

Search for bacteria capable of biodegradation of microcystins in Lake Baikal using molecular-biological technologies



Rymareva E.A.^{1*}, Tikhonova I.V.¹, Sorokovikova E.G.¹, Kan G.V.¹, Suslova M. Yu.¹, Potapov S.A.¹, Krasnopeev A.Yu.¹, Gutnik D.I.¹, Gorshkova A.S.¹, Lipko I.A.¹, Gladkikh A.S.², Belykh O.I.¹

¹Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033, Russia

²Pasteur St. Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology Rospotrebnadzor, St. Petersburg, Russia

ABSTRACT. In aquatic ecosystems, biodegradation of microcystins is the main route of elimination and detoxification. In this study, we discuss the ability of bacterioplankton of lakes Baikal, Doroninskoye, Gusinoye to degrade cyclic microcystin molecule. PCR analysis showed the absence of the key enzyme microcystinase *mlrA* for *mlr*-pathway. At the same time, metagenomic analysis of a community of the toxic cyanobacterium *Tychonema sp.* BBK16 revealed the presence of the *mlrC* gene responsible for cleavage of microcystin molecule linear residues. In addition, all bacteria-symbionts of cyanobacteria contain glutathione transferases - enzymes involved in nonspecific degradation of lipophilic toxic substances, which also include microcystins.

Keywords: bacterioplankton, cyanobacteria, microcystin, PCR, high-throughput sequencing

For citation: Rymareva E.A., Tikhonova I.V., Sorokovikova E.G., Kan G.V., Suslova M.Yu., Potapov S.A., Krasnopeev A.Yu., Gutnik D.I., Gorshkova A.S., Lipko I.A., Gladkikh A.S., Belykh O.I. Search for bacteria capable of biodegradation of microcystins in Lake Baikal using molecular-biological technologies // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1072-1078. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1072

1. Introduction

Massive development of cyanobacteria in water bodies is accompanied by the release of various toxic metabolites. The most common are microcystins, cyclic heptapeptides consisting of 7 amino acids: Cyclo-(D-Ala-X-D-D-MeAsp-Z-Adda-D-GluMdh), where D-Ala is D-alanine, D is MeAsp-D-erythro- β -methylaspartic acid, Adda is 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, D-Glu - D-glutamate, Mdh - N-methyldehydroalanine, X and Z - variable L-amino acids. More than 279 variants of microcystins have been discovered today (Bouaïcha et al., 2019). Due to their cyclic structure, microcystins are very stable and able to accumulate in the ecosystem (Massey and Yang, 2020; WHO, 2020). Since the quality of water is a global problem, there is a constant search for means to purify water from cyanobacteria toxins. Physical methods are usually associated with high cost, while chemical treatments need accurate calculations of reagent dosages. Biodegradation is the gentlest way to destroy microcystins in aquatic ecosystems, but it requires detailed study. The simplest way

to treat water by biodegradation is filtration through a sand filter containing native bacteria (Bourne et al., 2006; Salter et al., 2021). The bacterial taxa involved in microcystin degradation belong to three bacterial phyla: Actinobacteria, Pseudomonadota, and Bacillota (Pal et al., 2021; Zhang et al., 2011; Bourne et al., 1996). One of the microcystin degradation pathways is associated with the *mlrABCD* gene cluster, which encodes three hydrolysis enzymes, *mlrA* microcystinase, peptidases of linear microcystin residues, and an oligopeptide transfer protein. The first step involves disruption of the cyclic structure by breaking the Arg-Adda bond. Under the influence of the second enzyme, encoded by the *mlrB* gene, the linear peptide is degraded to a tetrapeptide to form the fragment ADDA-Glu-Mdh-Ala. The enzyme *mlrC* cleaves the tetrapeptide, releasing the amino acid Adda. The *mlrD* gene encodes a transporter protein that transfers microcystin and its degradation products into bacterial cells (He et al., 2022; Schmidt et al., 2014; Yuan et al., 2021). This degradation pathway generally takes place in eutrophic water bodies (Dexter et al., 2021). However, it has been shown in experiments that microcystin can be efficiently removed

*Corresponding author.

