

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОБНАРУЖЕНИЕ МИКРОЦИСТИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *MICROCYSTIS*, *PLANKTOTHRIX* И *DOLICHOSPERMUM* С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПРАЙМЕРНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНОВ *mscY*

© 2023 г. С. И. Сиделев*

Ярославский государственный университет, Ярославль, 150057 Россия

*e-mail: Sidelev@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 22.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

На основе мультипраймерной ПЦР разработан способ одновременной молекулярной детекции продуцентов микроцистинов — планктонных цианобактерий родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum*. Отобраны три пары родоспецифичных праймеров для амплификации генов *mscY* биосинтеза микроцистинов; четвертая пара праймеров использована для амплификации межгенного спейсера (IGS) *cpcBA*, служащего внутренним положительным контролем присутствия цианобактериальной ДНК в анализируемых образцах. Успешно амплифицированы четыре ПЦР-продукта ожидаемого размера с использованием смеси матриц ДНК микроцистин-продуцирующих штаммов *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* и природных колоний *Dolichospermum lemmermannii*, а также матрицы “природной” ДНК из озерного планктона. Предлагаемый способ может найти применение для разработки удобных тест-систем мониторинга водоемов с целью предотвращения и/или оценки риска накопления опасных цианобактериальных токсинов.

Ключевые слова: гены *mscY*, микроцистины, мультипраймерная ПЦР, цианобактерии

DOI: 10.31857/S0026365622600420, **EDN:** NMQRUZ

Токсичные цианобактериальные цветения, вызванные неконтролируемым антропогенным загрязнением водоемов фосфором и азотом, весьма распространены (Toxic Cyanobacteria..., 2021). В пресной воде чаще всего встречаются гепатотоксичные микроцистины (МС). Они относятся к классу циклических пептидов и имеют общую структуру: цикло-(DAla-X-DMeAsp-Z-AddA-DGlu-Mdha), где DAla — D-аланин, X и Z — L-аминокислоты (лейцин, аргинин и др.), DMeAsp — D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, AddA — (2S,3S,8S,9S)-3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота, DGlu — D-глутаминовая кислота и Mdha — N-метилдегидроаланин. МС продуцируются планктонными цианобактериями из родов *Microcystis*, *Dolichospermum* и *Planktothrix*; неоднократно были описаны случаи массового отравления животных и людей, в том числе со смертельным исходом (Toxic Cyanobacteria..., 2021).

В отношении биологической активности МС являются ингибиторами эукариотических протенинфосфатаз 1 и 2A; они вызывают окислительный стресс с разрушением гепатоцитов, а также служат канцерогенными и мутагенными факторами (Toxic Cyanobacteria..., 2021). Из-за их чрезвычай-

но высокой токсичности ВОЗ ввела безопасный норматив содержания МС-LR в питьевой воде — 1 мкг/л, который был недавно утвержден СанПиНом РФ 1.2.3685-21 в качестве ПДК для поверхностных водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.

Генетические основы биосинтеза МС хорошо изучены. Кластер генов микроцистинсинтетаз (*mscY*) обнаружен и секвенирован, в частности, у представителей родов *Microcystis* (Tillett et al., 2000), *Planktothrix* (Christiansen et al., 2003) и *Dolichospermum* (Rouhiainen et al., 2004). МС синтезируются мультиферментным комплексом, состоящим из пептидсинтетаз (NRPS), поликетидсинтаз (PKS) и ряда модифицирующих ферментов. Он осуществляет активацию, модификацию и включение аминокислот в состав молекул МС. Кластер генов *mscY* *M. aeruginosa* имеет размер 55 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и состоит из 10 генов, объединенных в опероны *mscYABC* и *mscYDEFGHIJ*, которые транскрибируются в противоположных направлениях от промоторного участка, расположенного между генами *mscA* и *mscD* (Tillett et al., 2000). Установлено (Molecular Tools..., 2017), что кластеры *mscY* у вышеуказанных родов цианобактерий

различаются как в расположении и количестве, так и в нуклеотидных последовательностях генов. Это заложило основу для разработки способов обнаружения токсичных цианобактерий в природных образцах с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Таксономическое определение продуцентов МС играет важную роль во всех существующих программах контроля и предупреждения вредоносных цианобактериальных цветений (англ. cyanobacterial Harmful Algal Blooms), притом что токсигенные и нетоксигенные штаммы цианобактерий морфологически не отличаются друг от друга (Molecular Tools..., 2017). После идентификации потенциальных продуцентов МС рекомендуется мониторинг их природного развития, особенно в водоемах питьевого назначения, с использованием доступных и дешевых методов, таких как световая микроскопия (Toxic Cyanobacteria..., 2021).

