vereshchagin G.Yu. 1927. Some data on Baikal deep water regime near Marituy. *Trudy of Committee for Lake Baikal Study* 2:77-138. (In Russian)

Влияние изменений климата на возникновение и характеристики прибрежного апвеллинга в заливе Лиственничный (Южный Байкал) с 1941 по 2023 гг.

Троицкая Е.С.^{1,2*}, Шимараев М.Н.¹, Асламов И.А.¹

¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», ул. К. Маркса, 1, Иркутск, 664003, Россия

АННОТАЦИЯ. В статье представлены результаты анализа влияния изменений климата на повторяемость и характеристики прибрежных апвеллингов в заливе Лиственничный (Южный Байкал) с 1941 по 2023 гг. С конца 1950-х годов показано уменьшение как полных, так и неполных апвеллингов. Кроме того, обнаружено увеличение доли апвеллингов в августе по сравнению с другими месяцами в течение 1970-2023 гг. Также были обнаружены тенденции к увеличению продолжительности апвеллинга и большим перепадам температуры во время апвеллинга после 1970 г. по сравнению с предыдущим периодом. Из анализа данных ERA5-Land установлено, что причиной наблюдаемых изменений стал глобальный ход снижения ветровой активности и специфическое перераспределение доли северных и юго-западных ветров в заливе в период исследований. Описаны и сопоставлены два случая полного и неполного апвеллингов. Высказано предположение о возможном экологическом воздействии на Лиственничный залив из-за комбинированного воздействия увеличения антропогенной нагрузки и уменьшения частоты апвеллингов.

Ключевые слова: Байкал, Лиственничный залив, апвеллинг, температура воды, ветер, изменения климата

1. Введение

Апвеллинг – это упорядоченное восходящее движение вод к поверхности водоема. Он является одним из механизмов вертикального водообмена и влияет на вертикальное распределение физических и химических параметров водоема (температура воды, соленость, плотность, химический состав воды, загрязняющие вещества), а также на биологические процессы (например, жизненные циклы бактерий, фито- и зоопланктона). Известно, что апвеллинг может развиваться в прибрежных и пелагических областях. Прибрежные апвеллинги достаточно хорошо изучены в крупных озерах мира (например, Бояринов и Петров, 1991; Bell and Eadie, 1983; Corman et al., 2010; Plattner et al., 2006).

На Байкале прибрежный апвеллинг впервые описал Г.Ю. Верещагин около ста лет назад (1927). Он измерил температуру воды и концентрации растворенного кислорода в прибрежных поверхностных водах, которые соответствовали значениям, наблюдаемым в пелагических областях на глубине 50-200 м. Позднее апвеллинги были обнаружены в

прибрежных районах Северного Байкала по спутниковыми снимками NOAA / AVHRR (Semovski et al., 2001). Katz S.L. с соавторами (2011) предположили, что изменчивость струйных течений является одним из факторов, влияющим на динамику вод в озере, в частности, на развитие прибрежного апвеллинга. Первые количественные оценки (понижение температуры воды, продолжительность и глубина развития апвеллинга, вертикальные скорости вод) прибрежных апвеллингов в Южном Байкале были получены относительно недавно (Шимараев и др., 2012).

Влияние апвеллинга на распределение планктона в Байкале сообщалось в некоторых биологических исследованиях. Например, М.М. Кожов (1962) наблюдал апвеллинг в проливе Малое Море и прилегающих районах озера после сильного NW шторма 4-9 сентября 1951 г. Температура поверхности воды понизилась с 12-13° до 7-7.5°С в проливе Малое Море и до 8-9°С у восточного берега острова Ольхон. После апвеллинга планктон «был очень редок, и относительно равномерно распределен в верхнем 100-метровом слое» (1962). В августе

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: elena.troitskaya@lin.irk.ru (Е.С. Троицкая)

Поступила: 15 декабря 2023; **Принята:** 27 декабря 2023;
Опубликована online: 28 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



1963 г. (Кожов и др., 1970) сильный NW ветер над акваторией Южного Байкала привел к подъему глубинных вод вблизи пос. Большие Коты. Температура поверхности воды понизилась до 5-6°C. Биомасса зоопланктона снизилась до 1,2 г/м² по сравнению со среднегодовым значением 40-50 г/м². Позже Э.Л. Афанасьева (1977) также показала, что вертикальные движения воды в зоне апвеллинга могут переносить науплии копепода эпишуры *Eupishura baikalensis* из глубинных слоев воды на ее поверхность. На основе измерений фитопланктона и спутниковых SeaWiFS наблюдений в 2001-2003 гг. Heim B. с соавторами (2005) пришли к выводу, что уменьшения концентрации хлорофилла *a* вдоль восточного берега Северного Байкала были связаны с апвеллингами. Комплексные исследования на полигоне в районе мыса Елохин (западный берег Северного Байкала) в августе 1988 г. показали, что концентрация хлорофилла *a* может увеличиваться после релаксации апвеллинга (Верболов и др., 1992).

