На правах рукописи

Тихонова Ирина Васильевна

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПИКОПЛАНКТОННЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

03.00.16. – экология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ИРКУТСК, 2006

Работа выполнена в отделе Ультраструктуры Клетки Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск).

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, с.н.с. Ольга Ивановна Белых

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор Валентин Валерьянович Дрюккер
доктор биологических наук, с.н.с. Любовь Степановна Бузолева

Ведущая организация: Красноярский государственный университет

Защита диссертации состоится «__»_____2006 г. в ___часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при Иркутском государственном университете по адресу: 664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. проф. М.М. Кожова (ауд. 219). Факс (3952) 241855, e-mail: dekanat@bio.isu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Иркутского государственного университета.

Автореферат разослан «___»_____2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н. Е.С. Купчинская.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Автотрофный пикопланктон (АРР) – это мельчайшие планктонные водоросли и цианобактерии размером 0,2-2,0 мкм (Sieburth *et al.*, 1978; Stockner, Antia, 1986). Особенно велико значение автотрофного пикопланктона в олиготрофных водах, где он создает до 70 % первичной продукции (Stockner, 1991; Weisse *et al*., 1993; Vörös *et al*., 1998).

Байкал является крупнейшим пресноводным олиготрофным водоемом Центральной Азии. Геологические, географические и гидрологические особенности озера определяют уникальность и высокую степень эндемизма его обитателей (Lake Baikal, 1998). Численность АРР достигает в озере 1 млн кл/мл, а вклад в первичную продукцию составляет 60-80 % (Вотинцев и др., 1972; Бондаренко, Гусельникова, 1989; Nagata *et al*., 1994). Байкальский АРР на 90 % состоит из цианобактерий, а на 10 % - из эукариотических водорослей (Поповская, Белых, 2003). Несмотря на важное значение, которое играют в Байкале пикопланктонные цианобактерии, степень их изученности недостаточна из-за небольших размеров объекта и ограниченного набора морфологических признаков. Для уточнения систематического положения пикоцианобактерий ранее были весьма успешно использованы молекулярно-биологические методы (Britschgi *et al.*, 1991; Nelissen *et al*., 1996; Nübel *et al.*, 1997; Ernst *et al*., 1995, 2003). Поэтому предполагается применить комплексный подход в изучении биоразнообразия байкальских пикоцианобактерий с использованием методов морфологии и молекулярной биологии.

Другим важным аспектом в исследованиях цианобактерий является вопрос о потенциальной токсичности некоторых видов. Известно, что такое экологическое явление, как «цветение» водоемов, обусловленное массовым развитием цианобактерий, нередко приводит к появлению в воде токсинов. Наиболее распространенным среди них является микроцистин, который вызывает отравления и поражения печени у человека и животных (Dunn, 1996; Kurmayer *et al.*, 2003). Молекулярно-биологическими методами было показано, что гены, участвующие в синтезе микроцистина, распространены спорадически среди 5 родов цианобактерий (Rantala *et al.*, 1998). Описано, что некоторые представители родов *Synechocystis* и *Synechococcus* содержат гены микроцистинсинтетазы (Rantala *et al.*, 1998; Christiansen *et al.*, 2001). Так как численность цианобактерий высока в течение всего года, исследования байкальских цианобактерий на содержание гена токсичности весьма важны как с научной точки зрения, так и для оценки качества воды.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – исследование морфологии, ультраструктуры и определение последовательности гена 16S рРНК байкальских пикопланктонных цианобактерий и выявление потенциально токсичных цианобактерий.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Описать морфологию и ультраструктуру пикопланктонных цианобактерий озера Байкал *in situ* с помощью оптической и электронной микроскопии.

2. Выделить штаммы пикоцианобактерий озера Байкал и описать их, используя микроскопические методы.
3. Охарактеризовать генетическое разнообразие байкальских цианобактерий *in situ* в сравнение с цианобактериями из других водоемов.
4. Определить нуклеотидные последовательности фрагментов 16S рибосомного гена культивируемых байкальских цианобактерий и сравнить с последовательностями цианобактерий из других пресноводных экосистем.
5. Выявить генетический маркер токсичности цианобактерий – ген синтеза микроцистина (*mcy*E) – в суммарной ДНК пико- и фитопланктонной фракций озера Байкал и водоемов с различной степенью трофности.

Научная новизна работы. Впервые дана комплексная характеристика байкальских пикопланктонных цианобактерий, в работе приводятся данные микроскопических, ультраструктурных и молекулярно-биологических исследований пикоцианобактерий в культурах и *in situ*. Выявлено высокое морфологическое и генетическое разнообразие пикоцианобактерий озера Байкал и проведен сравнительный анализ байкальских пикоцианобактерий с цианобактериями олиготрофных, мезотрофных и эвтрофных озер. Впервые проведено исследование ДНК байкальских цианобактерий и цианобактерий ангарских водохранилищ с использованием специфических праймеров к гену *mcy*E и показано наличие потенциально токсичных цианобактерий в фитопланктоне Усть-Илимского водохранилища.

Практическая значимость работы. Исследование байкальского автотрофного пикопланктона позволило уточнить систематическое положение байкальских цианобактерий, ревизия была проведена согласно современной систематике. Нами получены значения биообъемов клеток различных морфотипов байкальских пикоцианобактерий, полученные данные можно использовать при мониторинговых исследованиях озера Байкал. Создан банк данных генетических последовательностей 16S рДНК байкальских пикоцианобактерий, зарегистрировано 24 последовательности культивируемых цианобактерий (DQ399905-DQ39907, DQ401110, DQ401111, DQ403805-DQ403807, DQ407506-DQ407518, DQ422952, DQ459297, DQ459298) и 6 последовательностей некультивируемых цианобактерий (DQ418752, DQ297458-DQ297462), получены и зарегистрированы генетические последовательности цианобактерий озера Хубсугул (DQ297464, DQ302754, DQ302755, DQ422951). Использованные в работе методы молекулярно-биологической детекции токсичных цианобактерий являются перспективными для быстрого выявления токсичных видов в различных экосистемах и могут быть применены для мониторинга любых водных объектов и оценки качества воды в них. Эти методы позволяют в короткий срок определить не только наличие токсичных цианобактерий, но и идентифицировать их видовую принадлежность.

В диссертацию вошли результаты, полученные при финансовой поддержке грантов РФФИ № 02-04-49756, 05-04-48624; РФФИ-Байкал № 01-04-97217, 05-04-97222; молодежный проект СО РАН № 140; НШ-2195.2003.4 (поддержка ведущих научных школ) и гранта 2006 – РИ – 112 /001/007.