E-mail address: iren@lin.irk.ru (I.V. Tikhonova)

Received: August 02, 2024; **Accepted:** August 16, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



in the absence of microcystinase (Salter et al., 2021, Salter et al., 2023). The glutathione pathway of microcystin detoxification is carried out by the enzyme glutathione-S-transferase (Krausfeldt et al., 2019, Liu et al., 2024). Glutathione transferases (*gst*; EC 2.5.1.18) belong to the drug metabolism category in the KEGG database and are involved in the detoxification of lipophilic toxins via nucleophilic attack. They are engaged in cellular defense against oxidative stress in all aerobic bacteria (Allocati et al., 2009). During degradation of microcystin-LR, glutathione binds to the amino acid Mdha to form a microcystin-LR-glutathione conjugate. Further, gamma-glutamic acid is cleaved from the resulting compound. The formed microcystin-LR-cysteine-glycine conjugate undergoes the dipeptidase effect and then it is oxidized by acetyltransferase to microcystin-LR-mercaptopuronic acid (Schmidt et al., 2014).

The deep-water oligotrophic Lake Baikal has mesotrophic areas in the coastal zone and shallow bays where toxic cyanobacteria blooms are observed in summer. Also, cyanobacterial blooms are observed in lakes Gusinoye and Doroninskoye. Microcystins were previously found in the water of lakes Baikal and Kotokel (Belykh et al., 2011, Belykh et al., 2015). The aim of our work is to search for microcystin-degradating bacteria in Lake Baikal and other water bodies using PCR and high-throughput sequencing.

2. Materials and methods

PCR analysis was performed using 150 DNA templates from plankton samples (Lake Baikal, Lake Doroninskoye, and Lake Gusinoye) and from bacterial cultures isolated from plankton, benthos and bottom water of Lake Baikal. The *mlrA* key enzyme was searched using the primers *mlrAtf/mlrAtr* (Zhang et al., 2017). Sequencing of the obtained PCR fragments was performed on a genetic analyzer Nanofor 05 (Syntol, Russia).

Bioinformatic search for enzymes capable of degrading microcystin was performed in the DNA of the non-axenic culture of microcystin-producing *Tychonema* BBK16. The methodology for analyzing the genome of a cyanobacterium enriched with genomes of satellite bacteria has been described previously (Krasnopeev et al., 2023). Genes matching the sequences responsible for microcystin degradation were extracted from the assembled bins of bacterial symbionts using a blast search in the GenBank database. Additionally, a repeated, but already “reverse” search was performed based on the extracted complete genes in the whole assembly, not separated into bins. Glutathione transferases were determined by KEGG annotation using the BlastKOALA service (<https://www.kegg.jp/blastkoala>).

3. Results

PCR analysis with primers to microcystinase detected fragments of about 700, 800 and 1000 bp in length, but sequence determination revealed that they were products of nonspecific amplification. Thus, the key microcystin degradation enzyme *mlrA* was not

detected either in water or in the isolated bacterial strains.

In symbiont bacteria of the strain *Tychonema* sp. BBK16 a fragment of the *mrlC* gene was detected in the *Aminobacter* bin. It was present in multiple copies in the *Aminobacter* bins and matched the microcystin-degrading genes of the organisms *Mesorhizobium* sp. 113-3-3 (microcystinase C, similarity 87.4%), *Aminobacter aminovorans* KCTC 2477 (*mlrC* C-terminus family protein, similarity 87.4%), *Mesorhizobium loti* (Microcystin LR degradation protein *mlrC* CDS, similarity 87%), *Aminobacter* sp. NyZ550 (M81 family metallopeptidase, similarity 90%).

Glutathione transferases were present in all symbiont bacteria of the strain *Tychonema* sp. BBK16, indicating aerobic metabolism of these bacteria. Increased copy number of *gst* gene vary from 2 to 4 per genome/bin of *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, and *Sphingomonas*.