В последние несколько десятилетий на Байкале, как и во всем Северном полушарии отмечаются изменения ледово-термического режима (Livingstone, 1999; Magnuson et al., 2000; Шимараев и др., 2002; Todd and Mackay, 2003; Kouraev et al., 2007; Hampton et al., 2008; Шимараев и др., 2018; Sharma et al., 2021). Сроки ледостава сократились почти на три недели (Livingstone, 1999; Magnuson et al., 2000; Шимараев и др., 2002). Это привело к сдвигу сроков установления летней стратификации на более ранние даты и увеличению температуры поверхности воды. Сроки перехода к зимней стратификации соответственно сдвинулись на более поздние даты (Aslamov et al., 2024). Недавние исследования температуры воды в отдельных котловинах озера (Shimaraev et al., 2009) и теплосодержания водной толщи в Южном Байкале (Troitskaya et al., 2022) указывают на трансформацию поля температуры и перераспределение запасов тепла в условиях изменения климата. Следовательно, это должно отражаться на интенсивности процессов вертикального тепло- и водообмена в Байкале. Особое значение изменения температурного режима и процессов вертикального тепло- и водообмена приобретают для литорали, где обитает наибольшее количество гидробионтов.

Целью данной работы было определение количественных характеристик прибрежного апвеллинга, развивающегося в заливе Лиственничный, и их связи с ветром и изменениями климата в последние 80 лет.

2. Материалы и методы

Для выявления случаев апвеллинга и оценки его характеристик были использованы данные о температуре воды, полученные в 1941-2023 гг. у пирса ЛИН СО РАН в п. Листвянка, расположенном на берегу Лиственничного залива в Южном Байкале (Рис. 1). В 1941-2005 гг. температура измерялась ртутным термометром (точность $\pm 0,02^\circ\text{C}$) в 8, 14



Рис.1. Карта Лиственничного залива и мест проведения измерений (<https://earth.google.com/web> – дата обращения 29.11.2023). На врезке указано местоположение Лиственничного залива в Южном Байкале.

и 20 ч., с 2006 г. по настоящее время электронными датчиками температуры (точность $\pm 0,002^\circ\text{C}$, дискретность измерений от 1 с до 2 мин). В исследовании анализируется только период летней стратификации, когда поверхностные воды теплее глубинных слоев и апвеллинги вызывают резкий перепад температур, что облегчает их идентификацию. Для анализа случаев развития прибрежного апвеллинга использовались среднесуточные значения температуры воды. Определялись даты начала и окончания апвеллинга, его продолжительность и величина понижения температуры.

Апвеллингом считались случаи, когда температура резко понижалась на один или более градусов и сохранялась в течение трех и более дней. За дату начала апвеллинга принимался день, когда температура воды резко понижалась, за дату его окончания, когда температура воды на поверхности становилась близкой к таковой до апвеллинга. Продолжительность апвеллинга определялась как разница между датами начала и окончания апвеллинга. Величина понижения температуры воды рассчитывалась как разница между температурой воды перед началом апвеллинга и в момент, когда она достигала минимального значения во время апвеллинга.

В зависимости от того, с какой глубины поднимаются воды на поверхность водоема, выделяют полный и неполный апвеллинг. Полный апвеллинг характеризуется выходом подтермоклинных вод на поверхность, т.е. вод гипolimниона. При неполном апвеллинге процесс подъема вод есть, но подтермоклинные воды не достигают поверхности. В связи с этим нами были отдельно выделены полные апвеллинги, определены их характеристики и проанализированы условия их развития.

Чтобы проанализировать ветровые условия, использовались суточные данные о скорости и направлении ветра за 1954-2010 гг. с метеостанции Исток Ангары, с 2011 г. по настоящее время – с автоматической метеостанции, установленной на пирсе ЛИН СО РАН (пос. Листвянка). Так как расстояние между ними составляет около 4 км и морфометрические условия близки, ряд данных по ветру был принят однородным. По исходным данным определялся устойчивый по направлению ветер со скоростью не менее 3 м/с и продолжительностью не

менее 6 ч., наблюдавшийся в течение суток до даты развития апвеллинга и в день начала его развития. Затем рассчитывались средние направление и скорость ветра, при котором начинал развиваться апвеллинг. В 2011-2023 гг. современные данные позволили определить максимальные значения скорости ветра при его порывах.

3. Результаты

С учетом влияния климата на ледово-термический режим Байкала (Livingstone, 1999; Magnuson et al., 2000; Шимараев и др., 2002; Todd, Mackay, 2003; Kouraev et al., 2007; Hampton et al., 2008; Шимараев и др., 2018; Sharma et al., 2021), имеющиеся данные по температуре воды за весь период наблюдений были разбиты на два временных интервала: 1941-1969 и 1970-2023 гг. Период 1941-1969 гг. характеризуется понижением температуры поверхности воды, а период с 1970 г. по настоящее время – ее повышением (Рис. 2). Величина трендов в 1941-1969 гг. составила $-0,39^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ($r = 0,38$, $p = 0,04$), а в 1970-2023 гг. – $+0,26^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ($r = 0,38$, $p = 0,009$).