Защищаемые положения:

1. В автотрофном пикопланктоне озера Байкал доминируют цианобактерии родов *Synechocystis*, *Synechococcus* и *Cyanobium*. Байкальские пикоцианобактерии, несмотря на сходство с другими пресноводными цианобактериями, являются морфологически и генетически отличными.
2. Показано, что цианобактерии озера Байкал, Иркутского и Братского водохранилищ не содержат гена синтеза микроцистина. В Усть-Илимском водохранилище выявлены цианобактерии *Microcystis aeruginosa*, которые являются потенциально токсичными.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на научных мероприятиях: международные симпозиумы «SIAL» (Иркутск, 2002), «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ» (Иркутск, 2003), «IAC 2004» (Люксембург, 2004), «Научные основы сохранения водосборных бассейнов: междисциплинарные подходы к управлению природными ресурсами» (Улан-Удэ – Улан-Батор, 2004); международная конференция «Изменения климата и окружающей среды в Центральной Азии» (Улан-Батор, 2005); молодежная конференция-школа «Научные школы Сибири» (Иркутск, 2005); 4 международная Верещагинская конференция (Иркутск, 2005); III международная конференция по актуальным проблемам современной альгологии (Харьков, 2005); международная конференция «Первичная продукция водных систем» (Борок, 2005); международная конференция «Новые технологии в интегративной медицине и биологии» (Паттайя, 2006), Всероссийская конференция с международным участием «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006).

Публикации и личный вклад автора. По результатам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них четыре статьи в центральных и зарубежных журналах. Экспериментальные данные были получены автором как самостоятельно, так и в совместных экспериментах. Результаты, представленные в диссертации, защищаются впервые.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на ___ стр., состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы, содержащего 167 источников (129 на иностранных языках), содержит 5 таблиц, проиллюстрирована 15 рисунками с 83 микрофотографиями.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.б.н. О.И. Белых, а также своим соавторам: Е.Г. Сороковиковой, А.С. Гладких, Г.В. Помазкиной, Э.Э. Пензиной. Автор благодарен сотрудникам отдела Ультраструктуры Клетки за ценные указания и помощь в работе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Дана общая характеристика цианобактерий, рассмотрены морфологические и ультраструктурные признаки, необходимые для идентификации и систематики цианобактерий порядка *Chroococcales*, особое внимание уделено пикопланктонным родам – *Synechocystis*, *Synechococcus* и *Cyanobium*. Даны

экологические характеристики озер Байкал, Хубсугул и водохранилищ Иркутской области. Приведена история открытия и изучения пикопланктонных цианобактерий в различных экосистемах. Освещены экологические аспекты молекулярно-генетических исследований цианобактерий. Приведены литературные данные по проблеме токсичного цветения водоемов, а также по структуре и механизму синтеза токсинов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб

Байкал. В период с 1998 по 2003 гг. пробы для получения чистых культур пикоцианобактерий и морфологического анализа *in situ* были отобраны в фотическом слое по всей акватории озера, включая пелагиаль, заливы и мелководья. Для выявления генов синтеза микроцистина в ДНК цианобактерий пробы отбирали ежемесячно в течение 2005 г. в Южном Байкале на середине разреза Листвянка-Танхой с глубин от 0 до 50 метров.

Хубсугул. На озере Хубсугул пробы для выделения ДНК и микроскопического наблюдения были отобраны в пелагиали северной части озера с глубин от 0 до 25 метров в августе 2004 г.

Иркутское, Братское и Усть-Илимское водохранилища. Пробы воды для исследований на наличие гена *mcy*E цианобактерий были взяты в водохранилищах в августе 2005 г. В Иркутском водохранилище пробы отобраны вблизи п. Патроны (0-5 м). В Братском водохранилище – в районе залива Монахово, в Усть-Илимском получены в районе р. Вихорева и в Нижнеилимской ветви с глубин от 0 до 25 метров.

Методы исследования

Монокультуры байкальских цианобактерий получали на среде Z-8 (Rippka, 1988) рассевом проб воды на 1 % агаризованную среду в чашки Петри. Культивирование осуществляли в термостате (New Brunswick G25, USA) со световым режимом 1000-1500 лк (использовали лампы белого света) и температурой 11-12 ºС. Полученные штаммы пикоцианобактерий хранятся в музее Байкальских водорослей, отдел Ультраструктуры Клетки, Лимнологический Институт СО РАН. Для экспериментов по исследованию токсичности цианобактерий были использованы штаммы *Microcystis aeruginosa* Kützing CALU 972 и 973, любезно предоставленные Л.Н. Волошко (БИН, Санкт-Петербург).

Для эпифлуоресцентной микроскопии применяли Axiovert 200 (Zeiss), снабженный ртутной лампой HBO 100W. Автофлуоресценцию цианобактерий наблюдали под зеленым фильтром (DM-580+0-590, BF-0-610, G(IF-545+BG-36), микрофотографии получали камерой Pixera Pengium 600CL (DiRactor^{TM}) с помощью программы ВидеоТесТ-Размер 5.0. Для определения размеров клеток использовали программу «Image-Pro» (версия 4.5.0.29), статистическую обработку данных проводили в программе Excel for Windows 2000. Биообъемы клеток подсчитывали в соответствии с формулами объемов эллипсоида, шара и гемисферического цилиндра (Albertano *et al*., 1997).

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) пробы воды и клетки культивируемых цианобактерий фиксировали глутаральдегидом до 1 % конечной концентрации. Затем их фильтровали на поликарбонатные мембраны с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore) и дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации. Напыление золотом проводили в установке CPD-030 (Balzers), после чего препараты наблюдали в микроскоп Philips SEM 525 M, цифровые фотографии получали с помощью системы электронного сканирования изображения.

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) препараты готовили двумя способами. Для негативного контрастирования цианобактерии фиксировали глутаральдегидом до 1 % концентрации, отмывали байкальской водой и наносили на сеточки с формваровой пленкой. Для исследования ультратонкого строения клетки, материал фиксировали 0,25 % глутаральдегидом и 1 % оксидом осмия (конечные концентрации), высушивали спиртами возрастающей концентрации и ацетоном, после чего заливали в эпоксидные смолы. Ультратонкие срезы после окрашивания уранилацетатом и цитратом свинца и контрастированные препараты наблюдали в электронный микроскоп LEO 906E при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофотографии получали с помощью цифровой камеры MegaView II и программного обеспечения MegaVision (Soft Imaging System GmbH, Germany).

Суммарную ДНК выделяли методом ферментативного лизиса с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Для амплификации использовали участок гена 16S рРНК и участок *mcy*E-гена микроцистинсинтетазы (Nübel *et al*., 1997; Rantala *et al*., 2004), очистку полученных ПЦР-продуктов выполняли набором «DNA and Gel Band Purification Kit» (Amersham Biosciences, США). Последовательности генов определяли на автоматическом приборе 373A DNA Sequencer (Backmann, США). Для АТ-клонирования цианобактериальной ДНК применяли набор реактивов «pGEM-T-Easy Vector Systems» (Promega, США). Выверенные нуклеотидные последовательности генов сравнивали с помощью программы поиска гомологичных последовательностей Blasta и регистрировали в GenBank, номера зарегистрированных последовательностей представлены выше. Филогенетический анализ и построение деревьев проводили с использованием программ MEGA (версия 3.1, Kumar *et al*., 2004) и PAUP (версия 4, Swofford, 1998), графическую обработку дендрограмм выполняли в программе CorelDRAW Graphics Suite (версия 12).

