

УДК 574.58:504.455:543.399

БИОДЕСТРУКЦИЯ МИКРОЦИСТИНА-LR АВТОХТОННОЙ МИКРОБИОТОЙ РАЗНОТИПНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ

© 2023 г. Н. Г. Медведева*, @, Т. Б. Зайцева*, И. Л. Кузикова*, Е. Н. Чернова*

* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук” (СПб ФИЦ РАН), Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, ул. Корпусная, д. 18, Санкт-Петербург, 197110 Россия

@E-mail: ngmedvedeva@gmail.com

Поступила в редакцию 03.10.2022 г.

После доработки 26.01.2023 г.

Принята к публикации 26.01.2023 г.

Впервые показана способность автохтонной микробиоты разнотипных водных объектов Северо-Запада РФ деструктировать высокотоксичный микроцистин-LR (MC-LR). Максимальная скорость деградации MC-LR отмечена в водных образцах, отобранных в Сестрорецком разливе и Нижнем Суздальском озере в период массового развития цианобактерий. В образцах воды Ладожского озера, где ранее не были отмечены токсичные цианобактериальные цветения, биодеградация MC-LR проходила со значительно меньшей скоростью и более длительной лаг-фазой. Состав продуктов биодеградации MC-LR свидетельствует о наличии в составе автохтонной микробиоты исследуемых объектов микроорганизмов, способных деструктировать микроцистины как по *mlr* механизму, так и по биохимическому пути с участием глутатиона.

Ключевые слова: водные объекты, цианобактерии, микроцистин, автохтонная микробиота, биодеградация

DOI: 10.31857/S1026347022600820, **EDN:** AKYYTC

Изменение климата и загрязнение водных объектов органическими и минеральными соединениями, в том числе биогенными элементами, способствует массовому развитию микроводорослей, или “цветению” водных объектов во всем мире (Sivarajah *et al.*, 2021). “Цветения” могут вызывать представители различных отделов водорослей – золотистые (*Chrysophyta*), желто-зеленые (*Xanthophyta*), диатомовые (*Bacillariophyta*), криптофитовые (*Cryptophyta*), зеленые (*Chlorophyta*), а также цианобактерии (*Cyanophyta*) (Белякова и др., 2006). Цианобактерии являются одними из основных и наиболее опасных возбудителей “цветения” воды. Это связано со способностью данной группы прокариотов продуцировать токсины, опасные для человека и животных (Chorus *et al.*, 2000; Codd *et al.*, 2005).

Микроцистины (MC) являются одними из широко распространенных цианотоксинов в пресноводных водоемах по всему миру. Их основными продуцентами являются цианобактерии родов *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix* и др. (Chorus, Bartram, 1999). В процессе роста ци-

анобактерий микроцистины находятся в клетках и попадают в воду в результате их разрушения.

Микроцистины являются ингибиторами эукариотической серин/треонин фосфатазы 1 и 2A (PP1 и PP2A), что приводит к гиперфосфорилированию белков цитоскелета с последующей их деструкцией и деформацией гепатоцитов человека и животных. В результате возникают обширные кровоизлияния, увеличение размеров печени, а также онкологические заболевания (Zurawell *et al.*, 2005; Carmichael, Boyer, 2016; Massey, Yang, 2020).

Микроцистины относятся к циклическим гептапептидам с основной структурой цикло-(D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha), где D-Ala – D-аланин, D-MeAsp – D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, Adda – 3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота, D-Glu – D-глутамат, Mdha – N-метилдегидроаланин, X и Z – переменные L-аминокислоты (Chorus, Bartram, 1999).

В настоящее время известно 246 изомеров микроцистинов, отличающихся разной токсичностью (Tsuji *et al.*, 1994; Meriluoto *et al.*, 2017; Massey, Yang, 2020). Согласно рекомендациям ВОЗ

концентрация наиболее токсичного микроцистина-LR (MC-LR) в питьевой воде не должна превышать 1 мкг/л (Cyanobacterial toxins, 2020).

Благодаря циклической структуре микроцистины устойчивы к воздействию высоких температур, экстремальных pH, солнечному свету, вследствие чего могут сохраняться в водоемах месяцами (Tsuji *et al.*, 1994; Sivonen, Jones, 1999; Ras-togi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017).

Несмотря на свою стабильность микроцистины могут подвергаться биodeградации. Способностью разрушать микроцистины обладают как прокариотические, так и эукариотические микроорганизмы. Большинство бактерий-деструкторов относятся к *Proteobacteria* (α , β , γ), *Actinobacteria* и *Bacilli* (Li *et al.*, 2017; Massey, Yang, 2020). Многие из них имеют кластер генов *mlr*, ответственных за деградацию этих токсинов (Redouane *et al.*, 2019). Однако у ряда бактерий-деструкторов микроцистинов *mlr*-гены не обнаружены, что предполагает участие других генов в деструкции этих токсинов. Обсуждается участие в процессах микробной деструкции микроцистинов щелочных протеаз и глутатион-S-трансферазы (GST) (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2017; Krishnan *et al.*, 2018; Krausfeldt *et al.*, 2019). Весьма вероятно, что список ферментов, участвующих в процессах биотрансформации микроцистинов, со временем будет расширяться. Знание о биodeградации MC в окружающей среде на молекулярном уровне могло бы быть использовано для прогнозирования способности автохтонной микробиоты к удалению микроцистинов из среды. Однако отсутствие информации о молекулярных механизмах, отличных от биохимических путей, кодируемых *mlr* кластером, не позволяет в настоящее время использовать молекулярные методы для адекватной оценки способности природных сообществ микроорганизмов к деструкции MC.

Именно процесс биodeградации лежит в основе механизма разрушения микроцистинов в природных условиях (Christoffersen *et al.*, 2002; Bukowska *et al.*, 2018). Многочисленные публикации посвящены разложению микроцистинов автохтонной микробиотой озер (Christoffersen *et al.*, 2002; Dziga *et al.*, 2017; Krishnan *et al.*, 2018; Lezcano *et al.*, 2018), водохранилищ (Ho *et al.*, 2012; Medvedeva, Kuzikova, 2021), морей (Toruńska-Sitarz *et al.*, 2018), донных осадков (Rapala *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019), почв (Cao *et al.*, 2018; Redouane *et al.*, 2019). В большинстве этих исследований получены данные о способности природных микробных сообществ разрушать микроцистины, в том числе наиболее токсичный микроцистин-LR. Однако в ряде водоемов деструкция микроцистинов природной микробиотой не наблюдалась (Kiviranta *et al.*, 1991; Dziga *et al.*, 2017).

В России, несмотря на актуальность проблемы токсичных “цветений” водоемов исследования по оценке способности автохтонной микробиоты водных объектов разрушать альготоксины, в том числе микроцистины, до настоящего времени практически не проводились (Medvedeva, Kuzikova, 2021).

В настоящей работе была исследована биodeструкция микроцистина-LR природными микробными сообществами разнотипных водных объектов Северо-Запада России. В задачи исследования входило документирование наличия/отсутствия процессов деградации MC-LR, определение кинетических характеристик и продуктов деструкции микроцистина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Водные объекты и отбор проб. Пробы воды отбирали в водоемах, отличающихся как по природным характеристикам, так и по уровню антропогенной нагрузки — оз. Сестрорецкий Разлив, Нижнее Суздальское озеро, а также в Монастырской бухте и заливе Крестовый Ладожского озера (рис. 1, табл. 1).

