

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) *srcBA*, 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 (MC). 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. MC 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 MC являются ингибиторами эукариотических протейнфосфатаз 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 MC-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 MC хорошо изучены. Кластер генов микроцистинсинтеза (*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). MC синтезируются мультиферментным комплексом, состоящим из пептидсинтез (NRPS), поликетидсинтаз (PKS) и ряда модифицирующих ферментов. Он осуществляет активацию, модификацию и включение аминокислот в состав молекул MC. 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 *mscYA* и *mscYD* (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 *msc*.

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 м⁻² с⁻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 *msc* *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 *msc* были отобраны три пары родоспецифичных праймеров. В качестве внутреннего положительного контроля присутствия в образцах цианобактериальной ДНК была использована четвертая пара праймеров – РСβF/РСαR, специфичных для спейсера *srcVA-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 *msc* 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, °С	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>mscB</i> A1F <i>mscB</i> A1R	ATTGCCGTTATCTCAAGCGAG TGCTGAAAAAAGCTGCTGCATTA (Ostermaier, Kurmayer, 2009)	60	76
<i>mscE</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Dolichospermum</i>)	<i>mscE</i> F2 Anam <i>mscE</i> -12R	GAAATTTGTGTAGAAAGGTGC CAATCTCGGTATAGCGGC (Vaitooma 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.

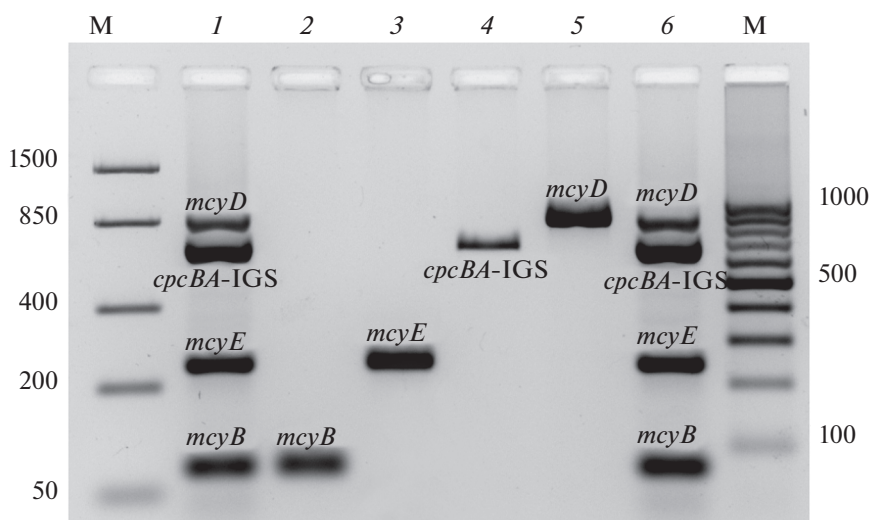


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов мультипраймерной амплификации трех генов *msc* и межгенного спейсера *cpcBA*-IGS. Дорожки: 1 – ампликоны *cpcBA*-IGS и трех генов биосинтеза МС *P. agardhii*, *M. aeruginosa* и *D. lemmermannii*; 2 – ампликон гена *mscB* *P. agardhii*; 3 – ампликон гена *mscE* *D. 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., Mokolke 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