4. Discussion

Degradation of microcystins by *mlr* pathway has been described in many eutrophic water bodies, but it is not the only way of destruction. It is possible that in Baikal, Doroninskoye and Gusinoye lakes microcystinase *mlrA* is not detected from the mismatch in primer structure. However, the ability to reduce microcystin concentrations in the absence of *mlr* genes was found in oligo-mesotrophic Lake Erie blooms. (Mou et al., 2013; Krausfeldt et al., 2019; Thees et al., 2019). As a deep-water oligotrophic lake with well-warmed shallow areas, Baikal is similar to Lake Erie in having a pronounced warm summer period with cyanobacterial blooms. We hypothesized that, as in Erie, the explored bacteria have a different mechanism of microcystin detoxification. The mechanism of glutathione-transferase modification is universal and widely used by bacteria. Baikal microorganisms - symbionts of toxic cyanobacteria have enzymes of the glutathione pathway, which makes this pathway potentially possible. Moreover, it is energetically advantageous to use enzymes of the glutathione cycle, as they are a universal defense against stress. The presence of the *mlr*-cluster enzyme, *mlrC*, in a bacterial genome derived from a toxic cyanobacterium community may indicate involvement in microcystin degradation, but it is necessary to determine the first step in the degradation of the cyclic microcystin molecule and whether degradation can proceed by a combination of glutathione cycle enzymes and *mrl* enzymes. It should be noted that metagenomic assembly of bacterial genomes can only suggest bacterial abilities. Accurate genome characterization requires isolation of a pure culture of *Aminobacter*. It is also necessary to carry out experiments with bacterioplankton and bacterial cultures with analytical determination of toxic peptide fragments.

5. Conclusions

DNA analysis of plankton from lakes Baikal, Doroninskoye, and Gusinoye, as well as bacterial cultures, showed the absence of the gene *mrlA* which is

the key enzyme of the selective degradation pathway. Perhaps there are bacteria containing the *mlrABCD* gene cluster, but the primers we used are not suitable for amplification.

Symbiotic bacteria of the microcystin-producing cyanobacterium *Tychonema* sp. BBK16 contain glutathione transferase enzymes in their genome that protect them from toxic metabolites and oxidative stress. Genome assemblies belonging to the bacteria *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, and *Sphingomonas* have multiple copies of this gene, suggesting that these particular bacteria actively utilize these enzymes for detoxification. The bacterium *Aminobacter* was also found to contain fragments of the *mrlC* gene and is presumably involved in the degradation of linear microcystin residues after the first steps of degradation of the toxic peptide's cyclic structure are realized. In such a way, in order to fully understand the mechanisms of microcystin degradation in Lake Baikal, it is necessary to conduct experiments to determine what changes cyanotoxins undergo under the action of bacterioplankton and bacterial cultures.