Отбор проб в озерах Нижнее Суздальское и Сестрорецкий Разлив проводили дважды — в отсутствие массового развития водорослей (24.05.2018 г.) и во время “цветения” водоемов (28.06.2018 г. и 08.08.2018 г. соответственно). В Ладожском озере (Валаамский архипелаг — залив Крестовый, Монастырская бухта) пробы отбирали 16.06.2018 г. в отсутствие “цветения” воды.

Образцы поверхностных вод (2 л) отбирали в стерильную посуду, фильтровали через 5 мкм мембранные фильтры (Whatman) и использовали для определения профиля цианобактериальных токсинов в природных образцах и в экспериментах по деструкции микроцистина-LR.

Определение профиля цианобактериальных токсинов и продуктов их деструкции в образцах природных вод. При определении профиля цианобактериальных токсинов и продуктов их деструкции для подготовки проб воды использовали метод твердофазной экстракции (Oasis HLB, Waters), а для проб отфильтрованной биомассы — экстракцию 75% водным метанолом под воздействием ультразвука. Анализ выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС-ВР) с использованием системы ВЭЖХ Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение анализируемых соединений проводили на колонке Thermo Hypersil Gold RP C18 (100 × 3 мм, 3 мкм, Thermo Fisher Scientific) в режиме градиентного элюирования (0.2 мл/мин) смесью воды и ацетонитрила,

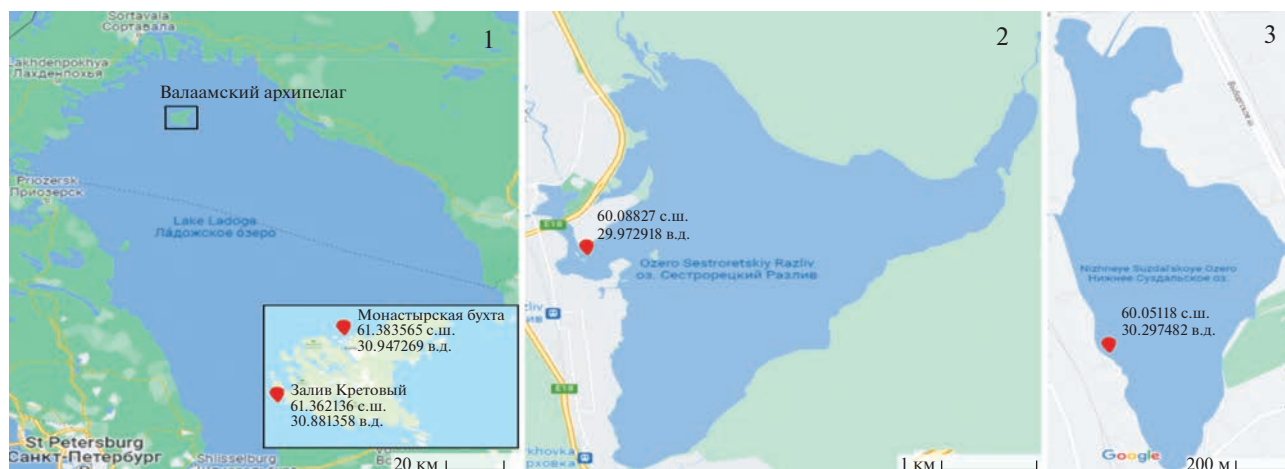


Рис. 1. Места отбора проб: 1 – Ладожское озеро, Валаамский архипелаг; 2 – озеро Сестрорецкий Разлив; 3 – Нижнее Суздальское озеро.

содержащих 0.05% муравьиной кислоты. Масс-спектрометрический анализ проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме детектирования положительных ионов. Целевые соединения идентифицировали на основании точного измерения массы ионов $[M + H]^+$ или $[M + 2H]^{2+}$ (разрешение 30000, точность в пределах 5 ppm) (Chernova *et al.*, 2016), данных из спектров фрагментации (Чернова и др., 2016) и хроматографических времен удерживания. Количественное определение проводили методом внутреннего и внешнего стандартов.

Были использовали следующие реактивы: ацетонитрил (Криохром, сорт “0”), метанол (LiChrosolvhypergrade для LC-MS, Merck, Германия), му-

равьиная кислота (98–100%, FlukaChemika, Buchs, Швейцария); стандартные соединения микроцистинов MC-LR, MC-RR, MC-YR (SigmaAldrich), а также MC-LY, MC-LA, MC-LW, MC-LF, [D-Asp³] MC-LR и [D-Asp³] MC-RR (EnzoLifeSciences, Inc., США). Вода, очищенная с помощью системы Direct-Q (Millipore, электропроводность 0.056 μ S/см при 25°C) (Массачусетс, США).

Деструкция микроцистина-LR. Микроцистин-LR (Sigma-Aldrich) вносили в 250 мл колбы Эрленмейера со 100 мл природной воды из расчета 100 мкг/л. Образцы инкубировали при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$, освещении 1000 лк в режиме свет : темнота = 12 : 12 ч до 60 сут. Образцы природных вод, стерилизованные при 1 атм в течение 30 мин

Таблица 1. Характеристика водных объектов

Водный объект	Использование	Площадь, га	Минимальная (средняя) глубина, м	Трофический статус	pH	Станция отбора
Оз. Сестрорецкий Разлив	РК	1100	5.5 (1.6)	Г (Chernova <i>et al.</i> , 2016)	8.0	60.08827 с.ш. 29.972918 в.д.
Нижнее Суздальское озеро	РК	97	4.5 (3.0)	Э (Chernova <i>et al.</i> , 2016)	7.7	60.05118 с.ш. 30.297482 в.д.
Ладожское озеро	ИВ, РК, Р	1787000	230 (46.9)	О–М (Степанова и др., 2020)	8.1	Залив Крестовый 61.362136 с.ш. 30.881358 в.д.
					8.5	Монастырская бухта 61.383565 с.ш. 30.947269 в.д.

Примечание. ИВ – источник водоснабжения; Р – рыболовство; РК – рекреационные цели; Г – гипертрофное; О – олиготрофное; М – мезотрофное; Э – эвтрофное.

Таблица 2. Содержание внутриклеточных токсинов в биомассе, отделенной при помощи фильтрации из проб воды

Микроцистин	[M + H] ⁺	Содержание микроцистинов, нг/л			
		Оз. Сестрорецкий разлив		Нижнее Суздальское озеро	
		до “цветения”	во время “цветения”	до “цветения”	во время “цветения”
[D-Asp ³]MC-LR	981.54095	—	—	—	—
MC-LR	995.55658	—	359	—	6
[D-Glu-OCH ₃ ⁶]MC-LR	1009.57227	—	6	—	—
[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MC-RR	1010.54236	—	9	8	41
[Dha ⁷]MC-FR	1015.52533	—	4	—	—
[D-Asp ³]MC-RR	1024.55798	25	815	14	133
[D-Asp ³]MC-YR	1031.52026	—	198	—	—
MC-RR	1038.57373	1	743	2	21
MC-YR	1045.53589	—	264	—	—
MC-(H ₄)-YR	1049.56714	—	104	—	—
[D-Asp ³]MC-WR	1054.53625	—	51	—	—
MC-WR	1068.55188	—	81	—	—
Сумма MC		26	3267	26	228

и содержащие то же количество MC-LR, использовали в качестве контроля для определения абиотической деструкции токсина и испарения воды в процессе длительного инкубирования проб.

