

ОБНАРУЖЕНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ В ИСТОЧНИКАХ ВОДОСНАБЖЕНИЯ И ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЕ НЕКОТОРЫХ ГОРОДОВ РОССИИ: ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ И АПРОБАЦИЯ МЕТОДОВ УДАЛЕНИЯ¹

© 2020 г. С. И. Сиделев^а *, О. В. Бабаназарова^а

^аРегиональный Центр экологической безопасности водных ресурсов
Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова,
Ярославль, 150057 Россия

*e-mail: Sidelev@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2018 г.

После доработки 04.12.2018 г.

Принята к публикации 11.04.2019 г.

Впервые получены данные о попадании токсинов цианобактерий в водопроводную воду, подаваемую населению некоторых городов Ярославской области. Детекция микроцистинов и значительное превышение безопасного уровня их содержания в водопроводной воде разных районов г. Ярославля в 2013 г. сопряжены с сезонной динамикой развития токсигенных цианобактерий в источнике водоснабжения – Горьковском водохранилище. Молекулярно-генетический анализ выявил виды *Microcystis* как основных продуцентов микроцистинов. Проведена оценка эффективности некоторых методов удаления разных типов цианотоксинов из воды.

Ключевые слова: цианотоксины, микроцистины, водопроводная вода, токсигенные цианобактерии, *Microcystis*, ПЦР.

DOI: 10.31857/S0321059620020182

Цианобактерии – одни из основных компонентов фитопланктона пресных вод, в том числе используемых для питьевых и рекреационных целей. Антропогенное эвтрофирование водоемов и потепление климата – ключевые причины широкого распространения цианобактериальных цветений воды. Известно, что это приводит к ухудшению качества воды, а также к появлению в ней вторичных метаболитов цианобактерий (цианотоксинов), способных вызывать отравления человека [13]. Несмотря на то, что у цианобактерий обнаружено огромное количество метаболитов с еще неизвестными токсическими свойствами, в современной литературе принято относить к цианотоксинам четыре группы веществ: гепатотоксины микроцистины (известно более ста изоформ), гепато- и цитотоксин цилиндроспермопсин (с двумя другими структурными вариантами), а также нейротоксины: анатоксин-а и сакситоксины или паралитические яды моллюсков (более

30 изоформ). Их химические структурные особенности, токсические свойства, механизмы биологической активности, способность вызывать оксидативный стресс, канцерогенный и мутагенный эффекты, а также многочисленные случаи массового отравления ими животных и людей подробно описаны в литературе [13]. С использованием результатов этих исследований в законодательстве многих стран мира установлены безопасные уровни содержания цианотоксинов в питьевой воде и рекреационных зонах водоемов [12]. Нормативы допустимого уровня содержания цианотоксинов в питьевой и природной воде в Российской Федерации отсутствуют и до настоящего времени исследования ограничивались поиском цианотоксинов и их продуцентов только в водоемах [1, 2, 4, 8, 10, 21, 22]. Основной известный путь попадания токсинов цианобактерий в организм человека – потребление воды. Однако большинство традиционных методов подготовки питьевой воды, используемых на водопроводных станциях (коагуляция/флокуляция, песчано-гравийный фильтр), не способны задерживать цианотоксины [15, 17].

Для оценки негативных последствий массового развития цианобактерий для здоровья населе-

¹ Исследование выполнено при финансировании в рамках гранта Президента РФ № МК-1284.2013.5. Статья написана при поддержке РФФИ (проект № 18-04-01069-а). Молекулярно-генетическая часть работы проведена в лаборатории эколобиомониторинга ЯрГУ.

Таблица 1. Характеристика исследованных водных объектов – источников хозяйственно-питьевого водоснабжения городов Ярославской области ($P_{\text{общ}}$ – общий фосфор, М – минерализация, O_2 – концентрация кислорода, Хл – хлорофилл “а”, В – биомасса фитопланктона, прочерк – отсутствие данных)

Водный объект	Станция отбора проб	Период	Координаты	$P_{\text{общ}}$, мг/л	pH	М, мг/л	Хл, мкг/л	В, мг/л	Фитопланктон
Горьковское водохранилище	ЦВС	Июль–сентябрь	57.64° с.ш. 39.88° в.д.	0.09	7.2	102	34.3	1.7	Aphanizomenon flos-aquae, Microcystis spp., Gloeotrichia echinulata, Dolichospermum spp., Stephanodiscus sp., Aulacoseira sp., Melosira varians, Chroomonas sp.
	СВС	Июль–сентябрь	57.69° с.ш. 39.81° в.д.	0.07	7.3	100	32.5	4.5	
р. Которосль	Пляж г. Ярославля	Июль–сентябрь	57.61° с.ш. 39.89° в.д.	0.11	7.6	206	23.8	5.6	Microcystis spp., Aphanizomenon flos-aquae, Planktothrix agardhii, Dolichospermum spp., Stephanodiscus spp., Aulacoseira sp., Scenedesmus opoliensis, Chlamydomonas spp., Pediastrum boryanum
оз. Плещеево	Водозабор г. Переславль-Залесский	Июнь	56.45° с.ш. 38.49° в.д.	0.04	–	73	1.8	0.1	Asterionella formosa, Fragilaria crotonensis, Stephanodiscus sp., Ceratium hirundinella, Dynobryon sp., Cryptomonas sp., Gloeotrichia sp., Dolichospermum spp.
р. Устье	п. Семибратово	Август	57.29° с.ш. 39.53° в.д.	0.06	7.4	264	–	0.3	Navicula sp., Gomphonopsis olivaceum, Epithemia sp., Monoraphidium arcuatum, Cryptomonas spp.

ния России актуально изучение возможности попадания цианотоксинов в водопроводную воду, которая проходит все стандартные стадии очистки на городских водопроводных станциях. Авторы статьи предположили, что возможное появление цианотоксинов в водопроводной воде должно быть сопряжено с сезонной динамикой развития токсигенных цианобактерий в фитопланктоне в источниках питьевого водоснабжения. Для проверки этой гипотезы исследование заключалось в сопряженном отборе образцов водопроводной воды и проб из источников водоснабжения ряда городов Ярославской области для анализа присутствия в ней цианотоксинов.

Цель работы – изучение возможности попадания цианотоксинов в водопроводную воду из водоемов – источников водоснабжения в некоторых городах Ярославской области, поиск их продуцентов и эффективных методов удаления из воды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 2013 г. был проведен отбор проб воды из источников водоснабжения ряда городов Ярославской области (табл. 1). Детальные ежемесячные

наблюдения с апреля по ноябрь 2013 г. были проведены на Горьковском водохранилище и р. Которосли. Пробы из оз. Плещеево отбирались трижды – в мае, июне и августе, одна проба воды была взята в середине лета (18.08.2013) из р. Устье – источника питьевого водоснабжения г. Ростов Великий. Все пробы собраны из верхнего полуметрового слоя воды батометром Руттнера или ведром. Станции отбора проб располагались либо на участках водозаборов водопроводных станций, либо в рекреационных районах у водоемов напротив городских пляжей (табл. 1). В Горьковском водохранилище пробы воды отбирались на двух станциях: в районе водозаборов Центральной (ЦВС) и Северной (СВС) водопроводных станций г. Ярославля. С января по ноябрь в Дзержинском и Заволжском районах г. Ярославля параллельно брались пробы водопроводной воды, подготовленной для хозяйственно-питьевых целей на ЦВС и СВС. Вода анализировалась на присутствие цианобактериальных токсинов.