В мае-октябре 1941-2023 гг. были выявлены 285 случаев апвеллинга. В каждом отдельном месяце регистрировалось до четырех апвеллингов. В течение одного года чаще всего фиксировалось 1-3 апвеллинга (Рис. 3). Максимальное количество апвеллингов составило 13 случаев в 1943 году.

Всего за период с 1941 по 1969 г. зарегистрировано 129 апвеллингов (в среднем 4,5 случая в год), а с 1970 по 2023 г. – 157 апвеллингов (в среднем 2,9 случая в год). На рис. 4 показана повторяемость апвеллингов за отдельные месяцы двух периодов. Сравнение периодов выявило изменение распределения апвеллингов по месяцам: по сравнению с 1941-1969 гг., 1970-2023 гг. показывает большую концентрацию апвеллингов в августе (с 38,0% до 46,5%), соседние июль и сентябрь показали незначительные изменения по числу апвеллингов. Во все

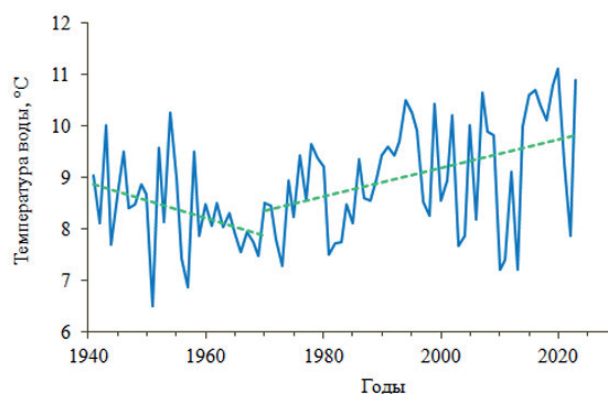


Рис.2. Средние за период прямой стратификации значения температуры воды на пирсе ЛИН СО РАН в п. Листвянка в 1941-2023 гг. (сплошная синяя кривая) и линейные тренды в 1941-1969 и 1970-2023 гг. (пунктирные зеленые кривые).

остальные месяцы число апвеллингов существенно снизилось (с 0,8% до 0% в мае, с 7,0% до 0,6% в июне и с 7% до 3% в октябре).

На рисунке 5 показана частота событий апвеллинга с различной продолжительностью для двух анализируемых периодов. При одинаковой средней продолжительности апвеллингов (7 сут) выявлено смещение продолжительности в большую сторону, начиная с 1970 г. (Рис. 5). В 1941-1969 гг. чаще наблюдались апвеллинги с продолжительностью 4-6 сут (57,7%), в то время как в 1970-2023 гг. продолжительность апвеллингов увеличилась до 5-8 сут (56,1%). В последние десятилетия в полтора раза выросло количество апвеллингов с продолжительностью 10 сут и более (с 11,5 до 17,8%).

Изменилась и величина понижения температуры воды во время апвеллинга. Так, в 1941-1969 и 1970-2023 гг. средние ее значения составили 4,2 и 5,3 $^{\circ}\text{C}$, максимальные 12,0 и 13,5 $^{\circ}\text{C}$, соответственно. Претерпел изменения и характер распределения повторяемости апвеллингов по понижениям темпе-

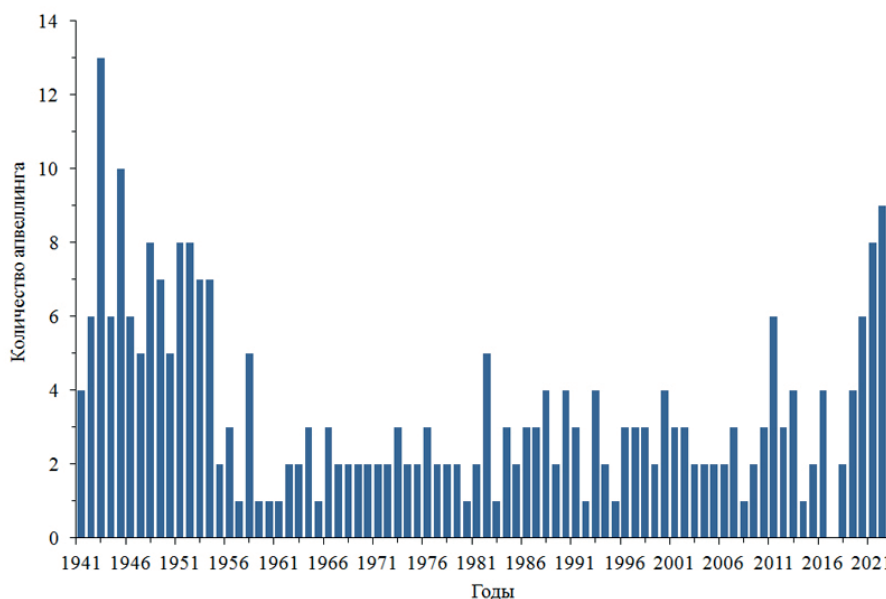


Рис.3. Количество выделенных апвеллингов в разные годы 1941-2023 гг.