Глава 3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИКОЦИАНОБАКТЕРИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

3.1. Байкальские пикоцианобактерии *in situ*

В планктоне озера Байкал выявлены доминирующие пикоцианобактерии, которые согласно классификации, предложенной Komárek, Anagnostidis (1999), принадлежат родам *Synechocystis* Sauv., *Synechococcus* Näg. и *Cyanobium Synechocystis limnetica* Popovsk., открытым ранее (Поповская, 1968). По данным флуоресцентной микроскопии и последующего морфометрического анализа,

диаметр клеток составляет в среднем 1,2 мкм, биообъем клетки достигает 1,76 мкм^3. Клетки *S. limnetica* встречаются чаще всего по 2-4 вместе (рис. 1а). Нами отмечено, что встречаются агрегаты цианобактерий рода *Synechocystis* sp., весьма сходные с *S. limnetica*, но в колониях по 8 и более клеток.

Род *Synechococcus* был представлен несколькими морфотипами. Первый морфотип назван нами морфотипом «короткие прямые палочки», они составляют 0,69 мкм в диаметре и достигают длины 1,93 мкм. Деление клеток правильное, после деления дочерние клетки иногда остаются соединенными в цепочки по две-четыре клетки, биообъем клетки составляет 1,95 мкм^3. Другой морфотип пикоцианобактерий рода *Synechococcus* определен как «длинные палочки» со слегка изогнутыми концами, клетки имеют размеры 0,68 х 5 мкм, а биообъем составляет 8,5 мкм^3.

Цианобактерии рода *Cyanobium* были представлены клетками эллипсоидной формы, реже встречаются коккоидные пикоцианобактерии этого рода, при этом кокки располагаются в коротких цепочках из 3-5 клеток (рис. 1б). Средний размер эллипсоидных цианобактерий составляет 0,91 х 1,38 мкм, биообъем клетки таких цианобактерий составляет 0,59 мкм^3, средний диаметр коккоидных – 0,9 мкм, а биообъем равняется 0,47 мкм^3. Важными признаками для различения родов *Cyanobium* и *Synechococcus* являются тип деления и морфология дочерних клеток, поэтому только культивирование пикоцианобактерий позволяет четко различить представителей этих двух родов. В литературе встречаются термины «*Synechococcus*-type» и *Synechococcus*/*Cyanobium* кластер, которые используются для обозначения представителей этих родов при нехватке морфологических и генетических критериев для точного определения (Callieri, Stockner, 2002).

Наши данные позволили уточнить значения объемов различных байкальских морфотипов, которые в дальнейшем могут быть применены при мониторинговых исследованиях озера Байкал. Так, ранее для этого использовали значения биообъема, приведенные только для эллипсоидного морфотипа пикоцианобактерий (Nagata *et al*., 1994). Весьма сходны с пикопланктонными клетками и клетки некоторых истинно колониальных родов цианобактерий, с размерами клеток до 2 мкм, например, *Aphanocapsa* Nägeli, *Aphanothece* Nägeli, *Cyanodiction* Pascher и другие (Callieri, Stockner, 2002). В Байкале таким наиболее часто встречаемым родом является *Aphanothece*. Клетки пикоцианобактерий этого рода располагаются парами или хаотически и объединены общим слоем слизи, которую не видно при эпифлуоресцентном наблюдении. Нами описаны представители вида *Aphanothece* sp. с плотно расположенными коккоидными клетками. Пикоцианобактерии другого массового вида *A. clathrata* W. et G.S. West, по результатам СЭМ имеют эллипсоидные клетки шириной 0,8-1,0 мкм и длиной 1,5 мкм (Belykh, Sorokovikova, 2003).

Используя полученные данные, нами было проведено сравнительное исследование морфологических характеристик пикоцианобактерий. Среди известных *Synechocystis* spp., обитающих в пресноводных водоемах не было найдено представителей этого рода, подобных *Synechocystis limnetica*. Наиболее

близка к байкальскому виду цианобактерия *S. parvula* Perfiliev, но она имеет более мелкие размеры – от 0,7 до 0,8 мкм. Из культивируемых цианобактерий рода *Synechocystis* близким к байкальскому виду является штамм *Synechocystis* PCC 8943, выделенный из мелкого пресноводного водоема, размеры клеток этого штамма до 2 мкм.

Сравнивая байкальские цианобактерии *Synechococcus* морфотипа «короткие палочки» с палочковидными цианобактериями других пресноводных озер, следует отметить их несхожесть. Более похожими на них цианобактериями являются палочковидные цианобактерии Балтийского моря с диаметром 0,55 мкм и длиной, практически совпадающей с длиной байкальских палочек (Albertano *et al*., 1996). Морфология *Synechococcus* морфотипа «длинные палочки» наиболее близка к морфологии цианобактерий *Synechococcus capitatus* Bailey-Watts *et* Komárek (Bailey-Watts, 1968; Komárek, Anagnostidis, 1999).

Коккоидные цианобактерии рода *Cyanobium*, аналогичные байкальским пикоцианобактериям, были обнаружены в озерах Гурон, Мичиган (Fahnenstiel, Carrick, 1992) и в озере Онтарио (Leppard *et al.*, 1987). Однако наиболее сходными с байкальскими эллипсоидными цианобактериями этого рода являются эллипсоидные цианобактерии Черного моря (Uysal, 2001).

Сравнительный анализ пикоцианобактерий озер Центральной Азии показал разнообразную морфологию пикоцианобактерий в озерах Телецкое и Хубсугул. Например, в озере Хубсугул выявлены морфотипы пикоцианобактерий родов *Cyanobium* и *Synechococcus*, сходные с байкальскими, однако более мелкие – эллипсоидные клетки размером 0,5 х 0,8 мкм и 0,85 х 0,9 мкм (Belykh *et al*., 2005). Род *Cyanobium* представлен клетками размером 0,75 х 1,1 мкм, которые собирались в агрегаты – цепочки, а род *Synechococcus* – клетками палочковидной формы 0,45 х 5 мкм и 0,75 х 5-10 мкм. Наиболее близкими к байкальским морфотипам являются палочковидные цианобактерии с диаметром клеток 0,75 мкм. Типичными цианобактериями родов *Synechococcus* и *Cyanobium* Телецкого озера являются кокки со средними размерами 0,65 мкм, мелкие эллипсоидные цианобактерии 0,44 х 0,33 мкм и тонкие палочки размерами 0,35 х 0,95 мкм и 0,3 х 1,2 мкм (Белых, Сафонова, 2005). Все морфотипы цианобактерий сильно отличались от байкальских пикопланктонных цианобактерий.

