

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2018, 28(4): 409–427

<https://doi.org/10.15407/alg28.04.409>

БАХАРЕЙ НОВРУЗИ¹, САУЛ БЛАНКО², ТАХИР НЕДЖАДСАТТАРИ¹

¹ Кафедра биологии, научно-исследовательское отделение,
Исламский университет Азад, Тегеран, Иран

² Лаборатория диатомологии, Институт окружающей среды
Ла Серна, 58, Леон 24007, Испания

bahare77biol@yahoo.com

bahareh.nowruzji@srbiau.ac.ir

**ХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРИЗНАКИ ОТРАВЛЕНИЯ
УТОК АНАТОКСИНОМ-А, НОДУЛАРИНОМ И
КРИПТОФИЦИНОМ НА ПОБЕРЕЖЬЕ ОЗЕРА ШУРМАСТ
(ПРОВИНЦИЯ МАЗАНДАРАН, ИРАН)**

Исследовано влияние токсичности пресноводных бактерий в период цветения в оз. Шурмаст. Токсичные цианобактерии в водных экосистемах могут создавать серьезные проблемы, особенно в теплые летние месяцы. Неизбежный контакт водоплавающих птиц с прибрежными пятнами «цветения» может приводить к их гибели. Целью исследования было найти причину гибели домашней утки в окрестностях оз. Шурмаст в иранской провинции Мазандаран. Первичный осмотр позволил предположить, что птица погибла в результате отравления цианотоксином. В ее желудке были обнаружены цианобактерии, которые были выделены в культуру. Оказалось, что они представляют собой три разных таксона, которые были определены по морфологическим признакам как *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. и *Nodularia* sp. Для их изучения использовали филогенетический анализ на основе последовательности гена 16S рРНК, полимеразную цепную реакцию, метод молекулярной идентификации наиболее вероятных генов цианотоксинов, метод дисковой диффузии, жидкостную хроматографию, масс-спектрометрию. Полученные последовательности гена 16S рРНК, на основании которых было проведено молекулярно-филогенетическое исследование штаммов, были зарегистрированы в ГенБанке как *Anabaena* sp. BN KY303913, *Nodularia* sp. BN KY303914 и *Nostoc* sp. BN KY303912. В результате исследований обнаружено три группы потенциально биоактивных соединений (анатоксин-а, нодуларин и криптофицин), которые могли привести к гибели этого животного. Этот случай является первым документальным подтверждением токсичности пресноводных цианобактерий в период цветения водоема в Иране.

Ключевые слова: цианобактерии, анатоксин-а, криптофицин, нодуларин, гибель птицы, токсичность, озеро Шурмаст, Иран

© Бахарей Новрузи, Саул Бланко Ланца, Тахир Неджадсаттари, 2018

Введение

Цианобактерии часто вызывают «цветение» воды в водоемах по всему миру (Van Apeldoorn et al., 2007). Они обладают способностью продуцировать большое количество биологически активных соединений (Liu et al., 2015), в т. ч. ряд токсинов, вызывающих отравление животных (Sivonen, Jones, 1999; Sivonen, Börner, 2008). Люди и животные могут подвергаться воздействию этих токсичных соединений при плавании в загрязненной воде или используя такую воду для других целей. Проблема, связанная с «цветением» воды токсичными цианобактериями, заключается в том, что в период «цветения» токсичность воды может изменяться в течение нескольких дней, что затрудняет прогнозирование безопасности водоема.

Способность продуцировать токсины установлена для 40 из 150 родов цианобактерий; наиболее важными из них являются *Anabaena* (Onodera et al., 1997), *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* и *Oscillatoria* (Van Apeldoorn et al., 2007). Состав токсинов, вырабатываемых представителями различных родов, варьирует в широких пределах. В зависимости от химической структуры их делят на две категории: циклические пептидные гепатотоксины, к которым относятся микроцистины и нодуларины, и алкалоидные нейротоксины, как например, анатоксины и цилиндроспермопсины (Sivonen et al., 1992). Наиболее часто в период цианобактериального «цветения» в воде обнаруживают гепатотоксичные микроцистины и нодуларины, но нейротоксические анатоксины также часто являются причиной смерти животных (Sivonen et al., 1992). Впервые случай отравления животных цианотоксинами был задокументирован в Австралии (Francis, 1878). С тех пор подобные случаи регистрировали в разных странах (Sivonen, Jones, 1999), причем их частота возрастает; особенно часто от отравлений цианотоксинами страдают собаки (Edwards et al., 1992; Gugger et al., 2005; Cadel-Six et al., 2007; Wood et al., 2007; Nowruzzi et al., 2012, 2013). Цианотоксины опасны для здоровья и могут привести к смерти, главным образом из-за повреждения печени, при попадании их в организм через воду, зараженную продуктами жизнедеятельности цианобактерий (Msagati et al., 2006).

Целью работы было исследование причин гибели домашней утки, предположительно, в результате действия цианотоксинов. Идея заключалась в том, чтобы выделить цианобактерии, ставшие причиной «цветения» воды, провести их идентификацию, определить состав биологически активных веществ, которые они вырабатывают, а также проанализировать их способность продуцировать опасные соединения методом молекулярной идентификации наиболее вероятных генов цианотоксинов, таких как ген *nosF* криптофицинов, ген *anaC* анатоксина и ген *ndaF* нодуларинов, а также провести филогенетический анализ выделенных штаммов по последовательности гена 16S рРНК. Хотя ранее (Halinen et al., 2008) было показано, что

секвенирование гена *r*РНК 16S не выявляет токсичности штаммов цианобактерий, и даже сканирование генов, необходимых для производства токсинов, не определяет, действительно ли цианобактерии могут продуцировать токсины, настоящее исследование направлено на предварительное исследование антимикробной и токсической оценки пресноводных цианобактерий.

Материалы и методы

Выделение штаммов

Исследование проводили с августа 2015 г. по декабрь 2016 г. Уже 30 августа 2015 г. был зафиксирован случай гибели домашней утки (*Anas platyrhynchos*) после того, как она плавала в оз. Шурмаст, расположенном в провинции Мазандаран в Иране. Обстоятельства гибели животного указывали на отравление цианотоксином. Это была молодая особь длиной 21 см и весом 13 кг. Местные жители сообщили, что утка плавала в озере приблизительно 15–20 мин и спустя 20–30 мин погибла. В содержимом желудка были обнаружены цианобактерии. Их предварительное исследование показало, что это были представители трех различных таксонов, выделенные в культуру. Штаммы выращивали в колбах Эрленмейера объемом 400 мл в научно-исследовательском отделении коллекции культур Исламского Университета Азад. Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DM750. Для описания морфологии исследуемых штаммов были выбраны следующие признаки: форма и размеры интеркалярных и терминальных клеток, гетероцист и акинет; наличие или отсутствие конечных гетероцист; форма нитей и их скоплений (Rajaniemi et al., 2005). Для идентификации использовали определитель гетероцистных цианобактерий (Komárek et al., 2013).