В источниках водоснабжения измерялись pH, минерализация воды и содержание кислорода с помощью портативных приборов HI 9142 и HI 991300 (“Hanna Instruments”, США). Концентрацию общего фосфора определяли путем мокрого

сжигания органических веществ серной кислотой с последующим применением метода Дениже–Аткинса [9], содержание хлорофилла “а” – стандартным спектрофотометрическим методом [6]. Фитопланктон из собранных проб концентрировали осадочным способом из объема 0.5 л, фиксировали раствором Люголя с добавлением 40% формалина для количественной обработки стандартным счетно-объемным методом [5]. Концентрацию цианотоксинов микроцистинов (MC), цилиндропермопсина (CYN), сакситоксинов (SXT) и анатоксина-а (ANA) определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA), используя соответствующие наборы реагентов согласно инструкциям фирмы-производителя (“Abraxis LLS”, США). Для определения растворенных форм цианотоксинов в источниках водоснабжения использовали фильтрованную природную воду. Водопроводную воду анализировали напрямую без предварительной подготовки. Кроме того, измерялось внутриклеточное содержание MC в собранной на фильтрах биомассе фитопланктона. Процедура экстрагирования включала в себя добавление к фильтру дистиллированной воды, цикл его замораживания и размораживания с последующей ультразвуковой обработкой.

Поиск цианобактерий-продуцентов токсинов в водоемах и водотоках проводили молекулярно-генетическими методами. Выделение ДНК из сконцентрированного на фильтрах фитопланктона осуществляли набором реагентов Diatom DNA Prep 200 (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. ДНК из отдельных колоний разных видов цианобактерий, собранных в Горьковском водохранилище, выделяли с помощью набора InstaGene Matrix (“BioRad”, США). Для обнаружения токсигенных цианобактерий в полученных образцах ДНК был проведен поиск генов *mcuE* (дополнительно *mcuD*), *aoaA*, *anaC*, *stxA*, отвечающих за синтез MC, CYN, ANA и SXT соответственно. Подробное описание применяемых праймеров, условий амплификации, техники постановки “одноколониальной” ПЦР (амплификация ДНК, выделенной из отдельных цианобактериальных колоний), а также информация об используемых в качестве положительных и отрицательных контролей штаммах цианобактерий приведены в [10, 21, 22].

Для поиска эффективных методов удаления цианотоксинов из воды была поставлена серия лабораторных экспериментов по оценке влияния высокой температуры (100°C), ультрафиолетового облучения (У/Ф) и фильтрации воды через гранулированный активированный уголь (ГАУ) на содержание очищенных форм цианотоксинов по схеме до (контроль) и после (опыт) воздействия данных факторов. В экспериментах использовали

коммерчески очищенные стандартные образцы микроцистина-LR (MC-LR) и CYN (производитель “Abraxis LLS”, США). В случае с SXT в качестве стандарта использовали профильтрованную природную воду из Рыбинского водохранилища, в которой ранее были идентифицированы как сами SXT, так и SXT-продуцирующие цианобактерии [22]. Кипячение водных растворов цианотоксинов длилось 20 с, затем данные по изменению их концентраций сравнивались с контрольными образцами, находившимися при комнатной температуре. Обработка опытных образцов цианотоксинов У/Ф-излучением (длина волны 254 нм) проводилась с помощью бактерицидной лампы мощностью 15 Вт в течение 10 мин на расстоянии 10 см от лампы. Для тестирования способности ГАУ адсорбировать цианотоксины их водные растворы пропускали через колонки, заполненные ГАУ из бытового фильтра очистки воды. После этого измеряли концентрации цианотоксинов методом ELISA и сравнивали их с концентрациями в исходных растворах. Все эксперименты проведены в четырех повторностях.

Полученные в экспериментах зависимые выборки обрабатывались статистически с использованием непараметрического дисперсионного анализа Фридмана. Множественное попарное сравнение средних концентраций цианотоксинов в опытных образцах с таковыми в контроле проводилось с помощью непараметрического аналога критерия Даннета [3]. При корреляционном анализе полевых данных рассчитывался коэффициент корреляции рангов Спирмена (r_s). В качестве критического уровня значимости в работе принято значение $p = 0.05$. Статистический анализ данных проводился в электронных таблицах MS Excel, программах Statistica 6.1 и Primer of Biostatistics V. 4.03.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура и сезонная динамика фитопланктона в источниках питьевого водоснабжения

Фитопланктон исследованных водоемов и водотоков состоял из цианобактерий, диатомей, зеленых и золотистых водорослей, а также фитоплагеллят из отделов Cryptophyta, Euglenophyta и Dinophyta (рис. 1). Количественный вклад каждой группы микроводорослей в фитопланктон значительно различался между водоемами. В водохранилище и р. Устье по биомассе доминировали диатомовые водоросли, в р. Которосли наряду с диатомеями значительную долю в биомассе составляли зеленые водоросли, в оз. Плещеево преобладали фитоплагелляты и золотистые водоросли (рис. 1). В фитопланктоне р. Устье цианобактерии не были обнаружены, в оз. Плещеево они были минорной группой, наибольший их

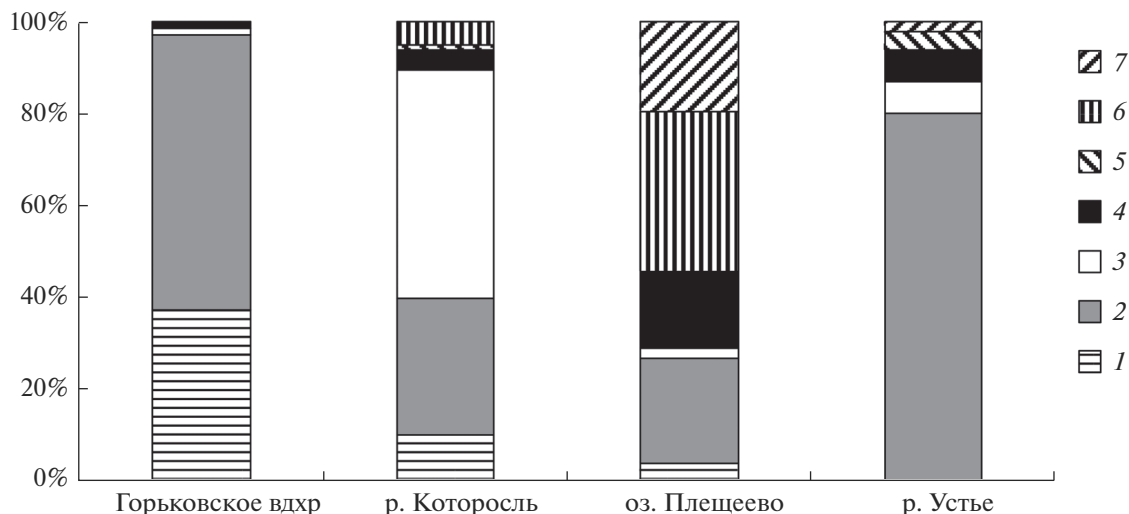


Рис. 1. Сравнение состава фитопланктона в исследованных источниках водоснабжения в 2013 г. по средней доле в общей биомассе цианобактерий (1), диатомовых (2), зеленых (3), криптофитовых (4), эвгленовых (5), динофитовых (6) и золотистых (7) водорослей.

