

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

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ И ВОДОХРАНИЛИЩАХ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Лимнологический Институт СО РАН (Иркутск)

Проведен поиск одного из генов синтеза микроцистина *mcyA* в цианобактериях озера Байкал и трех водохранилищ ангарского каскада с использованием специфических праймеров и ПЦР. В качестве контроля применяли музейный штамм *Microcystis aeruginosa* CALU 972, который в эксперименте вызывал гибель водных животных. ДНК штамма *M. aeruginosa* CALU 972 и ДНК фитопланктона Усть-Илимского водохранилища давали ПЦР-продукты, по длине соответствующие гену *mcyA*, а в ДНК байкальского фитопланктона и фитопланктона Иркутского и Братского водохранилищ ген *mcyA* не обнаружен. Определение нуклеотидных последовательностей ампликонов и BLAST-анализ выявили, что все они принадлежат *mcyA*-генам *M. aeruginosa*.

Ключевые слова: цианобактерии, токсины, микроцистин

DETECTION OF POTENTIALLY TOXIC CYANOBACTERIA IN LAKE BAIKAL AND RESERVOIRS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

I.V. Tikhonova, A.S. Gladkikh, O.I. Belykh, E.G. Sorokovikova

Limnological Institute of SB RAS, Irkutsk

The search of gene *mcyA* which belongs to gene cluster of nonribosomal peptide synthetase was carried out in cyanobacteria of Lake Baikal and Irkutsk region reservoirs. Polymerase chain reaction (PCR) with specific primers was chosen as tool for its detection. Collection toxic strain *Microcystis aeruginosa* CALU 972 was taken as positive control, the strain caused death of zooplankton in food experiments. Gene *mcyA* was found in cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* CALU 972 and in cyanobacteria of Ust-Ilimsk reservoir, Irkutsk reservoir and Bratsk reservoir cyanobacteria didn't contain *mcyA* gene of toxin synthesis. Detected gene *mcyA*, according sequencing data and BLASTA-analysis was determined as gene of *Microcystis aeruginosa*.

Key words: cyanobacteria, toxins, microcystin

ВВЕДЕНИЕ

Цветение сине-зеленых водорослей или цианобактерий в мезо- и эвтрофных озерах и водохранилищах и вызванное этим явлением ухудшение качества воды становятся серьезной проблемой во многих странах мира. В настоящее время существует много сообщений о массовом развитии в водоемах цианобактерий, синтезирующих токсины — микроцистины [10, 13]. Продукентами микроцистинов являются повсеместно распространенные цианобактерии родов *Microcystis* Elenk, *Anabaena* Vory, *Planktothrix* Anagnostidis et Komarek [13]. Микроцистины представляют собой циклические пептиды, синтез которых осуществляется комплексом ферментов нерибосомальной пептидсинтетазы. При попадании в организм человека и животных микроцистины вызывают интоксикацию организма с последующим некрозом печени, механизм их действия заключается в ингибировании сериновых фосфатаз [6, 7]. Микроцистин очень стабилен и может оставаться токсичным после кипячения. Одним из самых известных примеров отравления микроцистинами служит гибель в Бразилии 60 пациентов из 126 при диализе [6]. По рекомендации ВОЗ во многих странах проводится мониторинг токсинов в питьевой воде. Концентрация микроцистина не должна превы-

шать 1 мкг/л для одноразового приема и 0,1 мкг/л для многократного потребления.

Основными способами определения микроцистинов в питьевой воде являются многоступенчатые и трудоемкие хроматографические и иммунохимические методы [12, 13]. Молекулярно-биологические технологии, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием специфических праймеров, являются быстрым и точным способом оценки качества питьевой воды и определения токсичных видов цианобактерий [5]. Ранее была показана возможность выявления генов синтеза микроцистина с использованием праймеров, специфичных для гена *mcyE* цианобактерий рода *Microcystis* [4]. Целью настоящей работы является поиск в пробах воды озера Байкал и трех водохранилищ ангарского каскада фрагмента гена *mcyA*, кодирующего часть нерибосомальной микроцистинсинтетазы у цианобактерий родов *Microcystis* и *Anabaena* [11]. Ранее сообщалось, что цианобактерии родов *Microcystis* и *Anabaena* присутствуют как в Байкале, так и в водохранилищах Иркутского региона [1, 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы для исследования отбирали ежемесячно в течение 2005 года на пелагической станции в

Южном Байкале на разрезе Листвянка-Танхой от поверхности до глубины 1400 м; в Иркутском, Братском и Усть-Илимском водохранилищах — в августе 2005 года до глубины 25 м.