Экстракция и количественная оценка ДНК

ДНК экстрагировали с помощью E.Z.N.A. SP Plant DNA Mini Kit Protocol (Omega Bio-Tek) в соответствии с инструкциями производителя. Перед экстракцией 121 мг собранных клеток разрушали с помощью FastPrep FP120 (Savant Instruments Inc.) в течение 50 с при скорости 6,5 м/с. Концентрацию ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.). На первой стадии экстракции ДНК осадок растворяли до 600 мкл буфера SP1 и 5 мкл раствора РНКазы А для лизиса клеток при 65 °С в течение 10 мин. В эппендорфскую пробирку добавляли два вида стеклянных шариков (диаметр 0,5 мм или меньше), чтобы увеличить пробой клеток, и экстракцию продолжали, как указано в инструкции к набору. Количество экстрагированной ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, Wilmington, США).

Молекулярное определение штаммов и филогенетическое исследование

Ген 16S рРНК амплифицировали с помощью праймеров 359F и 781 Ra (Nübel et al., 1997). Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали смесь из 5 мкл 10 х ПЦР-буфера, 1 мкл dNTP-смеси (10 мМ), 2,5 мкл прямого праймера (10 мкМ), 1,25 мкл обоих обратных праймеров (10 мкМ) 0,5 мкл ДНК-полимеразы (DyNAzyme, 2 U/мкл) и 1 мкл ДНК (100 нг/мкл). Объем регулировали стерильной водой, доводя его до 50 мкл с помощью программы PCR 1 (табл. 1). Амплифицированные продукты были обнаружены в 1,0%-ном агарозном геле, приготовленном в 0,5%-ном ТАЕ-буфере, содержащем 1 мкл бромида этидия. Образцы (3 мкл) и загрузочный краситель (3 мкл) пипетировали на один гель. Использовали 5 мкл маркера (Lambda DNA-Hind III/PhiX-174 RF DNA-HaeIII Digest, Fermentas, Burlington, CA). Количество амплифицированной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop. ПЦР-продукт очищали с помощью набора GENE CLEAN Turbo Kit в соответствии с инструкцией набора (MP Biomedicals, Калифорния, США). Очищенный ПЦР-продукт

Таблица 1

Программы ПЦР (PCR), использованные в работе

Программа ПЦР	Подогрев	Тепловой цикл	Цикл отжига	Цикл полимеразы	Конечная полимеразы	Конечная температура	Кол-во циклов
PCR 1 амплификация гена 16S рРНК	94 °С, 3 мин	94 °С, 30 с	55 °С, 30 с	72 °С, 30 с	72 °С, 5 мин	4 °С	30
PCR 2 секвенирование гена 16S рРНК	–	96 °С, 10 с	50 °С, 5 с	60 °С, 4 мин	–	4 °С	25
PCR 3 <i>ndaF</i> для <i>Nodularia, anaC</i> для <i>Anabaena</i> и <i>nosF</i> для <i>Nostoc</i>	95 °С, 3 мин	95 °С, 30 с	60 °С, 30 с	72 °С, 30 с	72 °С, 5 мин	4 °С	30

осаждали для секвенирования: 40 мкл раствора NaCl (0,125 М) добавляли к 10 мкл продукта ПЦР (полученный раствор содержал 50 нг ДНК/мкл), пипетировали в раствор 2,5 объема холодного этанола (100%) и центрифугировали (13 000 г, 10 мин, 4 °С). Супернатант удаляли, добавляя к продукту 5 объемов этанола (250 мкл) и снова центрифугировали (13 000 г, 5 мин, 4 °С). Затем супернатант осторожно удаляли из пробирки, а осадок сушили при 37 °С. Чтобы реакция была с цветом, добавляли 12 мкл формамида Hi-Di и в течение 2 мин инкубировали при 94 °С. Затем образцы секвенировали с помощью

генетического анализатора ABI PRISM™ 310 (Applied Biosciences, Carlsbad, USA) с программой PCR 2 (см. табл. 1).

Последовательность хроматограмм корректировали вручную с применением BioEdit версия 7.0. Полученные последовательности использовали для конструирования консенсусной последовательности, затем выравненную последовательность сравнивали с последовательностями в базе данных NCBI (Национальная медицинская библиотека, США) с использованием программы BLAST. Фрагмент гена 16S рРНК был выравнен по отношению к набору из 16S рРНК генов различных типов цианобактерий. Пробелы и неоднозначные данные в последовательностях были удалены с помощью BioEdit. Филогенетические деревья с применением анализа максимального правдоподобия были построены с помощью программного пакета MEGA5 (версия 5.0) и применения двухпараметрической модели Kimura. Устойчивость дерева оценивали по процентам бутстрепа с использованием 1000 повторов. В качестве аут группы использовали *Bacillus subtilis* (EF420247.1). В процесс выравнивания также были включены 16S рРНК последовательности *Gloeobacter violaceus* (AF132790.1), *G. violaceus* PCC 8105 (AF132791.1), *Chroococcidiopsis* sp. BB84.1 (AJ344554.1) и *Chroococcidiopsis* sp. BB82.3 (AJ344553.1).

Молекулярное определение потенциальных токсинов и биологически активных соединений цианобактерий

В штаммах обнаружили гены биосинтеза цианобактериальных токсинов: анатоксинов (ген *anaC*), нодулариинов (ген *ndaF*) и метилпролина (ген *nosF*). Экстракт ДНК разбавляли до ПЦР-воды до получения 50 нг ДНК/мкл. Разделение ДНК, положительный и отрицательный контроль были добавлены для ген-специфических мастер-смесей (Koskeniemi et al., 2007; Yinen-Rantala et al., 2011) (табл. 2).

Таблица 2

Ген-специфические мастер-смеси для различных реакций ПЦР, использованные для выявления генов токсинов и биологически активных соединений

PCR мастер-смесь	1 X буфер, мкл	Форвардный праймер 10 мкМ, мкл	Реверсный праймер 10 мкМ, мкл	DyNazyme 2 U/мкМ, мкл	dNTP-mix 10 мкМ, мкл	Величина образца, мкл	Величина ампликона, бр
<i>ndaF</i> из <i>Nodularia</i> sp.	2	0,7 (<i>ndaF</i> 8452)	0,7 (<i>ndaF</i> 8640)	0,5	0,13	20	188
<i>anaC</i> из <i>Anabaena</i> sp.	2	1,0 (<i>anaC</i>)	1,0 (<i>anaB</i>)	0,25	0,4	20	263
<i>nosF</i> из <i>Nostoc</i> sp.	2	1,0 (<i>nosF</i>)	1,0 (<i>nosR</i>)	0,2	0,4	20	1000

Использовали программы 1, 2 и 3 ПЦР (табл. 1). Продукт ПЦР анализировали в 1,5%-ном агарозном геле, приготовленном в 0,5 x TAE-буфера. Гель запускали в течение 40 мин при 80 В.