ратуры (рис. 6). Если 1941-1969 гг. 60% случаев апвеллинга характеризовались понижением температуры на 1-4°C, то 1970-2023 гг. в 61% случаев апвеллинга температура воды понижалась на 3-7°C.

Анализ имеющихся данных о ветре (с 1954 г.) позволяет также оценить изменения характеристик ветра. В 1954-1969 гг. (Рис. 7) апвеллинги чаще всего развивались при ветрах N и SW направлений (64% случаев), начиная с 1970 г. – W и SW направлений (55% случаев). Средние и максимальные скорости ветра за рассматриваемые периоды несколько отличаются и составляют 6 (12) м/с в 1954-1969 и 5 (14) м/с в 1970-2023 гг.

В 1941-2023 гг. выявлено 42 полных апвеллинга. Из них 29 случаев приходятся на период с 1941 по 1969 гг., и 13 – на 1970-2023 гг. Наибольшее количество полных апвеллингов произошло в августе и сентябре – 18 и 13, соответственно, в октябре выявлено 7 случаев. В июне и июле зафиксировано по два полных апвеллинга. Один полный апвеллинг наблюдался в мае. Распределение полных апвеллингов по десятилетиям приведено на рис. 8.

Анализ имеющихся данных о ветре для 24 полных апвеллингов показал, что они развивались чаще всего (10 случаев) при SW ветре со скоростями 4-7 м/с. Четыре случая полных апвеллингов были связаны с W ветрами со скоростями 5-9 м/с.

4. Обсуждение

Таким образом, мы выделили летние апвеллинги в Ливенничном заливе, ранжировали их по продолжительности, понижению температуры воды, направлению и скорости сопутствующих ветров. Случаи полных апвеллингов рассматривались отдельно. Полученные данные были разделены на два временных периода, соответствующих наблюдаемым климатическим тенденциям.

Анализируя морфометрию залива Ливенничный, можно сделать вывод, что прибрежные апвеллинги могут развиваться под действием NNW ветров, вызывающих сгон, либо за счет экмановского переноса поверхностных вод при WSW ветрах и образовании антициклонического вихря в заливе. При развитии антициклонического вихря происходит опускание воды в его центре и компенсирующий подъем воды на периферии у берегов залива. Проанализированные данные по ветру, вызывающему апвеллинг, подтверждают высказанные предположения (Рис. 7).

Анализ распределения апвеллингов по годам показал, что до 1960 г. наблюдалось постепенное уменьшение числа апвеллингов в году. Затем до 2016 г. их среднее количество оставалось постоянным и составляло около 2,5 апвеллингов в год, а в последние 8 лет наблюдался некоторый рост (Рис. 3). Особый интерес вызвало сужение распределения повторяемости апвеллингов по месяцам и концентрация апвеллингов в августе в 1970-2023 гг. (Рис. 4). Отмечено также перераспределение апвеллингов в сторону большей продолжительности и большего

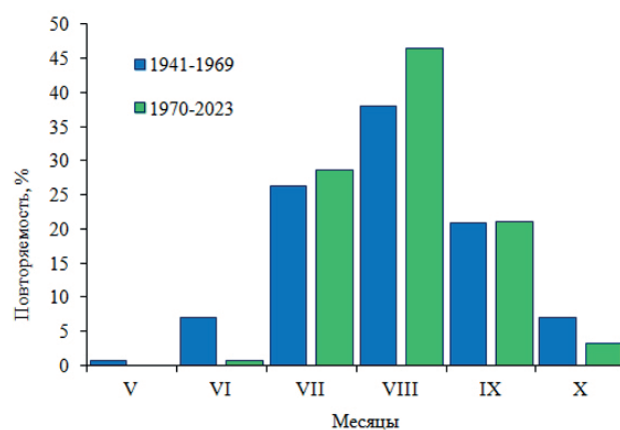


Рис.4. Повторяемость апвеллинга в отдельные месяцы в 1941-1969 и 1970-2023 гг.

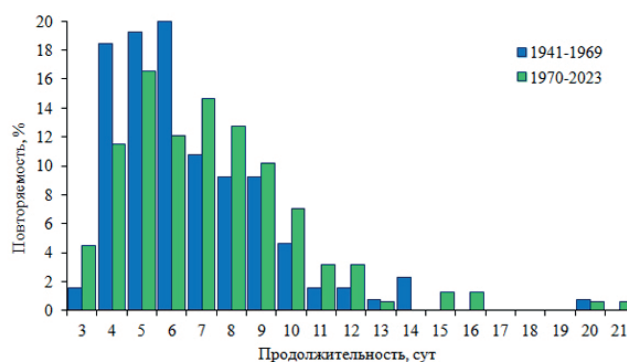


Рис.5. Повторяемость апвеллингов разной продолжительности в 1941-1969 и 1970-2023 гг.