ПЦР проводили применяя праймеры, фланкирующие участок гена *тсуА* длиной 300 пар нуклеотидов [9]. Условия ПЦР были стандартные: за предварительной денатурацией при 94 °С следовало 30 циклов амплификации. В качестве положительного контроля использовали ДНК токсичного штамма *M. aeruginosa* CALU 972, любезно предоставленного Л.Н. Волошко (БИН, Санкт-Петербург). Данный штамм был выделен во время токсичного цветения озер в Карелии. Тесты *in vivo* на особях *Daphnia magna* и *Epishura baicalensis* показали, что эта цианобактерия является токсичной и приводит к летальному исходу спустя 20 часов совместной инкубации. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена проводили на секвенаторе Beckman SEQ™ 8800 (Beckman Coulter Inc., USA). Далее полученные фрагменты генов сравнивали с генами других цианобактерий с помощью программы поиска гомологичных последовательностей BLASTA. Филогенетическое древо было построено по модели Кимуры, метод ближайших соседей, в программе MEGA, версия 3.1 [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе ДНК токсичного *M. aeruginosa* CALU 972 обнаружен ПЦР-продукт, соответствующий по молекулярной массе гену *тсуА*. В суммарной ДНК фитопланктона озера Байкал и фитопланктона Иркутского и Братского водохранилищ ген *тсуА* не выявлен. В результате тестирования ДНК фитопланктона Усть-Илимского водохранилища был зарегистрирован ПЦР-продукт длиной около 250 пар нуклеотидов, что свидетельствует о наличии *тсуА* гена в цианобактериях из этого водоема (рис. 1).

Анализ определенных нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLASTA выявил 97 % гомологию *тсуА*-гена *M. aeruginosa* CALU 972 с *тсуА*-генами штаммов *M. aeruginosa* 102 из озера Касумигаура (Япония), *M. aeruginosa* из мелких озер Финляндии и озера Онтарио. Последовательность изолята Усть-Илимского водохранилища на 96 % близка к последовательности *M. aeruginosa* NIES-89 из озера Кавагучи (Япония) и имеет 10 нуклеотидных и 3 аминокислотных замены по сравнению с японским изолятом. Таким образом, ген *тсуА* Усть-Илимского изолята принадлежит цианобактерии вида *M. aeruginosa*. Между генами контрольного штамма *M. aeruginosa* CALU 972 и *M. aeruginosa* Усть-Илимского водохранилища отмечены изменения 11 нуклеотидных позиций, которые привели к замене 6 аминокислот в микроцистинсинтетазе. Полученным последовательностям присвоены номера при депонировании в GenBank: DQ680154 — *M. aeruginosa* CALU 972, DQ683189 — *M. aeruginosa* из Усть-Илимского водохранилища.

На основе определенных генов был проведен филогенетический анализ, использованы нуклео-

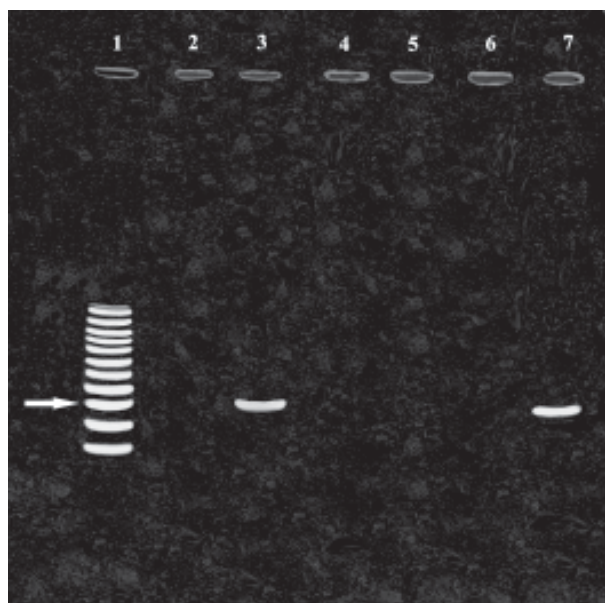


Рис. 1. ПЦР-анализ суммарной ДНК фитопланктона озера Байкал и водохранилищ на наличие гена *тсуА*. Электрофорез в 1% агарозном геле с бромистым этидием. 1 — маркер молекулярного веса, 2 — отрицательный контроль, 3 — *M. aeruginosa* CALU 972, 4 — оз. Байкал, 5 — Иркутское водохранилище, 6 — Братское водохранилище, 7 — Усть-Илимское водохранилище. Стрелкой указана ДНК, соответствующая длине 300 пар нуклеотидов.

тидные последовательности *тсуА*-генов цианобактерий из GenBank (табл. 1).

