

# РАЗНООБРАЗИЕ И ТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ВОДОЕМАХ И ВОДОТОКАХ Г. МОСКВЫ

Миронова Элина Алексеевна

Руководители:

в.н.с., к.б.н. Кезля Елена Михайловна

доцент, к.б.н. Гололобова Мария Александровна

МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва 2026

# Введение

- ▶ Цианобактерии – широко распространённые фотоавтотрофные прокариоты, которые обитают в пресноводных, солоноватых и морских экосистемах и населяют как планктонные, так и бентосные сообщества. При определённых условиях различные виды развиваются в массе, образуя «цветения» воды;
- ▶ Цианобактерии способны продуцировать токсины (гепатотоксины, нейротоксины и дерматотоксины и т.д.), опасные для здоровья человека и животных. Известно, что токсигенные и нетоксигенные штаммы одного и того же вида морфологически не различимы (Palinska & Surosz, 2014) поэтому для изучения распространения токсигенных видов необходимо применение полифазного подхода;
- ▶ В Московской гидросистема включает около 200 рек и ручьев и более 600 прудов (Прохоров, 1974);
- ▶ ! Разнообразие и распространение потенциально токсичных цианобактерий в водных объектах г. Москвы практически не изучено.

**Цель работы** – изучение разнообразия цианобактерий водоемов и водотоков г. Москвы с использованием полифазного подхода, анализ их токсического потенциала и оценка распространения токсичных и потенциально токсичных видов на основе классических и молекулярно-генетических подходов.

## Задачи:

1. Собрать пробы планктона из разнотипных водоемов на территории г. Москвы, провести анализ физико-химических параметров воды;
2. Выделить из природных образцов моноклональные штаммы цианобактерий и провести их идентификацию при помощи морфологических и молекулярно-генетических методов;
3. Определить токсический потенциал полученных штаммов цианобактерий на основании анализа генов, отвечающих за синтез цианотоксинов;
4. Определить видовой состав и численность цианобактерий в природных образцах на основе применения классических подходов (световая микроскопия) и метабаркодинга;
5. Сравнить данные о видовом разнообразии и распространении токсичных и потенциально токсичных видов цианобактерий, полученные на основе изучения природных образцов, выделенных в культуру штаммов и метабаркодинга.

# Материалы и методы



В июне-июле 2024 г. из **20** водных объектов г. Москвы проведен отбор проб:

- Реки – Москва (район Крылатское), Сетунь, Чаченка, Яуза;
- Пруды – Мещерский, Большой Крылатский, Первый Каменский, Патриарший, Чистый, Большой Екатерининский, Борисовский, Большой Садовый, Нижний Фермский+безымянные пруды на терр. ГБС РАН (2), д. Сколково (1), в Мещерском парке (1), р. Крылатское (1);
- Гребной канал.

! Определены физико-химические параметры воды: рН, температура и электропроводность.

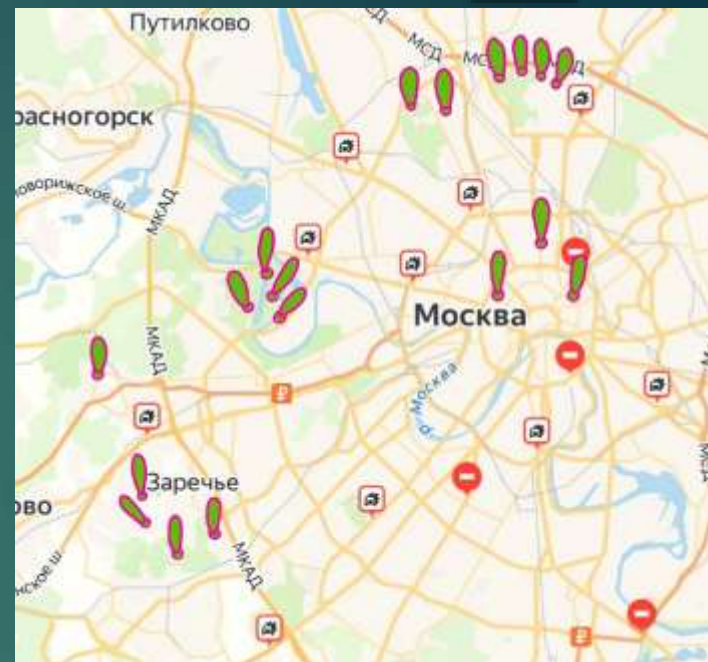


Рис. 1. Карта г. Москвы, значками отмечены точки сбора проб.