Acknowledgements

The study was funded by the state assignment № 0279-2021-0015. This study was carried out in Instrumental Center “Ultramicroanalysis” (sequencing) and “Experimental Freshwater Aquarium Complex for Baikal Hydrobionts” (cyanobacteria and bacteria cultivating). Bioinformatics analysis was performed on the supercomputer LIN SB RAS. The authors thank the crews of the research vessels “Titov”, “Koptyug”, “Vereshchagin”, “Papanin” for plankton and benthos sampling in Lake Baikal.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Allocati N., Federici L., Masulli M. et al. 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal* 276: 58–75. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2008.06743](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743)
- Belykh O., Sorokovikova E., Fedorova G. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Belykh O., Gladkikh A., Sorokovikova E. et al. 2015. Identification of toxic cyanobacteria in Lake Baikal. Reports of the Academy of Sciences 463(3): 353. DOI: [10.7868/S0869565215210227](https://doi.org/10.7868/S0869565215210227)
- Bouaïcha N., Miles C.O., Beach D.G. et al. 2019. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins* 11(12): 714. DOI: [10.3390/toxins11120714](https://doi.org/10.3390/toxins11120714)
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L. et al. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied Environmental Microbiology* 62(11): 4086-4094. DOI: [10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996)
- Bourne D.G., Blakeley R.L., Riddles P. et al. 2006. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Resources* 40(6): 1294-1302. DOI: [10.1016/j.watres.2006.01.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.022)
- Dexter J., McCormick A.J., Fu P. et al. 2021. Microcystinase - a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA. *Water Resources* 189: 116646. DOI: [10.1016/j.watres.2020.116646](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116646)
- He Q., Wang W., Xu Q. et al. 2022. Microcystins in water: detection, microbial degradation strategies, and mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(20): 13175. DOI: [10.3390/ijerph192013175](https://doi.org/10.3390/ijerph192013175)
- Krasnopeev A.Y., Tikhonova I.V., Podlesnaya G.V. et al. 2023. Diversity of bacteria and their metabolic pathways in a non-axenic culture of *Tychonema* sp. BBK16. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 229-243. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-229](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-229)
- Krausfeldt L.E., Steffen M.M., McKay R.M. et al. 2019. Insight into the molecular mechanisms for microcystin miodegradation in Lake Erie and Lake Taihu. *Frontiers in Microbiology* 10: 2741. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02741](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02741)
- Liu B.-L., Yu P.-F., Guo J.-J. et al. 2024. Congener-specific fate and impact of microcystins in the soil-earthworm system. *Journal of Hazardous Materials* 471: 134439. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2024.134439](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134439)
- Massey I.Y., Yang F. 2020. A mini review on microcystins and bacterial degradation. *Toxins* 12(4): 268. DOI: [10.3390/toxins12040268](https://doi.org/10.3390/toxins12040268)
- Mou X., Lu X., Jacob J. et al. 2013. Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie. *PLoS One* 8(4): e61890. DOI: [10.1371/journal.pone.0061890](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061890)
- Pal M., Purohit H.J., Qureshi A. 2021. Genomic insight for algicidal activity in *Rhizobium* strain AQ_MP. *Archives of Microbiology* 203(8): 5193-5203. DOI: [10.1007/s00203-021-02496-z](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02496-z)
- Salter C., VanMensel D., Reid T. et al. 2021. Investigating the microbial dynamics of microcystin-LR degradation in Lake Erie sand. *Chemosphere* 272: 129873. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2021.129873](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129873)
- Salter C., Westrick J.A., Chaganti S.R. et al. 2023. Elucidating microbial mechanisms of microcystin-LR degradation in Lake Erie beach sand through metabolomics and metatranscriptomics. *Water Resources* 247: 120816. DOI: [10.1016/j.watres.2023.120816](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120816)
- Schmidt J.R., Wilhelm S.W., Boyer G.L. 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. *Toxins* 6(12): 3354-3387. DOI: [10.3390/toxins6123354](https://doi.org/10.3390/toxins6123354)
- Thees A., Atari E., Birbeck J. et al. 2019. Isolation and characterization of Lake Erie bacteria that degrade the cyanobacterial microcystin toxin MC-LR. *Journal of Great Lakes Research* 45(1): 138-149. DOI: [10.1016/j.jglr.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.10.013)
- WHO. 2020. Cyanobacterial toxins: microcystins. Guidelines for drinking-water quality and guidelines for safe recreational water environments. WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6. World Health Organization. Switzerland: Geneva. p. 55
- Yuan M., Ding Q., Sun R. et al. 2021. Biodegradation of nodularin by a microcystin-degrading bacterium: performance, degradation pathway, and potential application. *Toxins* 13(11): 813. DOI: [10.3390/toxins13110813](https://doi.org/10.3390/toxins13110813)
- Zhang H., Huang Q., Yu Z. et al. 2011. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologia* 41 (1): 70-77.
- Zhang J., Lu Q., Ding Q. et al. 2017. A novel and native microcystin-degrading bacterium of *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Taihu. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(10): 1187. DOI: [10.3390/ijerph14101187](https://doi.org/10.3390/ijerph14101187)

Поиск бактерий, способных к биодegradации микроцистинов в озере Байкал, с помощью молекулярно-биологических технологий

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Рымарева Е.А.^{1*}, Тихонова И.В.¹, Сороковикова Е.Г.¹, Кан Г.В.¹, Сулова М.Ю.¹, Потапов С.А.¹, Краснопеев А.Ю.¹, Гутник Д.И.¹, Горшкова А.С.¹, Липко И.А.¹, Гладких А.С.², Белых О.И.¹