Филогенетический анализ выявил наибольшую родственность *тсуА*-генов *M. aeruginosa* Усть-Илимского водохранилища с карельским штаммом *M. aeruginosa* CALU 972, оба вида располагаются в одной кладе. Последовательность гена *тсуА* *M. aeruginosa* Усть-Илимского водохранилища является более древней по сравнению с другими последовательностями (рис. 2).

Таким образом, один из генов нерибосомальной микроцистинсинтетазы обнаружен в фитопланктоне Усть-Илимского водохранилища. По нашим данным, он принадлежал цианобактерии *M. aeruginosa*, численность которой в Усть-Илимском водохранилище в августе 2005 года была на несколько порядков выше, чем в Байкале и других водохранилищах в это же время. Известно, что массовое развитие токсичных цианобактерий часто является следствием эвтрофирования водоемов. Концентрации органических веществ и биогенных элементов в Усть-Илимском водохранилище превышали ПДК в несколько раз [2]. Хроматографического анализа, который позволяет выявить наличие микроцистина и его концентрацию, не проводили.

ВЫВОДЫ

1. С помощью ПЦР-анализа показано, что в озере Байкал, Иркутском и Братском водохранилищах потенциально токсичные цианобактерии не обнаружены, а в Усть-Илимском — подтверждено наличие кластера генов микроцистинсинтетазы цианобактерии *M. aeruginosa*.

Нуклеотидные последовательности *тсуА*-генов цианобактерий

Номера доступа (GenBank)	Штамм цианобактерий	Место выделения штамма
AJ 515453	<i>Microcystis</i> sp. 205	Озеро Малласярви (Финляндия)
AJ 515452	<i>Microcystis</i> sp. 199	Озеро Расатярви (Финляндия)
AJ 515460	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7941	Озеро Малое Ридео (Канада)
AJ 515457	<i>M. viridis</i> NIES-102	Озеро Касумигаура (Япония)
AJ 515459	<i>M. aeruginosa</i> NIES-89	Озеро Кавагучи (Япония)
AJ 515458	<i>Microcystis</i> sp. TUM7C	Озеро Таасаланярви (Финляндия)
AJ 515455	<i>Microcystis</i> sp. GL280646	Озеро Гранд-Лье (Франция)
AJ 515451	<i>Microcystis</i> sp. HUB 5.2.4	Озеро Пехлитци (Германия)
AJ 515456	<i>Microcystis</i> sp. IZANCYA5	Озеро Мира (Португалия)
AJ 515454	<i>Microcystis</i> sp. GL260735	Озеро Гранд-Лье (Франция)
AJ 515461	<i>Anabaena circinalis</i> 90	Озеро Весиярви (Финляндия)
AY566856	<i>Nostoc</i> sp. IO-102-1	Симбионт лишайника (Финляндия)
AFL515466	<i>Anabaena</i> cf. <i>flos-aquae</i> NIVA-CYA83	Озеро Эдландсватн (Норвегия)
AJ515465	<i>Anabaena</i> sp. 202A2	Озеро Весиярви (Финляндия)
AJ515464	<i>Anabaena</i> sp. 202A1/35	Озеро Весиярви (Финляндия)
AJ515463	<i>Anabaena</i> sp. 66B	Озеро Кийккара (Финляндия)
AJ515474	<i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 34	Озеро Колботнватнет (Норвегия)
AJ515473	<i>Planktothrix</i> sp. PCC 7821	Озеро Йершфен (Норвегия)