Биопробы

Токсичность трех выделенных штаммов анализировали методом дисковой диффузии. Он основан на кольце ингибирования, которое возникает из-за того, что тестовые микроорганизмы не растут на агаре вокруг анализируемого диска, содержащего токсин или антибиотики. Для биоанализа использовали штаммы *Aspergillus flavus* (Hambі 829), произрастающего на агаре Сабуро с декстрозой (Atlas 1993) при 28 °С, *Bacillus cereus* (Hambі 1881), растущем на TGY-агаре (Atlas 1993) при 28 °С и *Candida albicans* (Hambі 261), растущем в чашках на PDA-картофельном агаре с декстрозой (Atlas 1993) при 35 °С. Отдельные колонии из чашек помещали в физиологический раствор, так чтобы мутность соответствовала 0,5 стандарта мутности МакФарланда для *C. albicans* и *B. cereus*; для *A. flavus* величина OD составляла 0,09–0,11 при 530 нм.

Микроорганизмы из физиологического раствора высевали на МНА-пластины. На их поверхности размещали диски четырех видов. Один из них содержал 10 мкл нистатина и тетрациклина (1 мг/мкл, положительный контроль) для грибковых и бактериальных штаммов соответственно, и три диска содержали 100 мкл метанольного цианобактериального раствора, полученного путем центрифугирования культур при 7 000 g в течение 7 мин. Собранные клетки переносили в пробирку эппендорфа и сушили вымораживанием (Maxi dry plus, Heto-Holten A/S, Allerød, Дания) в течение ночи. Биомассу высушенных клеток измеряли, а затем из них экстрагировали биологически активные соединения путем добавления в микропробирку стеклянных шариков (диаметр 0,5 мм) и 1 мл метанола. Далее пробирку встряхивали с помощью прибора FastPrep (6,5 пробегов в течение 15 с) и центрифугировали при 20 000 g в течение 5 мин, чтобы выделить соединения в раствор метанола. МНА-пластины с *C. albicans* хранили при 35 °С в течение 24 ч, а МНА-пластины с *C. albicans*, *A. flavus* и *B. cereus* хранили при 28 °С в течение 48 ч.

LC-MS-анализ для идентификации биологически активных соединений

Для более точного определения качества биологически активных соединений в штаммах цианобактерий к 1 мл культуры каждого из штаммов добавляли 50 мкл муравьиной кислоты, затем в суспензию вносили стеклянные шарики диаметром 0,5 мм (Yinen-Rantala et al., 2011).

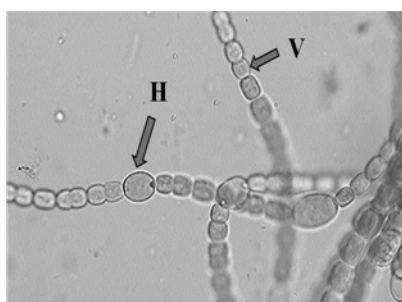
Образцы хранили при -20 °С. Перед анализом биоактивные соединения обрабатывали при помощи FastPrep (FP120; Bio101 Savant, Thermo Electron Corporation, Mitford, USA), чтобы разрушить клетки и высвободить биоактивные соединения в супернатант. Образец центри-

фугировали при 13 000 g в течение 5 мин, 20 мкл супернатанта разбавляли до 180 мкл ацетонитрила в стеклянной ампуле. Для обнаружения биоактивных соединений в стеклянную ампулу добавляли 200 мкл штамма, метанольный экстракт и закрывали колпачком. После подготовки все образцы анализировали с помощью LC-MS Agilent 1100 series LC/MSD Ion Trap XCT Plus System (Agilent Technologies, Пало-Альто, Калифорния, США).

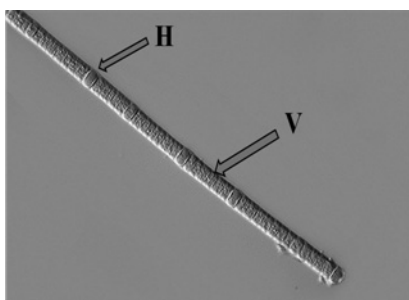
Результаты

Морфологические характеристики изученных цианобактериальных штаммов

Изоляты были идентифицированы как нитчатые цианобактериальные штаммы и классифицированы как представители семейства *Nostocaceae*. Первый штамм, имеющий бочонковидные вегетативные клетки, образующие прямую нить, был идентифицирован как *Anabaena* sp. Ни ложного ветвления, ни четкой слизистой оболочки вокруг трихомов не обнаружено. Вегетативные клетки содержали видимые гранулы, которые были темнее, чем остальная часть цитозоля. Гетероцисты не имели гранул и, казалось, имели более толстую клеточную стенку, чем вегетативные клетки. Второй штамм идентифицирован как *Nostoc* sp.



Anabaena sp. BN KY303913



Nodularia sp. BN KY303914



Nostoc sp. BN KY303912

Рис. 1. Микрофотографии штаммов токсичных цианобактерий, обнаруженных в желудке домашней утки с побережья оз. Шорумаст (провинция Мазандаран): V – вегетативные клетки, А – акинеты, Н – гетероцисты (400X)

Микроскопическое исследование показало, что вегетативные клетки в трихомах были сферическими, яйцевидными или цилиндрическими. В более длинных трихомах иногда наблюдались интеркалярные гетероцисты, а также акинеты. Третий штамм идентифицирован как *Nodularia* sp. Нити одиночные, неразветвленные, более-менее прямые. Клетки короткобочковидные, их длина не превышает ширины (рис. 1).

Секвенирование 16S рРНК и филогенетический анализ

Экстракция ДНК прошла успешно; в соответствии с величиной NanoDrop 260/280 нм, которая составляла 1,81, ПЦР-продукт был чистым и имел длину приблизительно 400 п.н. (рис. 2). Для выявления филогенетической взаимосвязи (рис. 3) мы использовали несколько последовательностей генов 16S рРНК штаммов *Anabaena* sp. BN KY303913, *Nodularia* sp. BN KY303914, *Nostoc* sp. BN KY303912. Консенсусное дерево (Bootstrap) было построено с использованием 1000 повторностей. Процент сходства родственных таксонов, образующих на дереве кластеры, отображается рядом с ветвями: 85%, 94% и 63% для *Nostoc*, *Anabaena* и *Nodularia* соответственно. Бутстрап конструировали с длиной ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для построения филогенетического дерева. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были устранены (рис. 3).

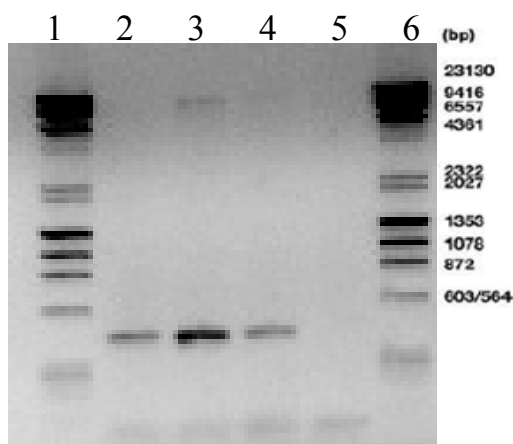


Рис. 2. Гель-экстракция ПЦР-продукта 16S рРНК

Среди использованных последовательностей гена 16S рРНК представителей родов *Nostoc*, *Nodularia* и *Anabaena* наибольшее сходство с изучаемыми штаммами имели последовательности штаммов *Nostoc muscorum* (HF678506.1), *Anabaena* sp. (KT290376.1, KT290372.1 и KT290372.1) и *Nodularia sphaerocarpa* (KC912767.1).