вклад в общую биомассу фитопланктона отмечался в Горьковском водохранилище и Которосли (рис. 1). Среди цианобактерий присутствовали потенциально токсигенные виды: *Microcystis* spp., *Dolichospermum* spp., *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs ex Born. et Flah., *Gloeotrichia echinulata* (J. E. Smith et Sowerby) P. Richt и *Planktothrix agardhii* Gom. (табл. 1).

Сезонная динамика обилия фитопланктона подробно изучена на станциях Горьковского водохранилища и Которосли. Она характеризовалась одним летним пиком обилия фитопланктона, более пролонгированным к осеннему периоду в Которосли (рис. 2). Доминирование весной диатомей и криптононад, резкий рост биомассы цианобактерий с июля, поддержание их высокой биомассы вплоть до сентября с последующим спадом обилия фитопланктона в октябре–ноябре – характерные черты сезонной сукцессии планктонного альгоценоза в 2013 г. в районах водозаборов в Горьковском водохранилище (рис. 2а, 2б). В Которосли большой вклад в ход сезонной сукцессии фитопланктона вносили зеленые водоросли и фитофлагелляты (рис. 2в). В обоих водоемах потенциально токсигенные цианобактерии присутствовали в следовых количествах уже в апрельских пробах. В летний период среди цианобактерий наибольшей биомассы (до 3.2 и 2.6 мг/л) достигали *Microcystis* и *Aphanizomenon flos-aquae* соответственно. Остальные виды цианобактерий либо постоянно присутствовали в фитопланктоне в небольшом количестве (*Dolichospermum flos-aquae*, *Pseudanabaena limnetica*, мелкоклеточные *Chroococcales*), либо отмечались

только в некоторые летние месяцы, как в случае с *Gloeotrichia echinulata* и *Planktothrix agardhii*, затем полностью выпадая из состава фитопланктона.

ПЦР-идентификация токсигенных цианобактерий

ПЦР-анализ суммарной ДНК планктона исследованных водоемов с помощью НЕР-праймеров, позволяющих определять наличие в пробах МС-продуцирующих цианобактерий, показал положительный результат для Горьковского водохранилища и р. Которосли и отрицательный – для оз. Плещеево и р. Устье (рис. 3а). Это подтверждало присутствие в Горьковском водохранилище и Которосли цианобактерий, потенциально способных продуцировать МС. Более детальный анализ с применением родоспецифичных праймеров к гену микроцистинсинтетаз *mscE* обнаружил в обоих водоемах присутствие МС-продуцирующих видов *Microcystis* с ранней весны до поздней осени (рис. 3б). Кроме того, в июне в фитопланктоне обоих водоемов появились *mscE* генсодержащие популяции *Dolichospermum*, а в Которосли – *mscE* генсодержащие популяции цианобактерии *Planktothrix agardhii*. Микроскопирование проб подтвердило присутствие этих видов в фитопланктоне в июне. В ДНК, выделенной из планктонных проб исследованных водоемов и водотоков, не обнаружены гены, ответственные за синтез других цианотоксинов, – ANA, CYN и SXT.

ПЦР-анализ ДНК, полученной из отдельных колоний *Microcystis*, показал в Горьковском водохранилище высокую долю колоний *M. aeruginosa*.

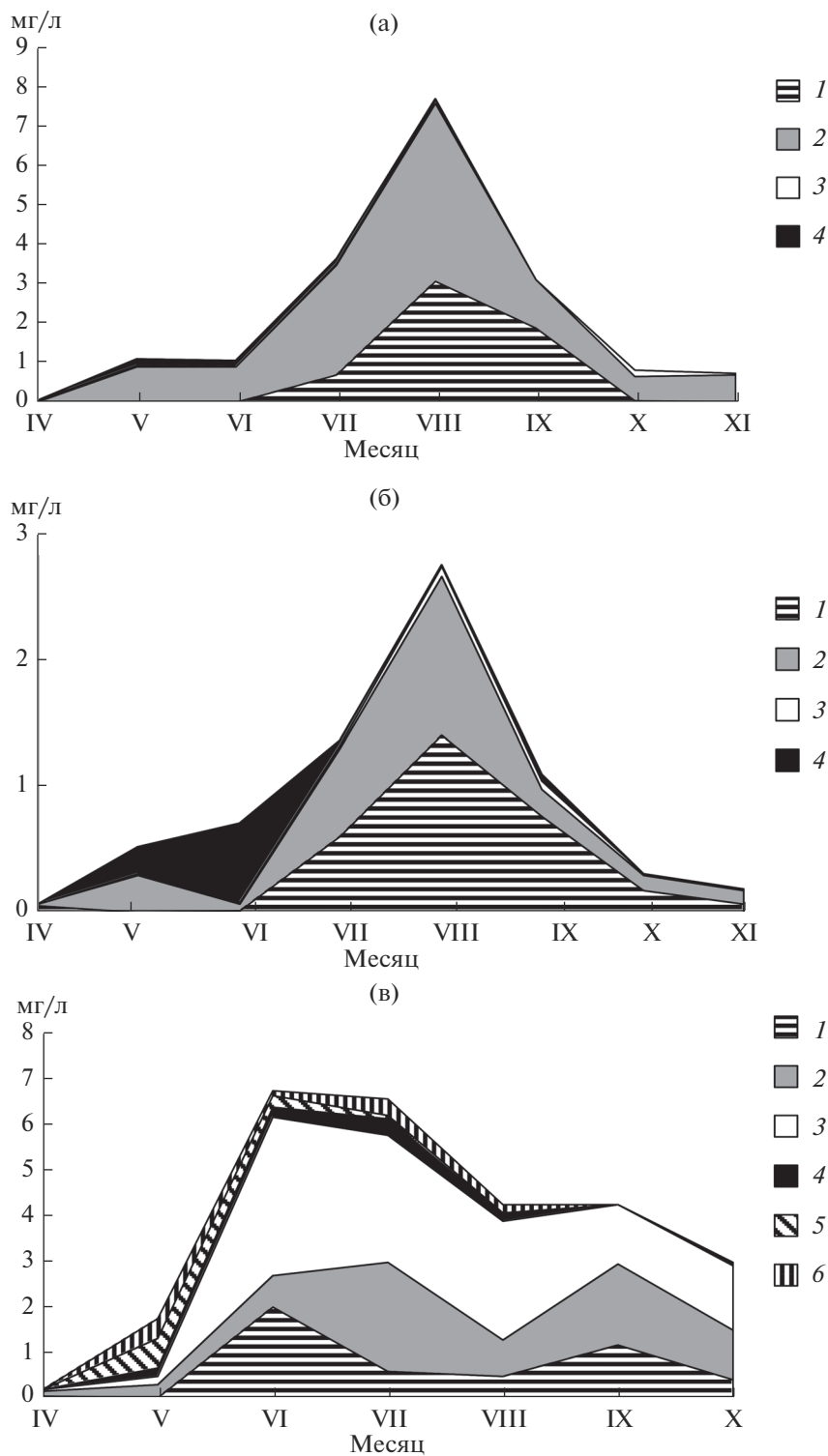


Рис. 2. Сезонная динамика биомассы фитопланктона в Горьковском водохранилище на станциях СВС (а) и ЦВС (б) и р. Которосли (в) в 2013 г. (1 – цианобактерии, 2 – диатомовые, 3 – зеленые, 4 – криптофитовые, 5 – эвгленовые, 6 – динофитовые водоросли).