¹ Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ. В работе обсуждаются возможности бактериопланктона озер Байкал, Доронинское, Гусиное разрушать циклическую молекулу микроцистина. ПЦР-анализ показал отсутствие ключевого фермента *mlr*-пути – микроцистиназы *mlrA*. Однако анализ метагеномной сборки сообщества культуры токсичной цианобактерии *Tychoneta* sp. ВВК16 выявил присутствие гена *mlrC*, ответственного за расщепление линейных остатков молекулы микроцистина. Выявлено, что бактерии-спутники токсичной цианобактерии содержат глутатион-трансферазы, являющиеся ферментами неспецифической деструкции липофильных токсичных веществ, к которым также относятся микроцистины.

Ключевые слова: бактериопланктон, цианобактерии, микроцистин, ПЦР, высокопроизводительное секвенирование

Для цитирования: Рымарева Е.А., Тихонова И.В., Сороковикова Е.Г., Кан Г.В., Сулова М.Ю., Потапов С.А., Краснопеев А.Ю., Гутник Д.И., Горшкова А.С., Липко И.А., Гладких А.С., Белых О.И. Поиск бактерий, способных к биодegradации микроцистинов в озере Байкал, с помощью молекулярно-биологических технологий // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1072-1078. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1072

1. Введение

Массовое развитие цианобактерий в водоемах сопровождается выделением различных токсичных метаболитов в воду. Наиболее распространенными являются микроцистины - циклические гептапептиды, состоящие из 7 аминокислот: цикло-(D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-GluMdh), 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, Mdh – N-метилдегидроаланин, X и Z – переменные L-аминокислоты. К настоящему времени обнаружено более 279 вариантов микроцистинов (Bouaïcha et al., 2019). Благодаря своей циклической структуре, микроцистины очень стабильны и способны существовать и накапливаться в экосистеме (Massey and Yang, 2020; WHO, 2020). Так как проблема качества воды является глобальной, постоянно ведутся поиски средств очистки

воды от токсинов цианобактерий. Недостатками предложенных способов является высокая стоимость (в случае физических методов) и необходимость расчета дозировок и очистки от реагентов (химические методы). Биодegradация является наиболее мягким путем разрушения микроцистинов в водных экосистемах, однако она требует подробного изучения. Наиболее простым способом очистки воды с помощью биодegradации является фильтрация через песочный фильтр, содержащий нативные бактерии (Bourne et al., 2006; Salter et al., 2021). Таксоны бактерий, участвующие в расщеплении микроцистина, принадлежат трем бактериальным филумам: Actinobacteria, Pseudomonadota, and Bacillota (Bourne et al., 1996; Zhang et al., 2011; Pal et al., 2021). Один из изученных путей разложения микроцистинов связан с кластером генов *mlr*ABCD, который кодирует три фермента гидролиза – микроцистиназу *mlrA*, пептидазы линейных остатков микроцистина и белок-переносчик олиго-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: iren@lin.irk.ru (И.В. Тихонова)

Поступила: 02 августа 2024; Принята: 16 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



пептидов. На первом этапе происходит разрушение циклической структуры путем разрушения связи Arg-Adda. Полученный линейный продукт разлагается до тетрапептида вторым ферментом, кодируемым геном *mlrB*. При этом происходит гидролиз связей аланин-лейцин и образуется пептидный промежуточный продукт ADDA-Glu-Mdha-Ala. Фермент *mlrC* расщепляет тетрапептид, высвобождая аминокислоту Adda. Ген *mlrD* кодирует белок-транспортер, который осуществляет транспорт микроцистина и продуктов его деградации в бактериальные клетки (Schmidt et al., 2014; Yuan et al., 2021; He et al., 2022). Этот путь деградации реализуется в эвтрофных водоемах (Dexter et al., 2021). Однако в экспериментах показано, что микроцистин может эффективно удаляться в отсутствие микроцистиназы (Salter et al., 2021, Salter et al., 2023). Альтернативный глутатионовый путь детоксикации токсичных веществ осуществляется ферментом глутатион-S-трансфераза (Krausfeldt et al., 2019, Liu et al., 2024). Глутатионтрансферазы (GST; EC 2.5.1.18) в базе данных KEGG находятся в категории Drug metabolism и участвуют в детоксикации липофильных токсинов посредством нуклеофильной атаки. Они участвуют в защите клеток от окислительного стресса у всех аэробных бактерий (Allocati et al., 2009). При деградации микроцистина-LR, глутатион связывается с аминокислотой Mdha с образованием конъюгата микроцистин-LR-глутатион. Далее от полученного соединения отщепляется гамма-глутаминовая кислота и образовавшийся конъюгат микроцистин-LR-цистеин-глицин, подвергается сначала действию дипептидазы, а после окисляется ацетилтрансферазой до микроцистин-LR-меркаптуроновой кислоты (Schmidt et al., 2014).