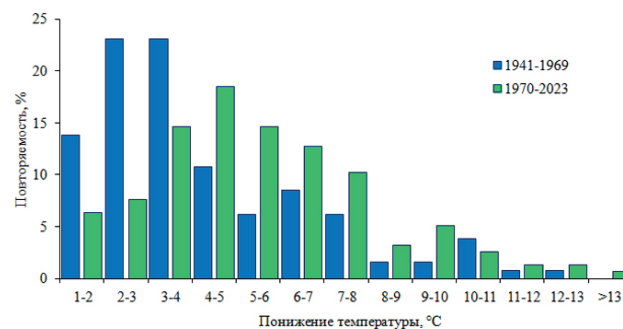


Рис.6. Повторяемость величины понижения температуры воды при апвеллинге в 1941-1969 и 1970-2023 гг.

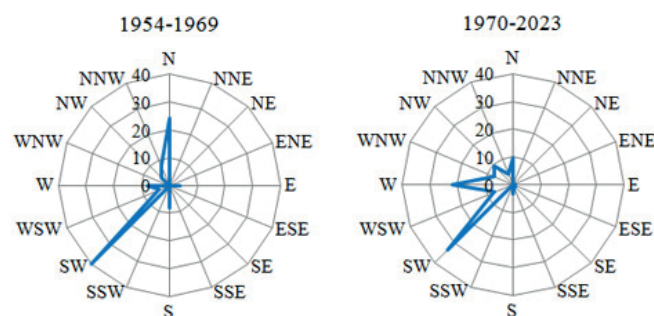


Рис.7. Повторяемость апвеллингов (%), развивающихся при ветрах определенного направления в течение двух периодов.

понижения температур после 1970 г. по сравнению с предыдущим периодом (Рис. 5, 6).

Число полных апвеллингов уменьшалось с каждым десятилетием: с 12 в 1940-х гг. до одного в 2010-х гг. После 2020 г. полные апвеллинги пока не наблюдались.

Чтобы выяснить возможные причины этих тенденций, необходимо проанализировать, как менялся ветер в эти периоды. Следует отметить, что скорости ветра в последние десятилетия стали заметно ниже, чем в середине 40-50-х годов прошлого века (Атлас ..., 1977). Сравнение средних скоростей ветра по отдельным месяцам 1959-1968 гг. и 2000-2022 гг. выявило их уменьшение в июне-августе на 0,8-1,1 м/с, в сентябре-ноябре – на 1,1-2,0 м/с. Подобные изменения наблюдаются на большей части территории России (Bulygina et al., 2013) и, вероятно, вызваны ускоренным потеплением в Арктике и уменьшением градиента температуры между экватором и полюсом, что отражается на среднеширотной атмосферной циркуляции и интенсивности ветров (Coumou et al., 2015).

Поскольку первоначальные данные о ветре были доступны только для дат апвеллинга, мы использовали известный реанализ Европейского центра среднесрочных прогнозов погоды в его последнем подробном выпуске ERA5-Land (Muñoz-Sabater et al., 2021), целью которого является объединение глобальной сети метеорологического мониторинга на основе четырехмерной вариационной системы ассимиляции ретроспективных данных, собранных в наиболее полной базе данных (с шагом сетки 0,1° и временным разрешением 1 час).

Были отобраны однородные часовые ряды ветров в Ливиньянке с 1950 по 2022 гг. Выполнено суточное осреднение и проанализирована временная изменчивость повторяемости ветров в летние месяцы по 8 основным направлениям с шагом 45°, а также рассчитаны средние векторные и скалярные скорости и устойчивость ветра. Поскольку в последние годы наблюдается увеличение повторяемости апвеллингов, было решено проанализировать этот период отдельно.

Изучение ветров за июль-сентябрь (когда происходит большая часть апвеллингов) показало, что среднемесячная скорость ветра постепенно возрастает с июля по сентябрь (2,2, 2,5 и 3 м/с, соответственно), повышается и устойчивость ветра (0,27, 0,33 и 0,52, соответственно). При этом происходит смена основных направлений ветров: в июле преобладают ветры W направления, в августе значительно увеличивается доля ветров NW направления, а к сентябрю они становятся доминирующими. При этом отмечена постепенная трансформация розы ветров за август. Если в 50-60-е гг. прошлого века W ветры составляли 33,5%, а северо-западные – 20,1% от общего числа ветров, то в последнее десятилетие из-за климатических изменений сроки перестройки ветров сместились, и, соответственно, изменилась повторяемость этих ветров в августе: 28,6% и 29,4% соответственно.