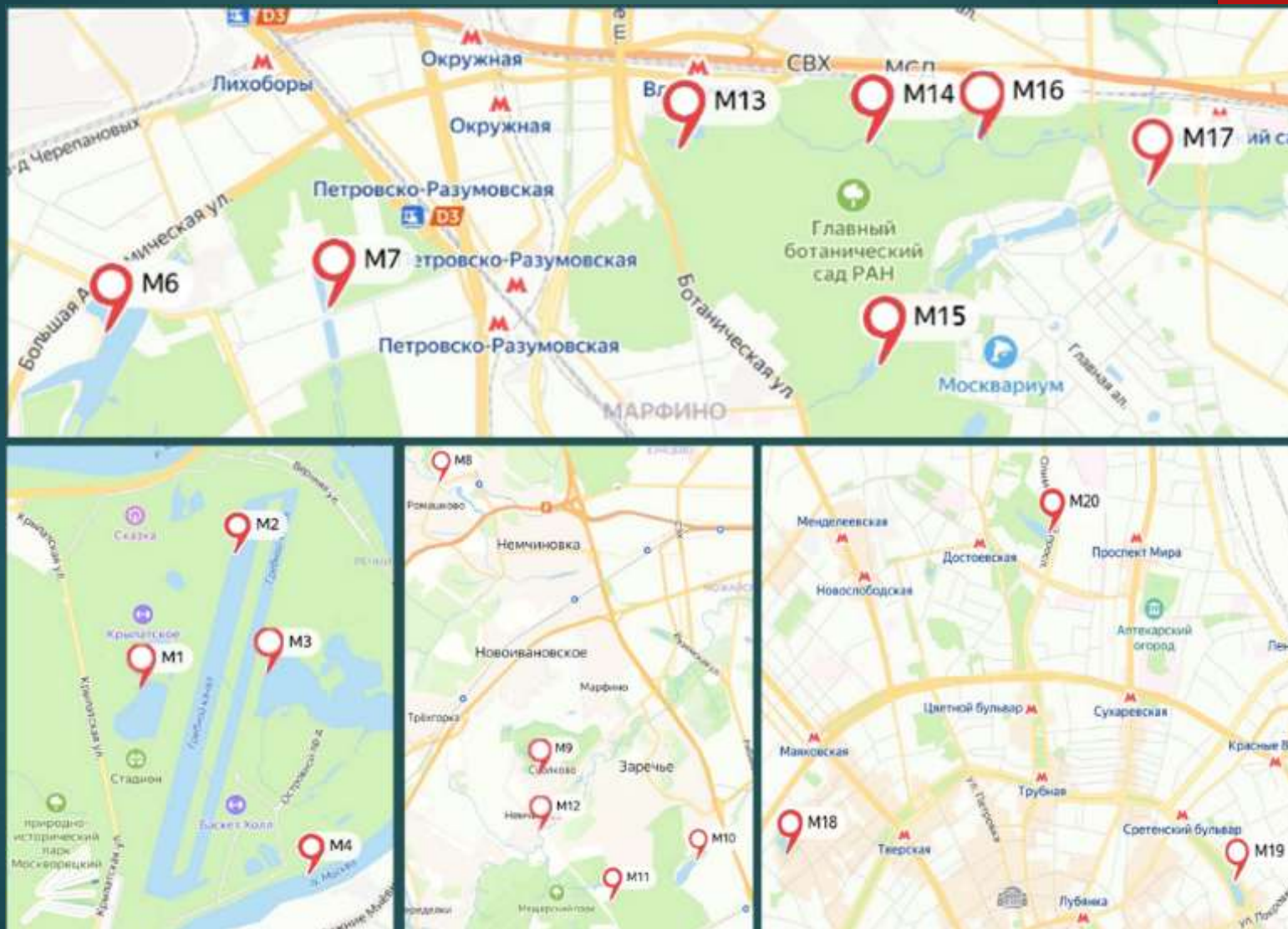



Рис. 2. Точки отбора проб (показаны значками, )

