



УДК 581.526.325.2

Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в бентосе озера Байкал

М. А. Ивачева^{1, 2}, И. В. Тихонова¹, Е. Г. Сороковикова¹,
А. Ю. Краснопеев¹, С. А. Потапов¹, Б. Чойдаш³, О. И. Белых¹

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

³Национальный университет Монголии, Улан-Батор

E-mail: iren@lin.irk.ru

Аннотация. В недавнее время отмечено массовое развитие способных к синтезу токсинов цианобактерий в донных сообществах олиготрофного озера Байкал. В настоящей работе исследованы образцы биоплёнок, собранные в прибрежной зоне южного Байкала с выходов коренных пород и с больших губок эндемичных родов *Baikalospongia* и *Lubomirskia*. В составе плёнок обнаружены цианобактерии, принадлежащие порядкам Synechococcales, Chroococcales, Oscillatoriales и Nostocales. С помощью молекулярно-биологических маркеров к гену микроцистин-синтетазы *mscE* выявлено, что среди цианобактерий исследованных бентосных биопленок присутствуют потенциальные продуценты микроцистина.

Ключевые слова: озеро Байкал, бентосные цианобактерии, микроцистины, ген *mscE*, ПЦР.

Введение

Байкал – древнейшее уникальное озеро, характеризующееся наибольшей глубиной в мире, холодноводностью, высокой прозрачностью и огромными запасами чистой пресной воды. Как и в других морских и пресноводных олиготрофных экосистемах [4; 16], одним из основных продуцентов органического вещества в планктоне Байкала являются цианобактерии [3].

Массовое развитие цианобактерий часто является признаком ухудшения экологического состояния водоёма и приводит к появлению в водах токсичных метаболитов цианобактерий, среди которых наиболее распространёнными и опасными являются микроцистины – гепатотоксичные циклические пептиды, синтезируемые нерибосомными пептидсинтетазами [15]. При употреблении концентраций выше 1 мкг/л в организме животных развиваются массовые кровоизлияния в печени, при постоянном употреблении более низких доз – рак печени.

Ранее в водной толще Байкала не регистрировались случаи цветения цианобактерий, приводящие к появлению токсинов, однако с увеличением антропогенной нагрузки в хорошо прогреваемых летом участках озера были

обнаружены виды рода *Microcystis*, способные к синтезу микроцистина и сам гепатотоксичный пептид в небольших концентрациях [1].

За последнее время собрано большое количество данных о массовом развитии токсин-продуцирующих видов в планктоне озёр Европы, Азии, Африки и Америки. Однако не всегда токсичные цианобактерии развиваются на поверхности, в хорошо прогреваемых и богатых биогенными элементами водах. Как показали исследования, бентосные цианобактерии, являющиеся основным первичным продуцентом в полярных водоёмах, несмотря на суровые условия и низкую температуру воды, также синтезируют токсины полипептидной и поликетидной природы – сакситоксин и микроцистин. С 2011 г. массовое развитие бентосных водорослей и цианобактерий было отмечено и в Байкале [14]. Исследование показало наличие продуцентов паралитических токсинов в биоплёнках со дна озера, однако поиск микроцистин-продуцирующих цианобактерий не проводили [6]. Присутствие в воде цианобактерий, способных синтезировать токсичные пептиды и алкалоиды, является настораживающим фактом, поскольку токсины могут легко высвободиться, делая питьевую воду опасной для здоровья человека, также они могут накапливаться в теле и органах рыб [12]. К настоящему времени бентосные продуценты микроцистина менее изучены, известны немногочисленные исследования в водоёмах Швейцарии, водохранилищах и озёрах Калифорнии [8], реках Нил [11] и Вайтаки (Новая Зеландия) [7], пресноводных водоёмах Арктики и Антарктики [13; 17–19].

Целью настоящей работы является поиск продуцентов микроцистина в бентосных биопленках из оз. Байкал с помощью маркера к гену микроцистинсинтетазы *mscE*.