Одно время единственным способом диагностики потенциальных продуцентов МС было выделение штаммов из природных образцов и подтверждение этого свойства в культуре. Однако для рутинного экологического мониторинга данный подход слишком трудоемок.

Диагностика планктонных продуцентов МС на уровне рода без выделения и культивирования штаммов стала возможной благодаря использованию родоспецифичных праймеров для амплификации генов биосинтеза МС с использованием матрицы природной ДНК (англ. environmental DNA). Для молекулярной детекции МС-продуцирующих цианобактерий в обход их таксономической идентификации разработано и апробировано много надежных протоколов монопраймерной ПЦР (Molecular Tools..., 2017).

В настоящей работе исследована возможность одновременной идентификации в природных образцах продуцентов МС из родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum* с использованием мультипраймерной амплификации генов *mcu*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализируемые объекты. МС-продуцирующие коллекционные штаммы *M. aeruginosa* (PCC 7806) и *P. agardhii* (NIVA-CYA 126/8) были любезно предоставлены профессором Элькой Диттманн (Университет Потсдама, Германия) и выращивались в питательной среде BG11 (Rippka et al., 1979) при температуре 25°C и 12-часовом световом периоде (плотность потока ФАР 30 мкмоль квантов $m^{-2} s^{-1}$). Природные колонии *D. lemmermannii* были изолированы из планктона оз. Рюмниково (Ярославская обл.) согласно методике, описанной в работе (Kurmayer, 2017), и использовались для выделения из них ДНК.

“Природная” ДНК была выделена из планктона водоемов, в которых ранее (Сиделев, 2014; Chernova et al., 2020): а) были обнаружены МС-продуцирующие представители родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum* с помощью молекулярных методов; б) были детектированы эти токсины в биомассе фитопланктона и в воде с помощью хромато-масс-спектрометрии.

Выделение ДНК. Препараты ДНК были выделены сорбционным методом с помощью набора Diatom DNA Prep 200 (“Лаборатория Изоген”, Россия) согласно инструкции производителя.

Подбор праймеров. Ключевым критерием подбора праймеров из имеющихся в свободном доступе была их специфичность в отношении генов *mcu* *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum*. Причем были отобраны те пары праймеров, специфичность которых ранее была доказана как для культивируемых штаммов МС-продуцирующих цианобактерий, так и образцов планктона (Vaitomaa et al., 2003; Ouahid et al., 2005; Ostermaier, Kurmayer, 2009). Кроме того, при подборе праймеров были учтены различия в температуре плавления и размерах ПЦР-продуктов. Все праймеры были проанализированы с помощью программы OligoAnalyzer 1.0.2 (“Teemu Kuulasmaa”, Финляндия) на возможность образования вторичных структур (гомо- и гетеродимеров, шпилек) при проведении мультиплексной ПЦР. В итоге для мультипраймерной амплификации генов *mcu* были отобраны три пары родоспецифичных праймеров. В качестве внутреннего положительного контроля присутствия в образцах цианобактериальной ДНК была использована четвертая пара праймеров – PCβF/PCαR, специфичных для спейсера *srcBA-IGS* между генами *srcA* и *srcB* (Neilan et al., 1995), участвующими в синтезе фикоцианина (табл. 1).

Условия проведения ПЦР. Реакция амплификации была проведена с использованием набора GenPak PCR Core (“Лаборатория Изоген”, Россия). Реакционная смесь объемом 40 мкл содержала по 2 мкл ДНК (исходная концентрация 10–100 нг/мкл) и 2 мкл каждого из праймеров (10 пкмоль/мкл). Программа амплификации: предварительная денатурация – 95°C/3 мин; 37 циклов амплификации – 95°C/30 с, 58°C/30 с, 72°C/1 мин; элонгация – 72°C/10 мин. Продукты ПЦР (ампликоны) были разделены методом электрофореза в геле 2%-ной агарозы и визуализированы в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведения мультипраймерной амплификации генов *mcu* приведены на рис. 1. На дорожке 1 находятся полосы, соответствующие четырем ампликонам ожидаемых размеров, полученным из смеси ДНК *M. aeruginosa* PCC 7806,