Наши данные подтверждают монофилетическое происхождение гетероцитных цианобактерий. Как видно из рис. 3, наши штаммы образовывали среди гетероцитных цианобактерий три хорошо поддерживаемые эволюционные линии (кластеры Н1-Н3). В кластер Н1 входят штаммы *Nostoc*, которые образуют два хорошо поддерживаемых

субкластера. Кластер H2 включает большинство штаммов *Anabaena* и состоит из четырех основных субкластеров: наш штамм попал в субкластер H2.2. Такая кластеризация свидетельствует о монофилетическом происхождении некоторых штаммов из рода *Anabaena*. Кластер H3 содержит два субкластера, в первый из которых попали два штамма *Anabaena* sp. и большинство штаммов *Nodularia*. Это подтверждает полифилетическое происхождение некоторых штаммов *Anabaena* и *Nodularia*.

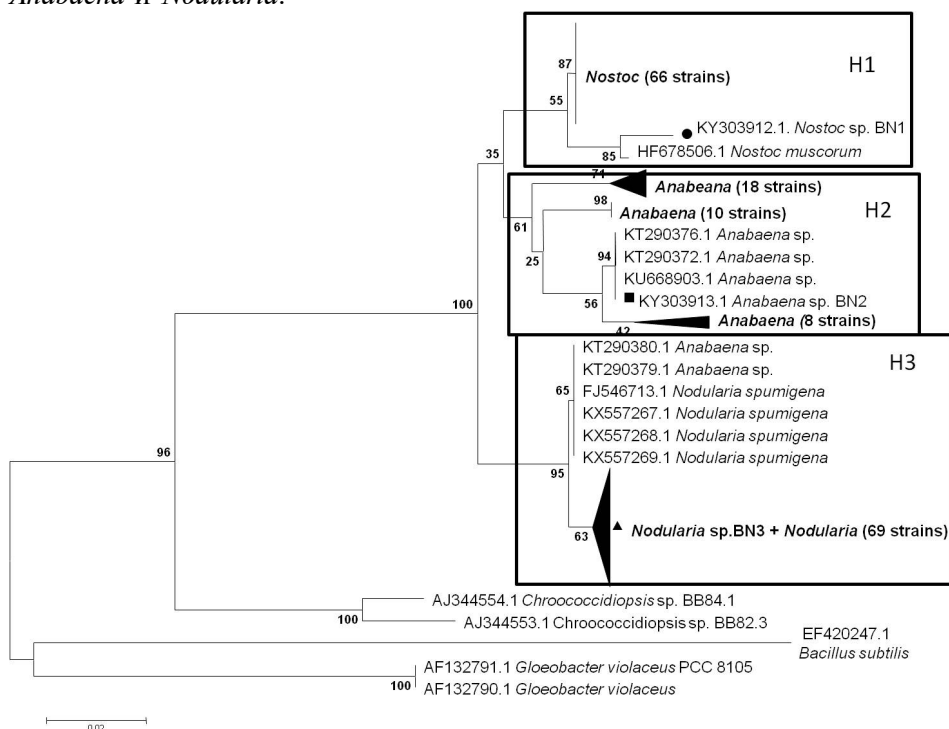


Рис. 3. Консенсусное дерево (Bootstrap) на основе максимальных вероятностных расстояний (maximum likelihood) оригинальных и взятых из GenBank последовательностей генов 16S рНК. Изученные штаммы (*Anabaena* sp. BN KY303913, *Nodularia* sp. BN KY303914 и *Nostoc* sp. BN KY303912) показаны в полном квадрате, полном треугольнике и полном круге соответственно. Числа рядом с узлами указывают значения бутстрапа для анализов ML (штрих – 0,02 смена позиции последовательности)

Молекулярное обнаружение потенциальных производителей токсинов и биоактивных веществ

Праймеры *nda* F8452 и *nda* F8640, кодирующие ген *ndaF*, дали продукт амплификации 188 пар оснований. Продукт амплификации длиной 1 kb также получали с помощью кодирующих метилпролин праймеров *nosF* и *nosR*; из образца ДНК также успешно амплифицировали ген *anaC* (рис. 4, А, В и С).

Биопробы

Nostoc sp. BN KY303912 оказался единственным штаммом, проявившим хорошую активность против *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и *Bacillus cereus*. По нашим результатам, наибольшая зона ингибирования была получена при воздействии метанольным экстрактом *Nostoc* на *Aspergillus flavus* (Hambí 829). *Anabaena* sp. BN KY303913 проявляла ингибирующий эффект только против *Bacillus cereus*. *Nodularia* sp. BN KY303914 вообще не проявила ингибирующего эффекта против *Candida albicans* (рис. 5).

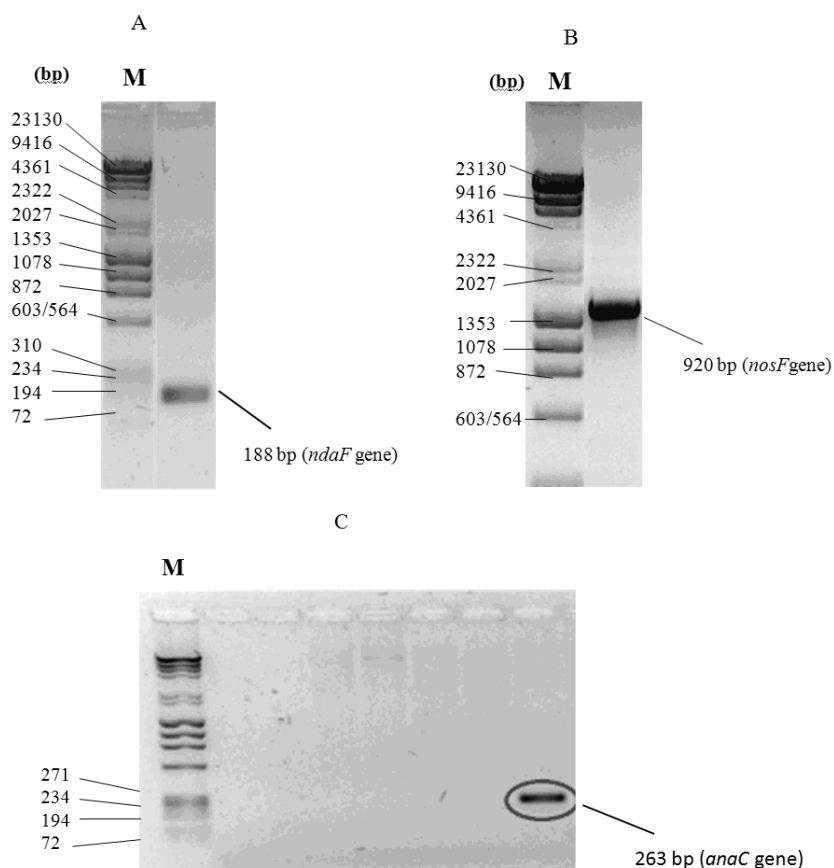


Рис. 4. ПЦР-продукты генов, кодирующих токсины/биоактивные соединения, анализируемые методом электрофореза ДНК в агарозном геле. ПЦР продуктов амплификации генов *nda* (обозначен как A, 188 bp), *nosF* (обозначен как B, 920 bp) и *anaC* (обозначен как C, 263 bp). M: Маркер Lambda DNA-Hind III/PhiX-174 RF DNA-HaeIII Digest

