

УДК(582.232:502.1)581.524.13

А.В. КУРЕЙШЕВИЧ¹, Л.П. ЯРМОШЕНКО¹, Н.И. КИРПЕНКО¹, О.И. БЕЛЫХ²,
Е.Г. СОРОКОВИКОВА²¹Институт гидробиологии НАН Украины
пр-т Героев Сталинграда 12, Киев 04210²Лимнологический Институт Сибирского отделения РАН
ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, а/я 278, 664033, Россия

К ВОПРОСУ О ФАКТОРАХ, СПОСОБСТВУЮЩИХ РАЗВИТИЮ ТОКСИЧНЫХ ВИДОВ ЦИАНОФЫТЫ

Ген *msuE* синтеза микроцистина был выявлен в 66,7% исследованных синезеленых водорослей, отобранных в разнотипных водных объектах Украины во время их массового развития. Чаще он обнаруживался в полидоминантных сообществах по сравнению с монодоминантными.

Ключевые слова: синезеленые водоросли, микроцистин, монодоминантные и полидоминантные сообщества

Массовое развитие Cyanophyta (Cyanobacteria, Cyanoprokaryota) сопровождается появлением в воде их метаболитов, в том числе альготоксинов. Среди последних высокой токсичностью для гидробионтов, теплокровных животных и человека отличаются микроцистины – гепатотоксичные циклические пептиды. Они способны продуцировать водоросли pp. *Microcystis* (Kütz.), *Anabaena* Bory ex Born. ex Flach., *Planktothrix* An. et Kom., *Nostoc* Vauch. ex Born. ex Flach., *Anabaenopsis* (Wolosz.) Mill., *Hapalosiphon* Näg. и др. [7]. Один и тот же вид может быть представлен как токсичными, так и не токсичными штаммами, которые невозможно различить под микроскопом [2]. Выделению, идентификации и исследованию свойств токсинов посвящено немало работ, однако до сих пор не установлены факторы, способствующие появлению в альгосообществах токсичных или потенциально токсичных синезеленых водорослей. В среднем в 59% случаев “цветение” воды Cyanophyta оказывается токсичным [5]. В последнее время для определения потенциально токсичных синезеленых водорослей все шире используют молекулярно-филогенетические методы, позволяющие еще до появления токсинов в воде в количествах, которые улавливаются аналитическими методами, установить наличие у вегетирующих Cyanophyta генов, ответственные за продукцию токсинов.

Цель работы – выявление методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) потенциально токсичных синезеленых водорослей в разнотипных водоемах Украины, а также анализ структуры альгосообществ и некоторых гидрохимических показателей, сопутствующих их развитию.

Материал и методы исследований

Образцы для анализов отбирали на отдельных участках Киевского, Каневского и Кременчугского водохранилищ, в озерах и прудах, Русановском канале г. Киева, некоторых рыбоводных прудах в период массового развития Cyanophyta в июле–начале сентября 2009 г.

Обработку проб фитопланктона, метафитона и перифитона осуществляли по общепринятым методикам [3]. Идентификацию видов водорослей здійснювали с использованием оптического микроскопа Axio Imager A1 фирмы „Carl Zeiss” (Институт гидробиологии НАН Украины).

Содержание в воде нитратного, нитритного, аммонийного азота, а также минерального растворенного фосфора, величину бихроматной окисляемости устанавливали стандартными гидрохимическими методами [1] после фильтрования проб через мембранные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм).

Для выполнения молекулярно-генетического анализа выбраны генетические маркеры к генам синтеза токсинов, в первую очередь микроцистинов – основных и наиболее распространенных цианотоксинов. Синтез микроцистинов осуществляется большим мультиферментным комплексом (микроцистин-синтетаза), кодируемым кластером генов *msuABCDEFGHIJ* [6] В настоящей работе в качестве маркера были использованы праймеры (Нер) к домену аминотрансферазы (АМТ) *msuE*-гена. Аминотрансфераза входит в состав всех известных микроцистин-синтез и играет ключевую роль в биосинтезе микроцистинов, выполняя перенос аминокислоты на Adda мотив [6]. АМТ-домен

найден у *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia* Mert. ex Born. et Flach., *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium* Kütz., содержащихся в пробах из разных водоемов, причем наличие АМТ-домена положительно коррелировало с продукцией микроцистинов [4].

