

БИОЛОГИЯ

УДК 581.526.325.2:582.232.7

О.И. Белых, И.В. Тихонова, Е.Г. Сорокикова, А.С. Гладких, О.В. Калюжная

ВЫЯВЛЕНИЕ ТОКСИЧНЫХ *MICROCYSTIS* В ОЗЕРЕ КОТОКЕЛЬСКОЕ (БУРЯТИЯ)

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-90420-Укр_ф_а.

В озере Котокельское с помощью световой микроскопии определено видовое разнообразие планктонных цианобактерий. На основе результатов молекулярно-филогенетических исследований выявлены потенциально токсичные цианобактерии, содержащие ген синтеза микроцистина (*mcyE*). Полученные последовательности принадлежат роду *Microcystis*, который широко распространен в водоемах мира и является наиболее частым возбудителем «цветения».

Ключевые слова: токсичные цианобактерии, *Microcystis*; озеро Котокельское; микроцистин; генетические маркеры; ПЦР.

Род *Microcystis* (Kütz.) Elenk. – один из самых широко распространенных среди синезеленых водорослей или цианобактерий – часто вызывает «цветение» воды в продуктивных водоемах. Некоторые виды *Microcystis* продуцируют токсичные циклические пептиды – микроцистины, состоящие из 7 аминокислот: цикло-(D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha), где D-Ala – D-аланин, D-MeAsp – D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, Adda – 3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенил-дека-4,6-диеновая кислота, D-Glu – D-глутамат, Mdha – N-метилдегидроаланин, X и Z – вариабельные L-аминокислоты. Кроме одноклеточных колониальных микроцистисов, обычными возбудителями «цветения» водоемов, синтезирующими микроцистины, являются нитчатые цианобактерии *Anabaena* [1] и *Planktothrix* [2]. Известно более 65 вариантов микроцистинов, различающихся в основном вариабельными аминокислотами и деметилированием MeAsp и Mdha [1]. Среди них наиболее часто встречается микроцистин-LR, где вариабельные L-аминокислоты представлены лейцином и аргинином, он также наиболее токсичен [3, 4]. RR- (аргинин-аргинин) и YR- (тирозин-аргинин) изоформы менее распространены. Варианты микроцистинов могут присутствовать в период «цветения» по несколько одновременно или каждый по отдельности. Токсины накапливаются в окружающей водной среде, аккумулируются в моллюсках, рыбе и других гидробионтах, далее передаются по трофической цепи теплокровным наземным животным и человеку. Известны также отравления травоядных млекопитающих на водопое при попадании в пищеварительный тракт как фитопланктона, так и самой воды. Определенную опасность представляет загрязнение цианотоксинами источников водоснабжения и водозаборов. Отравление может произойти при купании во время «цветения» воды [4]. Клинические симптомы при интоксикации микроцистином: диарея, тошнота, озноб, слабость [5]. Токсичность микроцистинов определяется их активным транспортом в клетки печени (гепатоциты) с последующим ингибированием эукариотического серин/треонин фосфатазы 1 и 2A [6]. Adda и D-глутамат играют ключевую роль в токсичности микроцистинов, именно этот участок взаимодействует с фосфатазами. В результате ингибирования фосфатаз происходит лизис гепатоцитов, кровоизлияния и застой крови в печени, что приводит к значительному увеличению ее размеров [6].

В последнее время во многих странах мира по рекомендации Всемирной организации здравоохранения (1998) проводится мониторинг цианотоксинов в питьевой воде, при этом установленная ВОЗ предельно допустимая концентрация микроцистина-LR составляет 1 мкг/л. Одна из основных задач контроля качества питьевой воды – выявление видов, способных синтезировать токсины. Во время «цветения» в воде могут присутствовать как микроцистин-продуцирующие, так и нетоксичные штаммы одного вида, их невозможно отличить от друг от друга микроскопически. Наиболее быстрым и точным методом выявления токсикогенных цианобактерий является полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами, специфичными к генам, ответственным за синтез токсинов.