Анализ методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS) для анатоксина-а, микроцистина и биологически активных соединений

Анализ методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) выявил наличие пептидных соединений трех разных классов (анатоксин-а, криптофицин и нодуларин). Ген *nosF* связан с биосинте-

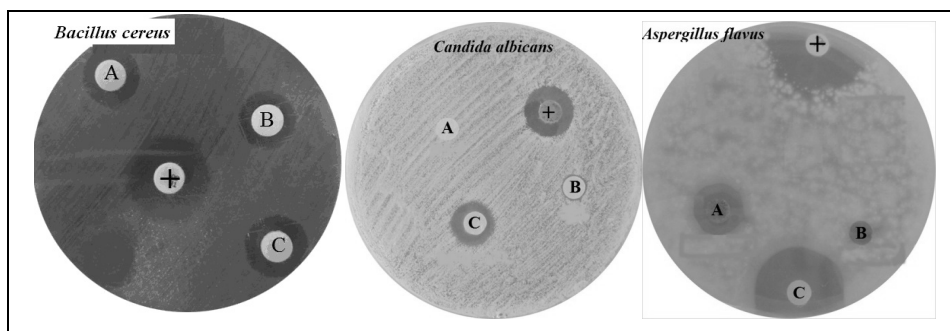


Рис. 5. Зона ингибирования, проявляемая метанольными экстрактами токсичных штаммов цианобактерий против *Aspergillus flavus* (Hambi 829), *Candida albicans* (Hambi 261) и *Bacillus cereus* (Hambi 1881). A – *Nodularia* sp. BN KY303914; B – *Anabaena* sp. BN KY303913; C – *Nostoc* sp. BN KY303912

зом представителей рода *Nostoc* необычного аминокислотного 4-метилпролина.

Полученные результаты показали наличие криптофицина в штамме *Nostoc* sp. BN KY303912 (рис. 6). LC-MS анализ показал наличие протонированного анатоксина-а (166 m/z), сравнение ионного спектра продукта с ионными структурами подтвердил это (рис. 7). При универсальном LC-MS-анализе появились цианобактины: частично, анацикламид A15 и анацикламид A15G (рис. 8). LC-MS-анализ на наличие биологически активных соединений показал, что изученный цианобактериальный штамм продуцировал нодуларин (рис. 9).

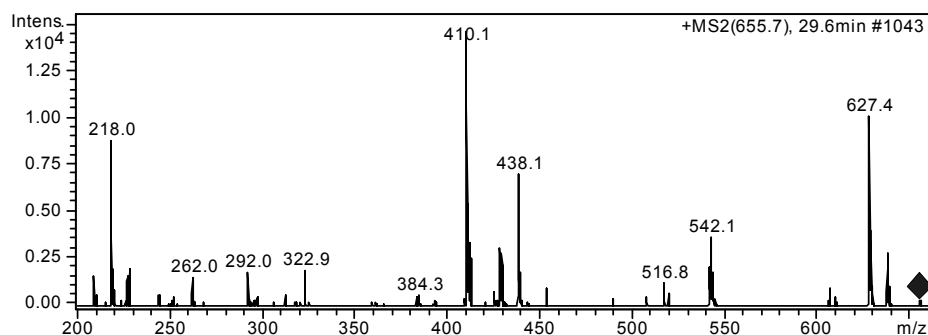


Рис. 6. Образцы фрагментации MS/MS2 протонированных криптофицинов (Сгу; 655,5 m/z) из штамма *Nostoc*. Ион прекурсора отмечен ромбом

Обсуждение

Цианобактерии продуцируют большое количество вторичных метаболитов. К ним относятся цианобактериальные токсины и соединения, интересные с точки зрения терапевтического использования (Fewer et al., 2009). В данной работе сообщается о выявлении анатоксина-а,

нодуларина и криптофицинов в штаммах *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Nodularia* sp., идентифицированных по морфологическим и молекулярным признакам (с использованием гена 16S рРНК). По традиционной системе классификации, они представляют порядок *Nostocales*. Роды *Nostoc* Vaucher 1886 и *Anabaena* Bory 1886 относятся к семейству *Nostocaceae*, а *Nodularia* Mertens 1886 – к *Aphanizomenonaceae*. Штаммы представляют собой нитчатые оксифототрофные цианобактерии, обитающие как в наземных, так и водных местообитаниях. С помощью различных методов генной технологии и аналитической химии мы идентифицировали штаммы *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. и *Nodularia* sp. как продуцирующие токсины, в частности анатоксин-а, нодуларин и криптофицин, которые и вызвали гибель утки.

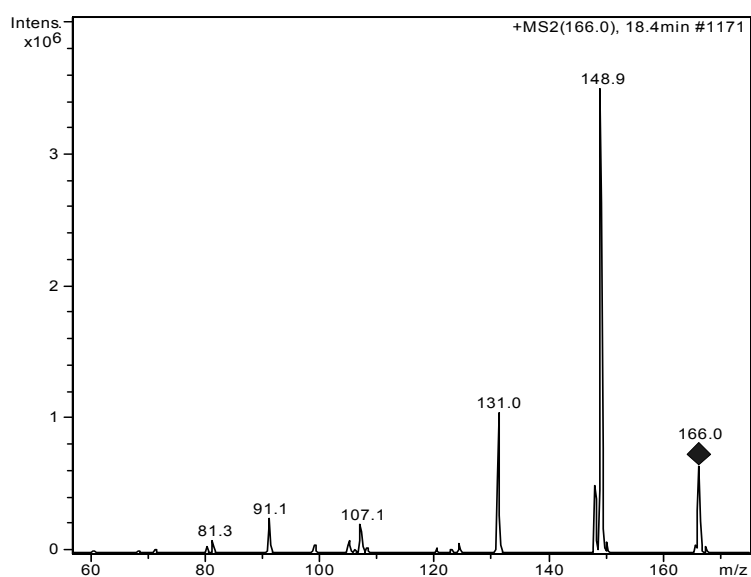


Рис. 7. Ионная хроматограмма протонированного анатоксина-а (166 м/г, m/z) и его различных ионизированных соединений. Ион прекурсора отмечен ромбом

Известно, что позднелетние цветения *Nodularia spumigena* в Балтийском море являются одними из крупнейших в мире (Fewer et al., 2009; Sivonen, 2009). Токсичные цветения воды в водоемах препятствуют ее использованию для хозяйственных нужд, а также рекреации. Важно понять, как именно действует цианобактерия при выработке токсинов и какие факторы способствуют ее росту.