# Методика исследования

7

## Природные пробы

Фитопланктон  
сеть Апштейна  
( $d=29$  мкм)  
100 л => 0,25 л

Метабаркодинг  
состав  
сообществ  
цианобактерий

Световая  
микроскопия  
Морфология и  
численность

## Культуры

штаммы  
цианобактерий

(Zeiss Axio Scope A1,  
иммерсионный объектив EC  
Plan-NEOFLU-AR x100)

16S рРНК  
молекулярная  
идентификация

Идентификация  
на основе  
морфологии

ПЦР-скрининг  
гены *тсу*, *сур*, *ана*

**ВЭЖХ-МСВР**  
подтверждение  
ТОКСИНОВ



# Культивирование

- Для культивирования часть природного образца переносили в чашку Петри и добавляли питательную среду WC;
- Штаммы выделяли помощи стеклянной пипетки Пастера, культивировали на среде WC в течение 3 недель;
- Выделена ДНК полученных штаммов, проведена амплификация и секвенирование по региону 16S рРНК, праймеры CYA359F и 1467R.



Рис. 3. Этапы получения и методы изучения штаммов цианобактерий.

# Определение токсического потенциала

- Проведен ПЦР-анализ участков генов микроцистинов (*mcuA*, *mcuB*, *mcuE*), анатоксина (*anaC*) и цилиндроспермопсина (*cyrB*);
- В качестве положительного контроля при анализе на токсикогенность использовали штамм *Microcystis aeruginosa* CALU 972 из Коллекции цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей Ресурсного центра "Культивирование микроорганизмов" СПбГУ;
- Присутствие микроцистинов определяли методом ВЭЖХ-МСВР совместно с коллегами из Центра экологической безопасности СПб ФИЦ РАН.



Рис. 4. Этапы получения и методы изучения штаммов цианобактерий.

- Для метабаркодинга использовали часть исходного образца (50 мл);
- Концентраты были отфильтрованы через мембранный фильтр (диаметр пор 0,4 мкм) с использованием системы вакуумной фильтрации Sartorius;
- Полученные мембраны с биомассой были сразу заморожены;
- Пробоподготовку и секвенирование проводили в компании «Синтол» (г. Москва); на платформе Illumina MiSeq (2×250 п.н);
- Выбран маркерный регион V3–V4 16S рРНК с использованием цианоспецифичных праймеров CYA359F и CYA781Rd;
- Биоинформатическую обработку данных метабаркодинга проводили совместно с коллегами из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), Института биохимии и физиологии им. Г.К. Скрыбина РАН.



Рис. 5. Исследование проб методом метабаркодинга.

# Результаты



Изучена морфология и получены молекулярно-генетические данные для **23 штаммов** цианобактерий.

**Таблица 1.** Систематическое положение полученных штаммов.

Порядок	Семейство	Таксон	Количество штаммов
<b>Nostocales</b>	Aphanizomenonaceae	<i>Aphanizomenon</i> sp.	1
		<i>Dolichospermum</i> sp.	1
		<i>Anabaena</i> sp.	1
<b>Oscillatoriales</b>	Phormidiaceae	<i>Argonema galeatum</i> *	1
<b>Chroococcales</b>	Microcystaceae	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2
		<i>Woronichinia naegeliana</i>	17

\* Первая подтвержденная находка данного таксона в исследованных водоемах Москвы за пределами типового местообитания.