Для определения содержания MC-LR в воде образцы (5 мл) лиофилизировали и растворяли в 400 мкл 25%-го водного метанола. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 10000 об./мин в течение 5 мин. Концентрацию MC-LR определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе HP1090 (“Hewlett-Packard”, США) с диодно-матричным детектором (длина волны 238 нм, разрешение 1.2 нм) по методике, описанной ранее (Medvedeva *et al.*, 2017). Стандартный раствор MC-LR получен от Alexis Corporation (Швейцария).

Кинетические параметры деградации MC-LR в образцах рассчитывали в соответствии с уравнением реакции первого порядка:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt},$$

где C — концентрация MC-LR в пробе, мкг/л; C_0 — исходная концентрация MC-LR, мкг/л; k — константа скорости реакции; t — время инкубирования, сут.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием Past 4.x software (<http://folk.vio.no/ohammer/past>). Статистическую значимость различий между вариантами оценивали с помощью one-way Anova и Tukey’s post hoc теста.

Для оценки нормальности данных и равенства дисперсий использовали Shapiro-Wilk и Levene тесты. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Все данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение трех независимых повторений каждого варианта с тремя параллельными повторностями в каждом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В образцах, отобранных в водоемах, для которых характерно регулярное токсичное “цветение” воды (озера Сестрорецкий Разлив и Нижнее Суздальское), зарегистрированы структурные варианты микроцистинов, в том числе наиболее токсичный MC-LR (табл. 2, 3). Наименьшее разнообразие и количество внутриклеточных (26 нг/л) и отсутствие внеклеточных токсинов отмечено в образцах, отобранных до начала активной вегетации цианобактерий.

В образцах, отобранных в Сестрорецком Разливе во время “цветения” содержание внутриклеточных токсинов (11 структурных вариантов) достигало 3267 нг/л, внеклеточных — 4 нг/л. В пробах из Нижнего Суздальского озера во время “цветения” воды зарегистрировано наличие 5 структурных вариантов MC, их суммарное содержание в пробах биомассы составляло 228 нг/л, при этом внеклеточных токсинов детектировано не было. Следует отметить, что в озерах Сестрорецкий Разлив и Нижнем Суздальском, начиная с 2008 г., ежегодно детектируются микроцистины в

Таблица 3. Содержание внеклеточных токсинов в пробах воды

Микроцистин	[M + H] ⁺	Содержание микроцистинов, нг/л			
		Оз. Сестрорецкий Разлив		Нижнее Суздальское озеро	
		до “цветения”	во время “цветения”	до “цветения”	во время “цветения”
MC-LR	995.55658	—	1	—	—
[D-Asp ³]MC-RR	1024.55798	—	1	—	—
MC-RR	1038.57373	—	1	—	—
MC-YR	1045.53589	—	1	—	—
Сумма MC		0	4	0	0

Таблица 4. Параметры кинетики деструкции MC-LR автохтонной микробиотой водных объектов

Место отбора	Время отбора проб	k , сут ⁻¹	T_{50} , сутки	R ²	Лag-фаза, сутки
Оз. Сестрорецкий Разлив	Во время цветения	0.24 ± 0.03 ^a	3.1 ± 0.2 ^a	0.97	0
	До цветения	0.16 ± 0.01 ^b	9.6 ± 0.8 ^b	0.982	5
Нижнее Суздальское озеро	Во время цветения	0.27 ± 0.02 ^a	3.1 ± 0.2 ^a	0.962	0
	До цветения	0.15 ± 0.02 ^b	10 ± 2 ^b	0.941	5
Ладожское озеро, Монастырская бухта	Отсутствие цветения	0.013 ± 0.001 ^b	> 60	0.985	14
Ладожское озеро, залив Крестовый	Отсутствие цветения	0.015 ± 0.001 ^b	57.3 ± 1.1 ^b	0.986	14

Примечание. Разные буквы (а, б, в) указывают на статистически значимые различия между местами отбора проб ($p < 0.05$).

период активной вегетации цианобактерий с доминированием потенциально токсичных видов *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralf et Born et Flah., *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. et Kom. и различных видов р. *Microcystis* (Chernova et al., 2016; Воякина и др., 2020).

В отличие от озер Сестрорецкий Разлив и Нижнее Суздальское информация о цианобактериальных цветениях и содержании цианотоксинов в прибрежной зоне Ладожского озера в районе Валаамского архипелага (Монастырская бухта и залив Крестовый) отсутствует. Это связано, прежде всего, с невысоким уровнем вегетации цианобактерий, несмотря на доминирование в планктоне потенциально токсичных видов *Dolichospermum spiroides* (Kleb.) Wacklinetal. (2009), *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anag. and Kom. (1988) и видов рода *Woronichinia* (Степанова и др., 2020).

В пробах, отобранных в Ладожском озере 16.06.2018 г., микроцистины также не были детектированы.

При инкубировании всех образцов природных вод с внесенным микроцистином-LR (100 мкг/л) наблюдается убывь токсина вне зависимости от уровня трофности и параметров водоема, времени отбора (в отсутствии или во время “цветения”), наличия или отсутствия токсичных “цветений” в предыдущие годы (рис. 2).

Следует отметить, что в стерильных образцах (абиотический контроль) статистически значимых изменений концентрации MC-LR не выявлено ($p \geq 0.05$), что свидетельствует о его микробной деградации в опытных вариантах.

Наиболее активно и без лаг-фазы деструкция MC-LR проходила в образцах воды, отобранных во время “цветения” в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озере (рис. 2а, 2б, табл. 4).

Полная деструкция MC-LR в этих образцах отмечена на 11–12 сут инкубирования. Статистически значимых различий констант скорости и времени полураспада MC-LR в образцах, отобранных из “цветущих” Сестрорецкого Разлива и Нижнего Суздальского озера, не выявлено ($p \geq 0.05$).