Своевременное выявление и широкое информирование населения об этой цианобактерии имеют решающее значение для предотвращения будущих отравлений. Значимость защиты Балтийского моря от эвтрофикации и, следовательно, образования вредных токсичных цианобактериальных цветений очевидна в мире, где чистая, безопасная и пресная вода становится все более ценным ресурсом. В то время как гепатотоксины вызывают смерть в течение нескольких часов, нейротоксину для этого нужны минуты (Sivonen, 2009).

Anacyclamides

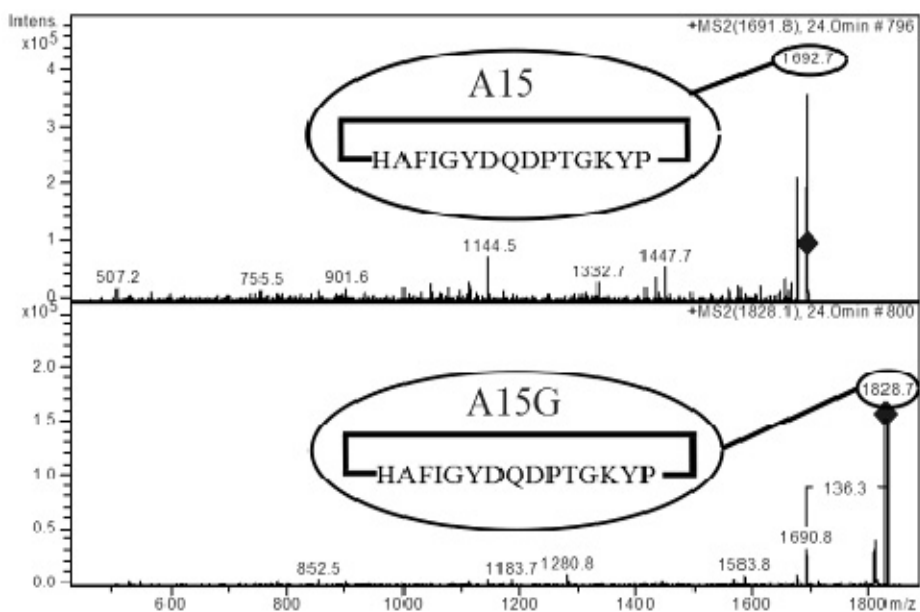


Рис. 8. Сравнение анациклидов A15 и A15G. Несходство соединений показано при помощи гераниловой группы (136. 3Da)

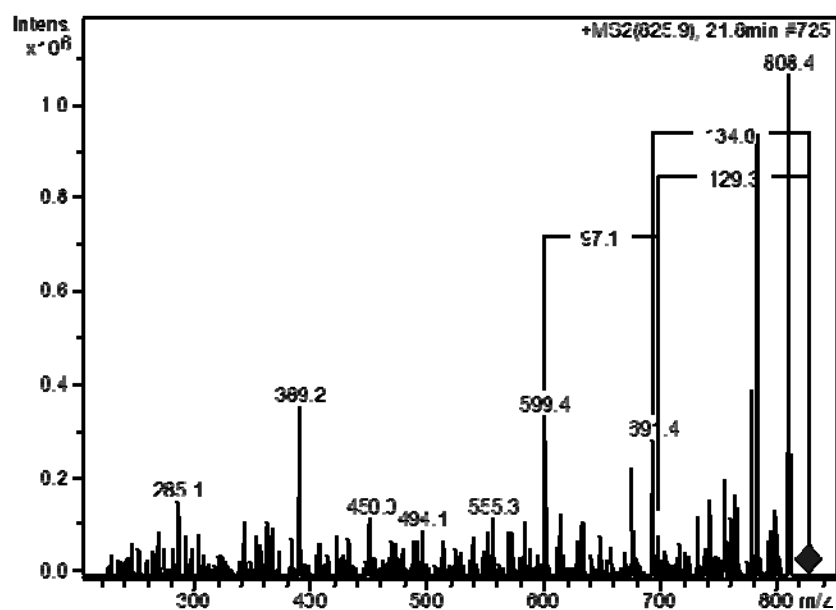


Рис. 9. Нодуларин, идентифицированный в цианобактериальном штамме. Спектр иона продукта из протонированного иона нодуларина m/z 808.4. Ион прекурсора отмечен ромбом

Анатоксин-а – первый цианобактериальный токсин, для которого были установлены токсикологические эффекты и химическая структура (Carmichael et al., 1975; Gugger et al., 2005). Об его обнаружении в водоемах периодически сообщалось в пяти странах Европы, трех из Азии, двух из Северной Америки и одной из Африки (Sivonen, Jones, 1999). Самые высокие концентрации анатоксина-а (4400 мкг/г сухой массы) были отмечены в Финляндии (Sivonen et al., 1989). Таким образом, можно полагать, что анатоксин-а, продуцируемый *Anabaena* sp., был причиной отравления домашней утки у берегов оз. Шорумаст. Клинические признаки отравления анатоксином-а – мышечная фасцикуляция, судороги, коллапс, цианоз и затем смерть (Edwards et al., 1992; Gunn et al., 1992).

Puschner et al. (2008) сообщали о гибели трех собак (двух лабрадоров ретриверов и одного лабрадора веймаранера) спустя час после купания в реке в Онтарио (США). Они провели около 5 мин в воде во время контролируемой прогулки по ферме. Также в ноябре 2005 г. по меньшей мере пять собак умерли после купания в р. Хульт (Нижний Северный остров, Новая Зеландия). В них был обнаружен анатоксин-а, период времени между плаванием и смертью составлял около 1 ч (Wood et al., 2007).

Анатоксин-а относится к алкалоидам и анацикламидам, состоящим из протеиногенных аминокислот (Sivonen, Jones, 1999). У *Anabaena* sp. выявили два разных анацикламида: A15 и A15G, из которых второй содержит геранильную группу, через пост-трансляционные модификации определенных аминокислот (Sivonen et al., 2010). Эти цианобактерии были идентифицированы в штаммах рода *Anabaena* (Leikoski, 2010). Таким образом, наши результаты соответствовали идентификации штаммов как токсинпродуцирующих цианобактерий. Более того, анатоксин-а имитирует эффект ацетилхолина (Sivonen, 2009). Это нейротрансмиттер как в периферической, так и в центральной нервной системах многих организмов, включая людей. Анатоксин-а вызывает быструю смерть, блокируя дыхание (Sivonen, 2009). Также было установлено (Ylinen-Rantala et al., 2011), что время действия анатоксина-а напрямую коррелирует с величиной и весом живого организма (в нашем случае утки).

Было бы целесообразно изучить способность штаммов *Nostoc* производить вторичные метаболиты. Шестнадцать метаболитов с биоактивными свойствами, включая противораковые, антибиотические, противогрибковые и противовирусные, уже обнаружены в семи штаммах *Nostoc* (Namikoshi et al., 1990; Sivonen et al., 1990; Fujii et al., 1999; Oksanen et al., 2004). Наиболее распространенные натуральные продукты, например криптофицины, цианобактерии, продуцируют в комбинаторных путях, таких как смешанные системы PKS/NRPS (Sivonen, 2009).