Материалы и методы

Пробы были отобраны в сентябре 2015 г. в прибрежной зоне оз. Байкал близ пос. Листвянка. С помощью водолазов-исследователей с глубин 6–8 м собрали 6 типов образцов биоплёнок с выходов коренных пород и с большой губки. Образцы фиксировали 4%-ным формалином, цианобактерии идентифицировали с помощью световой и эпифлюоресцентной микроскопии [5].

Экстракцию ДНК проводили с помощью набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В согласно инструкции производителя. Праймеры *HerR* и *HerF*, амплифицирующие фрагмент гена *mscE* фермента нерибосомной пептидсинтетазы микроцистина и условия амплификации описаны ранее [9]. В качестве положительного контроля использовали ДНК токсичной цианобактерии *M. aeruginosa* CALU 972. Для разделения ампликонов проводили электрофорез ПЦР-фрагментов в 1%-ном агарозном геле, фрагменты нужной длины элюировали из геля и клонировали по инструкции с набором реактивов Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Определение последовательностей осуществляли в ЦКП «Геномика» (Новосибирск). Полученные последовательности обрабатывали по ранее предложенному алгоритму [2].

Результаты и обсуждение

Отобрано 6 образцов биоплёнок с разных субстратов – со скал (выходов коренных пород) и с байкальских губок родов *Baikalospongia* и *Lubomirskia*. В пробах обнаружены цианобактерии, принадлежащие порядкам Synechococcales, Chroococcales, Oscillatoriales и Nostocales. В обрастаниях с больных губок доминировал *Tolypothrix distorta*, в образцах с губок *L. baicalensis* наряду с *T. distorta* в большом количестве наблюдали *Oscillatoria curviceps*, *Kamptonema formosum*, *Synechococcus* sp. и *Leptolyngbya margaritata*. В пробах с камней доминировали *T. distorta* и *Symplocastrum* sp., *Symplocastrum* sp., *Tychonema* sp., *Aphanocapsa parasitica*, *K. formosum*, *O. curviceps*, *Pseudanabaena* spp., *Leptolyngbya* sp.

В четырёх образцах ДНК, полученных из биоплёнок с помощью специфичных праймеров, амплифицировался фрагмент длиной 470 пар нуклеотидов, соответствующий выбранным праймерам. Из полученной библиотеки клонов участка гена микроцистинсинтетазы определено 50 последовательностей. В результате удаления одинаковых последовательностей выделено два очень схожих генотипа. Последовательности депонированы в базу данных GenBank (KX853209–KX853220). Используя BLAST-анализ определили, что все они гомологичны фрагменту гена микроцистинсинтетазы цианобактерий родов *Microcystis* и *Anabaena*, однако процентное сходство 74–75 % не позволяет отнести полученные нами последовательности к какому-либо конкретному роду. Такая гомология свидетельствует о дальнем родстве байкальской цианобактерии с представленными в базе данных микроцистин-продуцирующими планктонными цианобактериями. Генетический анализ показал, что полученные нами последовательности образуют дистантную монофилетичную группу с максимальной степенью бутстреп-поддержки (100 %) (рис.).

Анализируя филогенетическое древо, можно увидеть, что такой поддержкой характеризуются клады, в которых находятся токсинообразующие представители одного рода. Мы предполагаем, что в составе бентоса оз. Байкал обнаружен неизвестный ранее потенциальный продуцент микроцистина.