В глубоководном олиготрофном озере Байкал в прибрежной зоне и мелководных заливах присутствуют мезотрофные участки, где летом наблюдается цветение токсичных цианобактерий. Также, цианобактериальные цветения отмечаются в озерах Котокель, Гусиное и Доронинское. Ранее микроцистины обнаружены в воде озер Байкал и Котокель (Belykh et al., 2011, Belykh et al., 2015). Цель нашей работы – поиск бактерий-деструкторов микроцистина в озере Байкал и других водоемах, с помощью ПЦР и высокопроизводительного секвенирования.

2. Материалы и методы

Для ПЦР-анализа использовали 150 образцов ДНК, выделенной из образцов планктона озер Байкал, Доронинское, Гусиное, а также ДНК культур бактерий, изолированных из планктона, бентоса и придонной воды озера Байкал. Поиск ключевого фермента специфического пути деградации *mlrA* вели с помощью праймеров *mlrAtf/mlrAtr* (Zhang et al., 2017). Секвенирование полученных фрагментов ПЦР выполнено на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия).

Биоинформатический поиск ферментов, способных разрушать микроцистин, проводили в геномной ДНК неаксеничной культуры *Tychonema*

sp. ВВК16, синтезирующей микроцистин. Методика анализа генома цианобактерии, обогащенного геномами бактерий-спутников, описана ранее (Краснопеев и др., 2023). Собранные бины бактерий-симбионтов использовали для извлечения генов, которые совпали при поиске в базе GenBank с последовательностями генов, отвечающих за деградацию микроцистинов. Дополнительно осуществляли повторный, но уже «обратный» поиск на основе извлеченных полных генов в полной сборке, не разбитой на бины. Глутатион-трансферазы определены аннотацией по KEGG с помощью сервиса BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala>).

3. Результаты

При ПЦР-анализе с праймерами к микроцистиназе обнаружены фрагменты длиной около 700, 800 и 1000 п.н., однако при определении последовательностей выявлено, что они являются продуктами неспецифичной амплификации. Таким образом, ключевого фермента деструкции микроцистина *mlrA* не обнаружено ни в воде, ни в выделенных штаммах бактерий.

У бактерий-симбионтов штамма *Tychonema* sp. ВВК16 обнаружены фрагменты гена *mlrC* у бина *Aminobacter*. В бинах *Aminobacter* они присутствовали в нескольких копиях и совпадали с микроцистин-деградирующими генами организмов *Mesorhizobium* sp. 113-3-3 (microcystinase C, сходство 87.4%), *Aminobacter aminovorans* KCTC 2477 (*mlrC* C-terminus family protein, сходство 87.4%), *Mesorhizobium loti* (Microcystin LR degradation protein *mlrC* CDS, сходство 87%), *Aminobacter* sp. NyZ550 (M81 family metalloproteinase, сходство 90%).

Глутатион-трансферазы присутствовали у всех бактерий-спутников штамма *Tychonema* sp. ВВК16, что говорит о том, что они аэробные микроорганизмы. В бинах бактерий *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, *Sphingomonas* копияность этих генов составляла от 2 до 4 копий на геном.