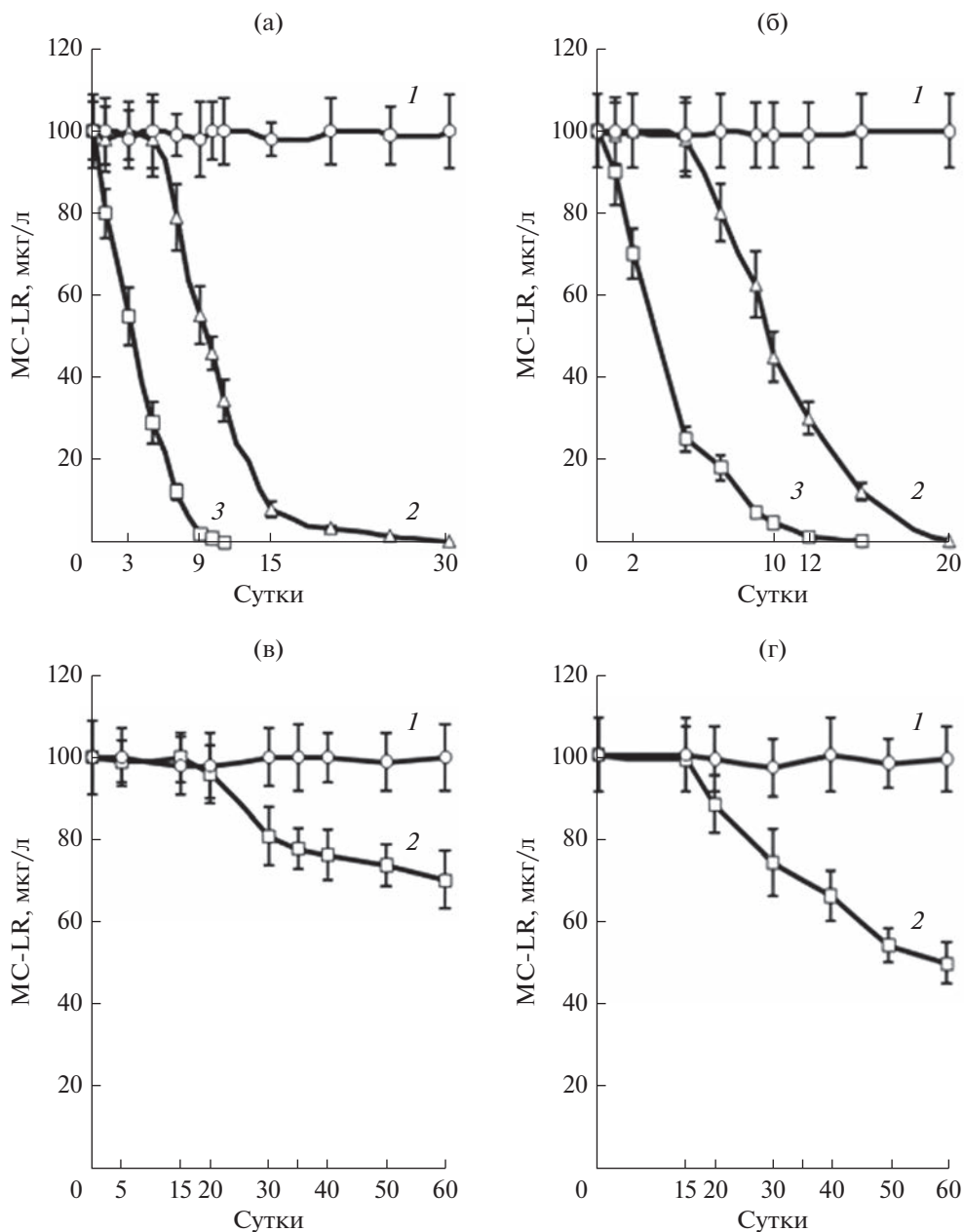


Рис. 2. Деструкция MC-LR в образцах воды: а – Сестрорецкий разлив, б – Нижнее Суздальское озеро, в – Ладожское озеро, Монастырская бухта, г – Ладожское озеро, залив Крестовый; 1 – стерильные образцы; 2 – образцы, отобранные в отсутствие “цветения” воды; 3 – образцы, отобранные во время “цветения” воды.

Разложение микроцистина автохтонной микробиотой этих водных объектов, отобранных в образцах воды до начала массового развития водорослей, характеризовалась меньшей скоростью деструкции (более чем в 1.5 раза) и увеличенным более чем в 3 раза временем полураспада MC-LR, по сравнению с аналогичными показателями “цветущих” объектов, а также наличием 5-ти суточной лаг-фазы.

В образцах воды, отобранных в Монастырской бухте и заливе Крестовом Ладожского озера, в ко-

торых ранее не были задокументированы токсичные цветения цианобактерий, и не были определены альготоксины, в том числе микроцистины, деструкция MC-LR также происходит, но со значительно меньшей скоростью по сравнению с ежегодно “цветущими” Сестрорецким Разливом и Нижним Суздальским озерами. В обоих образцах, отобранных в Ладожском озере, наблюдается длительная лаг-фаза (14–15 сут), и через 60 сут убыль MC-LR не превышала 29.6 и 50% для Монастырской бухты и залива Крестового соответ-

ственно. Скорость деструкции MC-LR в образцах воды Ладожского озера была в 11 раз ниже по сравнению с образцами воды, отобранными в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озере до начала активной вегетации цианобактерий.

Различия в скоростях деградации микроцистинов в окружающей среде может быть результатом различных факторов — температуры, pH, содержания органического вещества, присутствия ионов металлов (Fe^{3+} , Al^{3+}), состава и активности автохтонной микробиоты (Kumar *et al.*, 2019). Хорошо известно, что скорость разложения MC природными сообществами микроорганизмов значительно выше, если в этом водном объекте уже наблюдались “цветения” и наличие MC в воде (Christoffersen *et al.*, 2002; Dziga *et al.*, 2017). Присутствие в водной среде микроцистинов приводит к изменению структуры бактериального сообщества и повышению в нем количества MC-деградирующих бактерий, а также к индукции ферментов, участвующих в процессах трансформации этих токсинов (Giaramida *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2021). В ряде исследований показано, что микроцистины индуцируют экспрессию генов *mlr* кластера, отвечающего за деструкцию этих токсинов у некоторых микроорганизмов (Shimizu *et al.*, 2011; Maghsoudi *et al.*, 2016). Для образцов воды, отобранных из водоемов, где ранее не фиксировались “цветения” и микроцистины, характерно наличие лаг-фазы, в течение которой происходит адаптация микробиоты к MC, индукция необходимых для их деструкции ферментов (Edwards *et al.*, 2008; Dziga *et al.*, 2017). В лабораторных условиях после лаг-фазы обычно следует быстрая стадия убыли микроцистинов (Edwards *et al.*, 2008; Giaramida *et al.*, 2013).

Полученные нами результаты частично согласуются с этими выводами. Самая длительная лаг-фаза — 15 сут, отмечена для образцов воды, отобранных в Монастырской бухте и заливе Крестовый, в которых ранее не было зафиксировано токсичных цианобактериальных цветений (рис. 2в, 2г, табл. 4).

Однако в отличие от данных зарубежных исследователей (Edwards *et al.*, 2008) мы наблюдали лаг-фазу до 5 сут и для проб воды, отобранных из регулярно “цветущих” Сестрорецкого Разлива и Нижнего Суздальского озер, в которых ежегодно фиксируются микроцистины. Следует отметить, что лаг-фаза зафиксирована только в пробах, отобранных в этих водоемах до начала массового развития цианобактерий. В образцах воды во время “цветения” водоемов биодеструкция MC происходила значительно быстрее и без лаг-фазы.

Методом ВЭЖХ-MC-BP в инкубированных с микроцистином образцах воды из Сестрорецкого Разлива, Нижнего Суздальского озер и Ладожского озера (залив Крестовый и Монастырская

бухта) идентифицированы продукты деструкции MC-LR (рис. 3).