Результаты исследований и их обсуждение

Ранее с помощью ПЦР-анализа и праймеров к генам *mscA* и *mscE* был исследован фитопланктон оз. Байкал и водохранилищ ангарского каскада. В Усть-Илимском водохранилище присутствие *mscA*-гена выявлено у *Microcystis aeruginosa*, в Братском – найдена *Anabaena* sp., содержащая *mscE*-ген. В фитопланктоне Байкала указанные гены не обнаружены [2].

Анализ альгосообществ водоемов Украины показал, что из 18 исследованных проб АМТ-домен *mscE*-гена обнаружен в 12 (табл. 1). Присутствие в пробах фитопланктона токсичных либо потенциально токсичных видов *Cyanophyta* не зависело от типа водного объекта. Гены синтеза микроцистинов были найдены в фитопланктоне днепровских водохранилищ и их заливов, озер, прудов г. Киева, рыбоводных прудов, а также Русановского канала. В исследованных точках водохранилищ структура фитопланктона была полидоминантной. В исследуемых прудах и озерах она имела монодоминантный характер. *Cyanophyta* были представлены: *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend Elenk., *M. pulverea* (Wood) Forti emend. Elenk., *M. wesenbergii* Komarek, *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs., *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb., *Romeria gracilis* Koczw., *Merismopedia tenuissima* Lemm., *Lyngbya limnetica* Lemm., *L. intermedia* Gardn., а также представителями рр. *Phormidium*, *Oscillatoria* Vauch. и *Gomphosphaeria* (Ag.) Ehr.

Таблица 1

Результаты анализов проб, отобранных во время массового развития *Cyanophyta*, на наличие гена синтеза токсинов *mscE* с праймерами НерF и НерR

Характеристика и место отбора проб	Дата	Результат ПЦР с Нер-праймерами
Перифитон, водоём-охладитель Хмельницької АЕС	26.06.09	–
Фитопланктон, рыбоводный пруд, г. Канев, верхний участок Кременчугского в-ща	11.08.09	–
Метафитон, нижний участок Каневского в-ща, юго- западное побережье урочища Змеиных о-вов	11.08.09.	–
Нагонные скопления <i>Cyanophyta</i> , нижний участок Каневского в-ща, северное побережье лиманного хозяйства у берега Змеиных о-вов	11.08.09.	–
Пленка водорослей, нижний участок Каневского в-ща, шлюз между лиманным хозяйством и Змеиными о-вами	11.08.09.	+
Пленка синезеленых водорослей, верхний бьеф Каневской ГЭС, дамба, левый берег	11.08.09	+
Пленка водорослей, верхний участок Кременчуг-ского в-ща, у пристани г. Канева	11.08.09	+
Фитопланктон, нижний участок Киевского в-ща, с. Лютеж, пелагиаль	29.07.09	–
Фитопланктон, нижний участок Киевского в-ща, с. Лютеж, литораль	27.08.09.	+
Фитопланктон, нижний участок Киевского в-ща, с. Лютеж, литораль	29.08.09	+
Пленка водорослей у берега, залив Оболонь Каневского в-ща	28.08.09	+
Пленка водорослей у берега, залив Каневского в-ща, в р-не о. Теличка	1.09.09	+
Пленка, залив Вовкуватый Каневского в-ща	2.09.09	+
Пленка водорослей, оз. Луговое (Киев)	3.09.09	–
Пленка водорослей, Русановский канал (Киев)	4.09.09	+
Пленка водорослей у берега, пруд Бетонный (ул. Булгакова, Киев)	6.09.09	+
Фитопланктон, рыбоводный пруд у с. Мирозко в Киево-Святошинском р-не, пгт. Ворзель	7.09.09	+
Пленка водорослей у берега, оз. Выдубецкое (Киев)	8.09.09	+

Установлено, что *mscE*-ген чаще обнаруживался в фитопланктоне, структура которого имела полидоминантный характер, в то же время в монодоминантных сообществах он не был выявлен. В частности, в пробе фитопланктона из нижнего участка Каневского водохранилища в районе

лиманного хозяйства в прибрежных скоплениях Cyanophyta, представленных практически одним *Microcystis aeruginosa*, гены синтеза микроцистина не обнаружены. Не найден *mcyE*-ген также в фитопланктоне оз. Лугового, где абсолютным доминантом в альгосообществе был *Aphanizomenon flos-aquae*. Его численность составляла 99,9% от общей, а биомасса – 99,6%. Гены синтеза микроцистина, по литературным данным, у *A. flos-aquae* не известны.