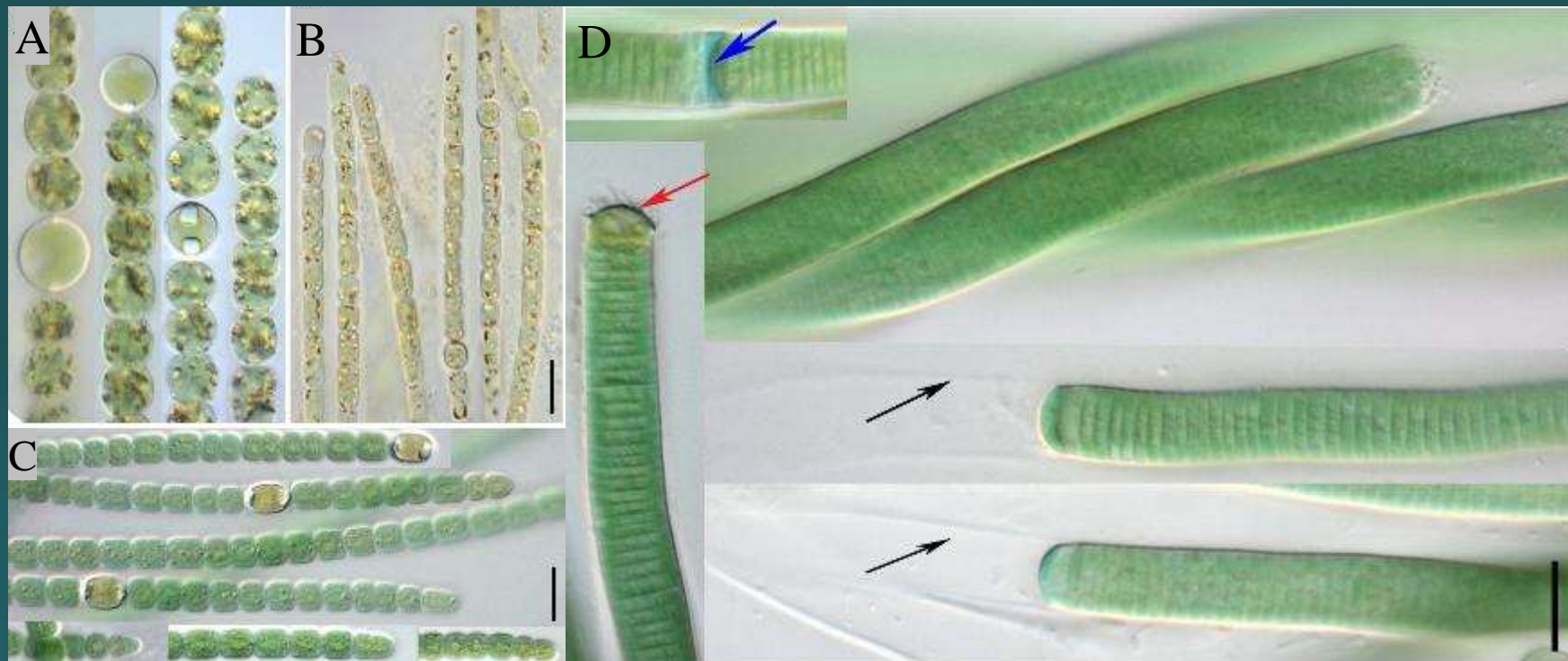


Рис. 6. Микрофотографии изученных штаммов.

А - *Dolichospermum* sp. CBMC469m, В – *Aphanizomenon* sp. CBMC479m,  
С – *Anabaena* sp. CBMC473m, D – *Argonema galeatum* CBMC475m.

Синяя стрелка – некридий, красная стрелка – апикальная клетка, черные стрелки – пустые слизистые чехлы.

Масштабные линейки = 10 мкм.



Рис. 7. Микрофотографии изученных штаммов.

А – *Microcystis aeruginosa* СВМС403м, В – *Woronichinia naegeliana* СВМС680м . Масштабные линейки = 10 мкм.