Таким образом, показано, что бентосные обрастания, усиленно развивающиеся в озере даже в холодное время года, содержат новых для науки потенциальных продуцентов цианобактериальных токсинов – микроцистинов. Ранее нами показано, что массовое развитие планктонных токсигенных цианобактерий наблюдается в летнее время года в тёплых хорошо прогреваемых заливах Байкала [1; 2]. В настоящем исследовании обнаружены содержащие ген синтеза микроцистина цианобактерии, развивающиеся на дне озера, где температура не является оптимальной для роста ранее описанных продуцентов гепатотоксинов. Продуцирование токсинов психрофильными цианобактериями показано при исследованиях водоёмов Арктики и Антарктики [13; 17–19]. Так, при исследовании бентоса в водоёмах о. Шпицберген установлен весьма сходный с байкальским видовой состав бентоса, с помощью масс-спектрометрии выявлены продуцируемые токсины [10]. Поскольку нами получены данные о наличии токсичных генотипов

цианобактерий в составе собранных бентосных биоплёнок, представляется важным продолжать исследования с целью выявить психрофильную бентосную цианобактерию – продуцент микроцистинов в оз. Байкал. Необходимо также провести химический анализ биоплёнок озера на предмет выявления микроцистина.

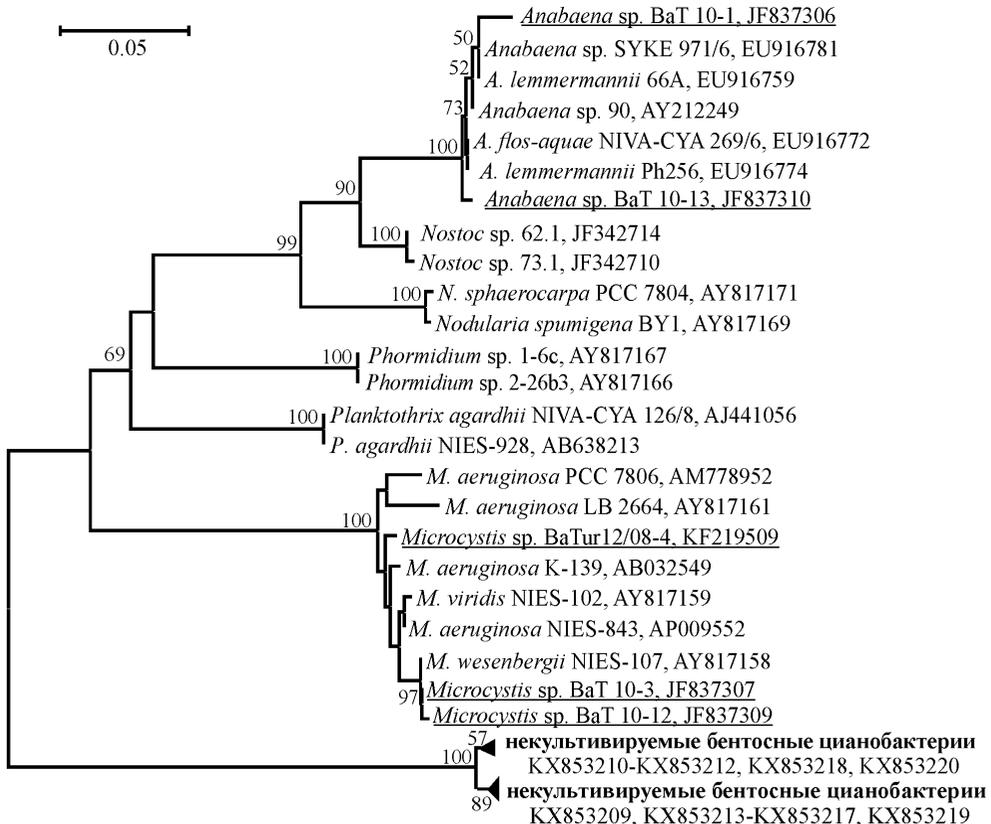


Рис. Генетический анализ АМТ домена *tcyE* и *ndaF* генов цианобактерий. Древо получено с использованием метода объединения ближайших соседей (NJ). Цифрами в узлах ветвления показаны результаты бутстреп-анализа 1000 реплик. Последовательности, полученные в настоящем исследовании, выделены жирным шрифтом. Последовательности планктонных цианобактерий оз. Байкал, полученные ранее, подчеркнуты

Работа выполнена при поддержке бюджетных тем ЛИН СО РАН VI.61.1.4, VI.55.1.3 и проекта РФФИ № 16-54-44035 Монг_а. Авторы выражают благодарность И. В. Ханаеву за отбор проб губок и сотрудникам ЦКП СО РАН «Геномика» (г. Новосибирск).