Микроцистины синтезируются нерибосомно большим мультиферментным комплексом, состоящим из различных модулей, включая нерибосомную пептидсинтазу (NRPS), поликетидсинтазу (PKS), а также дополнительные модифицирующие ферменты [7]. Эти модули катализируют активацию, модификацию и конденсацию специфических аминокислот. Кластер генов, кодирующий ферменты для синтеза микроцистинов (*mcy*), определен у двух штаммов *M. aeruginosa* PCC 7806 [7] и K-139 [8], он имеет длину 55 тыс. п. н. и состоит из 10 открытых рамок считывания.

В настоящей работе поиск потенциально токсичных цианобактерий проводили с помощью маркеров, которые позволяют выявить нуклеотидную последовательность, кодирующую домен аминотрансферазы (АМТ) гена *mcyE*. АМТ входит в состав всех известных микроцистин-синтетаз и, как недавно показано [9], нодулярин-синтетазы (*nda*), которая кодирует синтез другого известного гепатотоксина – нодулярина, продуцируемого видами рода *Nodularia*. АМТ локализуется в PKS-модуле *mcyE*- и *ndaF*-генов и играет ключевую роль в биосинтезе микроцистинов и нодуляринов, выполняя перенос аминокислоты на Adda мотив [7, 9].

Озеро Котокельское (52°50' с.ш., 108°10' в.д.) – крупный промысловый водоем Бурятии – расположено в 2 км к востоку от Байкала. Длина озера 15 км, наибольшая ширина 6 км, глубина 12 м. Котокельское является объектом туристско-рекреационной зоны Прибайкалья, здесь находится множество турбаз и пансионатов. Летом 2008 г. на озере зарегистрирована массо-

вая гибель рыб, водоплавающих птиц и домашних кошечек, отмечено 16 случаев отравлений человека, связанных с употреблением в пищу леща, выловленного в озере. У всех пострадавших были симптомы Гаффской болезни или, согласно медицинской терминологии, алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии. Отравлений вследствие купания в озере не регистрировали [10]. Этиология Гаффской болезни, также называемой юксовско-сартланской, остается невыясненной, одной из возможных причин является действие биологически активных веществ цианобактерий [4]. В настоящее время на озере действует запрет на употребление в пищу рыбы, купание и использование воды для бытовых и хозяйственных нужд [10].

Материалы и методы

Пробы фитопланктона были отобраны сетью Апштейна в августе 2008 г. у пос. Исток в прибрежной зоне озера и зафиксированы 4% формалином для микроскопического наблюдения и 80% этанолом для молекулярно-биологического анализа. Одновременно с отбором проб была определена температура и прозрачность воды по диску Секки.

Для изучения видового состава и численности цианобактерий использовали световой микроскоп Axiovert 200 (Zeiss, Германия).

ДНК выделяли методом адсорбции на силикагеле с использованием набора ДНК-Сорб (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия) по инструкции производителя. ПЦР проводили на приборе Mini Cyclor (MJ Research, BioRad, США) с применением реагентов фирмы «Амплисенс» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) в объеме 15 мкл (концентрация ДНК 200–300 нг). Для выявления генов синтеза микроцистинов и нодуляринов использовали универсальные праймеры НерF и НерR [11]. Реакцию проводили по следующей программе: 2 мин – 92°C и далее 35 циклов: 92°C – 20 с, 52°C – 30 с, 72°C – 1 мин, в последнем цикле этап элонгация удлиннен до 6 мин. В положительной контрольной реакции использовали ДНК токсичного штамма *Microcystis aeruginosa* CALU 972, любезно предоставленного Л.Н. Волошко (БИН, С.-Петербург), в отрицательной контрольной реакции – ДНК штамма *Synechococcus* sp. ВАС 98111.

Анализ полученных ПЦР-продуктов проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с использованием 0,5% ТАЕ буфера (20 мМ трис-ОН, 0,5 мМ ЭДТА, 7,8 мМ CH₃COOH, pH 7,6). В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК фага λ, обработанную рестриктазой Pst I («Сиб Энзим», Новосибирск). Полосы с последовательностями длиной около 400 п. н. вырезали и проводили элюцию нуклеотидного материала методом замораживания–оттаивания. Очищенные фрагменты клонировали в векторе pGEM-T-Easy Vector System (Promega, США) в компетентных клетках *E. coli* штамм XL-1. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на секвенаторе Beckman CEQ[™] 8800 (Beckman Coulter Inc., США). Полученные хроматограммы обрабатывали программой Chromas (www.techneysi-um.com.au/chromas.html). Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями базы данных GenBank с

помощью программы BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Выравнивание последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили при помощи пакета программ MEGA, версия 4.0 [12]. Полученные последовательности депонированы в базу данных GenBank под номерами GQ366342–GQ366346.