Способность штамма *Nostoc* продуцировать криптофицины и его эффективность против *Aspergillus flavus* (Hambí 829) и *Candida albicans*

(Hambi 261), подтверждают гипотезу о том, что эта активность связана с криптофицином (рис. 4). Криптофицин 1, первоначально выделенный из штамма *Nostoc* sp. ATCC 53789, является сильным фунгицидом и очень токсичен. Затем он был выделен также из штамма *Nostoc* sp. GSV 224 и показал сильную цитотоксичность в отношении ряда опухолевых клеток человека. Механизм цитотоксичности криптофицинов представляет собой взаимодействие тубулина с нарушением тубулин-динамики, что приводит к апоптозу опухолевых клеток. Он показывает хорошую активность против широкого спектра чувствительных к лекарственным средствам и лекарственно-устойчивых мышечных и твердых опухолей человека (Liang et al., 2005). Криптофицины оказывают антипролиферативную и антимитотическую активность путем связывания с концами микротрубочек, тем самым блокируя клеточный цикл в метафазе митоза, и могут быть использованы в лечебных целях. Нет никаких свидетельств отравления ими животных (собак или крыс). Криптофицины были выделены исключительно из наземных штаммов *Nostoc* (Golakoti et al., 1994, 1995), а не из водных местообитаний, как в случае других пептидных классов.

Молекулярная идентификация генов биосинтеза показала амплификацию гена *nosF* в изученных штаммах. Показано, что необычная аминокислота (2S, 4S)-4-метилпролин (MePro) биосинтезируется через гены *nosE* и *nosF*, а согласно различным исследованиям присутствие биосинтетических генов 4-mPro связано с биосинтезом новых токсически биоактивных соединений цианобактерий (Luesch et al., 2003; Becker et al., 2004; Liu et al., 2014). Восемь биосинтетических генных кластеров, содержащих биосинтетические гены 4-mPro *nosE* и *nosF*, были обнаружены в общедоступных геномах цианобактерий, что свидетельствует о том, что 4-mPro является хорошим маркером для выявления ранее неизвестных нерибосомальных пептидов (Liu et al., 2014).

Известно, что представители рода *Nodularia* часто вызывают «цветение» воды в солоноватых водоемах, например в Балтийское море, где зафиксированы случаи отравления животных (Sivonen et al., 1989; Fewer et al., 2009) в основном с участием гепатотоксина нодуларина в концентрации LD_{50} 50–70 мкг · кг⁻¹ при внутрибрюшинном введении мышам (Sivonen et al., 1990). Концентрация его в нашем исследовании составляла 373 нг · мг⁻¹, что, вероятно, достаточно, чтобы вызвать описанное отравление домашней утки. Подобно другим гепатотоксинам, нодуларин вызывает бледность, протрацию, паралич задних конечностей и судороги у мышей (Sivonen et al., 1990; Sivonen, 2009). Смерть наступила в результате внутреннего кровоизлияния и последующего гиповолемического шока, поэтому вполне вероятно, что такое же отравление произошло в нашем случае.

Заключение

Чтобы предотвратить дальнейшие случаи отравления животных, вызванные цианобактериями, важно защитить водные экосистемы от эвтрофикации. Если в водном объекте уже присутствуют токсичные цианобактерии, необходимо избегать любого использования воды. Животные должны быть лишены доступа к загрязненным водам, но если вода с токсинами все же попала в организм, необходимо немедленное лечение. В любом случае необходимы дополнительные исследования, чтобы понять и предотвратить формирование массового «цветения» воды цианобактериями, а также получить дополнительную информацию о цианобактериальных токсинах и о том, как препятствовать их продуцированию.

Методы по выявлению генов, связанных с этими токсичными соединениями, могут устаревать из-за естественных мутаций или сами гены могут быть настолько разнообразными, что конкретные праймеры могут быть еще не выработаны. Существует также относительный дефицит сведений о токсичности цианобактерий – продуцентов анатоксина-а, нодуларина и криптофицина в случаях отравления животных. Однако приведенные выше данные показывают, что цианобактерии являются многообещающим, но еще не исследованным природным ресурсом биологически активных соединений, полезных для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Из новых препаратов, одобренных в период с 1983 по 1994 год, до 80% антибактериальных и противоопухолевых лекарств были получены из натуральных продуктов. Несомненно, биоактивные соединения водорослей представляют интерес для формирования новой безопасной окружающей среды.

Это исследование было разработано и выполнено на кафедре биологии Научно-исследовательского отделения Исламского университета Азад, Тегеран, Иран. Авторы хотели бы поблагодарить д-ра Дэвида Фьюера (Dr. David Fewer), д-ра Джуни Джокела (Dr. Jouni Jokela) и д-ра Лео Рухийайнена (Dr. Leo Rouhiainen) с Кафедры исследования пищевых продуктов и экологии Университета Хельсинки за помощь в освоении методик, использованных в работе.

REFERENCES

- Becker J.E., Moore R.F., Moore B.S. Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nosto-cyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization. *Gene*. 2004. 325: 35–42.
- Cadel-Six C., Peyraud-Thomas C., Brient L., Tandeau de Marsac N., Rippka R., Mejean A. Different genotypes of anatoxin producing cyanobacteria co-exist in the Tarn River, France. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2007. 73: 7605–7614.
- Carmichael W.W., Biggs D.F., Gorham P.R. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science*. 1975. 187: 542–544.