4. Обсуждение

Деградация микроцистинов ферментами *mlrABCD* кластера описана во многих эвтрофных водоемах, однако она не является единственным путем деструкции. Возможно, в Байкале, Доронинском и Гусином озере микроцистиназа *mlrA* не обнаружена из-за несовпадения структуры праймеров. При цветении олиго-мезотрофного озера Эри концентрация микроцистина в воде снижалась в отсутствие активности *mlr* генов (Mou et al., 2013; Krausfeldt et al., 2019; Thees et al., 2019). Являясь глубоководным олиготрофным озером с хорошо прогреваемыми мелководными участками, Байкал сходен с озером Эри наличием ярко выраженного теплого летнего периода с цветениями цианобактерий. Возможно, как и в озере Эри, в исследуемых нами озерах другой механизм детоксикации микроцистина. Механизм работы глутатион-трансферазы универсальный и широко используется бактери-

ями. У байкальских микроорганизмов – симбионтов токсичной цианобактерии присутствуют ферменты глутатионового пути, что делает этот путь потенциально возможным, при этом энергетически выгодно использовать ферменты цикла глутатиона, поскольку они являются универсальной защитой от стресса. Присутствие фермента *mlr*-кластера – *mlrC* в геноме симбионтной бактерии, собранном из сообщества токсичной цианобактерии, может свидетельствовать о способности деструкции микроцистина. В таком случае, надо установить, как проходит первый этап разрушения циклической молекулы микроцистина и может ли деградация протекать комбинацией ферментов глутатионового цикла и ферментов *mlr*. Следует отметить, что метагеномная сборка бактериальных геномов позволяет только предположить способности бактерий, для точной характеристики генома требуется выделение чистой культуры *Aminobacter*. Также необходимо поставить эксперименты с бактериопланктоном и культурами бактерий с аналитическим определением фрагментов токсичного пептида, чтобы понять путь деструкции.

5. Выводы

Анализ ДНК планктона озер Байкал, Хубсугул, Доронинское, Гусиное, а также культур бактерий, показал отсутствие гена ключевого фермента селективного пути деградации *mlrA*. Возможно, все-таки есть бактерии, содержащие кластер генов *mlr ABCD*, но используемые нами праймеры не подходят для их идентификации.

Бактерии, ассоциированные с токсичной цианобактерией *Tychonema* sp. BVK16, содержат в своем геноме ферменты глутатионтрансферазы, защищающие их от токсичных метаболитов и окислительного стресса. Геномы, принадлежащие бактериям *Tahibacter*, *Paucibacter*, *Bosea*, *Sphingomonas*, имеют несколько копий этого гена, что позволяет предположить, что именно эти бактерии активно пользуются этими ферментами для детоксикации. Бактерия *Aminobacter* содержит фрагменты гена *mlrC* и предположительно участвует в деструкции линейных остатков микроцистина после первых этапов деструкции циклической структуры токсичного пептида.

Для полного понимания механизмов деградации микроцистинов в озере Байкал, необходим эксперимент, помогающий определить, какие изменения претерпевают цианотоксины под действием бактериопланктона и культур бактерий.

Благодарности

Исследование выполнено по теме государственного задания № 0279-2021-0015. Работы проведены в приборном центре «Ультрамикроанализ» (секвенирование) и в экспериментальном пресноводном аквариумном комплексе для байкальских гидробионтов (культивирование цианобактерий и бактерий). Биоинформатический анализ проводился