Результаты и обсуждение

Температура воды на поверхности оз. Котокельское в исследуемый период составляла 20°C, прозрачность по диску Секки достигала 1 м. В фитопланктоне доминировали цианобактерии *Aphanocapsa holsatica* (Lemm.) Cronb. et Kom. (82% общей численности). Такие виды, как *Anabaena spiroides* Kleb., *Aphanocapsa conferta* (W. et G.S. West) K.-Legn. et Cronb., *Aphanothece clathrata* W. et G.S. West, *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz., *Planktolingbya contorta* (Lemm.) An. et Kom., *P. limnetica* (Lemm.) K.-Legn. et Cronb., *Coelosphaerium kuetzingianum* Näg. и *Snowella lacustris* (Chodat) Kom. et Hindak составляли менее 6%. В колониальной слизи *Microcystis aeruginosa* встречалась *Pseudanabaena voronichinii* An.

Озеро Котокельское интенсивно исследовалось в 30–50-х гг. прошлого столетия, что, в первую очередь, связано с его промысловым значением. Ежегодный улов рыбы в начале XX в. составлял более 1 200 т [13]. В этот период наиболее подробно исследованы температурный режим, гидрохимические параметры, флора и фауна озера. Показано, что воды озера летом значительно прогреваются, иногда до 25,8°C, прозрачность воды летом падает до 0,6–0,8 м вследствие сильного развития планктона, зимой увеличивается до 5 м, поверхностные слои воды достаточно насыщены кислородом, а у дна отмечается его дефицит [13].

Уже длительное время исследователи отмечают доминирующую роль синезеленых водорослей (цианобактерий) в альгофлоре озера. В пробах планктона ранее обнаружены *Merismopedia* sp., *Chroococcus* sp., *Microcystis pulvereae*, *M. pulvereae* f. *incerta*, *M. aeruginosa*, *Aphanothece* sp., *Gloeococcus schroeteri*, *Coelosphaerium* sp., *C. kuetzingianum*, *C. natans*, *Gomphosphaeria lacustris*, *Snowella rosea*, *Anabaena flos-aquae*, *A. scheremetievi*, *A. spiroides*, *A. circinalis*, *A. lemmermannii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Gloeotrichia ehinulata* [13–16]. В Котокельском развивается «сибирский» комплекс видов, типичный для неглубоких хорошо прогреваемых продуктивных озер, видовой состав фитопланктона сходен с таковым, описанным Г.И. Поповской [17], для прибрежных участков бухт, соров и заливов Байкала. «Сибирский» комплекс видов значительно отличается от холоднолюбивого «байкальского», свойственного пелагиали Байкала, в котором преобладают диатомовые водоросли [17]. Первые исследователи озера относили Котокельское к группе водоемов, обособившихся от Байкала вследствие понижения уровня последнего. Г.Ю. Верещагин [18] и М.М. Кожов [14] считали, что озеро в прошлом могло быть заливом Байкала. В подтверждение ранее существовавшей связи между двумя озерами в Котокельском были найдены два вида байкальских гаммарид и эндемик Байкала – рачок *Epischura baicalensis* [19, 20]. В настоящее время от

Байкала оз. Котокельское отделено небольшой горной цепью, но связано с ним через систему мелких рек. Сток озерных вод в Байкал осуществляется на севере посредством небольших рек Исток и Турка.