3.2. Морфологическая характеристика байкальских культивируемых пикоцианобактерий

Для изучения байкальских культивируемых цианобактерий использовали 24 штамма пикоцианобактерий. По морфологическим признакам культивируемые нами цианобактерии разделены на три рода: *Synechocystis, Synechococcus* и *Cyanobium*. По пигментному составу штаммы делятся на две группы: фикоэритрин- и фикоцианин-доминирующие. Комплексное описание культур проводится в отдельной таблице диссертации, а некоторые микрофотографии представлены на рис. 1 (в, г).

Культивируемый представитель рода *Synechocystis* штамм BAC 9721 является более крупным по сравнению с *S. limnetica*, а также имеет ярко

красную флуоресценцию, свидетельствующую о высоком содержании фикоцианина. Большая часть культур (13) принадлежат к роду *Synechococcus*, а 10 – к роду *Cyanobium*. Анализируя полученные данные, можно заключить, что клетки эллипсоидного морфотипа наиболее распространены среди культивируемых и некультивируемых байкальских цианобактерий, так, 50 % байкальских штаммов имеют данную форму клетки.

Суммируя морфологические особенности байкальских пикоцианобактерий *in situ* и в культурах, следует отметить, что пикоцианобактерии озера Байкал весьма варьируют по форме и размеру. Наибольшей вариабельностью обладает длина клетки, чем ширина, особенно у представителей рода *Synechococcus.* Также, биообъем клетки у них в 3-5 раз выше, чем у клеток цианобактерий рода *Cyanobium*. Среди культивируемых цианобактерий наиболее близкими к байкальским штаммам оказались эллипсоидные *Synechococcus/Cyanobium* ОК 01 и ОК 10, выделенные из озера Окутама и палочковидные *Synechococcus* ВО 8807 из озера Констанце. Исследования пикопланктона *in situ* показали, что наиболее похожими на байкальские пикоцианобактерии являются цианобактерии озер Америки и Канады – Гурон, Мичиган, Онтарио и германского озера Констанце.

Глава 4. УЛЬТРАСТРУКТУРА БАЙКАЛЬСКИХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Исследования цианобактерий с помощью ТЭМ показали ультраструктуру клетки, типичную для порядка *Chroococcales* и выявили особенности ультратонкого строения трех родов цианобактерий. Микрофотографии некоторых из них представлены на рис. 1 (д, е).

Для рода *Synechocystis* показано различие в ультраструктуре клеток штамма BAC 9721 и некультивируемой цианобактерии *S. limnetica* в количестве тилакоидных мембран и наличии слизи у разделившихся клеток культуры *Synechocystis* BAC 9721. Нами не обнаружен слой гликокаликса в клеточной стенке, ранее описанный для семи морских изолятов *Synechocystis* (Vaara, 1982). Вероятно, этот признак не является характерным для пресноводных цианобактерий.

Для рода *Synechococcus* исследования с помощью метода негативного контрастирования показывают разнообразие морфотипов и отсутствие спинов на четырехслойной клеточной стенке. Ультратонкое строение некультивируемых цианобактерий рода *Synechococcus* весьма простое, с двумя концентрическими тилакоидными мембранами. Штаммы *Synechococcus* BAC 0103 и BAC 22 имеют четкое морфологическое отличие на ультратонких срезах – клетки *Synechococcus* BAC 0103 прямые, цилиндрической формы, а *Synechococcus* BAC 22 – овальные и слегка изогнутые. Тилакоиды располагаются концентрически, параллельно клеточной стенке. Как у *Synechococcus* sp. из природных образцов, так и у культивируемых штаммов наблюдаются две тилакоидные мембраны. Наиболее распространенными клеточными включениями являются полифосфатные гранулы и полиэдральные тела, последних больше, чем у представителей р. *Synechocystis*, они занимают центральную часть клетки, имеют форму многогранника и среднюю