Таблица 1. Общие сведения о мультипраймерной амплификации трех генов *msc* и межгенного спейсера *cpcBA*-IGS

Аmplифицируемый ген	Пара праймеров	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Температура отжига, °C	Размер ампликона, п.н.
<i>mscD</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Microcystis</i>)	PKDF2 PKDR2	AGTTATTCTCCTCAAGCC CATTCGTTCCACTAAATCC (Ouahid et al., 2005)	52	859
<i>mscB</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Planktothrix</i>)	<i>mscBA1F</i> <i>mscBA1R</i>	ATTGCCGTTATCTCAAGCGAG TGCTGAAAAAAGTCTGCATTAA (Ostermaier, Kurmayer, 2009)	60	76
<i>mscE</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Dolichospermum</i>)	<i>mscEF2</i> AnamcyE-12R	GAAATTTGTGTAGAAAGGTGC CAATCTCGGTATAGCGGC (Vaitomaa et al., 2003)	58	250
<i>cpcBA</i> -IGS (у фикоцианин-содержащих цианобактерий)	PCβF PCαR	GGCTGCTTGTTTACGCGACA CCAGTACCACCAGCAACTAA (Neilan et al., 1995)	55	685

P. agardhii NIVA—CYA 126/8 и *D. lemmermannii*. Такой же результат был получен для “природной” ДНК (дорожка 6). Для сравнения приведены результаты независимо проведенных (в четырех ПЦР-системах) амплификаций ДНК разных МС-продуцирующих цианобактерий (дорожки 2–5).

Ранее были предприняты успешные попытки мультипраймерной амплификации генов *msc* с детекцией результатов методом гель-электрофореза (Ouahid et al., 2005; Valério et al., 2010). Однако эти исследования проводились с целью повы-

шения надежности обнаружения продуцентов МС за счет амплификации в одной реакционной пробирке нескольких генов из кластера *msc*. В настоящей работе продемонстрирована возможность идентификации родов МС-продуцирующих цианобактерий в ходе одной мультипраймерной ПЦР. Подобный подход по сравнению с монопраймерной ПЦР удобен тем, что значительно экономит реактивы и сокращает время получения результата при проведении экологического мониторинга токсичных цианобактерий.

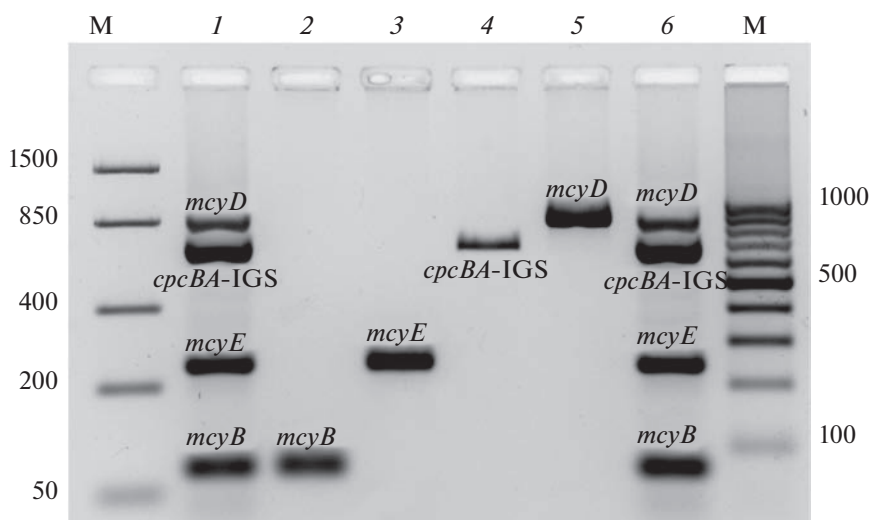


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов мультипраймерной амплификации трех генов *msc* и межгенного спейсера *cpcBA*-IGS. Дорожки: 1 – ампликоны *cpcBA*-IGS и трех генов биосинтеза МС *P. agardhii*, *M. aeruginosa* и *D. lemmermannii*; 2 – ампликон гена *mscB* *P. agardhii*; 3 – ампликон гена *mscE* *D. lemmermannii*; 4 – ампликон *cpcBA*-IGS; 5 – ампликон гена *mscD* *M. aeruginosa*; 6 – ампликоны *cpcBA*-IGS и трех генов биосинтеза МС “природной” ДНК. М – маркер молекулярной массы (п.н.).