posa, *M. viridis* и *M. novasekii*, содержащих гены микроцистинсинтеза *mscE* и *mscD* (табл. 2). Среди популяции *M. flos-aquae* в водохранилище

только 65% проанализированных колоний потенциально были способны продуцировать МС, остальные генотипы *M. flos-aquae* не содержали

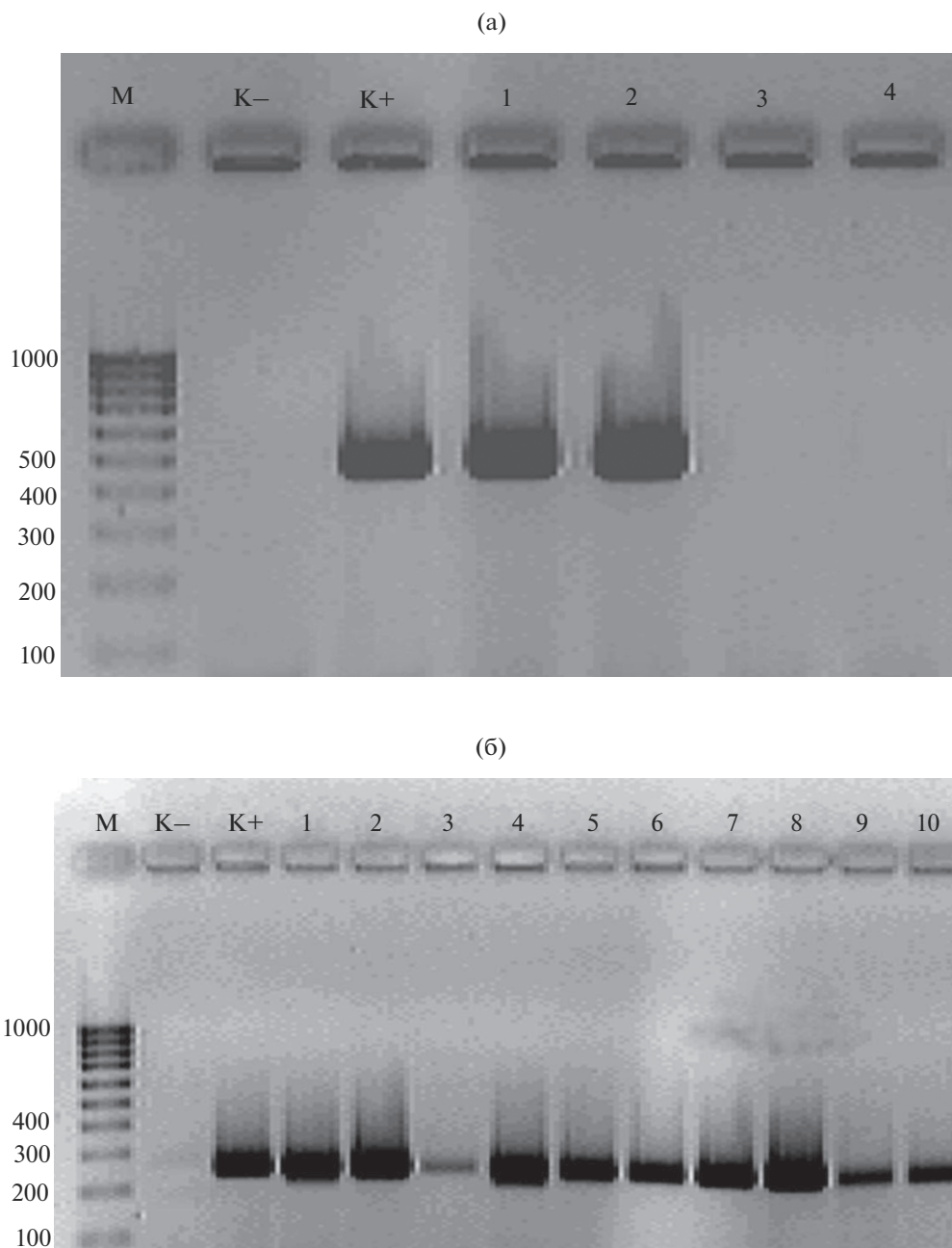


Рис. 3. ПЦР-анализ суммарной ДНК фитопланктона исследованных источников питьевого водоснабжения: а – электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК фитопланктона (размер ампликона 472 п.н.) с универсальными НЕР-праймерами на наличие гена синтеза микроцистинов *mcyE* у цианобактерий из Горьковского водохранилища (1), р. Которосли (2), оз. Плещеево (3) и р. Устье (4); б – электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК фитопланктона Горьковского водохранилища, собранного на станции СВС в 2013 г., с родоспецифическими праймерами *mcyE*-F2/*Microcystis*-R8 на присутствие гена *mcyE* у *Microcystis* (размер ампликона 250 п.н.): 1–23 апреля, 2–24 мая, 3–20 июня, 4–15 июля, 5–31 июля, 6–14 августа, 7–29 августа, 8–18 сентября, 9–9 октября, 10–13 ноября 2013 г. М – маркер молекулярного веса (п.н.), (K-) – отрицательный контроль (ДНК штамма *Gloeocapsa decorticans*, не содержащего штамма ген *mcyE*), (K+) – положительный контроль (ДНК штамма *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, содержащего ген *mcyE*).

анализируемых генов синтеза МС (табл. 2). Ни одной колонии *M. wesenbergii*, содержащей гены микроцистинсинтез, не обнаружено (табл. 2). Молекулярный анализ отдельных колоний

Gloeotrichia echinulata (13 экз.) и *Aphanizomenon flos-aquae* (11 экз.), выделенных из водохранилища, не выявил присутствия в клетках этих видов генов биосинтеза цианотоксинов.