В нашей работе мы провели поиск микроцистин- и нодулярин-продуцирующих цианобактерий, содержащих домен аминотрансферазы в *mscE*- и *ndaF*-генах микроцистин и нодулярин-синтез. АМТ-домен, амплифицированный с помощью Нер-праймеров, ранее найден у *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium* из разных водоемов, причем его наличие 100% коррелировало с продукцией гепатотоксичных микроцистинов и нодуляринов [11]. При ПЦР-анализе с праймерами к гену АМТ нами получен положительный результат, что позволило сделать вывод о наличии в оз. Котокельском потенциально токсичных цианобактерий. Сравнительный анализ последовательностей из Котокельского и имеющихся в базе данных GenBank выявил высокую степень гомологии пяти ампликонов с *mscE*-генами токсичных представителей рода *Microcystis* из разных мест обитания. Последовательности *Microcystis* sp. K1, K2 и K4 имеют 97–99% гомоло-

гии с последовательностями штаммов *M. aeruginosa* NIES-843, *M. aeruginosa* K-139 и *M. viridis* NIES-102, выделенных при токсичных цветениях озера Касумигаура, Япония [8, 11, 21]. Последовательности *Microcystis* sp. K3 и K5 на 98% сходны с последовательностями штаммов *M. aeruginosa* PCC 7806, PCC 7005, UTEX В 2667 из озер Нидерландов, США и Канады и некультивируемого *Microcystis* sp. (EU099028) из планктона р. Нил, Египет [11]. Последовательностей с высокой степенью гомологии к генам нодулярин-синтеза не найдено. При микроскопическом анализе фитопланктона оз. Котокельское виды рода *Nodularia* также не были обнаружены, как и в более ранних исследованиях.

Филогенетический анализ последовательностей генов *mscE* и *ndaF* показал, что представители родов *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix* и *Phormidium* образуют на древе отдельные кластеры с высоким уровнем bootstrap-поддержки (70–97%) (рис. 1). Полученные нами последовательности входят в кластер цианобактерий рода *Microcystis*, представленный, в основном, различными изолятами *M. aeruginosa*, который является самым известным и распространенным токсичным видом.

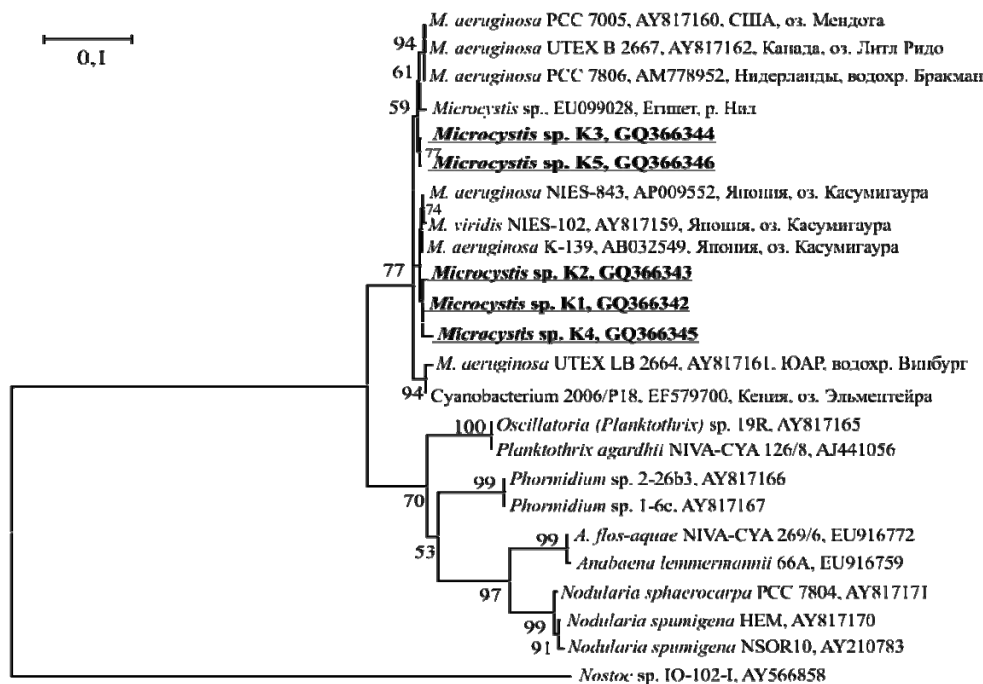


Рис. 1. Корневое филогенетическое древо цианобактерий, основанное на результатах секвенирования генов микроцистин- и нодуляринсинтез (*mscE*, *ndaF*), построенное с использованием метода ближайших соседей. Эволюционные расстояния определены по модели Кимуры. Цифрами показаны результаты «bootstrap»-анализа. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в данной работе. Масштаб соответствует двум заменам на 100 п. н.