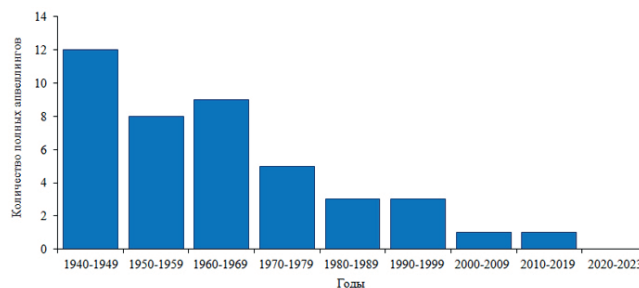


Рис.8. Количество полных апвеллингов по десятилетиям.

Изучение доли двух основных направлений ветров в августе, вызывающих апвеллинг в Ливиньянском заливе (Рис. 7), выявило незначительное постепенное увеличение доли северных ветров, вызывающих сгон (с 1% в 1950-е гг. до 2% в 1960-2020-е гг. и 3% за последнее десятилетие). Повторяемость SW ветров также несколько увеличилась (с 2% в 1950-е гг. до 3,1% в последнее десятилетие), но была понижена до 1,7% в течение 1960-2010-х гг., что, вероятно, является одной из причин уменьшения количества апвеллингов в этот период (Рис.3).

Если подсчитать суммарную повторяемость N и SW ветров в августе за два периода: до 1969 г. и с 1970 г., то можно отметить, что она увеличилась с 3,6% до 5%, соответственно. Наблюдаемый рост доли ветров, вызывающих апвеллинги, совпадает с ростом числа зарегистрированных апвеллингов в августе 1970-2023 гг. по сравнению с предыдущим периодом (Рис. 4). Меньшее количество апвеллингов в июле объясняется тем, что для этого месяца характерны минимальные скорости ветра за весь летне-осенний период и минимальная устойчивость ветра. Доля апвеллингов в сентябре также меньше, несмотря на общее усиление ветра. Причиной этого является значительное увеличение устойчивости NW ветров (>0,5), а также снижение доли SW ветров до 2% (по сравнению с 4-5% в августе).

Наблюдаемое перераспределение апвеллингов в сторону большей продолжительности и с большим понижением температуры в 1970-2023 гг. по сравнению с предыдущим периодом (Рис. 5, 6) имеет общую причину. Это напрямую связано с увеличением доли апвеллингов в августе. Август характеризуется самой теплой водой литорали, и, соответственно, возникающий апвеллинг при одинаковой температуре поднимающихся вод вызовет большее понижение температуры в августе, чем в другие месяцы. И, соответственно, поступающей холодной воде из-за своей высокой теплоемкости потребуется гораздо больше времени, чтобы прогреться до своих изначально высоких значений температуры.

О влиянии параметров ветра на развитие полных апвеллингов можно судить, анализируя метеорологические данные во время полного апвеллинга 11-21 сентября 2011 г., когда параметры ветра измерялись с высокой дискретностью автоматической метеостанцией. Устойчивый ветер WNW

направления начался вечером 11 сентября и продолжался три дня. Скорость ветра достигала 17 м/с и составляла в среднем 8,7 м/с. Температура воды в начале апвеллинга была 10,6°C, к 15 сентября понизилась до 4,0°C, а после релаксации апвеллинга 21 сентября составила 6,8°C. Следует отметить, что не только сила и продолжительность ветра, но и его устойчивость необходима для развития полного апвеллинга. Например, 16-27 августа 2023 г. при максимальных наблюдаемых скоростях \bar{W} ветра (средняя скорость 14 м/с, порывы до 35 м/с) температура воды упала с 19,4°C до 4°C. Однако, поскольку ветер многократно уменьшался и снова усиливался в течение 10 дней, были зарегистрированы колебания температуры воды от 4 до 10-15°C с периодом от 12 до 24 ч. образуя так называемый перемежающийся апвеллинг. Несмотря на то, что вода из гипolimниона выходила на поверхность, неустойчивые ветры не позволяли вовлечь в это движение большие водные массы, и при малейшем ослаблении ветра вода немедленно заменялась теплой поверхностной водой. Поэтому мы не отнесли данный случай к полному апвеллингу.

Выявленные закономерности изменения условий формирования и существования апвеллингов в Лиственничном заливе позволяют высказать следующие предположения. С одной стороны, уменьшение количества полных апвеллингов должно повлиять на объем транспорта биогенов из гипolimниона в литораль. С другой стороны, уменьшение повторяемости апвеллингов должно сопровождаться повышением средней поверхностной температуры в прибрежной зоне в летний сезон, что увеличивает вертикальные градиенты плотности в верхних слоях и может вызвать эвтрофикацию литорали. Как следствие, наблюдаемый в последние годы резкий всплеск роста водорослей *Spirogyra* в заливе Лиственничный (Кравцова и др., 2012; Тимошкин и др., 2014; Timoshkin et al., 2018) может быть связан с комплексным влиянием возрастающей антропогенной нагрузки (и богатого поступления биогенов со сточными водами) и климатических изменений (Шимараев и Троицкая, 2018). Последние, в свою очередь, оказывают двойное влияние на повышение температуры литорали: как за счет большего потепления из-за более высоких температур воздуха, так и за счет менее частого водообмена (и, как следствие, меньшего охлаждения) с глубинными водами оз. Байкал. Таким образом, могут сформироваться более благоприятные физические и трофические условия для развития водорослей, не характерных для литорали Байкала.