Таблица 2. ПЦР-анализ ДНК отдельных колоний разных видов *Microcystis*, отобранных в Горьковском водохранилище, на наличие генов синтеза МС (“+” – ген детектирован, “–” – ген отсутствовал)

Вид	Число проанализированных колоний	Наличие гена <i>mcuE</i>	Наличие гена <i>mcuD</i>	Колонии, содержащие гены <i>mcuE</i> и <i>mcuD</i> , %
<i>Microcystis aeruginosa</i>	8	+	+	100
<i>Microcystis viridis</i>	7	+	+	86
<i>Microcystis flos-aquae</i>	37	+	+	65
<i>Microcystis wesenbergii</i>	17	–	–	0
<i>Microcystis novacekii</i>	10	+	+	80

Сезонная динамика концентраций микроцистинов в водоемах и водопроводной воде

В Горьковском водохранилище и р. Которосли обнаружены МС как в растворенном виде, так и во внутриклеточной фракции. В отобранных пробах из оз. Плещеево и р. Устье цианотоксины отсутствовали, это хорошо согласовалось с данными микроскопии и ПЦР-анализа (рис. 3а). МС в водоемах фиксировались в течение всего периода наблюдений, их суммарная концентрация на станциях отбора проб изменялась от следовых значений до 12.5 мкг/л. В Горьковском водохранилище отмечались сгонно-нагонные явления, которые приводили к формированию массивных пятен цветения вдоль прибрежной зоны. В пробе, отобранной из подобного пятна цветения в августе 2013 г., концентрация растворенных в воде МС достигала 1670 мкг/л при огромных биомассах цианобактерий и видов *Microcystis* – 35.6 и 2.8 г/л соответственно. В водохранилище на обеих станциях сезонные изменения концентраций МС имели сходную динамику. Вплоть до июня МС присутствовали лишь в следовых количествах, начиная с июля и до сентября их концентрации резко возросли. В октябре и ноябре содержание МС в водохранилище снизилось (рис. 4а). Сезонная динамика МС в Которосли отличалась от таковой в водохранилище более поздним (лишь в сентябре–октябре) увеличением их концентраций (рис. 4а). Отмеченные особенности сезонных изменений содержания МС в водоемах определялись динамикой развития их основных продуцентов – видов *Microcystis* (рис. 4а). Основной вклад в биомассу *Microcystis* в обоих водоемах вносили два вида – *M. aeruginosa* и *M. wesenbergii*. Остальные представители рода *Microcystis* присутствовали в фитопланктоне лишь спорадически. Между численностью *M. aeruginosa* и суммарными концентрациями МС установлена сильная статистически значимая связь ($r_s = 0.71$, $p < 0.05$, $n = 21$). Для *M. wesenbergii* такой корреляции не обнаружено ($r_s = 0.39$, $p > 0.05$, $n = 17$).

Анализ методом ELISA водопроводной воды, отобранной в городах Ярославле и Рыбинске,

впервые подтвердил присутствие в ней МС (табл. 3). В пробе водопроводной воды, отобранной в г. Переславль-Залесский, источник водоснабжения которого – оз. Плещеево, МС иммуноферментным анализом не зафиксированы (табл. 3). Это объясняется отсутствием токсигенных цианобактерий в оз. Плещеево в период исследования (рис. 3а).

Наиболее детально сезонная динамика концентраций МС в водопроводной воде изучена для двух районов г. Ярославля. Как видно из рис. 4б, с января по июнь МС либо не обнаруживались в водопроводной воде обоих районов, либо присутствовали в количествах, едва превышающих предел чувствительности метода ELISA (0.04 мкг/л). Однако начиная с июля МС стали фиксироваться в водопроводной воде в опасных для здоровья людей количествах (рис. 4б). Это совпало с началом развития их продуцентов в Горьковском водохранилище (рис. 4а). Вплоть до сентября концентрации МС в водопроводной воде Дзержинского района г. Ярославля изменялись от 0.8 до 7.0 мкг/л, в Заволжском районе – от 1.5 до 9.4 мкг/л. В октябре и ноябре со спадом развития продуцентов МС в водохранилище (рис. 4а) резко снизились и концентрации самих цианотоксинов в водопроводной воде (рис. 4б).

Таблица 3. Концентрации МС, измеренные в водопроводной воде некоторых городов (п.д. – предел детекции МС методом ELISA, 0.04 мкг/л)

Место отбора проб	Дата отбора проб	МС, мкг/л
г. Ярославль,	18.08.2013	0.2
Фрунзенский район	21.09.2013	1.5
г. Ярославль,	20.09.2013	3.9
Ленинский район		
г. Рыбинск	08.09.2013	9.5
г. Переславль-Залесский	15.08.2013	<п.д.

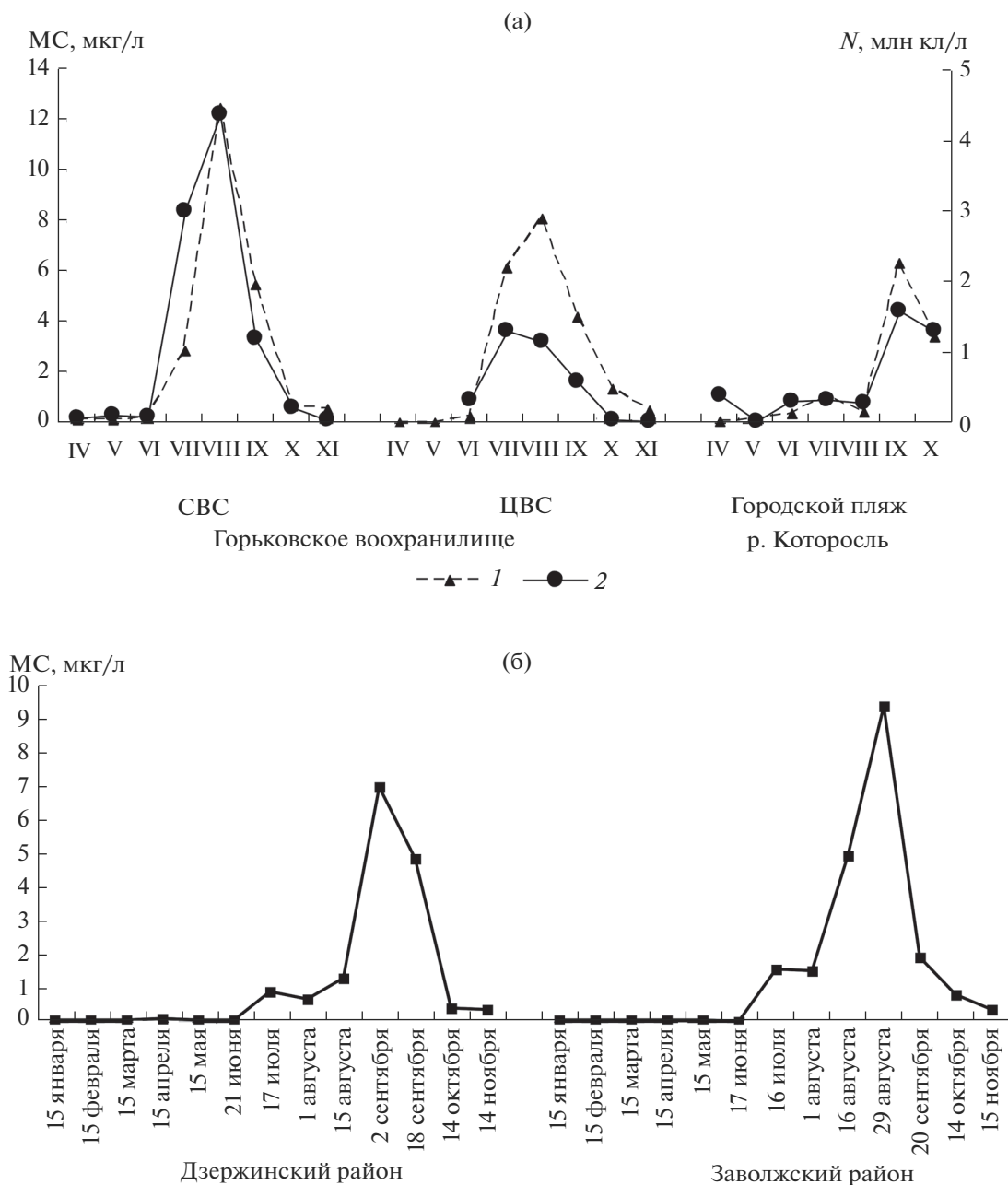


Рис. 4. Сезонная динамика суммарных концентраций МС (1), численности *Microcystis aeruginosa* (2) на станциях отбора проб в Горьковском водохранилище и р. Которосли (а) и изменение содержания МС в водопроводной воде двух районов г. Ярославля (б) в 2013 г.