- Edwards C., Beattie K.A., Scrimgeour C.M., Codd G.A. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*. 1992. 30: 1165–1175.
- Fewer D., Jokela J., Rouhiainen L., Wahlsten M., Koskenniemi K., Stal L.J., Sivonen K. The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Mol. Microbiol.* 2009. 73(5): 924–937.
- Francis G. Poisonous Australian lake. *Nature*. 1878. 18: 11–12.
- Fujii K., Sivonen K., Kashiwagi T., Hirayama K., Harada K.I. Nostophycin, a novel cyclic peptide from the toxic cyanobacterium, *Nostoc* sp. 152. *J. Org. Chem.* 1999. 64: 5777–5782.
- Golakoti T., Ogino J., Heltzel C.E., Husebo T.L., Jensen C.M., Larsen L.K., Patterson G.M.L., Moore R.E., Mooberry S.L., Corbett T.H., Valeriote F.A. Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of eighteen new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224. *J. Amer. Chem. Soc.* 1994. 117(49): 12030–12049.
- Golakoti T., Ohtani I., Patterson D.J., Moore R.E., Corbett T.H., Valeriote F.A., Demchik L. Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224. *J. Amer. Chem. Soc.* 1994. 116: 4729–4737.
- Gugger M., Lenoir S., Berger C., Ledreux A., Druart J.C., Humbert J.F., Guette C., Bernard C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*. 2005. 45: 919–928.
- Gunn G.J., Rafferty A.G., Rafferty G.C. Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (cyanobacteria). *Vet. Record*. 1992. 130: 301–302.
- Halinen K., Fewer D.P., Sihvonen L.M., Lyra C., Eronen E., Sivonen K. Genetic diversity in strains of the genus *Anabaena* isolated from planktonic and benthic habitats of the Gulf of Finland (Baltic Sea). *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008. 64: 99–108.
- Komárek J., Sant'Anna C.L., Bohunická M., Mareš J., Hentschke G.S., Rigonato J., Fiorett M.F. Phenotype diversity and phylogeny of selected *Scytonema*-species (*Cyanoprokaryota*) from SE Brazil. *Fottea*. 2013. 13(2): 173–200.
- Koskenniemi K., Lyra C., Rajaniemi-Wacklin P., Jokela J., Sivonen K. Quantitative real-time PCR detection of toxic *Nodularia* cyanobacteria in the Baltic Sea. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2007. 73: 2173–2179.
- Leikoski N., Fewer D.P., Jokela J., Wahlsten M., Rouhiainen L., Sivonen K. Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2010. 76: 701–709.
- Liang J., Moore R.E., Moher E.D., Munroe J.E., Al-awar R.S., Hay D.A., Varie D.L., Zhang T.Y., Aikins J.A., Martinelli M.J., Shih C., Ray J.E., Gibson L.L., Vasudevan V., Polin L., White K., Kushner J., Simpson C., Pugh S., Corbett T.H. Cryptophycins 309, 249 and other cryptophycin analogs: Preclinical efficacy studies with mouse and human tumors. *Invest New Drugs*. 2005. 23(3): 213–224.
- Liu L., Jokela J., Fewer D., Wahlsten M., Permi P., Sivonen K. Nostoginosins: trypsin inhibitors from *Nostoc* sp. strain FSN. *J. Nat. Prod.* 2015. 77(8): 1784–1790.
- Liu L., Jokela J., Herfindal L., Wahlsten M., Sinkkonen J., Permi P., Sivonen K. 4-methylproline guided natural product discovery: Co-occurrence of 4-hydroxy- and 4-methylprolines in nostoweipeptins and nostopeptolides. *ACS Chem. Biol.* 2014. 9(11): 2646–2655.
- Luesch H., Hoffmann D., Hevel J.M., Becker J.E., Golakoti T., Moore R.E. Biosynthesis of 4-Methylproline in Cyanobacteria: Cloning of nosE and nosF Genes and Biochemical

- Characterization of the Encoded Dehydrogenase and Reductase Activities. *J. Org. Chem.* 2003. 68: 83–91.
- Msagati T.A.M., Siame B.A., Shushu D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.* 2006. 78: 382–397.
- Nowruzi B., Khavari-Nejad R.-A., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstattari T. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. *Algae.* 2012. 27(4): 303–313.
- Nowruzi B., Khavari-Nejad R.A., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstattari T. Identification and toxigenic potential of a cyanobacterial strain (*Stigomena* sp.). *Prog. Biol. Sci.* 2013. 3(1): 79–85.
- Nübel U., Garcia Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1997. 63: 3327–3332.
- Oksanen I., Jokela J., Fewer D.P., Wahlsten M., Rikkinen J., Sivonen K. Discovery of Rare and Highly Toxic Microcystins from Lichen-Associated Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain IO-102-I. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2004. 70(10): 5756–5763.
- Onodera H., Oshima Y., Henriksen P., Yasumoto T. Confirmation of anatoxin-A(S), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon.* 1997. 35: 1645–1648.
- Puschner B., Hoff B., Tor E.R. Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *J. Vet. Diag. Invest.* 2008. 20(1): 89–92.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kastovska K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komarek J., Sivonen K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (*Nostocales*, Cyanobacteria). *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 2005. 55: 11–26.
- Sivonen K. Cyanobacterial toxins. *Encycl. Microbiol.* 2009: 290–307.
- Sivonen K., Börner T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Norfolk: Caister Acad. Press, 2008. Pp. 159–197.
- Sivonen K., Jones G.J. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: E.F.N. Spon, 1999. Pp. 41–111.
- Sivonen K., Leikoski N., Fewer D.P., Jokela J. Cyanobactins – ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2010. 86: 1213–1225.
- Sivonen K., Namikoshi M., Evans W.R., Carmichael W.W., Sun F. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1992. 58: 2495–2500.
- Sivonen K., Carmichael W.W., Namikoshi M., Rinehart K.L., Dahlem A.M., Niemelä S.I. Isolation and characterisation of hepatotoxic microcystin homologues from the filamentous freshwaters cyanobacterium *Nostoc* sp. 152. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1990. 56: 2650–2657.
- Sivonen K., Himberg K., Luukkainen R., Niemelä S.I., Poon G.K., Codd G.A. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxic. Assess.* 1989. 4: 339–352.
- Van Apeldoorn M.E., van Egmond H.P., Speijers G.J., Bakker G.J. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. & Food Res.* 2007. 51: 7–60.
- Wood S.A., Selwood A.I., Rueckert A. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon.* 2007. 50: 292–301.

Ylinen-Rantala A., Känä S., Wang H., Rouhiainen L., Wahlsten M., Rizzi E., Berg K., Gugger M., Sivonen K. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2011. 77: 7271–7278.

Поступила 22 января 2018 г.

Подписала в печать Е.К. Золотарёва

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2018, 28(4): 409–427

<https://doi.org/10.15407/alg28.04.409>

Bahareh Nowruzi¹, Saül Blanco², Taher Nejadstari¹

¹Department of Biology, Science and Research Branch,
Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Diatom Lab., the Institute of the Environment,
58 La Serna, Leyn 24007, Spain

CHEMICAL AND MOLECULAR EVIDENCES FOR THE POISONING OF A DUCK
BY ANATOXIN-A, NODULARIN AND CRYPTOPHYCIN AT THE COAST OF LAKE
SHOORMAST (MAZANDARAN PROVINCE, IRAN)

The toxic cyanobacteria in aquatic ecosystems are a big concern especially in warm summer months. Animals are incapable of avoiding toxic blooms near the shore and might get poisoned. In this study the aim was to find a cause of death of a domestic duck found near the coastal area of the ShoorMast Lake. Cyanotoxin poisoning was suspected as the cause of fatalities, as a result, the water samples were collected and examined with phenotypic and genotypic analyses in order to find if the duck is poisoned by the toxic cyanobacteria. Different molecular and chemical methods such as phylogenetic analysis based on 16S *r*RNA gene sequence, polymerase chain reaction, disc diffusion bioassays and liquid chromatography-mass spectrometry were used. Based on the results, three different cyanobacteria strains were found in duck's stomach and three diverse groups of potentially bioactive compounds (anatoxin-a, nodularin and cryptophycin) might account for the death of this animal. The cyanobacteria strains were identified and registered under DDBJ as *Anabaena* sp. BN KY303913, *Nodularia* sp. BN KY303914 and *Nostoc* sp. BN KY303912. This case is the first documented incident of toxicity from fresh water cyanobacteria related intoxication in Iran.

Key words: anatoxin-a, cryptophycin, duck, nodularin, poiyanoyanosoning, ShoorMast Lake, Iran