5. Выводы

В итоге представленной работы были проанализированы данные о температуре прибрежной воды и ветрах в заливе Лиственничный. Выявлены летние прибрежные апвеллинги, ранжированы по продолжительности, понижению температуры воды, направлению и силе сопутствующих ветров. Полученные данные были разделены на два

периода, соответствующие наблюдаемым климатическим тенденциям.

Установлено, что основные ветры, вызывающие апвеллинг, имеют N и SW направления, что подтверждается морфометрией залива. Анализ распределения апвеллингов по годам показал, что до 1960 г. наблюдалось постепенное уменьшение числа апвеллингов в год. С 1960 по 2016 год среднее количество событий было примерно постоянным и составляло около 2,5 апвеллингов в год и в последние 8 лет наблюдается их небольшое увеличение. Максимальное количество апвеллингов (13) отмечено в 1943 г. Продолжительность апвеллингов в среднем составляет 7 сут, максимальная – 21 сут (в 1979 г.). Температура воды обычно падает примерно на 5°C, максимальный перепад составил 13,5°C в 2016 г.

Обнаружено увеличение доли апвеллингов в августе по сравнению с другими месяцами в период 1970-2023 гг. Выявлено также перераспределение апвеллингов в сторону их большей продолжительности и больших перепадов температуры после 1970 г. по сравнению с предыдущим периодом. Причиной этих изменений стал глобальный ход снижения ветровой активности, связанный с наблюдаемыми климатическими изменениями, а также особое перераспределение доли N и SW ветров в заливе в период исследований.

Число полных апвеллингов уменьшалось с каждым десятилетием: с 12 в 1940-х гг. до всего одного в 2010-х. После 2020 года полные апвеллинги пока не наблюдались. Описаны и сопоставлены два случая полного и перемежающегося апвеллингов. Высказано предположение о возможном экологическом воздействии на залив Лиственничный из-за комбинированного воздействия увеличения антропогенной нагрузки и уменьшения частоты апвеллингов.

Благодарности

Авторы благодарят всех сотрудников Лаборатории гидрологии и гидрофизики ЛИИ СО РАН за участие в экспедиционных работах и сборе данных, а также за продуктивное обсуждение результатов исследований. Особая благодарность Руслану Гнатовскому за подготовку данных ERA5-Land для анализа.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ЛИИ СО РАН (0279-2021-0004).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Aslamov I., Troitskaya E., Gnatovsky R. et al. 2024. Study of Interannual Variability of the Winter Mesothermal Temperature Maximum Layer in Southern Baikal. *Water* 16(21):1-19. DOI: [10.3390/w16010021](https://doi.org/10.3390/w16010021)