Таким образом, на основе мультиплексной ПЦР разработан эффективный способ одновременной молекулярной детекции продуцентов МС — цианобактерий родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum*. Данный способ может найти применение для разработки удобных тест-систем мониторинга водоемов с целью предотвращения и/или оценки риска накопления опасных цианобактериальных токсинов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы развития ЯрГУ (НИР № Р2-GL3-2022 “Молекулярно-генетические исследования, оценка физиолого-биохимического статуса и биотехнологического потенциала живых систем”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сиделев С.И. Молекулярно-генетическая идентификация микроцистин-продуцирующих таксонов цианобактерий в озере Неро (Россия) // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 626–628.
- Sidelev S.I. Molecular genetics identification of microcystin-producing cyanobacteria taxa in Lake Nero (Russia) // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 709–711.
- Chernova E., Sidelev S., Russkikh I., Korneva L., Solovyova V., Mineeva N., Stepanova I., Zhakovskaya Z. Spatial distribution of cyanotoxins and ratios of microcystin to biomass indicators in the reservoirs of the Volga, Kama and Don rivers, the European part of Russia // Limnologica. 2020. V. 84. Art. 125819.
- Christiansen G., Fastner J., Erhard M., Börner T., Dittmann E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 564–572.
- Molecular Tools for Detection and Quantification of Toxic Cyanobacteria / Eds. Kurmayer R., Sivonen K., Wilmotte A., Salmaso N. Hoboken, NJ: Wiley, 2017. 402 p.
- Kurmayer R. Isolation of single cyanobacteria colonies/filaments // Molecular Tools for Detection and Quantification of Toxic Cyanobacteria / Eds. Kurmayer R., Sivonen K., Wilmotte A., Salmaso N. Hoboken, NJ: Wiley, 2017. P. 32–34.
- Neilan B., Jacobs D., Goodman A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 3875–3883.
- Ostermaier V., Kurmayer R. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps // Microb. Ecol. 2009. V. 58. P. 323–333.
- Ouahid Y., Pérez-Silva G., del Campo F.F. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions // Environ. Toxicol. 2005. V. 20. P. 235–242.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 111. P. 1–61.
- Rouhiainen L., Vakkilainen T., Siemer B.L., Buikema W., Haselkorn R., Sivonen K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* Strain 90 // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 686–692.
- Tillett D., Dittmann E., Erhard M., von Döhren H., Börner T., Neilan B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide polyketide synthetase system // Chem. Biol. 2000. V. 7. P. 753–764.
- Toxic Cyanobacteria in Water / Eds. Chorus I., Welker M. Boca Raton: CRC Press, 2021. 839 p.
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K., Rouhiainen L., Tallberg P., Møkelke L., Sivonen K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase gene *E* copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 7289–7297.
- Valério E., Chambel L., Paulino S., Faria N., Pereira P., Tenreiro R. Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples // Environ. Toxicol. 2010. V. 25. P. 251–260.

Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria *Microcystis*, *Planktothrix*, and *Dolichospermum* Using Multiprimer Amplification of the *mcy* Genes

S. I. Sidelev*

Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150057 Russia

*e-mail: Sidelev@mail.ru

Received May 19, 2022; revised June 22, 2022; accepted June 24, 2022

Abstract—A multiprimer PCR-based technique for the joint molecular detection of microcystin-producing planktonic cyanobacteria of the genera *Microcystis*, *Planktothrix* and *Dolichospermum* was developed. To amplify the *mcy* genes of microcystin biosynthesis, three pairs of genus-specific primers were selected, while the

fourth pair was used to amplify the inter-gene spacer (IGS) *cpcBA* acting as an inner positive control for the presence of cyanobacterial DNA in the analyzed samples. Four PCR products of predicted size were successfully amplified using a mixture of DNA templates isolated from microcystin-producing strains of *M. aeruginosa*, *P. agardhii*, and field colonies of *D. lemmermannii* colonies retrieved from the environment, as well as an environmental DNA template from lake plankton. The proposed multiprimer PCR-based approach may be used to design convenient test systems for monitoring aquatic ecosystems to prevent and/or assess the risk of accumulation of harmful cyanobacterial toxins.

Keywords: *mcy* genes, microcystins, multiprimer PCR, cyanobacteria