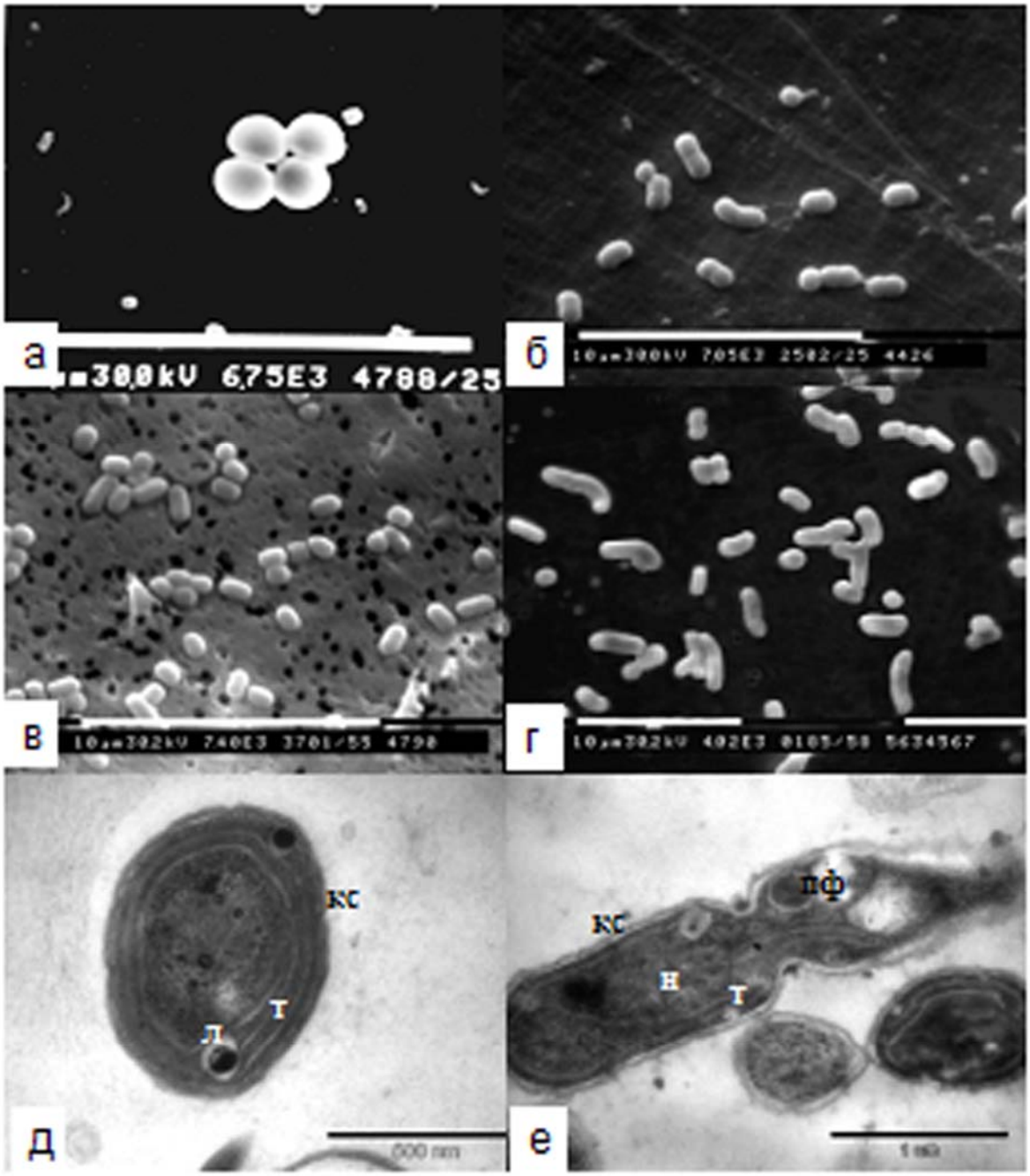

Рис 1. Байкальские пикопланктонные цианобактерии. СЭМ: а – *Synechocystis limnetica*; б – *Cyanobium* sp. *in situ*; в – культивируемые цианобактерии *Cyanobium* BAC 106; г – культивируемые цианобактерии *Synechococcus* BAC 22. ТЭМ: д – ультратонкий срез *Cyanobium* sp. *in situ*; е – ультратонкий срез *Synechococcus* BAC 0103. Обозначения: кс – клеточная стенка; т – тилакоиды; н – нуклеоид; пф – полифосфатные гранулы; л – липидные гранулы.

электронную плотность, иногда наблюдается темный контур вокруг включения. Гранулы полифосфатов выглядели как включения неправильной формы в периферической части клетки. Область нуклеоида четко выражена как в делящихся, так и во взрослых клетках.

Некультивируемые пикоцианобактерии рода *Cyanobium* озера Байкал имеют эллипсоидную форму клеток с гладкой поверхностью, без спинов и пилей и равномерно делятся в одной плоскости (рис. 1, д). Иногда число тилакоидов в клетке достигает трех, хотя наиболее встречаемым морфотипом в природе являются цианобактерии с двумя тилакоидами. Микрофотографии типичного представителя рода *Cyanobium* – штамма BAC 67 показывают, что центр клетки занимают полиэдральные тела, а область нуклеоида менее осмиофильная. Два концентрических тилакоида имеют пристенное положение, на их мембранах располагаются фикобилисомы размером 15 нм. Из других включений в клетках были отмечены гранулы полифосфатов, небольшие размеры которых (до 30 нм) свидетельствуют о том, что клетка находится в активной стадии роста. Цианобактерии штамма *Cyanobium* BAC 9990 отличаются от цианобактерий штамма BAC 67 только формой клетки, внутреннее строение их практически одинаково.

Исследование пикоцианобактерий при помощи ТЭМ показало различия трех родов *Synechocystis*, *Synechococcus* и *Cyanobium*. Наиболее четко выраженные отличия наблюдаются между родами *Synechocystis* и *Synechococcus*. Между родом *Synechococcus* и недавно выделенным родом *Cyanobium* различия в большей мере связаны с формой клетки и типом деления, ультраструктура их клеток является весьма сходной.

Суммируя данные всех морфологических исследований, можно говорить о том, что для видов *Synechococcus* и *Cyanobium* данные ультратонкого строения не являются информативными для установления их систематического положения. Хотя ранее для разделения этих родов было предложено использовать ультраструктурные характеристики (Komarek, Anagnostidis, 1999).

Глава 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА 16S рРНК ПИКОЦИАНОБАКТЕРИЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

5.1. Определение первичных последовательностей гена 16S рРНК некультивируемых пикоцианобактерий озера и филогенетический анализ

Определено 6 последовательностей некультивируемых цианобактерий из озера Байкал и 4 – из озера Хубсугул длиной 600-633 пар нуклеотидов (начиная с 106 нуклеотида гена). Проведенный анализ полученных последовательностей показал, что все они являются новыми, а наибольшую гомологию они имеют с пикоцианобактериями из альпийских озер и озер Хубсугул и Бива (98-99 %). Филогенетический анализ с высокой поддержкой выявил общую кладу для последовательностей цианобактерий озера Хубсугул (клоны 7, 14) и Байкал (клоны 1, 4, 5). Эта клада также содержит последовательности цианобактерий озер Бива, Павин (Франция) и небольших альпийских озер Европы. Остальные клоны были расположены спорадически,

например, последовательность клона 6 (Байкал) принадлежит ветви, включающей фикоэритрин-доминирующие палочки из озер Окутама и Констанце (Katano, Fukui, 2003; Ernst *et al*., 2003), *Cyanobium rubescens* Chang и клон цианобактерии MW 15-2 субальпийского озера (Crosbie *et al*., 2003). Клоны 9 (Хубсугул) и 3 (Байкал) являются особенными, они лежат в кладе, образованной некультивируемыми цианобактериями P 38-23, MW32B5 и MW38B3 из европейских озер. Также эту кладу дополняют представители р. *Cyanobium* и *Synechococcus* из озера Бива. Последовательность клона 2 (Байкал) имеет следующих общих родственников – цианобактерия ARC-11 из озера Эри, клон из озера Мичиган и клон MH 301 из озера Мондси. Интересен тот факт, что в одной кладе лежат цианобактерии из совершенно разных пресноводных озер, как по происхождению, так и по трофности.

Таким образом, ближайшими родственниками некультивируемых байкальских цианобактерий являются пресноводные цианобактерии разнообразных водоемов. Такие данные можно объяснить тем, что озеро Байкал имеет много разных экотопов, где варьируют температура, освещенность и другие экологические факторы, что обуславливает наличие высокого разнообразия пикоцианобактерий.

5.2. Определение первичных последовательностей гена 16S рРНК культивируемых пикоцианобактерий озера Байкал и филогенетический анализ

Получено 24 новых последовательности 16S рДНК культивируемых байкальских цианобактерий, 23 фрагмента гена пикоцианобактерий принадлежат к кластеру *Synechococcus/Cyanobium*, а один фрагмент – к роду *Synechocystis*. Длина фрагментов составляет 535 пар нуклеотидов, нуклеотидный состав на 97-100% совпадает со структурой последовательностей цианобактерий р. *Synechococcus*/*Cyanobium* из пресноводных водоемов, что свидетельствует о принадлежности к данному кластеру. Последовательности культур BAC 103 и 104, а также BAC 16, 67, 9990, 11, 39 имеют 100 % гомологию участка 16S рРНК гена, такой факт был описан ранее для морфологически различающихся видов бактерий (Palys *et al*., 1997).