Соединение с m/z 615.33785, фрагментный спектр которого соответствует описанному ранее продукту деструкции MC-LR тетрапептиду Adda-Glu-Mdha-Ala-OH (Bourne *et al.*, 1996), детектирован во всех анализируемых образцах (рис. 4). Фрагментные спектры содержали характеристичные дочерние ионы с m/z 598; 566; 509; 477; 464; 375, приведенные в (Bourne *et al.*, 1996).

Наряду с тетрапептидом (m/z 615) в образцах, отобранных в Ладожском озере, детектировано соединение с m/z 1013, 56497 (рис. 3в).

Соединение с m/z 1013.56497, фрагментный спектр которого представлен на рис. 5, идентифицировано как линеализированная форма MC-LR — Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-Masp-Arg-OH. Фрагментные спектры содержали характеристичные дочерние ионы с m/z 995; 862; 571; 488, приведенные в (Bourne *et al.*, 1996), и кроме того, дочерние ионы, присутствующие в фрагментном спектре MC-LR с m/z 995; 977; 844; 728; 710; 682; 599; 571; 553; 470 (Чернова и др., 2016).

Наличие в продуктах деструкции MC-LR тетрапептида с m/z 615 и линеализированной формы MC-LR с m/z 1013 свидетельствует о биохимическом пути деградации микроцистина бактериальными штаммами, имеющими кластер генов *mlr* (Bourne *et al.*, 1996; Dziga *et al.*, 2017). Биохимические пути деградации микроцистинов бактериями, имеющими ген *mlr*, хорошо изучены для бактерий pp. *Sphingopyxis*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, а также *Bacillus*, *Novosphingomonas* и некоторых других (Li *et al.*, 2017; Massey, Yang, 2020). Тем не менее, *mlr* деградация микроцистинов не является единственным путем их трансформации. Кластер генов *mlr* не детектирован у некоторых MC-деградирующих бактерий, в т.ч. *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Paucibacter* sp. (Li *et al.*, 2017). Обсуждается наличие альтернативных путей биохимической трансформации микроцистинов автохтонной микробиотой озера Эри (Северная Америка), ряда озер Польши, в которых не были детектированы *mlr* гены деструкции (Krishnan *et al.*, 2018; Krausfeldt *et al.*, 2019; Salter *et al.*, 2021).

Продукты трансформации MC-LR, отличные от промежуточных продуктов *mlr*-деструкции, — конъюгаты микроцистина с глутатионом MC-LR-Glu (m/z 651.82356) и с цистеином MC-LR-Cys (m/z 1116.56628) детектированы нами в процессе биодеструкции MC-LR автохтонной микробиотой Ладожского озера (залив Крестовый и Монастырская бухта) (рис. 6). Идентификация данных конъюгатов осуществлялась по точной массе протонированного молекулярного иона, а также согласно данным фрагментных спектров. В фрагментом спектре соединения с m/z 651, соответ-

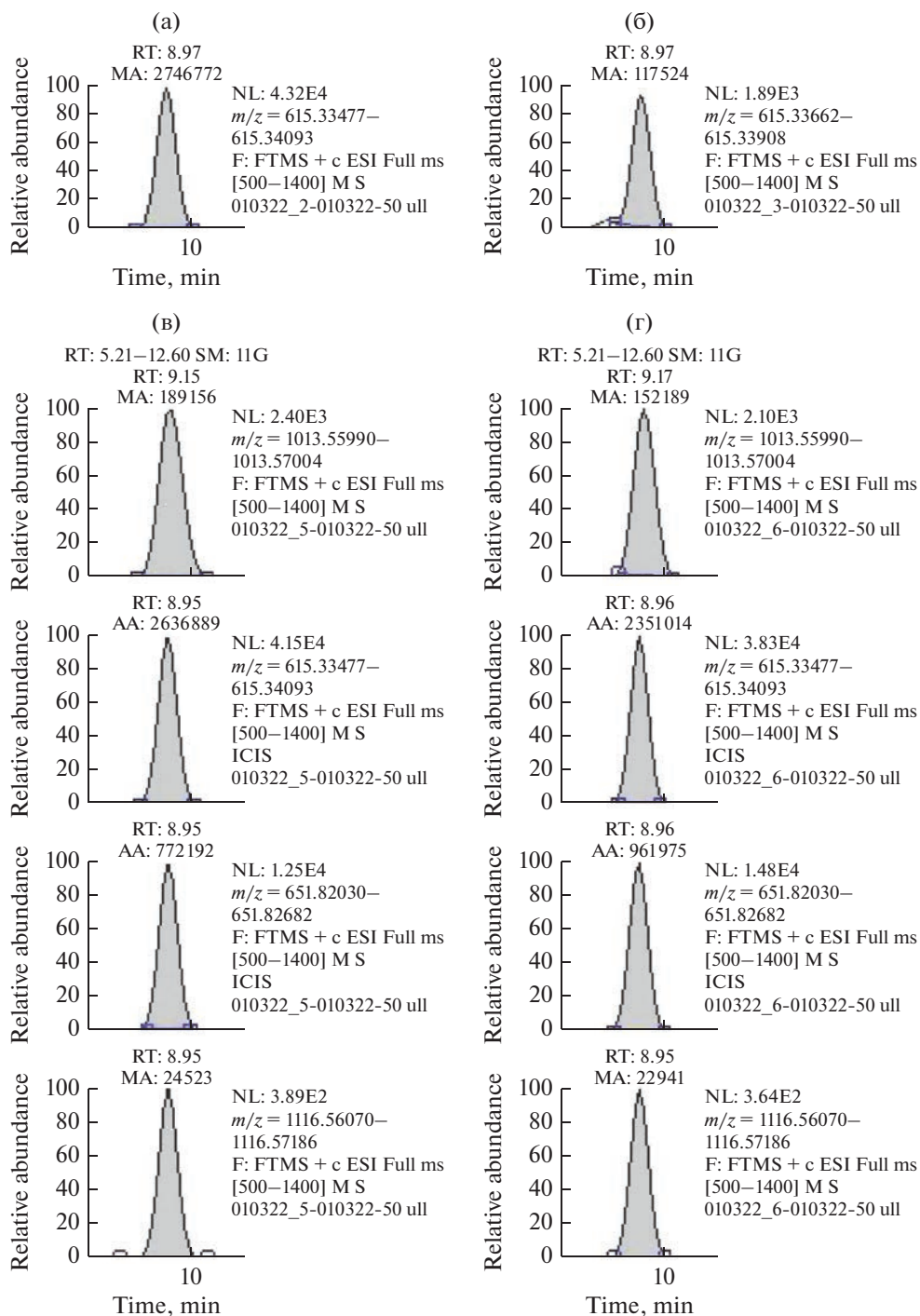


Рис. 3. Масс-хроматограммы продуктов трансформации микроцистина-LR: а – Сестрорецкий Разлив, б – Нижнее Суздальское озеро, в – Ладожское озеро, залив Крестовый, г – Ладожское озеро, Монастырская бухта. RT – время удерживания.

ствующего MC-LR-Glu, отмечали присутствие характеристического дочернего иона с m/z 587, а в фрагменте спектра соединения с m/z 1116, соответствующего MC-LR-Cys, дочерних ионов с m/z 1029 и 599 (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2017). Кроме того, в фрагментном спектре последнего присут-

ствовали дочерние ионы, принадлежащие MC-LR: 553; 571; 599; 682; 710; 728 (Чернова и др., 2016).