Экспериментальная апробация методов удаления цианотоксинов из воды

Для поиска методов удаления цианотоксинов из воды проведено несколько серий лабораторных экспериментов по воздействию на них высокой температуры и У/Ф, а также проверена эффективность адсорбции цианотоксинов с помощью ГАУ. Оказалось, что кратковременное кипячение воды не приводило к статистически значимому снижению концентраций МС-LR,

СУН и SXT относительно контроля (критерий Даннета, $p > 0.05$, $n = 4$) (рис. 5). У/Ф в течение 10 мин эффективно разрушало молекулы МС-LR (критерий Даннета, $p < 0.05$, $n = 4$), однако устойчивость СУН и SXT к У/Ф была высокой. Концентрация этих цианотоксинов при 10-минутном облучении У/Ф статистически незначимо снизилась в сравнении с концентрацией в контрольном варианте без воздействия У/Ф (критерий Даннета, $p > 0.05$, $n = 4$) (рис. 5б, 5в). Только лишь про-

пускание воды через ГАУ приводило к удалению всех тестируемых цианотоксинов, токсичные молекулы в воде после воздействия ГАУ методом ELISA не детектировались (рис. 5а, 5б, 5в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В России до настоящей работы исследования токсинов цианобактерий ограничивались их поиском лишь в природных водоемах [1, 2, 4, 8, 10, 21, 22]. Впервые в водопроводной воде городов Ярославля и Рыбинска было детектировано присутствие одной из самых опасных групп цианотоксинов – МС, обладающих гепатотоксичностью, канцерогенным и мутагенным эффектами [13]. Результаты настоящего исследования показали, что период с июля по сентябрь 2013 г. в Горьковском водохранилище характеризовался пиком развития продуцентов МС и наибольшими концентрациями в воде этих цианотоксинов (рис. 4а). В этот же период фиксировались наибольшие концентрации МС в водопроводной воде, отобранной в разных районах г. Ярославля (рис. 4б). Таким образом, полученные данные подтвердили проверяемую гипотезу – появление МС в водопроводной воде в г. Ярославле определялось сезонной динамикой развития токсигенных цианобактерий в фитопланктоне Горьковского водохранилища – источнике хозяйственно-питьевого водоснабжения.

Также с использованием молекулярно-генетического и статистического анализа впервые удалось достоверно установить основных продуцентов МС в обследованных источниках водоснабжения городов Ярославской области. Среди цианобактерий основными продуцентами МС в водохранилище и Которосли в период исследований оказались представители рода *Microcystis*. Это продемонстрировано с использованием двух модификаций метода ПЦР, в частности амплификацией из природных проб (метагеномной ДНК) участка гена *mscE*, специфичного только для видов *Microcystis*, и методом “одноколониной” ПЦР. Оба метода показали идентичные результаты, а применение последней методики позволило впервые детально изучить состав продуцентов МС в Горьковском водохранилище на видовом уровне. Стопроцентная встречаемость среди *M. aeruginosa* *mscE* генсодержащих колоний указывала на этот вид как на основного продуцента МС в Горьковском водохранилище. Это положение подтвердилось и результатами корреляционного анализа: сильная статистически значимая связь получена между численностью *M. aeruginosa* и суммарными концентрациями МС в источниках водоснабжения. В пресных водах России МС-продуцирующие популяции этого вида были ранее идентифицированы молекулярными методами в Рыбинском водохранилище

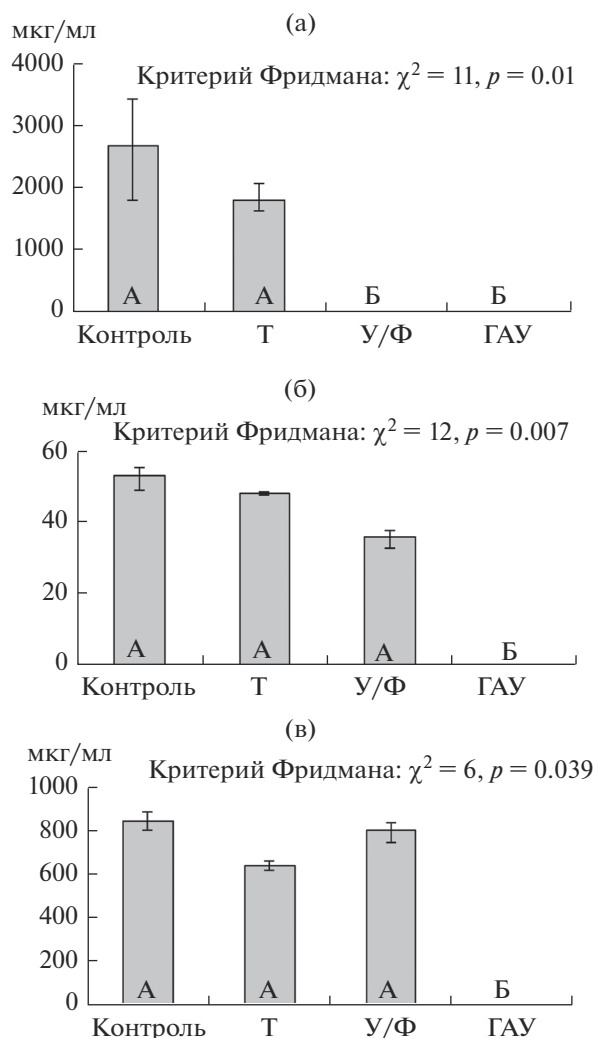


Рис. 5. Изменение концентраций МС (а), SXT (б), CYN (в) при кипячении (Т), ультрафиолетовом облучении (У/Φ) и пропускании их водных растворов через гранулированный активированный уголь (ГАУ) относительно контрольных образцов. Буквы на столбцах – статистическая значимость различий концентраций цианотоксинов в опытных образцах относительно контроля по критерию Даннета: одинаковые буквы (АА) – различия статистически незначимые, разные буквы (АБ) – различия статистически значимые. Планки погрешностей – минимальное и максимальное значения из четырех повторностей.