Проведенный филогенетический анализ (рис. 2) показывает высокое сходство всех пресноводных цианобактерий, при этом морские пикоцианобактерии *Cyanobium bright*, *Synechococcus* T7cc1 располагаются отдельно, с бутстреп-поддержкой 99 %. Показано, что 41 % культур цианобактерий оз. Байкал образуют «кластер байкальских цианобактерий», а остальные – распадаются на отдельные ветви вместе с цианобактериями из других водоемов. «Байкальский кластер» имеет высокую бутстреп-поддержку (73), 50 % культивируемых штаммов пикоцианобактерий в этом кластере имеют идентичные нуклеотидные последовательности на данном участке гена, все штаммы являются фикоэритрин-доминирующими и имеют красно-коричневую окраску (BAC 9950, 18, 39, 11, 9990, 67, 16, 41, 08). Однако, мы можем утверждать, что все штаммы являются разными видами, с учетом проведенных ранее морфологических исследований. Для 33 % последовательностей пикоцианобактерий (BAC 103, 104, 9984, 9969, 105, 106)

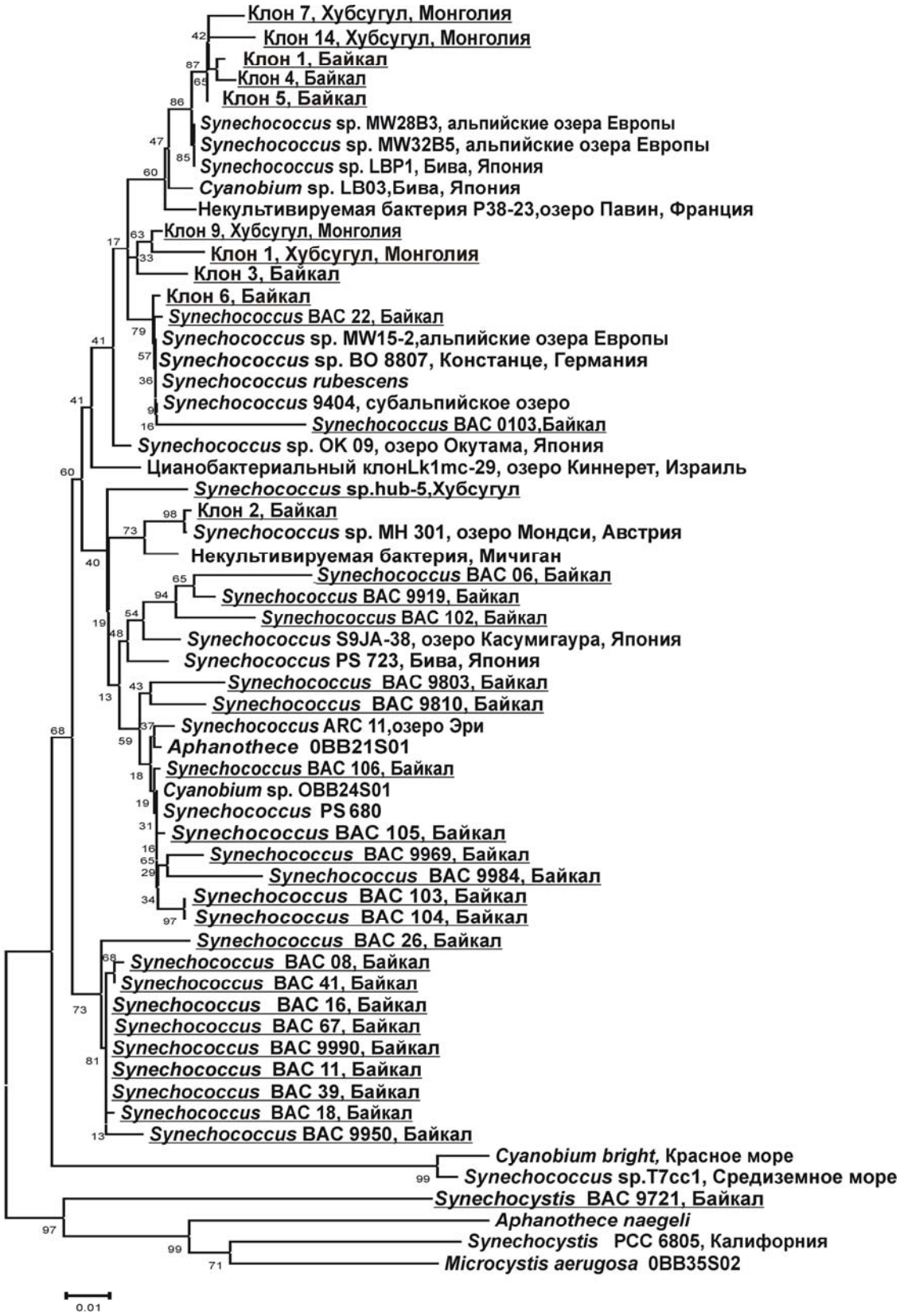

Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей фрагмента гена 16S рРНК байкальских пикоцианобактерий и цианобактерий из GenBank. Подчеркнуты виды, последовательности которых получены автором.

было характерно образование кластера «фикоцианин-доминирующих» пикоцианобактерий вместе с другими пресноводными видами. Наиболее близкими родственниками для них являются пикоцианобактерии р. *Synechococcus* из озера Бива и пресноводная *Aphanothece* sp. из водоема Италии, последовательность которой описана недавно (Castiglioni *et al*., 2005). Все штаммы, кроме BAC 9810, лежащие в кластере с цианобактериями из японских озер, имеют зеленоватую окраску. Штаммы *Synechocystis* PCC 6805, *Synechocystis* BAC 9721, *M. aeruginosa* OBB35S02 и *Aphanothece naegeli* лежат в кластере с высокой бутстреп-поддержкой (97 %), причем байкальский штамм *Synechocystis* BAC 9721 образует отдельную ветвь.

Предпринятые нами попытки разделить два очень сходных рода – *Synechococcus* и *Cyanobium* – только использованием выбранного фрагмента 16S рибосомного гена показали, что цианобактерии этих родов весьма схожи генетически и могут лежать в одной кладе. Например, типичные представители рода *Synechococcus* с явно выраженным неравномерным делением и присутствием извитых палочек в культуре – штаммы BAC 22 и BAC 0103 лежат в одной кладе с видом *Cyanobium rubescens*. Это говорит о том, что, скорее всего, разделение родов *Synechococcus* и *Cyanobium* является неправомерным, а они принадлежат к одному полифилетичному роду цианобактерий.

В заключение, следует отметить, что в озере присутствуют генетически уникальные пикоцианобактерии, образующие вместе с другими пресноводными цианобактериями общую группу. Большое разнообразие генотипов пикоцианобактерий можно объяснить разнообразием экологических условий на Байкале – например, в пелагиали и литорали.