на суперкомпьютере ЛИН СО РАН. Авторы выражают благодарность командам научно-исследовательских судов «Титов», «Коптюг», «Верещагин», «Папанин» за помощь в отборе проб планктона и бентоса на озере Байкал.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Краснопеев А.Ю., Тихонова И.В., Подлесная Г.В. и др. 2023. Разнообразие бактерий и путей их метаболизма в неаксеничной культуре *Tychonema* sp. BVK16. *Limnology and Freshwater Biology* 2023 (6): 229-243. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-229](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-229)
- Allocati N., Federici L., Masulli M. et al. 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal* 276: 58–75. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2008.06743](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743)
- Belykh O., Sorokovikova E., Fedorova G. et al. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia* 671: 241-252. DOI: [10.1007/s10750-011-0724-2](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0724-2)
- Belykh O., Gladkikh A., Sorokovikova E. et al. 2015. Identification of toxic cyanobacteria in Lake Baikal. *Reports of the Academy of Sciences* 463(3): 353. DOI: [10.7868/S0869565215210227](https://doi.org/10.7868/S0869565215210227)
- Bouaïcha N., Miles C.O., Beach D.G. et al. 2019. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins* 11(12): 714. DOI: [10.3390/toxins11120714](https://doi.org/10.3390/toxins11120714)
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L. et al. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied Environmental Microbiology* 62(11): 4086-4094. DOI: [10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996)
- Bourne D.G., Blakeley R.L., Riddles P. et al. 2006. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Resources* 40(6): 1294-1302. DOI: [10.1016/j.watres.2006.01.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.022)
- Dexter J., McCormick A.J., Fu P. et al. 2021. Microcystinase - a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA. *Water Resources* 189: 116646. DOI: [10.1016/j.watres.2020.116646](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116646)
- He Q., Wang W., Xu Q. et al. 2022. Microcystins in water: detection, microbial degradation strategies, and mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(20): 13175. DOI: [10.3390/ijerph192013175](https://doi.org/10.3390/ijerph192013175)
- Krausfeldt L.E., Steffen M.M., McKay R.M. et al. 2019. Insight into the molecular mechanisms for microcystin miodegradation in Lake Erie and Lake Taihu. *Frontiers in Microbiology* 10: 2741. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02741](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02741)
- Liu B.-L., Yu P.-F., Guo J.-J. et al. 2024. Congener-specific fate and impact of microcystins in the soil-earthworm system. *Journal of Hazardous Materials* 471: 134439. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2024.134439](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134439)
- Massey I.Y., Yang F. 2020. A mini review on microcystins and bacterial degradation. *Toxins* 12(4): 268. DOI: [10.3390/toxins12040268](https://doi.org/10.3390/toxins12040268)
- Mou X., Lu X., Jacob J. et al. 2013. Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie. *PLoS One* 8(4): e61890. DOI: [10.1371/journal.pone.0061890](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061890)
- Pal M., Purohit H.J., Qureshi A. 2021. Genomic insight for algicidal activity in *Rhizobium* strain AQ_MP. *Archives*

of Microbiology 203(8): 5193-5203. DOI: [10.1007/s00203-021-02496-z](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02496-z)

Salter C., VanMensel D., Reid T. et al. 2021. Investigating the microbial dynamics of microcystin-LR degradation in Lake Erie sand. *Chemosphere* 272: 129873. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2021.129873](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129873)

Salter C., Westrick J.A., Chaganti S.R. et al. 2023. Elucidating microbial mechanisms of microcystin-LR degradation in Lake Erie beach sand through metabolomics and metatranscriptomics. *Water Resources* 247: 120816. DOI: [10.1016/j.watres.2023.120816](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120816)

Schmidt J.R., Wilhelm S.W., Boyer G.L. 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. *Toxins* 6(12): 3354-3387. DOI: [10.3390/toxins6123354](https://doi.org/10.3390/toxins6123354)

Thees A., Atari E., Birbeck J. et al. 2019. Isolation and characterization of Lake Erie bacteria that degrade the cyanobacterial microcystin toxin MC-LR. *Journal of Great Lakes Research* 45(1): 138-149. DOI: [10.1016/j.jglr.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.10.013)

WHO. 2020. Cyanobacterial toxins: microcystins. Guidelines for drinking-water quality and guidelines for safe recreational water environments. WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6. World Health Organization. Switzerland: Geneva. p. 55

Yuan M., Ding Q., Sun R. et al. 2021. Biodegradation of nodularin by a microcystin-degrading bacterium: performance, degradation pathway, and potential application. *Toxins* 13(11): 813. DOI: [10.3390/toxins13110813](https://doi.org/10.3390/toxins13110813)

Zhang H., Huang Q., Yu Z. et al. 2011. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologica* 41 (1): 70-77.

Zhang J., Lu Q., Ding Q. et al. 2017. A novel and native microcystin-degrading bacterium of *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Taihu. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(10): 1187. DOI: [10.3390/ijerph14101187](https://doi.org/10.3390/ijerph14101187)