[22] и в оз. Неро [8]. Высокая встречаемость *mscE* генсодержащих генотипов отмечалась в фитопланктоне Горьковского водохранилища и для видов *M. viridis*, *M. novacekii* и *M. flos-aquae*. Однако показано, что некоторая доля популяции этих видов в водохранилище (от 14 до 35% проанализированных колоний) не способна продуцировать МС, гены синтеза микроцистинов *mscE* и *mscD* у клеток этих колоний отсутствовали. О высокой встречаемости МС-продуцирующих колоний этих трех видов из рода *Microcystis* было

известно и ранее из исследований европейских водоемов [24]. Одновременное сосуществование в водоеме токсигенных и нетоксигенных популяций одного вида среди цианобактерий – известное явление [16]. Данные настоящего исследования подтверждают данный факт, однако экологические причины подобного внутривидового полиморфизма у цианобактерий неизвестны. По-видимому, *M. wesenbergii* можно отнести к виду, не способному синтезировать МС в Горьковском водохранилище. Это подтвердили как результаты ПЦР, так и отсутствие корреляции между сезонными изменениями численности *M. wesenbergii* и концентраций МС в водохранилище. Полученные данные о *M. wesenbergii* хорошо согласуются с результатами других работ и указывают на отсутствие МС-продуцирующих популяций этого вида в водоемах как Волжского бассейна, так и Европы. В исследованиях, проведенных ранее на Рыбинском водохранилище [22], на Горьковском водохранилище в 2009–2011 гг. [8], на оз. Неро [7, 8] и в разнообразных водоемах Европы [24], не было обнаружено МС-продуцирующих природных популяций *M. wesenbergii*. При доминировании этого вида среди цианобактерий в периоды цветения водоемов следует ожидать невысокие количества МС в воде.

Другие виды цианобактерий, относящиеся к потенциальным продуцентам МС, встречались в фитопланктоне Горьковского водохранилища в период исследований лишь sporadически. *Dolichospermum* spp. и *Planktothrix agardhii* идентифицированы в водохранилище и р. Которосли как потенциальные продуценты МС. По [2, 19, 21, 22], МС-продуцирующие популяции этих видов в меньшей степени, чем таковые *Microcystis*, распространены в водоемах России. Молекулярно-генетический анализ колоний одного из доминантов фитопланктона Горьковского водохранилища *Aphanizomenon flos-aquae* не подтвердил присутствие гепато- и нейротоксичных популяций этого вида. Пока и в других водоемах России получить достоверные данные о присутствии токсигенных популяций *Aphanizomenon flos-aquae*, как и *Gloeotrichia echinulata*, не удалось [10, 18, 22].

Выявленные в данном исследовании уровни концентраций МС (0.04–1670 мкг/л) в источниках питьевого водоснабжения сопоставимы с полученными ранее для Горьковского водохранилища разными методами, в том числе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (HPLC/MS-MS). Так, в рекогносцировочных исследованиях авторов в Горьковском водохранилище на тех же станциях отбора проб в 2009–2011 гг. обнаружено, что концентрации внутриклеточного МС изменялись от 0.2 до 5113 мкг/л в районах сгона водорослевых масс и в пятнах цветения [7, 8]. Используемый в данном исследовании иммунофер-

ментный метод не позволяет определить состав МС. Однако ранее в исследованиях авторов методом HPLC/MS-MS в Горьковском водохранилище были идентифицированы девять вариантов МС с преобладанием МС-RR, МС-LR и МС-YR [7], причем МС-LR – наиболее токсичен для млекопитающих [13]. Аналогичные данные по составу МС в Горьковском водохранилище получены и в исследовании [4].

В России отсутствуют ПДК для цианотоксинов. Однако во многих странах мира на основе токсикологических исследований законодательно приняты нормативы допустимого уровня их содержания в питьевой воде и в водах рекреационных зон [12]. В качестве безопасных для людей введены следующие уровни концентраций для МС: 1–1.5 и 4–25 мкг/л для питьевой воды и рекреационных зон водоемов соответственно [12]. Можно заключить, что в 2013 г. наиболее опасным по уровню содержания МС в источниках водоснабжения и водопроводной воде городов Ярославской области оказался период с июля по сентябрь (рис. 4; табл. 3). В это время концентрации МС в водопроводной воде почти на порядок превышали безопасный уровень, а в районах интенсивного цианобактериального цветения воды в Горьковском водохранилище был высокий риск прямого токсического влияния МС на людей при рекреационном использовании водоема.

Обнаружение высоких концентраций МС в водопроводной воде ряда городов России подтвердило низкую эффективность очистки воды от данных цианотоксинов традиционными методами на водопроводных станциях. Поскольку имеются достоверные данные о периодическом развитии в Горьковском водохранилище CYN- и SXT-продуцирующих цианобактерий [10, 20], был проведен поиск эффективных методов удаления разных типов цианотоксинов из воды. Лабораторные эксперименты показали высокую устойчивость водных растворов МС-LR, CYN и SXT к кратковременному кипячению. Этот результат хорошо согласовался с данными о низкой степени дегградации МС при температуре 40°C в течение 80 сут [14] и CYN при кипячении его водного раствора в течение 15 мин [11]. Сведений о действии высокой температуры на разрушение SXT найти не удалось. Таким образом, кипячение воды следует признать неэффективным методом удаления цианотоксинов. У/Ф в экспериментах авторов приводил к дегградации лишь молекул МС-LR, два других цианотоксина оказались устойчивы к воздействию этого фактора. В [23] приведены данные о быстрой изомеризации МС при воздействии У/Ф с образованием нетоксичных продуктов. Напротив, в работах [11, 26] показана значительно меньшая степень фотодегградации CYN по сравнению с таковой у МС, в том числе при воздействии У/Ф, что согласуется с ре-

зультатами настоящих экспериментов. Данные об устойчивости SXT к У/Ф в научной литературе отсутствуют. Несмотря на экспериментально подтвержденную способность У/Ф разрушать МС, использование этого метода на практике ограничено. Дозы У/Ф, достаточные для разрушения МС, на несколько порядков выше тех, что обычно используются на водопроводных станциях для дезинфекции воды [13, 25]. Наиболее эффективным методом удаления всех трех цианотоксинов оказалось пропускание воды через ГАУ. Ранее, в [15, 17, 25] была продемонстрирована высокая степень очистки воды от растворенных в ней цианотоксинов с использованием ГАУ. Описаны случаи успешного применения ГАУ для удаления токсинов цианобактерий из питьевой воды на водопроводных станциях [17]. Однако эффективность адсорбции цианотоксинов ГАУ уменьшается довольно быстро в периоды цианобактериального цветения воды в источниках водоснабжения из-за высокого содержания в ней органических веществ, что требует частой замены сорбента [13, 15, 17, 25]. Основной подход к очистке воды от цианотоксинов за рубежом — это использование так называемого “мультибарьерного” принципа. Он предполагает использование на водопроводных станциях многоступенчатой системы очистки воды от цианотоксинов с применением нескольких эффективных методов. Результат этого подхода — снижение концентрации цианотоксинов в питьевой воде до безопасных уровней [15, 17].

ВЫВОДЫ

Впервые получены данные о попадании токсинов цианобактерий в питьевую воду, подготовленную на водопроводных станциях некоторых городов России. По результатам исследований в 2013 г., концентрации МС в водопроводной воде в разных районах г. Ярославля определяются сезонной динамикой развития токсигенных цианобактерий в фитопланктоне Горьковского водохранилища. Измеренные методом ELISA концентрации МС как в источниках питьевого водоснабжения, так и в водопроводной воде ряда городов России в период с июля по сентябрь 2013 г. значительно превышали ее безопасный уровень, законодательно принятый во многих странах мира. Присутствие других опасных для здоровья людей гепато- и нейротоксинов цианобактерий в период исследования не было обнаружено.