- Bell G.L., Eadie B.J. 1983. Variations in the distribution of suspended particles during an upwelling event in Lake Michigan in 1980. *Journal of Great Lakes Research* 9(4):559-567.
- Bulygina O.N., Korshunova N.N., Razuvaev V.N. 2013. Changes in the wind regime over Russia in the last decades. In: *Proceedings of the Main Geophysical Observatory named after A. I. Voeikov*, pp. 156-172.
- Corman J.R., McIntyre P.B., Kuboja B. et al. 2010. Upwelling couples chemical and biological dynamics across the littoral and pelagic zones of Lake Tanganyika, East Africa. *Limnology and Oceanography* 55(1):214-224. DOI: [10.4319/lo.2010.55.1.0214](https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.1.0214)
- Coumou D., Lehmann J., Beckmann J. 2015. The weakening summer circulation in the Northern Hemisphere mid-latitudes. *Science* 348:324-327. DOI: [10.1126/science.1261768](https://doi.org/10.1126/science.1261768)
- Hampton S.E., Izmet'eva L.R., Moore M.V. et al. 2008. Sixty years of environmental change in the world's largest freshwater lake - Lake Baikal, Siberia. *Global Change Biology* 14:1-12. DOI: [10.1111/j.1365-2486.2008.01616.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01616.x)
- Heim B., Oberhaensli H., Fietz S. et al. 2005. Variation in Lake Baikal's phytoplankton distribution and fluvial input assessed by SeaWiFS satellite data. *Global and Planet Change* 46: 9-27. DOI: [10.1016/j.gloplacha.2004.11.011](https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2004.11.011)
- Katz S.L., Hampton S.E., Izmet'eva L.R. et al. 2011. Influence of long-distance climate teleconnection on seasonality of water temperature in the World's largest lake - Lake Baikal, Siberia. *PLoS ONE* 6(2):e14688. DOI: [10.1371/journal.pone.0014688](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014688)
- Kouraev A.V., Semovski S.V., Shimaraev M.N. et al. 2007. The ice regime of Lake Baikal from historical and satellite data: Relation to air temperature, dynamical, and other factors. *Limnology and Oceanography* 52(3):1268-1286. DOI: [10.4319/lo.2007.52.3.1268](https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.3.1268)
- Livingstone D.M. 1999. Ice break-up on southern Lake Baikal and its relationship to local and regional air temperatures in Siberia and to the North Atlantic Oscillation. *Limnology and Oceanography* 44(6):1486-1497. DOI: [10.4319/lo.1999.44.6.1486](https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.6.1486)
- Magnuson J.J., Robertson D.M., Benson B.J. et al. 2000. Historical Trends in Lake and River Ice Cover in the Northern Hemisphere. *Science* 289:1743-1746. DOI: [10.1126/science.289.5485.1743](https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1743)
- Muñoz-Sabater J., Dutra E., Agustí-Panareda A. et al. 2021. ERA5-Land: a state-of-the-art global reanalysis dataset for land applications. *Earth System Science Data* 13:4349-4383. DOI: [10.5194/essd-13-4349-2021](https://doi.org/10.5194/essd-13-4349-2021)
- Plattner S., Mason D.M., Leshkevich G.A. et al. 2006. Classifying and forecasting coastal upwellings in Lake Michigan using satellite derived temperature images and buoy data. *Journal of Great Lakes Research* 32:63-76. DOI: [10.3394/0380-1330\(2006\)32\[63:CAFCUI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3394/0380-1330(2006)32[63:CAFCUI]2.0.CO;2)
- Semovski S.V., Shimaraev M.N., Minko N.P. et al. 2001. Use of satellite observations to study thermal fronts of Lake Baikal. *Earth Observation and Remote Sensing* 16(5):773-787.
- Sharma S., Richardson D.C., Woolway R.I. et al. 2021. Loss of ice cover, shifting phenology, and more extreme events in northern hemisphere lakes. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 126(10):1-12. DOI: [10.1029/2021JG006348](https://doi.org/10.1029/2021JG006348)
- Timoshkin O.A., Moore M.V., Kulikova N.N. et al. 2018. Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia). *Journal of Great Lakes Research* 44(2):230-244. DOI: [10.1016/j.jglr.2018.01.008](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.01.008)
- Todd M.C., Mackay A.W. 2003. Large-scale climate controls on Lake Baikal ice cover. *Journal of Climate* 16:3186-3199. DOI: [10.1175/1520-0442\(2003\)016<3186:LCCOLB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(2003)016<3186:LCCOLB>2.0.CO;2)
- Troitskaya E., Budnev N., Shimaraev M. 2022. Changes in the heat content of water column in the slope area of the southern basin of Lake Baikal in the 21st Century. *Water* 14:348. DOI: [10.3390/w14030348](https://doi.org/10.3390/w14030348)
- Атлас волнения и ветра озера Байкал: Справочное и навигационное пособие. 1977. Ленинград: Гидрометеоздат.
- Афанасьева Э.Л. 1977. Биология байкальской эпифиты. Новосибирск: Наука.
- Бояринов П.М., Петров М.П. 1991. Процессы формирования термического режима глубоких пресноводных водоемов. Л.: Наука.
- Верболов В.И., Гранин Н.Г., Жданов А.А. и др. 1992. Оценка гидрофизического состояния деятельного слоя по материалам полигонных наблюдений на Байкале. *Водные ресурсы* (5):74-86.
- Верещагин Г.Ю. 1927. Некоторые данные о режиме глубинных вод Байкала в районе Маритуты. *Труды Комиссии по изучению оз. Байкал* 2:77-138.
- Кожов М.М. 1962. Биология озера Байкал. М: Изд-во АН СССР.
- Кожов М.М., Помазкова Г.И., Устюжин Ю.А. 1970. Распределение зоопланктона в Южном Байкале. *Известия Биолого-географического института при Иркутском университете*. 23(1):87-94.
- Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В. и др. 2012. Нарушение вертикальной зональности зеленых водорослей в открытом Лиственничном заливе озера Байкал, как следствие локального антропогенного воздействия. *Доклады Академии наук (Общая биология)* 447(2):227-229.
- Шимараев М.Н., Троицкая Е.С., Блинов В.В. и др. 2012. Об апвеллингах в озере Байкал. *Доклады Академии наук (Науки о земле)* 442(5):696-700.
- Шимараев М.Н., Троицкая Е.С. 2018. Тенденции изменения температуры верхнего слоя воды на прибрежных участках Байкала в современный период. *География и природные ресурсы* (4):95-104. DOI: [10.21782/GIPR0206-1619-2018-4\(95-104\)](https://doi.org/10.21782/GIPR0206-1619-2018-4(95-104))
- Тимошкин О.А., Бондаренко Н.А., Волкова Е.А. и др. 2014. Массовое развитие зелёных нитчатых водорослей родов *Spirogyra* Link и *Stigeoclonium* Kutz. (CHLOROPHYTA) в прибрежной зоне Южного Байкала. *Гидробиологический журнал* (5):15-26.