Список литературы

1. Идентификация токсичных цианобактерий в озере Байкал / О. И. Белых [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2015. – Т. 463, № 3. – С. 353–357.

2. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины / О. И. Бельх [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – Т. 21. – С. 363–378.
3. Belykh O. I. Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: Abundance, dynamics, and distribution / O. I. Belykh, E. G. Sorokovikova // Aquatic Ecosystem Health & Management. – 2003. – Vol. 6. – P. 251–261.
4. Callieri C. Freshwater autotrophic picoplankton: a review / C. Callieri, J. Stockner // J. Limnol. – Vol. 61. – P. 1–14.
5. Diversity of Cyanobacterial Species and Phylotypes in Biofilms from the Littoral Zone of Lake Baikal / E. Sorokovikova [et al.] // J. of Microbiol. – 2013. – Vol. 51, N 6. – P. 757–765.
6. First detection of benthic cyanobacteria in Lake Baikal producing paralytic shellfish toxins / O. Belykh [et al.] // Toxicon. – 2016. – Vol. 121. – P. 36–40.
7. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (*Oscillatoriales*) associated with a dog poisoning in New Zealand / S. Wood [et al.] // Toxicon. – 2010. – Vol. 55, N 4. – P. 897–903.
8. Izaguirre G. Benthic cyanobacteria (*Oscillatoriaceae*) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California / G. Izaguirre, A. Jungblut, B. Neilan // Water Res. – 2007. – Vol. 41, N 2. – P. 492–498.
9. Jungblut A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria / A. Jungblut, B. Neilan // Arch. Microbiol. – 2006. – Vol. 185. – P. 107–114.
10. Microcystins and anatoxin-a in Arctic biocrust cyanobacterial communities / E. Chrapusta [et al.] // Toxicon. – 2015. – Vol. 101. – P. 35–40.
11. Mohamed Z. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt / Z. Mohamed, H. el-Sharouny, W. Ali // Toxicon. – 2006. – Vol. 47, N 5. – P. 584–590.
12. Ni W. Microcystin accumulation in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) during a *Microcystis*-dominated bloom and risk assessment of the dietary intake in a fish pond in China / W. Ni, J. Zhang, Y. Luo // Environ Sci Pollut Res. – 2015. – doi:10.1007/s11356-015-4974-9
13. Potent toxins in Arctic environments – Presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems // J. Kleinteich [et al.] // Chem. Biol. Interact. – 2013. – Vol. 206. – P. 423–431.
14. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? / O. A. Timoshkin [et al.] // J. Great Lakes Res. – 2016. – Vol. 42. – P. 487–497.
15. Sivonen K. Cyanobacterial Toxins / K. Sivonen, G. Jones // Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management – London: E & FN Spon, 1999. – P. 41–111.
16. Stockner J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective / J. Stockner, N. Antia // Can. J. Fish. Sci. – 1986. – Vol. 43. – P. 2472–2503.
17. Temperature-related changes in polar cyanobacterial mat diversity and toxin production / J. Kleinteich [et al.] // Nat. Clim. Chang. – 2012. – Vol. 2. – P. 356–360.
18. Trout-Haney J. Presence of the Cyanotoxin Microcystin in Arctic Lakes of Southwestern Greenland / J. Trout-Haney, Z. Wood, K. Cottingham // Toxins. – 2016. – Vol. 8., № 256. – P. 1–6.