В перифитоне бетонных откосов отводного канала водоема-охладителя Хмельницкой АЭС вегетировало сообщество с доминированием *Lyngbya limnetica* и *L. intermedia*. Эти виды были выделены в культуру и проанализированы с помощью ПЦР - анализа, который показал отсутствие *mcyE* гена. Не обнаружены гены синтеза микроцистина также в фитопланктоне рыбоводного пруда в районе г. Канева, где по численности доминировала *Merismopedia tenuissima* (87,5 %), а по биомассе – динофитовая водоросль *Sphaerodinium cinctum* (Ehr.) Wolosz. (70,5%) и *M. tenuissima* (9,5%). В пробе метафитона, отобранной в нижнем участке Каневского водохранилища, в макроскопических объемных колониях, где доминировала *Anabaena flos-aquae*, выявлено 14 видов водорослей, которые принадлежали к Cyanophyta (4), Chlorophyta (2) и Bacillariophyta (8). Синезеленые были представлены *M. aeruginosa*, *M. pulverea*, видами родов *Merismopedia* и *Gomphosphaeria*. Ген синтеза микроцистина *mcyE* в пробе не был обнаружен. Это, на наш взгляд, закономерно, учитывая, скорее не антагонистические, а синергические отношения между водорослями в метафитоне.

Ген синтеза микроцистина *mcyE* присутствовал в двух пробах фитопланктона Киевского водохранилища, отобранных у берега в районе с. Лютеж в августе. В то же время в пробе из пелагиали водохранилища (июль) потенциально токсичные виды не обнаружены. Состав фитопланктона этих проб существенно не отличался. Не исключено, что появление токсичных видов водорослей в литорали водохранилища могло быть связано с негативным аллелопатическим влиянием высших водных растений на представителей Cyanophyta.

Исследования показали (табл. 2), что в пробах, где обнаружены токсигенные виды, в среднем была выше бихроматная окисляемость воды и ниже (в 2 раза) отношение содержания аммонийного азота к нитратному ($N_{ам} / N_{нитр}$), а также соотношение концентраций растворенного минерального азота и фосфора – N/P (в 1,35 раза), по сравнению с теми образцами, где ген *mcyE* не был выявлен.

Таблица 2

Сравнительная характеристика гидрохимических показателей проб с наличием (+) или отсутствием (-) гена синтеза микроцистина *mcyE*

Ген <i>mcyE</i>	pH	БО, мг O ₂ /дм ³	$\Sigma N_{мин}$, мг N/дм ³	$N_{ам}/N_{нитр}$	P-PO ₄ ³⁻ , мг P/дм ³	N/P
+	<u>7,3–9,3</u> 8,3	<u>0,3–100,0</u> 50,9	<u>0,37–1,05</u> 0,51	<u>1,0–6,3</u> 2,4	<u>0,05–0,20</u> 0,13	<u>2,0–10,1</u> 4,9
-	<u>8,26–8,5</u> 8,3	<u>5,3–33,0</u> 14,5	<u>0,38–1,00</u> 0,62	<u>2,5–7,9</u> 4,9	<u>0,06–0,16</u> 0,11	<u>2,8–10,7</u> 6,6

Примечание: в числителе – пределы, в знаменателе – среднее; $N_{ам} / N_{нитр}$ – отношение концентраций аммонийного и нитратного азота.

Высокое содержание минерального растворенного фосфора в воде, низкое отношение азота к фосфору свидетельствует о лимитировании развития водорослей по азоту. Это может усиливать антагонистические взаимоотношения между ними и выживание в этих условиях видов с сильным аллелопатическим потенциалом, а также способствовать экспрессии генов токсичности и синтезу токсинов.