Несмотря на то, что роль глутатиона в бактериальной деградации микроцистинов еще не подтверждена, известно, что первой стадией биodeградации MC-LR высшими растениями

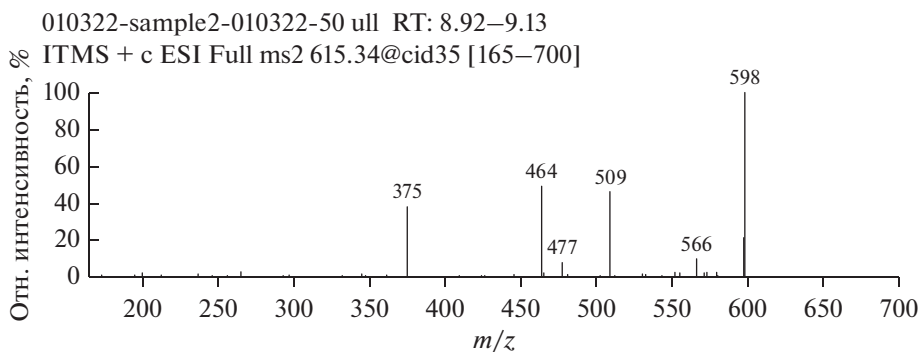


Рис. 4. Фрагментный спектр тетрапептида (m/z 615).

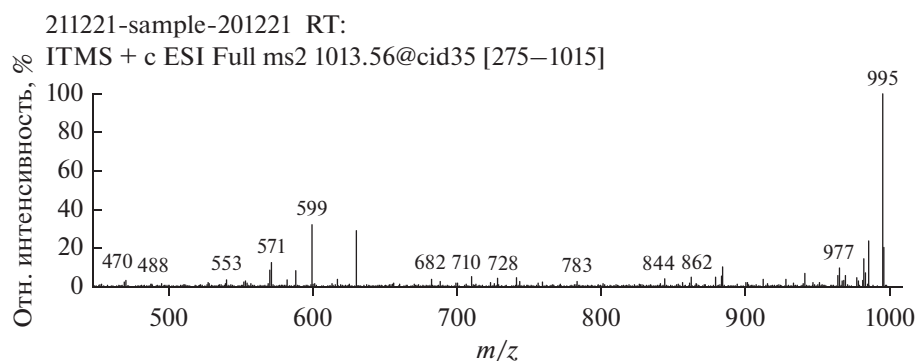


Рис. 5. Фрагментный спектр линеализованного MC-LR (m/z 1013).

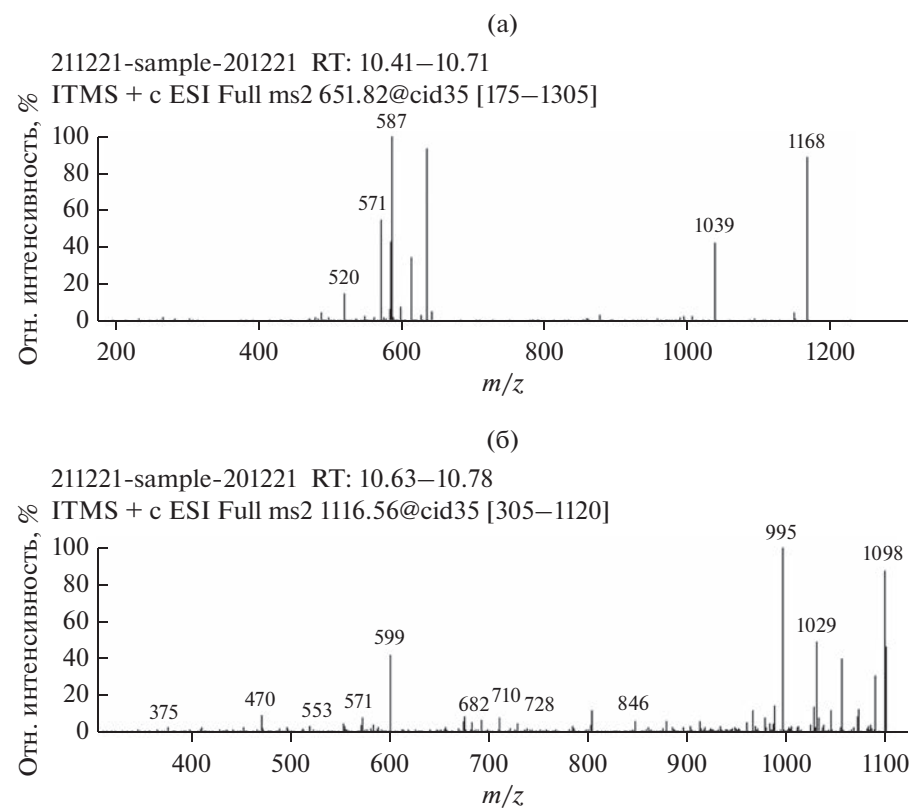


Рис. 6. Фрагментные спектры конъюгатов MC-LR с глутатионом (m/z 651) (а) и цистеином (m/z 1116) (б).

Ceratophyllum demersum, беспозвоночными *Daphnia magna*, моллюсками *Dreissena polymorpha*, крысами является конъюгация MC с GSH с последующим образованием цистеинового конъюгата MC-LR-CYS (Schmidt *et al.*, 2014; Krausfeldt *et al.*, 2019). Учитывая роль GSH в бактериальной деградации многих ксенобиотиков (Allocati *et al.*, 2009), предполагается участие глутатиона и в микробном метаболизме микроцистина (Mou *et al.*, 2013; Krausfeldt *et al.*, 2019). Полученные нами результаты подтверждают ранее высказанную гипотезу о широком распространении в природных объектах микроорганизмов, способных разлагать микроцистины как по *mlr* механизму, так и по другим биохимическим путям, в том числе с образованием конъюгатов микроцистина с глутатионом и цистеином (Krausfeldt *et al.*, 2019; Salter *et al.*, 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробная деградация микроцистинов играет важнейшую роль в снижении их концентрации в природных объектах. В настоящей работе установлено, что деструкция наиболее токсичного MC-LR автохтонной микробиотой происходит в образцах воды разнотипных водных объектов Северо-Запада РФ с площадью от 97 до 1787000 га, глубиной от 4.5 до 230 м, уровнем трофности от мезо- до гипертрофного. Структурные изомеры микроцистинов, в т.ч. MC-LR определены только в образцах воды, отобранных в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озерах, в которых ежегодно отмечается массовое развитие цианобактерий. При этом максимальное содержание микроцистинов 3271 нг/л (Сестрорецкий Разлив) и 228 нг/л (Нижнее Суздальское озеро) отмечено в пробах, отобранных в период “цветения” этих водоемов.

Автохтонная микробиота изучаемых объектов деградировала MC-LR независимо от истории “цветения” водоемов и их предварительной экспозиции с микроцистинами. Однако максимальная скорость деструкции MC-LR отмечена в водных образцах, отобранных в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озерах в период массового развития цианобактерий. Скорость деструкции MC-LR в образцах воды в отсутствие “цветения” была ниже в 1.5 раза (Сестрорецкий Разлив и Нижнее Суздальское озеро) и 18 раз (Ладожское озеро) по сравнению с “цветущими” водоемами. В этих же образцах наблюдалась лаг-фаза от 5 до 15 сут соответственно. Обычно лаг-фаза требуется для адаптации автохтонной микробиоты к MC-LR, увеличению количества MC-деградирующих микроорганизмов в популяции.