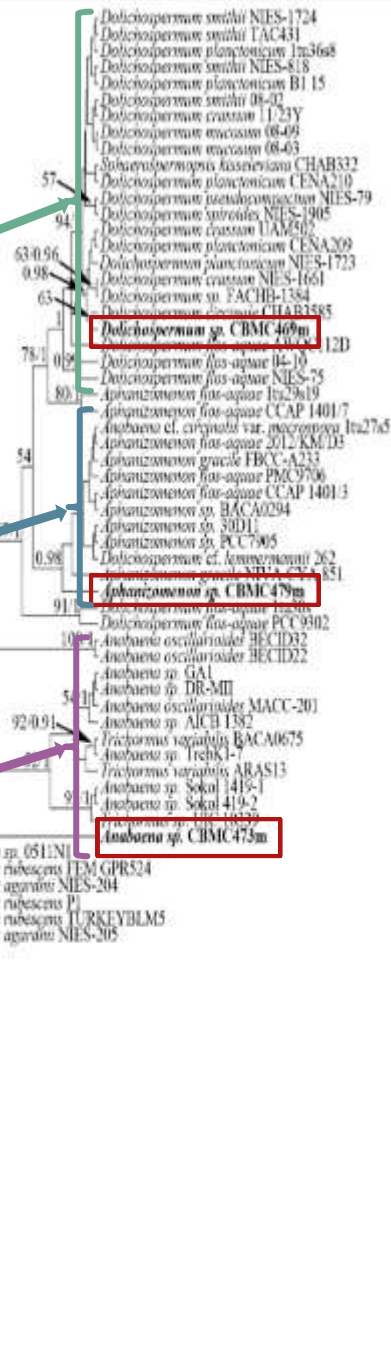


*Dolichospermum* sp.

*Aphanizomenon* spp.

*Anabaena* spp.

*Argonema*  
*galeatum*



Филогенетический анализ полученных штаммов из порядков Nostocales и Oscillatoriales на основе гена 16S рНК

Рис. 9. Филогенетическое дерево некоторых родов цианобактерий, построенное по методу BI и RAxML (16S рНК). Показаны значения LB выше 50 и PP выше 0,90.

# ПЦР-скрининг генов синтеза цианотоксинов

17

В результате амплификации генов, участвующих в синтезе микроцистина (*mcuA*, *mcuB* и *mcuE*), цилиндроспермопсина (*cyrB*) и анатоксина (*anaC*); только у двух штаммов *Microcystis aeruginosa* (СВМС403m и СВМС523m) были обнаружены фрагменты генов, кодирующих микроцистины (*mcuA*, *mcuB* и *mcuE*).