Выводы

1. Ген синтеза микроцистина *mcyE* был обнаружен в большинстве исследуемых проб – 66,7%. Наличие его в фитопланктоне во время “цветения” воды Cyanophyta не зависело от типа водного объекта.
2. Ген *mcyE* чаще обнаруживался в полидоминантных сообществах по сравнению с монодоминантными, что может быть связано с участием микроцистина в аллелопатических взаимоотношениях между видами.
3. В образцах, где обнаружены токсигенные виды Cyanophyta, бихроматная окисляемость воды была выше, а отношение содержания аммонийного азота к нитратному ($N_{ам} / N_{нитр}$) и соотношение концентраций растворенного минерального азота и фосфора (N/P) ниже, по сравнению с теми образцами, где ген *mcyE* не был выявлен.

Робота виконана при підтримці грантов ДФФІ-РФФД - 2009, № 28.6/013, РФФІ № 10-04-01613а, № 09-04-90420 -Укр_а и МК-1239.2010.4.

1. *Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши* / под ред. А.Д. Семёнова. – Л.: Гидрометеиздат, 1977. – 542 с.
2. 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. РАН. – 2006. – Т. 409, № 3. – С. 425–427.
3. *Топачевский А.В.* Пресноводные водоросли Украинской ССР / Топачевский А.В., Масюк Н.П.. – К.: Вища школа, 1984. – 333 с.
4. *Jungblut A.D.* Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria / Jungblut A.D., Neilan A.B. // Arch. Microbiol. – 2006. – Vol. 185. – P. 107–114.
5. *Sivonen K.* Cyanobacterial toxins / K. Sivonen, G. Jones // Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management / Eds. I. Chorus, J. Bartram: EFN Spon. – London, 1999. – P. 41–111.
6. *Tillett D.* Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system / D. Tillett, E. Dittmann, M. Erhard, H. von Dohren [et al.] / Chem Biol. – 2000. – Vol. 7. – P. 753–764.
7. *Welker M.* Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis / M. Welker // FEMS Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 30. – P. 530–563.

А.В. Курейшев¹, Л.П. Ярмошенко¹, Н.І. Кірпенко¹, О.І. Белих², Е.Г. Сороковікова²

¹Інститут гідробіології НАН України, Київ

²Лімнологічний інститут Сибірського відділення РАН, Іркутськ, Росія

ДО ПИТАННЯ ПРО ЧИННИКИ, ЩО СПРИЯЮТЬ РОЗВИТКУ ТОКСИЧНИХ ВИДІВ СЬАНОРНУТА

Ген *mcyE* синтезу мікроцистину було зафіксовано у 66,7% досліджуваних проб, відібраних у різномісних водних об'єктах України під час масового розвитку синьо-зелених водоростей. Він частіше виявлявся в полідомінантних угрупованнях порівняно з монодомінантними.

Ключові слова: синьо-зелені водорості, мікроцистин, монодомінантні і полідомінантні угруповання

A.V. Kureyshevich¹, L.P. Yarmoshenko¹, N.I. Kirpenko¹, O.I. Belich², E.G. Sorokovikova²

¹ Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv

² Limnology Institute of the Siberian Separation of RAS, Irkutsk, Russia

TO QUESTION ABOUT FACTORS WHICH ASSIST TO DEVELOPMENT OF TOXIC TYPES OF CYANOPHYTA

The gene *mcyE* of microcystin synthesis was detected in 66,7% investigated samples collected from the different water bodies of Ukraine during the mass development of blue green algae. It was revealed more often in polydominant communities than in monodominant ones.

Key words: blue green algae, microcystin monodominant and polydominant communities

УДК [504.064.36:574]

Л.А. КУЧАЙ, Е.Н. СОКОЛОВА

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

пос. Борок Некоузского р-на, Ярославская обл., 152742, Россия

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ЭКОСИСТЕМЫ (НА ПРИМЕРЕ ОЗЕРА НЕРО)

В работе рассматривается возможность использования функции желательности для нормирования характеристик водоема с целью оценки состояния его экосистемы на примере озера Неро. Используется функция желательности Харрингтона. Составлена таблица экологических норм для первичной продукции, хлорофилла *a*, биогенных элементов и органического вещества.

Ключевые слова: экосистема, экологическое нормирование, функция желательности