Состав детектируемых продуктов биодеструкции MC-LR позволяет предположить разные пу-

ти деградации MC в изучаемых водных объектах. Идентификация в продуктах деструкции линейализованного MC-LR (m/z 1013) и тетрапептида (m/z 615) свидетельствует о наличии в составе автохтонной микробиоты всех изучаемых водных объектов микроорганизмов, обладающих кластером генов *mlr*, отвечающих за деструкцию микроцистинов у целого ряда бактериальных культур pp. *Sphingopyxis*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Novosphingomonas*.

Наличие в продуктах деструкции MC-LR микробиотой Ладожского озера (залив Крестовый, Монастырская бухта) конъюгатов MC-LR с глутатионом (m/z 651) и цистеином (m/z 1116) свидетельствует о присутствии в этих образцах микроорганизмов, способных деструктировать MC-LR не только по *mlr* механизму, но и по другому биохимическому пути с участием глутатиона.

Полученные нами результаты подтверждают ранее выдвинутую гипотезу о широком распространении способности автохтонной микробиоты различных водных объектов к деструкции микроцистинов, которая может осуществляться как по *mlr* механизму, так и другими биохимическими путями. Представленные в данном исследовании данные важны для понимания процессов детоксикации автохтонной микробиотой водных объектов, загрязненных микроцистинами, а также могут быть использованы для выделения новых MC-деградирующих микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041100086-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белякова З.Н., Волошко Л.Н., Гаврилова О.В., Гогорев З.М., Макарова Ю.Б., Рундина Л.А. Водоросли, вызывающие “цветение” водоемов Северо-Запада России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 367 с.
- Воякина Е.Ю., Русских Я.В., Чернова Е.Н., Жаковская З.А. Токсичные цианобактерии и их метаболиты в водоемах Северо-Запада России // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 1. С. 124–129. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-1-124-129>
- Степанова А.Б., Воякина Е.Ю., Бабин А.В., Зуева Н.В., Зуев Ю.А. Результаты исследований прибрежной зоны Ладожского озера в районе Валаамского архипелага (1998–2019 гг.) в РГГМУ // Гидрометеорология и экология. 2020. № 60. С. 325–350. (Stepanova A.B., Voyakina E.Yu., Babin A.V., Zueva N.V., Zuev Yu.A. Results of studies of the coastal zone of Lake Ladoga in the area of the Valaam archipelago (1998–2019) at RSHU // *Gidrometeorologiya i Ekologiya. Hydrometeorology and Ecology (Proceedings of the Russian State Hydrometeorological Univer-*

- sity). 2020. № 60. P. 325–350)
<https://doi.org/10.33933/2074-2762-2020-60-325-350>
- Чернова Е.Н., Русских Я.В., Подольская Е.П., Жаковская З.А. Определение микроцистинов и анатоксина-а методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения // Научное приборостроение. 2016. Т. 26. № 1. С. 11–25.
- Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. Glutathione transferases in bacteria // FEBS J. 2009. V. 276. P. 58–75.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x>
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L., Jones A., Negri A.P., Riddles P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4086–4094.
<https://doi.org/10.1128/AEM.62.11.4086-4094.1996>
- Bukowska A., Kaliński T., Chróst R.J. Degradation of microcystins by water and bottom sediment bacterial communities from a eutrophic freshwater lake // Aquat. Microb. Ecol. 2018. V. 82. № 523. P. 129–144.
<https://doi.org/10.3354/ame01887>
- Cao Q., Steinman A.D., Yao L., Xie L. Effects of light, microorganisms, farming chemicals and water content on the degradation of microcystin-LR in agricultural soils // Ecotoxicol Environ Saf. 2018. V. 156. P. 141–147.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.030>
- Carmichael W.W., Boyer G.L. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes // Harmful Algae. 2016. V. 54. P. 194–212.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.002>
- Chernova E., Russkikh I., Voyakina E., Zhakovskaya Z. Occurrence of microcystins and anatoxin-a in eutrophic lakes of Saint Petersburg, Northwestern Russia // Oceanol Hydrobiol Stud. 2016. V. 45. № 4. P. 466–476.
<https://doi.org/10.1515/ohs-2016-0040>
- Chorus I., Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management // World Health Organization. London: Für WHO durch E & FN Spon / Chapman & Hall, 1999. 416 p.
- Chorus I., Falconer I.R., Salas H.J., Bartram J. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters // J. Toxicol. Environ. Health. Part B. 2000. V. 3. № 4. P. 323–347.
<https://doi.org/10.1080/109374000436364>
- Christoffersen K., Lyck S., Winding A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins // Aquat. Microb. Ecol. 2002. V. 27. № 2. P. 125–136.
<https://doi.org/10.3354/ame027125>
- Codd G.A., Lindsay J., Young F.M., Morrison L., Metcalf J.S. Harmful cyanobacteria: From mass mortalities to management measures // Harmful cyanobacteria / Eds Huisman J., Matthijs H.C.P., Visser P.M.; Netherlands: Springer, 2005. P. 1–23.
- Cyanobacterial toxins: microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: World Health Organization 2020 (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Dziga D., Maksylewicz A., Maroszek M., Budzyńska A., Napierkowska-Krzebietke A., Toporowska M., Grabowska M., Kozak A., Rosińska J., Meriluoto J. The biodegradation of microcystins in temperate freshwater bodies with previous cyanobacterial history // Ecotoxicol Environ Saf. 2017. V. 145. P. 420–430.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.046>
- Edwards C., Graham D., Fowler N., Lawton L.A. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters // Chemosphere. 2008. V. 73. № 8. P. 1315–1321.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07>
- Esterhuizen-Londt M., Hertel S., Pflugmacher S. Uptake and biotransformation of pure commercial microcystin-LR versus microcystin-LR from a natural cyanobacterial bloom extract in the aquatic fungus *Mucor hiemalis* // Biotechnology letters / Eds Esterhuizen-Londt M., Hertel S., Pflugmacher S. 2017. V. 39. № 10. P. 1537–1545.
<https://doi.org/10.1007/s10529-017-2378-2>
- Giaramida L., Manage P.M., Edwards C., Singh B.K., Lawton L.A. Bacterial communities' response to microcystins exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure // Int. Biodegradation. 2013. V. 84. P. 111–117.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.036>
- Ho L., Dreyfus J., Boyer J., Lowe T., Bustamante H., Duker P., Meli T., Newcombe G. Fate of cyanobacteria and their metabolites during water treatment sludge management processes // Sci. Total Environ. 2012. V. 424. P. 232–238.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.025>
- Hu C., Zuo Y., Peng L., Gan N., Song L. Widespread Distribution and Adaptive Degradation of Microcystin Degradation (mlr-Genotype) in Lake Taihu, China // Toxins. 2021. V. 13. Article 864.
<https://doi.org/10.3390/toxins13120864>
- Kiviranta J., Sivonen K., Lahti K., Luukkainen R., Niemelä S.I. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins – a laboratory study // Arch. Hydrobiol. 1991. V. 121. № 3. P. 281–294.
<https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/121/1991/281>
- Krausfeldt L.E., Steffen M.M., McKay R.M., Bullerjahn G.S., Boyer G.L., Wilhelm S.W. Insight into the molecular mechanisms for microcystin biodegradation in Lake Erie and Lake Taihu // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Article 2741.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02741>
- Krishnan A., Zhang Y.-Q., Mou X. Isolation and Characterization of Microcystin-Degrading Bacteria from Lake Erie // Bull Environ Contam and Toxicol. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s00128-018-2468-4>
- Kumar P., Hegde K., Brar S.K., Cledon M., Kermanshahi-Pour A. Potential of biological approaches for cyanotoxin removal from drinking water: A review // Ecotox-