Ранее с помощью генетического маркера *mscA* мы выявили присутствие токсикогенного *M. aeruginosa* в фитопланктоне Усть-Илимского водохранилища [22]. В Братском водохранилище найдена *Anabaena* sp., содержащая гены микроцистин-синтеза [23]. Эти водохранилища ангарского каскада характеризуются как мезотрофные с наличием эвтрофных участков. Содержание органических веществ и биогенов в водохранилищах в несколько раз превышает ПДК вследствие сбросов промышленных и хозяйственно-бытовых сточных вод из очистных сооружений городов и населенных пунктов Иркутской области [24]. На оз. Котокельском в послед-

ние годы наблюдаются явные признаки эвтрофирования, проявляющегося, в первую очередь, в массовом развитии цианобактерий. Известно, что цианобактериальным «цветениям» водоемов и продукции токсинов способствует высокая концентрация биогенов, низкое отношение содержания азота к фосфору ($N : P < 25$) и ряд других факторов [1, 2]. По последним данным, предельно допустимая концентрация фосфатов, принятая в России для рыбохозяйственных водоемов (0,05 мг/л), в оз. Котокельском превышена в 10 раз [10]. В лабораторных экспериментах показано, что концентрация микроцистина падает в несколько раз, когда при культивировании

M. aeruginosa в среде наблюдается минимальное содержание азота. Оптимальная температура для большинства токсин-продуцирующих цианобактерий лежит в пределах 20–25°C [25]. Анализ проб из 241 озера в США выявил, что концентрация микроцистинов повышается с увеличением трофического статуса озер [26]. Фактором, способствующим распространению цианобактериального «цветения», является способность *Microcystis* мигрировать в водоемах [27]. Представители карповых рыб, в частности карась и плотва, могут стимулировать развитие *Microcystis* напрямую – при транзитном прохождении данной цианобактерии через их кишечники, и косвенно: экскретируя фосфор и взмучивая донные отложения при добывании пищи, что приводит к резкому увеличению потока биогенов из осадков в толщу воды [28]. Вследствие аккумуляции микроцистина в рыбе в 100 г ее мышечной массы может содержаться 2,64–

49,7 мкг/г микроцистина-LR, что в 1,3–25 раз больше нормы допустимого суточного потребления, установленной ВОЗ [29].