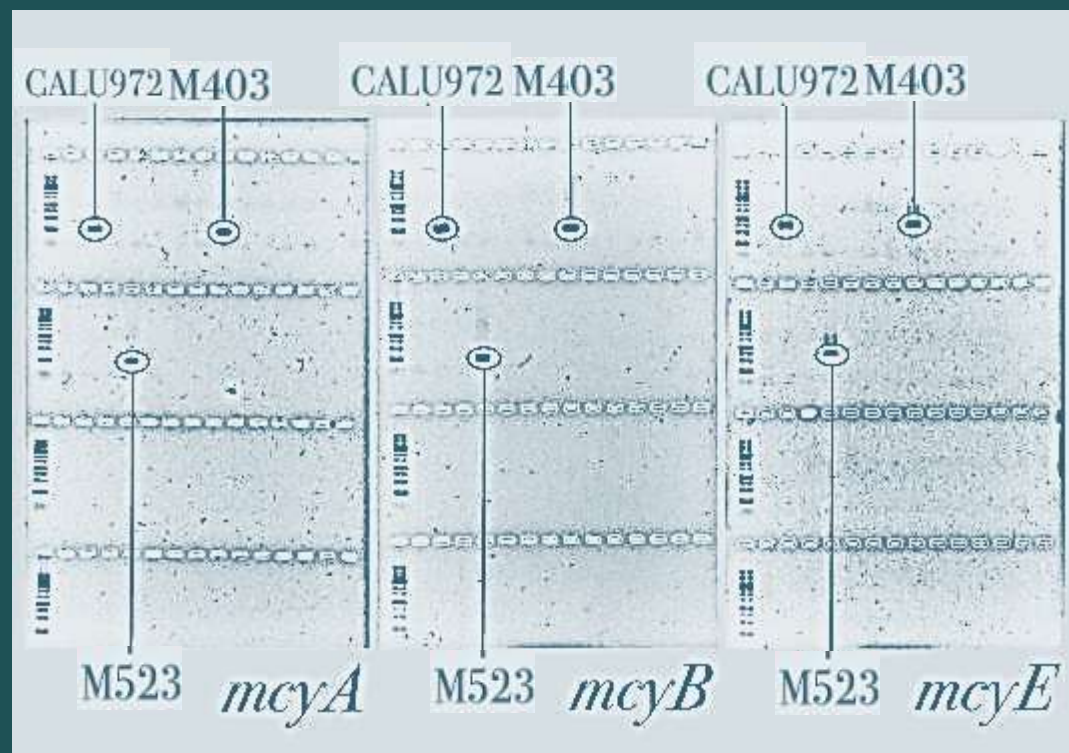
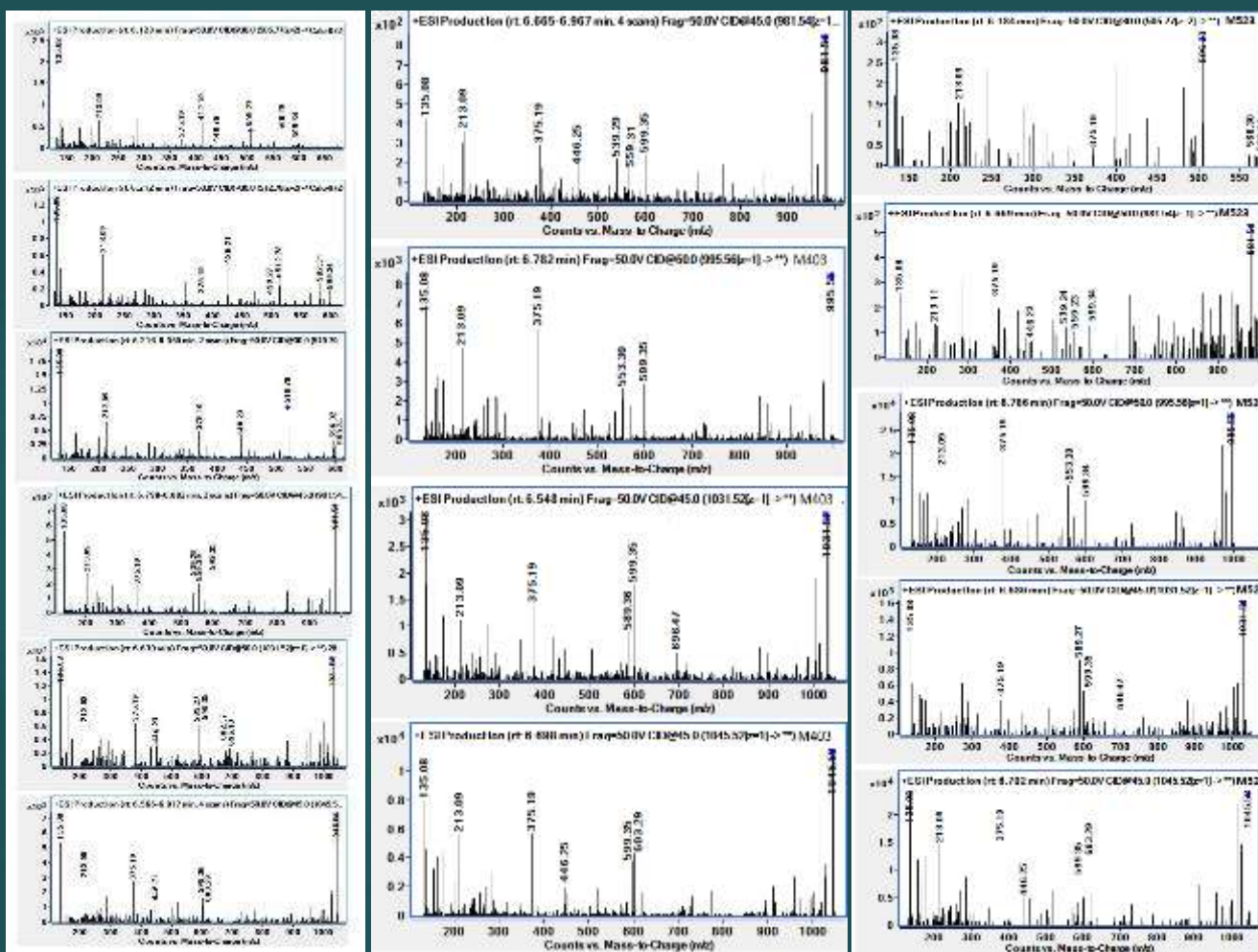