- icol Environ Saf. 2019. V. 172. P. 488–503.
https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.066
- Lezcano M.Á., Quesada A., El-Shehawey R. Seasonal dynamics of microcystin-degrading bacteria and toxic cyanobacterial blooms: Interaction and influence of abiotic factors // *Harmful Algae*. 2018. V. 71. P. 19–28.
https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.11.002
- Li J., Li R., Li J. Current research scenario for microcystins biodegradation – A review on fundamental knowledge, application prospects and challenges // *Sci Total Environ*. 2017. V. 595. P. 615–632.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.285
- Li J., Li J., Shi G., Mei Z., Wang R., Li D. Discerning biodegradation and adsorption of microcystin-LR in a shallow semi-enclosed bay and bacterial community shifts in response to associated process // *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016. V. 132. P. 123–131.
https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.033
- Maghsoudi E., Fortin N., Greer C., Maynard C., Pagé A., Duy S.V., Sauvé S., Prévost M., Dorner S. Cyanotoxin degradation activity and mlr gene expression profiles of a *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Champlain, Canada // *Environ Sci Process Impacts*. 2016. V. 18. № 11. P. 1417–1426.
https://doi.org/10.1039/c6em00001k
- Massey I.Y., Yang F.A. Mini Review on Microcystins and Bacterial Degradation // *Toxins*. 2020. V. 12. № 4. 268.
https://doi.org/10.3390/toxins12040268
- Medvedeva N.G., Kuzikova I.L. Mycrocystin-LR degradation by indigenous bacterial community of Rybinsk reservoir // *IOP Conference Series “Earth and Environmental Science”*. 2021. V. 834. № 1. Article 012066.
https://doi.org/10.1088/1755-1315/834/1/012066
- Medvedeva N., Zaytseva T., Kuzikova I. Cellular responses and bioremoval of nonylphenol by the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii* 1113 // *J. Mar. Syst*. 2017. V. 171. P. 120–128.
https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2017.01.009
- Meriluoto J., Spoof L., Codd G.A. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. 2017.
- Mou X., Lu X., Jacob J., Sun S., Heath R. Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie // *PloS one*. 2013. V. 8. № 4. Article e61890.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061890
- Rapala J., Lahti K., Sivonen K., Niemelä S. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a // *Lett. Appl Microbiol*. 1994. V. 19. P. 423–428.
https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00972.x
- Rastogi R.P., Sinha R.P., Incharoensakdi A. The cyanotoxin-microcystins: current overview // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. 2014. V. 13. P. 215–249.
https://doi.org/10.1007/s11157-014-9334-6
- Redouane E.M., El Amrani Zerrifi S., El Khalloufi F., Oufdou K., Oudra B., Lahrouni M., Campos A., Vasconcelos V. Mode of action and fate of microcystins in the complex soil-plant ecosystems // *Chemosphere*. 2019. V. 225. P. 270–281.
https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03
- Salter C., VanMensel D., Reid T., Birbeck J., Westrick J., Mundle S.O.C., Weisener C.G. Investigating the microbial dynamics of microcystin-LR degradation in Lake Erie sand // *Chemosphere*. 2021. V. 272. Article 129873.
https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.12
- Schmidt J., Wilhelm S., Boyer G. The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring // *Toxins*. 2014. V. 6. № 12. P. 3354–3387.
https://doi.org/10.3390/toxins6123354
- Shimizu K., Maseda H., Okano K., Itayama T., Kawauchi Y., Chen R., Zhang Z., Sugiura N. How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity // *Lakes & Reservoirs: Research & Management*. 2011. V. 16. № 3. P. 169–178.
https://doi.org/10.1111/j.1440-1770.2011.00480.x
- Sivarajah B., Simmatis B., Favot E.J., Palmer M.J., Smol J.P. Eutrophication and climatic changes lead to unprecedented cyanobacterial blooms in a Canadian sub-Arctic landscape // *Harmful Algae*. 2021. V. 105. Article 102036.
https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102036
- Sivonen K., Jones G. Chapter 3: Cyanobacterial toxins. In: *Chorus I., Bartram J. (Eds.), Toxic Cyanobacterial in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, 1999. P. 55–124.
- Toruńska-Sitarz A., Kotlarska E., Mazur-Marzec H. Biodegradation of nodularin and other nonribosomal peptides by the Baltic bacteria // *Int Biodeterior Biodegradation*. 2018. V. 134. P. 48–57.
https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.08.004
- Tsuji K., Naito S., Kondo F., Ishikawa N., Watanabe M.F., Suzuki M., Harada K. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization // *Environ. Sci. Technol*. 1994. V. 28. P. 173–177.
https://doi.org/10.1021/es00050a024
- Zurawell R.W., Chen H., Burke J.M., Prepas E.E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments // *J. Toxicol. Environ. Health, Part B: Critical Reviews*. 2005. V. 8. P. 1–37.
https://doi.org/10.1080/10937400590889412
- Zhu F.-P., Han Z.L., Duan J.L., Shi X.S., Wang T.T., Sheng G.P., Wang S.-G., Yuan X.-Z. A novel pathway for the anaerobic biotransformation of microcystin-LR using enrichment cultures // *Environ Polut*. 2019. V. 247. P. 1064–1070.
https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.013

Microcystin-LR Biodestruction by Autochthonous Microbiota of Different Water Bodies in the North-West of Russia

N. G. Medvedeva^{1, #}, T. B. Zaytseva¹, I. L. Kuzikova¹, and E. N. Chernova¹

¹ St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences (SPC RAS), Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, Korpusnaya st., 18, St. Petersburg, 197110 Russia

[#]e-mail: ngmedvedeva@gmail.com

The ability of the autochthonous microbiota of different water bodies in the North-West of the Russian Federation to degrade the highly toxic microcystin-LR (MC-LR) was shown for the first time. The maximum rate of degradation of MC-LR was noted in water samples from the Sestroretskij Razliv Lake and the Lower Suzdal Lake during the period of mass development of cyanobacteria. In water samples from Lake Ladoga, where no toxic cyanobacterial blooms were previously noted, MC-LR biodegradation proceeded at a much lower rate and with a longer lag phase. The composition of MC-LR biodegradation products indicates the presence in the autochthonous microbiota of the studied objects of microorganisms capable of degrading microcystins both by the mlr mechanism and by the biochemical pathway involving glutathione.

Keywords: water bodies, cyanobacteria, microcystin, autochthonous microbiota, biodegradation