Таким образом, анализ фитопланктона с помощью световой микроскопии показал, что в оз. Котокельском в августе 2008 г. наблюдалось массовое развитие колониальных цианобактерий *Aphanocapsa* и *Microcystis*. На основании полученных молекулярно-филогенетических данных можно заключить, что в озере присутствуют токсикогенные цианобактерии рода *Microcystis*. Наличие токсичных цианобактерий в оз. Котокельском представляет собой определенную угрозу для жителей Байкальского региона. Учитывая рекреационную и промысловую важность озера, наблюдающиеся здесь случаи массового отравления людей и животных, а также прямую водную связь с Байкалом, исследования по выявлению токсичных цианобактерий в Котокельском следует сделать регулярными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I., Bartram J. (eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. EFN Spon: London, 1999. P. 41–111.
2. Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains // AEM. 1990. Vol. 56. P. 2658–2666.
3. Stoner R.D., Adams W.H., Slatkin D.N., Siegelman H.W. The effects of single L-amino acid substitutions on the lethal potencies of the microcystins // Toxicon. 1989. Vol. 27. P. 825–828.
4. Орлов Б.Н., Гелашивили Д.Б., Ибрагимов А.К. Ядовитые животные и растения СССР. Справочное пособие для студентов вузов по спец. «Биология». М.: Высш. шк., 1990. 272 с.
5. Codd G.A., Bell S.G., Kaya K. et al. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health // Europ. J. Phycol. 1999. Vol. 34. P. 405–415.
6. Yoshizawa T., Matsushima R., Watanabe M.F. et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity // J. Cancer Res. clin. Oncol. 1990. Vol. 116. P. 609–614.
7. Tillett D., Dittmann E., Erhard M. et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system // Chem. Biol. 2000. Vol. 7. P. 753–764.
8. Nishizawa T., Ueda A., Asayama M. et al. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin // J. Biochem. 2000. Vol. 127. P. 779–789.
9. Moffit M.C., Neilan B.A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed evolution of cyanobacterial hepatotoxins // AEM. 2004. Vol. 70. P. 6353–6362.
10. Минздравсоцразвития РФ. Постановление № 4 от 10.06.2009 «О введении ограничительных мероприятий на озере Котокель». Режим доступа: <http://www.burprn.ru/docs/decision/detail.php?ID=1351>, свободный.
11. Jungblut A.-D., Neilan A.B. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria // Arch. Microbiol. 2006. Vol. 185. P. 107–114.
12. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
13. Егоров А.Г. Озеро Котокель // Известия Биол.-геогр. НИИ при ИГУ. Иркутск, 1950. Т. 11, вып. 1. 38 с.
14. Кожов М.М. Озеро Котокель (гидробиологический очерк) // Известия БГНИИ при Иркутском государственном университете. 1938. Т. 8, вып. 1–2. 45 с.
15. Кордэ Н.В. Биостратиграфия отложений озера Котокель // Мезозойские и кайнозойские озера Сибири. М.: Наука, 1968. С. 150–170.
16. Антипова Н.Л., Помазкова Г.И. О планктоне оз. Котокель // Исследования гидробиологического режима водоемов Восточной Сибири. Иркутск: БГНИИ, 1971. С. 27–39.
17. Поповская Г.И. Фитопланктон Байкала и его многолетние изменения (1958–1990): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 1991. 32 с.
18. Вережгаин Г.Ю. К познанию водоемов, расположенных у берегов Байкала // Труды Комиссии по изучению оз. Байкал. Пг., 1918. Т. 1, вып. 1. С. 55–104.
19. Дорогостайский В.Ч. Краткий очерк о работах Байкальской экспедиции Академии наук в 1916 году // Труды Комиссии по изучению оз. Байкал. Пг., 1922. Т. 1, вып. 2. 36 с.
20. Справочник по водным ресурсам СССР. Гидрометеиздат, 1936. Т. 16, вып. 1. 78 с.
21. Kaneko T., Nakajima N., Okamoto S., Suzuki I. et al. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843 // DNA Res. 2007. Vol. 14. P. 247–256.
22. Тихонова И.В., Белых О.И., Помазкина Г.В., Гладких А.С. Анализ цианобактерий озера Байкал и Усть-Илимского водохранилища на наличие гена синтеза микроцистина // Доклады АН. 2006. Т. 409. С. 425–427.
23. Тихонова И.В., Гладких А.С., Белых О.И., Сорокикова Е.Г. Выявление потенциально токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области с помощью полимеразной цепной реакции // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2006. Т. 2. С. 202–205.
24. Кудринская Г.Б., Морева О.А. Результаты гидрохимического мониторинга р. Вихорева // Материалы рабочего совещания по выполнению природоохранных мероприятий ОАО «ЦКК» – ОАО «БКХ» в 2000–2003 гг. Иркутск, 2004. С. 53–60.
25. Codd G.A., Poon G.K. Cyanobacterial toxins // Biochemistry of the algae and cyanobacteria. Proceedings of the Phytochemistry Society of Europe. Oxford: Oxford University Press, 1988. Vol. 28. P. 283–296.
26. Graham J.L., Jones J.R., Jones S.B. et al. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States // Water Res. 2004. Vol. 38. P. 4395–4404.
27. Johnson B.R., Jacoby J.M. Cyanobacterial toxicity and migration in a mesotrophic lake in western Washington, USA // Hydrobiologia. 2003. Vol. 495. P. 79–91.
28. Kolmakov V.I., Gladyshev M.I. Growth and potential photosynthesis of cyanobacteria are stimulated by viable gut passage in crucian carp // Aquatic Ecol. 2003. Vol. 37. P. 237–242.
29. Xie L., Xie P., Guo L. et al. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China // Env. Toxicology. 2005. Vol. 20. P. 293–300.