19. Widespread distribution and identification of eight novel microcystins in Antarctic cyanobacterial mats / S. Wood [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – P. 7243–7251.

Microcystin-Producing Cyanobacteria in the Benthos of Lake Baikal

M. A. Ivacheva^{1,2}, I. V. Tikhonova¹, E. G. Sorokovikova¹,
A. Yu. Krasnopeev¹, S. A. Potapov¹, B. Choydash³, O. I. Belykh¹

¹*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk*

²*Irkutsk State University, Irkutsk*

³*National University of Mongolia, Ulan-Bator*

Abstract. Cyanobacteria are one of main reasons of decrease of water quality in eutrophic, well-warmed freshwater bodies. Recently, bulk data on mass development of toxin-producing species in the plankton are collected from major part of lakes worldwide. It is found out recently that benthic cyanobacteria are main primary producers in polar water bodies, despite rigorous conditions and low water temperature, synthesize as well polypeptide and polyketide toxins - saxitoxin and microcystin. Mass development of cyanobacteria on Lake Baikal bottom resulted in change of the structure on benthic community and in the mortality of endemic Baikalian sponge. Using molecular biology markers for the gene of microcystin synthesis, we found out in oligotrophic Lake Baikal benthos cyanobacteria able to produce hepatotoxic peptides.

Keywords: Lake Baikal, benthic cyanobacteria, microcystins, mcyE gene, PCR.

*Ивачева Мария Александровна
инженер*

*Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 42–54–15*

магистрант

*Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1*

тел.: (3952) 24–18–55

e-mail: ivacevam@gmail.com

*Ivacheva Maria Aleksandrovna
Engineer*

*Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–54–15*

Irkutsk State University

*Undergraduate
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003*

tel.: (3952) 24–18–55

e-mail: ivacevam@gmail.com

*Тихонова Ирина Васильевна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник*

*Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 42–54–15*

e-mail: iren@lin.irk.ru

*Tikhonova Irina Vasilyevna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist*

*Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–54–15*

e-mail: iren@lin.irk.ru

*Сороковикова Екатерина Георгиевна
кандидат биологических наук,
научный сотрудник*

Лимнологический институт СО РАН

*Sorokovikova Ekaterina Georgievna
Candidate of Sciences (Biology),
Research Scientist*

Limnological Institute SB RAS

664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 42-54-15
e-mail: kati_sor@mail.ru

Краснопеев Андрей Юрьевич
инженер

Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 42-54-15
магистрант

*Иркутский национальный исследовательский
технический университет*
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83
e-mail: andrewkrasnopeev@gmail.com

Потапов Сергей Анатольевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
аспирант
тел. (3952) 42-54-15
e-mail: poet1988@list.ru

Чойдаш Батцэцэг
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Национальный Университет Монголии
210646 Улан-Батор, Монголия
а/я 46А/523
тел. (976) 950-90-03
e-mail: ivacevam@gmail.com

Белых Ольга Ивановна
кандидат биологических наук, заведующий
лабораторией
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 42-54-15
e-mail: belykh@lin.irk.ru

3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-54-15
e-mail: kati_sor@mail.ru

Krasnopeev Andrei Yurievich
Engineer
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-54-15
Undergraduate
*National Research Irkutsk State Technical
University*
83, Lermontov st., Irkutsk, 664074
e-mail: andrewkrasnopeev@gmail.com

Potapov Sergey Anatolyevich
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
doctoral student
phone: (3952) 42-54-15
e-mail: poet1988@list.ru

Battsetseg Choidash
Candidate of Sciences (Biology), Research
Scientist
National University of Mongolia
Ulaanbaatar, Mongolia, 210646
P.O.Box 46A/523
phone: (976) 950-90-03
e-mail: ivacevam@gmail.com

Belykh Olga Ivanovna
Candidate of Sciences (Biology), Head of
Laboratory
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-54-15
e-mail: belykh@lin.irk.ru