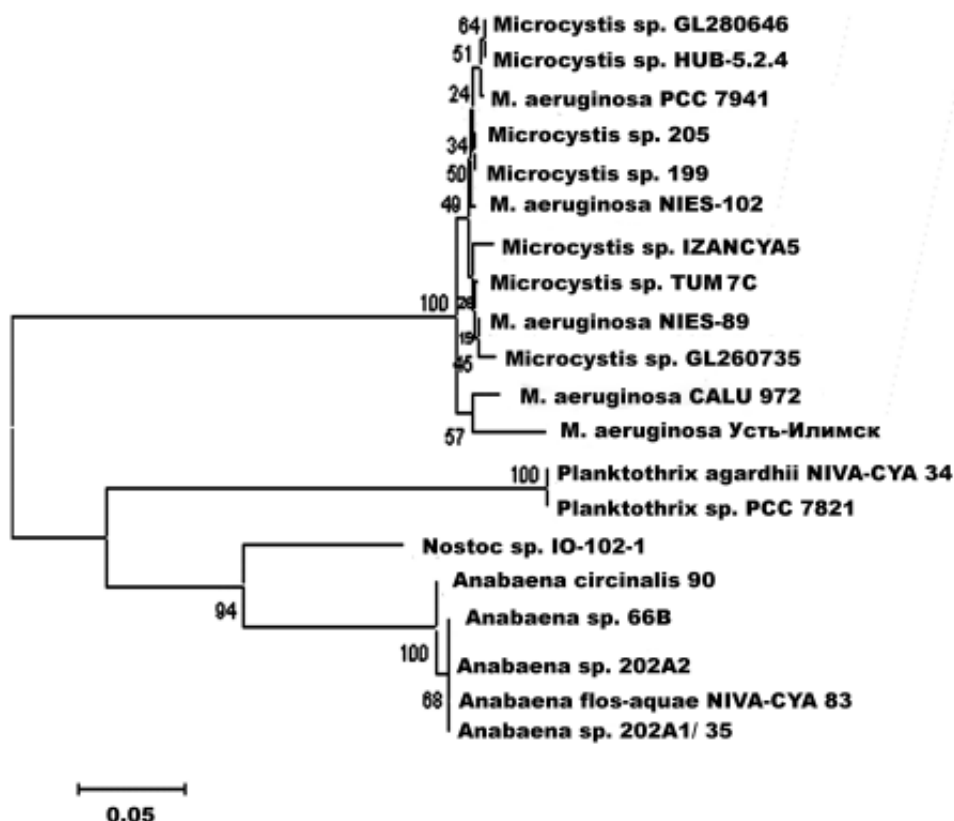


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения *тсуА*-генов токсичных цианобактерий из GeneBank и определенных последовательностей *M. aeruginosa* CALU 972 и *M. aeruginosa* Усть-Илимского водохранилища.

2. Генетически родственным штаммом по гену *тсuA* для Усть-Илимского *M. aeruginosa* является штамм *M. aeruginosa* CALU 972, выделенный из мелкого озера Карелии.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ № 05-04-97222, Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН № 140, гранта «Фонда поддержки отечественной науки» и гранта 2006-РИ-112./001/007.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева С.С. Фитопланктон водоемов Ангары / С.С. Воробьева. — Новосибирск, 1995. — 126 с.

2. Кудринская Г.Б. Результаты гидрохимического мониторинга р. Вихоревой / Г.Б. Кудринская, О.А. Морева // Материалы рабочего совещания по выполнению природоохранных мероприятий ОАО «ЦКК» — ОАО «БКХ» в 2000—2003 гг. (Иркутск — Братск, 15—16 апреля 2004 г.). — Иркутск, 2004. — С. 53—60.

3. Поповская Г.И. Фитопланктон глубочайшего озера мира / Г.И. Поповская // Тр. ЗИН АН СССР. — 1987. — Т. 172. — С. 102—115.

4. Тихонова И.В. Анализ цианобактерий озера Байкал и Усть-Илимского водохранилища на наличие гена синтеза микроцистина / И.В. Тихонова, О.И. Белых, Г.В. Помазкина, А.С. Гладких // Докл. Акад. Наук — 2006. — Т. 409, № 3. — С. 1—3.

5. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples / H. Pan, L. Song, Y. Liu et al. // Arch. Microbiol. — 2002. — Vol. 178. — P. 421—427.

6. Dunn J. Algae, kills dialysis patients in Brazil / J. Dunn // BMJ. — 1996. — Vol. 312. — P. 1183—1184.

7. Falconer I.R. An overview of problems caused by toxic blue green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water / I.R. Falconer // Environ. Toxicology. — 1999. — Vol. 14. — P. 5—12.

8. Kumar S. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // Briefings in Bioinformatics. — 2004. — Vol. 5. — P. 150—163.

9. Phylogenetic evidence for early evolution of microcystin synthesis / A. Rantala, D. Fewer, M. Hisbergues et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 101. — P. 568—573.

10. Plötzliche Todesfälle von Alprinderm im Kanton Graubünden / H. Naegeli, A. Sahin, U. Braun et al. // Schweizer Archiv für Tierheilkunde. — 1997. — Vol. 139. — P. 201—209.

11. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in Lakes / J.A. Vaitomaa, K. Rantala, T. Halinen et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69. — P. 7289—7297.

12. Quелlette A. Toxic *Microcystis* is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxic genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities / A. Quелlette, S. Handy, S. Wilhelm // Microb. Ecol. — 2006. — Vol. 51. — P. 154—165.

13. Sivonen K. A quite to their public health consequences, monitoring and management / K. Sivonen, G. Jones // Toxic cyanobacteria in water. — London: E&FN Spon, 1999. — P. 41—111.