ПЦР-анализ выявил виды *Microcystis* как основные продуценты МС в обследованных источниках водоснабжения городов Ярославской области. Кроме того, *Dolichospermum* spp. и *Planktothrix agardhii* идентифицированы в водохранилище и р. Которосли как потенциальные продуценты МС, однако отмечались в фито-

планктоне лишь sporadически. Полученные данные о составе продуцентов МС должны учитываться при прогнозировании рисков для населения от массового развития разных видов цианобактерий в источниках питьевого водоснабжения Волжского региона.

Проведенный скрининг возможных методов удаления из воды цианотоксинов разных типов показал высокую устойчивость молекул МС-LR, СУН и SXT к кратковременной термической обработке. Воздействие У/Ф оказалось действенным только по отношению к МС-LR, а наиболее эффективен из исследованных методов удаления всех трех цианотоксинов — пропускание воды через ГАУ. Полученные экспериментальные результаты имеют важное прикладное значение для разработки мероприятий по защите здоровья населения в периоды массового развития цианобактерий в источниках питьевого водоснабжения.

Авторы выражают благодарность С.М. Ждановой (ИБВВ РАН) и Д.Н. Плигину (ЯрГУ) за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бабаназарова О.В., Кармайер Р., Сиделев С.И., Александрина Е.М., Сахарова Е.Г.* Структура фитопланктона и содержание микроцистинов в высокоэвтрофном озере Неро // *Вод. ресурсы.* 2011. Т. 38. № 2. С. 223–231.
2. *Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Потапов С.А.* Токсичные цианобактерии в озере Байкал // *Изв. ИГУ. Сер. Биология. Экология.* 2013. Т. 6. № 3(1). С. 27–34.
3. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
4. *Корнева Л.Г., Соловьева В.В., Русских Я.В., Чернова Е.Н.* Состояние фитопланктона и содержание цианотоксинов в Рыбинском, Горьковском и Чебоксарском водохранилищах в период аномально жаркого лета 2010 г. // *Вода: химия и экология.* 2014. № 8. С. 24–29.
5. *Кузьмин Г.В.* Фитопланктон. Видовой состав и обилие // *Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов.* М.: Наука, 1975. С. 73–87.
6. *Сигарева Л.Е.* Спектрофотометрический метод определения пигментов фитопланктона в смешанном экстракте // *Методические вопросы изучения первичной продукции планктона внутренних водоемов.* СПб.: Гидрометеиздат, 1993. С. 75–85.
7. *Сиделев С.И., Бабаназарова О.В., Зубишина А.А. и др.* Токсигенные цианобактерии и содержание цианотоксинов в водоемах Верхней Волги // *Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: Материалы III Междунар. науч. конф. Ярославль, 2014.* С. 186–188.
8. *Сиделев С.И., Зубишина А.А., Бабаназарова О.В. и др.* Мониторинг содержания цианотоксинов микроцистинов в водоемах Верхней Волги: молекулярно-генетический и аналитический подходы // *Вода: химия и экология.* 2014. № 8. С. 88–94.

9. *Строганов Н.С., Бузинова Н.С.* Практическое руководство по гидрохимии. М.: Изд-во МГУ, 1980. 196 с.
10. *Chernova E., Sidelev S., Russkikh I., Voyakina E., Babanazarova O., Romanov R., Kotovshchikov A., Mazur-Marzec H.* *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* as neurotoxins producers in some Russian freshwaters // *Toxicol.* 2017. V. 130. P. 47–55.
11. *Chiswell R.K., Shaw G.L., Eaglesham G., Smith M.J., Norris R.L., Seawright A.A., Moore M.R.* Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition // *Environ. Toxicol.* 1999. V. 14. P. 155–161.
12. *Chorus I.* Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau: Fed. Environ. Agency (Umweltbundesamt), 2012. 147 p.
13. *Chorus I., Bartram J.* Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon, 1999. 416 p.
14. *Harada K-I., Tsuji K., Watanabe M.F., Kondo F.* Stability of microcystins from cyanobacteria – III. Effect of pH and temperature // *Phycologia.* 1996. V. 35. № 6. P. 83–88.
15. *He X., Liu Y-L., Conklin A., Westrick J., Weavers L.K., Dionysiou D.D., Lenhart J.J., Mouser P.J., Szlag D., Walker H.W.* Toxic cyanobacteria and drinking water: impacts, detection, and treatment // *Harmful algae.* 2016. V. 54. P. 174–193.
16. *Kurmayer R., Christiansen G., Fastner J., Börner T.* Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. // *Environ. Microbiol.* 2004. V. 6. № 8. P. 831–841.
17. *Pantelić D., Svirčev Z., Simeunović J., Vidović M., Trajković I.* Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia // *Chemosph.* 2013. V. 91. P. 421–441.
18. *Semenova A.S., Sidelev S.I., Dmitrieva O.A.* Experimental investigation of natural populations of *Daphnia galeata* G.O. Sars from the Curonian Lagoon feeding on potentially toxigenic cyanobacteria // *Biol. Bull.* 2017. V. 44. № 5. P. 538–546.
19. *Sidelev S.I.* Molecular genetics identification of microcystin-producing cyanobacteria taxa in lake Nero (Russia) // *Microbiol.* 2014. V. 83. № 5. P. 709–711.
20. *Sidelev S.I., Fastner J., Dittmann-Thünemann E., Babanazarova O.V., Zubishina A.A.* First report on the presence of cylindrospermopsin-producing blue-green algae (cyanobacteria) in the Russian waters // Тез. докл. II(X) Международный. ботан. конф. молодых ученых. СПб.: ЛЭТИ, 2012. С. 40.
21. *Sidelev S.I., Golokolenova T.B., Chernova E.N., Russkikh Ya.V.* Analysis of phytoplankton in Tsimlyansk reservoir (Russia) for the presence of cyanobacterial hepato- and neurotoxins // *Microbiol.* 2015. V. 84. № 6. P. 828–837.
22. *Sidelev S.I., Korneva L.G., Solovyeva V.V., Zubishina A.A., Pligin D.N.* Molecular genetic identification and seasonal succession of toxigenic cyanobacteria in phytoplankton of the Rybinsk reservoir (Russia) // *Inland Water Biol.* 2016. V. 9. № 4. P. 368–374.
23. *Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H., Harada K-I.* Stability of microcystins from cyanobacteria. II: Effect of UV light on decomposition and isomerization // *Toxicol.* 1995. V. 33. P. 1619–1631.
24. *Via-Ordorika L., Fastner J., Kurmayer R. et al.* Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies // *Syst. Appl. Microbiol.* 2004. V. 27. P. 592–602.
25. *Westrick J.A., Szlag D.C., Southwell B.J., Sinclair J.* A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment // *Analytical and Bioanalytical Chem.* 2010. V. 397. P. 1705–1714.
26. *Wörmer L., Huerta-Fontela M., Cires S., Carrasco D., Quesada A.* Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin // *Environ. and Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 3002–3007.