Глава 6. ВЫЯВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРОВ ТОКСИЧНОСТИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Штаммы *Microcystis aeruginosa* CALU 972 и CALU 973, использованные нами в качестве положительного контроля, являлись токсичными для водных животных, как показали проведенные нами эксперименты. Анализ ДНК этих штаммов выявил ПЦР-продукт, соответствующий по молекулярной массе гену *mcy*E, что свидетельствует о способности этих цианобактерий к синтезу микроцистина.

В суммарной ДНК фито- и пикопланктона озера Байкал и фитопланктона Иркутского и Братского водохранилищ ген *mcy*E не выявлен. В результате тестирования ДНК фитопланктона Усть-Илимского водохранилища зарегистрирован ПЦР-продукт длиной 812 пар нуклеотидов, что свидетельствует о наличии *mcy*E гена в цианобактериях этого водоема. Определение нуклеотидной последовательности полученного фрагмента показало его принадлежность гену *mcy*E цианобактерии *M. aeruginosa*, этот вид известен как один из основных возбудителей массового цветения водоемов во многих странах мира. Микроскопический анализ планктонных проб подтвердил, что в августе 2005 г. в Усть-Илимском водохранилище наблюдалось массовое цветение цианобактерий этого вида, численность их достигала 500 тыс. кл/л (Тихонова и др., 2006).

Построенное филогенетическое дерево на основе полученных нами фрагментов гена *mcy*E показало, что контрольные штаммы отличаются от *M. aeruginosa* Усть-Илимского водохранилища, который, в свою очередь формировал отдельную ветвь, занимающую базальное положение по отношению к ним (рис. 3). Контрольный штамм *M. aeruginosa* CALU 973 на дереве располагается вместе со штаммами этого вида, выделенными во время токсичного цветения водоемов Европы. Штамм *M. aeruginosa* CALU 972 наиболее близок цианобактериям из японского озера Касумигаура и озера Мира (Португалия).

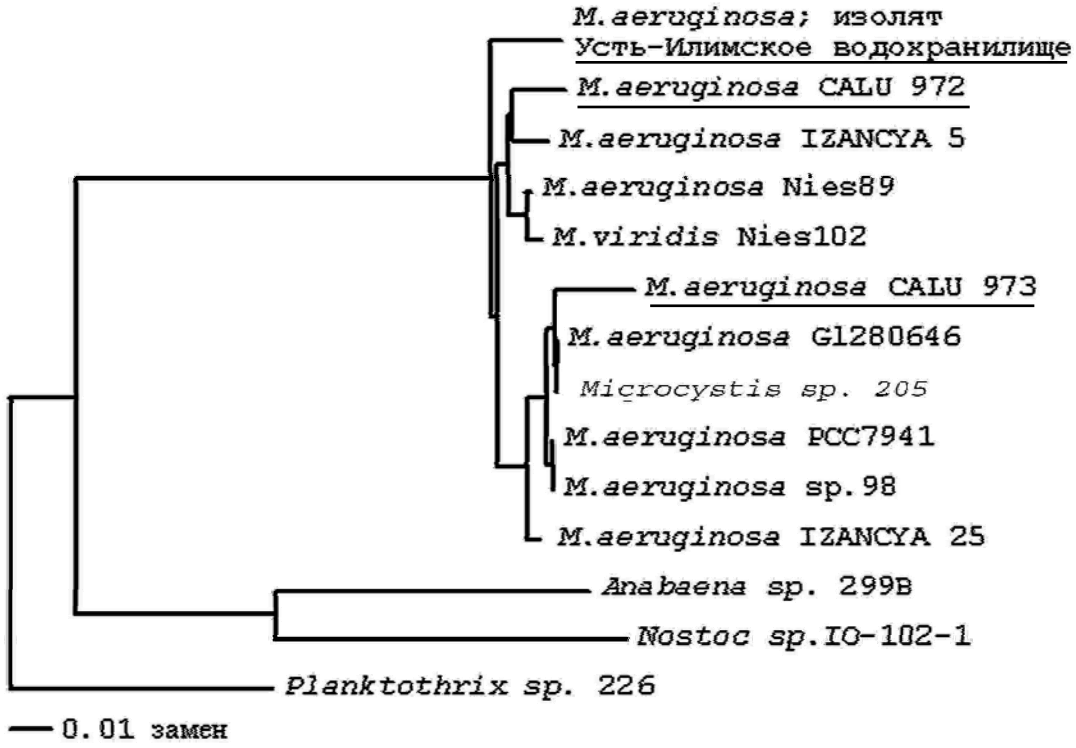

Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе фрагмента *mcy*E-гена кластера микроцистинсинтетазы. Подчеркнуты виды, последовательности которых получены автором.

Таким образом, в озере Байкал, Иркутском и Братском водохранилищах не выявлены цианобактерии, способные продуцировать микроцистин, а в фитопланктоне Усть-Илимского водохранилища методом ПЦР-диагностики показано наличие цианобактерии *M. aeruginosa*, содержащей один из генов синтеза микроцистина – *mcy*E. Концентрация этого вида в Усть-Илимском водохранилище в августе 2005 года была намного выше, чем в Байкале и других исследуемых водохранилищах в это же время. Известно, что массовое развитие токсичных цианобактерий часто является следствием эвтрофирования водоемов, а концентрации органических веществ и биогенных элементов в Усть-Илимском водохранилище превышают ПДК в несколько раз (Кудринская, Морева, 2004). Использованные в работе методы являются перспективными для быстрого выявления токсичных штаммов и прогнозирования состояния экосистемы водоемов, они помогают установить, какой вид цианобактерий, продуцирующих микроцистин, присутствует в данном водоеме.

ВЫВОДЫ

1. В составе пикоцианобактериального сообщества озера Байкал на основе данных флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии выявлены представители трех родов цианобактерий: *Synechocystis*, *Synechococcus, Cyanobium*. Род *Synechocystis*, помимо ранее известного эндемичного вида *Synechocystis limnetica*, представлен *Synechocystis* sp., образующим агрегаты. Морфотипы с цилиндрическими и палочковидными изогнутыми клетками с неравномерным делением определены нами как представители рода *Synechococcus.* Морфотипы с коккоидными, эллипсоидными и коротко-цилиндрическими формами клеток и равномерным делением отнесены к роду *Cyanobium*.

2. Получено 24 штамма байкальских пикоцианобактерий. По составу пигментов штаммы делятся на две группы: фикоэритрин-доминирующие и фикоцианин-доминирующие. По данным флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии один штамм принадлежит к роду *Synechocystis*, 14 – к роду *Synechococcus*, а остальные – к роду *Cyanobium*. К роду *Synechococcus* отнесены штаммы с полиморфными клетками от кокков до длинных палочек, образующие агрегаты. Цианобактерии рода *Cyanobium* представлены различными морфотипами: одиночные или в парах клетки от коккоидной до палочковидной формы размером от 0,6 до 1 мкм.

3. Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК генов 6 некультивированных пикоцианобактерий озера Байкал показал, что все полученные последовательности уникальны и схожи с некультивируемыми цианобактериями озера Хубсугул, Бива и других пресноводных озер.

4. Все 24 последовательности 16S рРНК генов культивируемых цианобактерий являются новыми и принадлежат родам *Synechocystis*, *Synechococcus* и *Cyanobium*. Показано, что 41 % культур цианобактерий образуют «кластер байкальских цианобактерий», а остальные распадаются на отдельные ветви вместе с цианобактериями из пресноводных олиготрофных и мезотрофных водоемов. Использование фрагмента рибосомного гена для систематики пикоцианобактерий выявило полифилетичность родов *Cyanobium* и *Synechococcus* и тенденцию схожести пикоцианобактерий по экотопам.

5. Проведен поиск гена синтеза микроцистина *mcy*E в суммарной ДНК пико- и фитопланктонной фракций байкальской воды и ангарских водохранилищ. Установлено, что цианобактерии озера Байкал, Иркутского и Братского водохранилищ не содержат гена *mcy*E в отличие от цианобактерий Усть-Илимского водохранилища, в котором этот ген был обнаружен при помощи молекулярно-биологических методов у вида *Microcystis aeruginosa*.

Основные работы, опубликованные по теме диссертации

1. Пензина Э.Э. Использование люминесцентных методов в систематике водорослей озера Байкал / Пензина Э.Э., Тихонова И.В. // Тезисы лекций и докладов 5 Всероссийской школы-семинара "Люминесценция и сопутствующие явления". – Иркутск, 2000. – С. 60.

2. Тихонова И.В. Подходы к молекулярно-биологическим исследованиям байкальских автотрофных пикоцианобактерий / Тихонова И.В., Белых О.И. // Тез. докл. конф. «Оценка современного состояния микробиологических исследований в Восточно-Сибирском регионе». – Иркутск, 2002. – С. 123-124.

3. Kalyuzhnaya O.V. Investigation of the cyanobacterial *sodB* gene from *Anabaena* sp. of Lake Baikal using PCR, direct sequencing and molecular cloning methods / Kalyuzhnaya O.V., Konstantinov Y.M., Belykh O.I., Tikhonova I.V. // Abstracts of inter. Baikal symposium on Microbiology (IBSM-2003) “Microorganisms in ecosystems of lakes, rivers and reservoirs”. – Irkutsk, 2003. – P.58-59.

4. Belykh O.I. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: Species composition, abundance and structure / Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Saphonova T.A., Tikhonova I.V. // Abstracts of the third Inter. Simp. Ancient Lakes: Speciation, development in time and space, natural history. – Irkutsk, 2002. – P. 21.

5. Belykh O.I. Cyanobacteria of Lake Khubsugul / Belykh O.I., Tikhonova I.V. // Abstracts of inter. Baikal symposium on Microbiology (IBSM-2003) “Microorganisms in ecosystems of lakes, rivers and reservoirs”. – Irkutsk, 2003. – P. 180-181.

6. Tikhonova I.V. Biodiversity of picoplanktonic cyanobacteria in lakes Baikal and Hovsgol / Tikhonova I.V., Belykh O.I., Sorokovikova E.G. // Abs. of «16th Symposium of the International Association for Cyanophyta Research». – Luxembourg, 2004. – P. 66-67.

7. Белых О.И. Автотрофный пикопланктон крупнейших озер Центральной Азии / Белых О.И., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В. // Тезисы международной конференции ″Научные основы сохранения водосборных бассейнов: междисциплинарные подходы к управлению природными ресурсами". – Улан-Удэ – Улан-Батор, 2004. – С. 135-137.

8. Белых О.И. Продуктивность автотрофного пикопланктона в озерах Байкал и Хубсугул / Белых О.И., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В. // Материалы международной конференции ″Первичная продукция водных систем". – Борок, 2005. – С. 11-13.

9. Tikhonova I.V. Comparing autotrophic picoplankton in Great freshwater Lakes of Central Asia: Baikal and Hovsgol / Tikhonova I.V., Belykh O.I., Sorokovikova E.G. // Abs. of Third inter. conf. «Environmental Change in Central Asia». – Mongolia, 2005. – P. 110-111.

10. Тихонова И. В.Молекулярно-биологические исследования пикоцианобактерий озера Байкал / Тихонова И. В., Белых О.И. // Материалы III

межд. конф. по актуальным проблемам соврем. альгологии. – Харьков, 2005. – С. 161.

11. Тихонова И.В. Выявление токсичных и потенциально токсичных видов цианобактерий в байкальской воде / Тихонова И.В., Белых О.И., Помазкина Г.В., Гладких А.С. // Тез. докл. четвертой Верещагинской Байкальской конференции. – Иркутск, 2005. – С. 190-191.

12. Тихонова И.В. Выявление генетических маркеров токсичности цианобактерий в озере Байкал / Тихонова И.В., Белых О.И. // Тр. Третьей интегр. конф. молодых ученых СО РАН и ВШ. – Иркутск, 2005. – С. 129-130.

13. Belykh O.I. Autotrophic Picoplankon of Lake Baikal: Species Composition and Structure / Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Saphonova T.A. // Hydrobiology. – 2006. – V. 568, supl. 1. – P. 9-17.

14. Belykh O.I. Abundance, morphological diversity, and spatial distribution of autotrophic picoplankton in Lake Hovsgol (Mongolia) / Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Fedotov A.F. // Aquatic Ecosystem Health & Management. – 2005. – V. 8(4). – P. 251-262.

15. Тихонова И.В. Анализ цианобактерий озера Байкал и Усть-Илимского водохранилища на наличие гена синтеза микроцистина / Тихонова И.В., Белых О.И., Помазкина Г.В., Гладких А.С. // Докл. Акад. Наук. – 2006. – Т. 409(3). – С. 1-3.

16. Тихонова И.В. Выявление потенциально токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области с помощью полимеразной цепной реакции / Тихонова И.В., Гладких А.С., Белых О.И., Сороковикова Е.Г. // Бюлл. Восточно-Сибирского Научного Центра. – 2006. – Т. 2. – С. 202-205.

17. Белых О.И. Выявление генов синтеза токсинов у цианобактерий озера Байкал и водоемов Байкальского региона / Белых О.И., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Гладких А.С. // Международный научный междисциплинарный семинар «Новые технологии в интегративной биологии и медицине». – Патайя, 2006. – С. 11.

18. Гладких А.С. Выявление токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области / Гладких А.С., Белых О.И., Тихонова И.В., Помазкина Г.В., Сороковикова Е.Г. // Тез. Всероссийской конференции. – Улан-Удэ, 2006. – С. 31.