Рис. 10. Результаты гель-электрофореза продуктов амплификации генов биосинтеза микроцистинов.

# Определение микроцистинов методом ВЭЖХ-МС/ВР

В биомассе штаммов *M. aeruginosa* СВМС403m и СВМС523m выявлено 7 структурных вариантов микроцистинов; содержание MC-LR составляет 20–28%.

18



A

B

C

Рис. 11. Масс-спектры фрагментов конгенов микроцистинов.

A – CALU 972,  
B – СВМС403m,  
C – СВМС523m

## Метабаркодинг

Таксономический состав цианобактерий включает **22** порядка, **38** семейств, **76** родов, и **1239** ASV.

Многие ASV имели 100% сходство сразу с несколькими видами из БД, поэтому оценить число видов по данным метабаркодинга достаточно трудно.

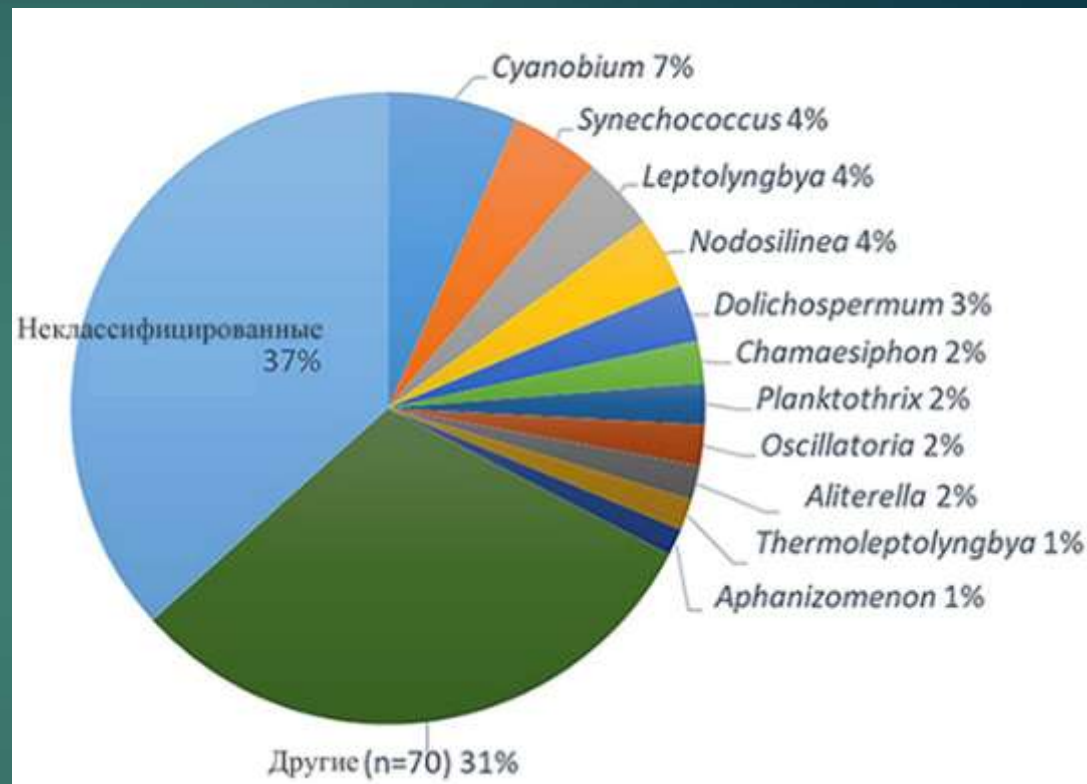


Рис. 12. Распределение ASV класса Cyanophyceae (%) на уровне родов, лидирующих по числу ASV, по данным анализа гипервариабельного региона V3–V4 16S рРНК.

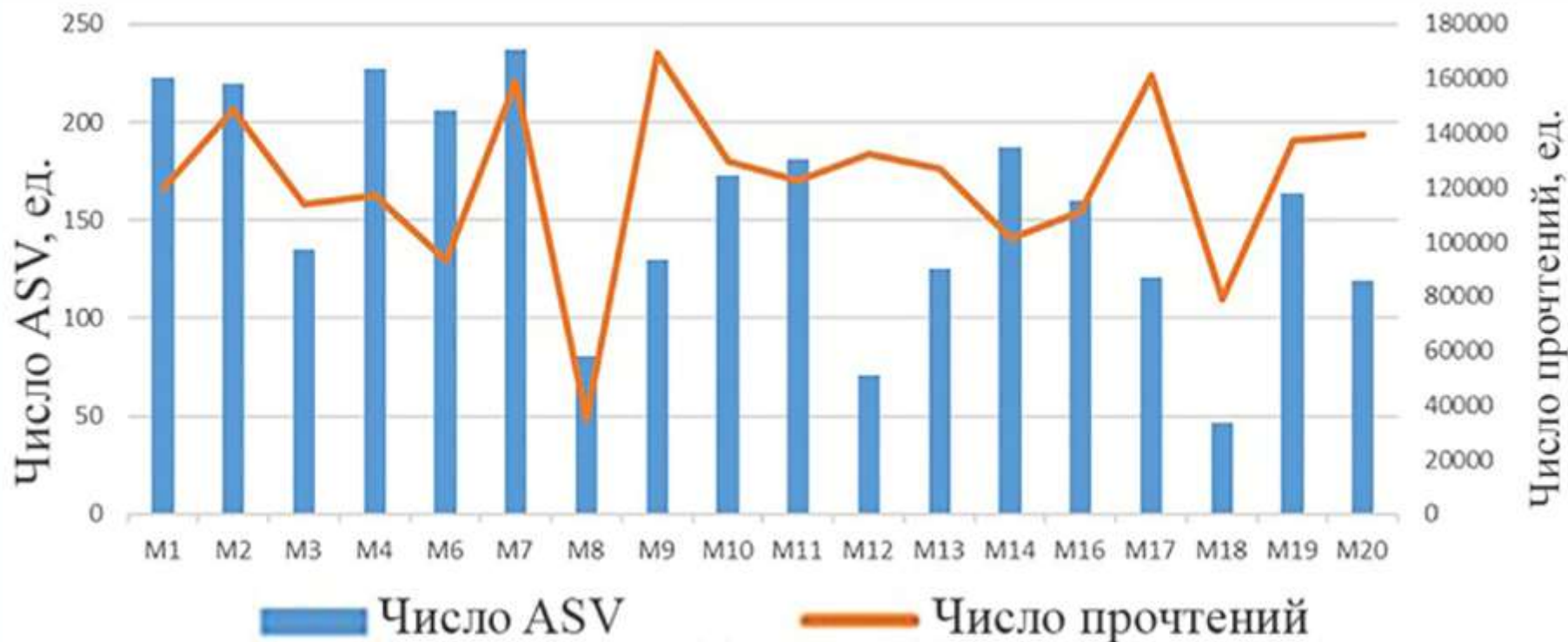


Рис. 13. Число идентифицированных ASV и обилие ASV цианобактерий в пробах из водоёмов и водотоков г. Москвы.

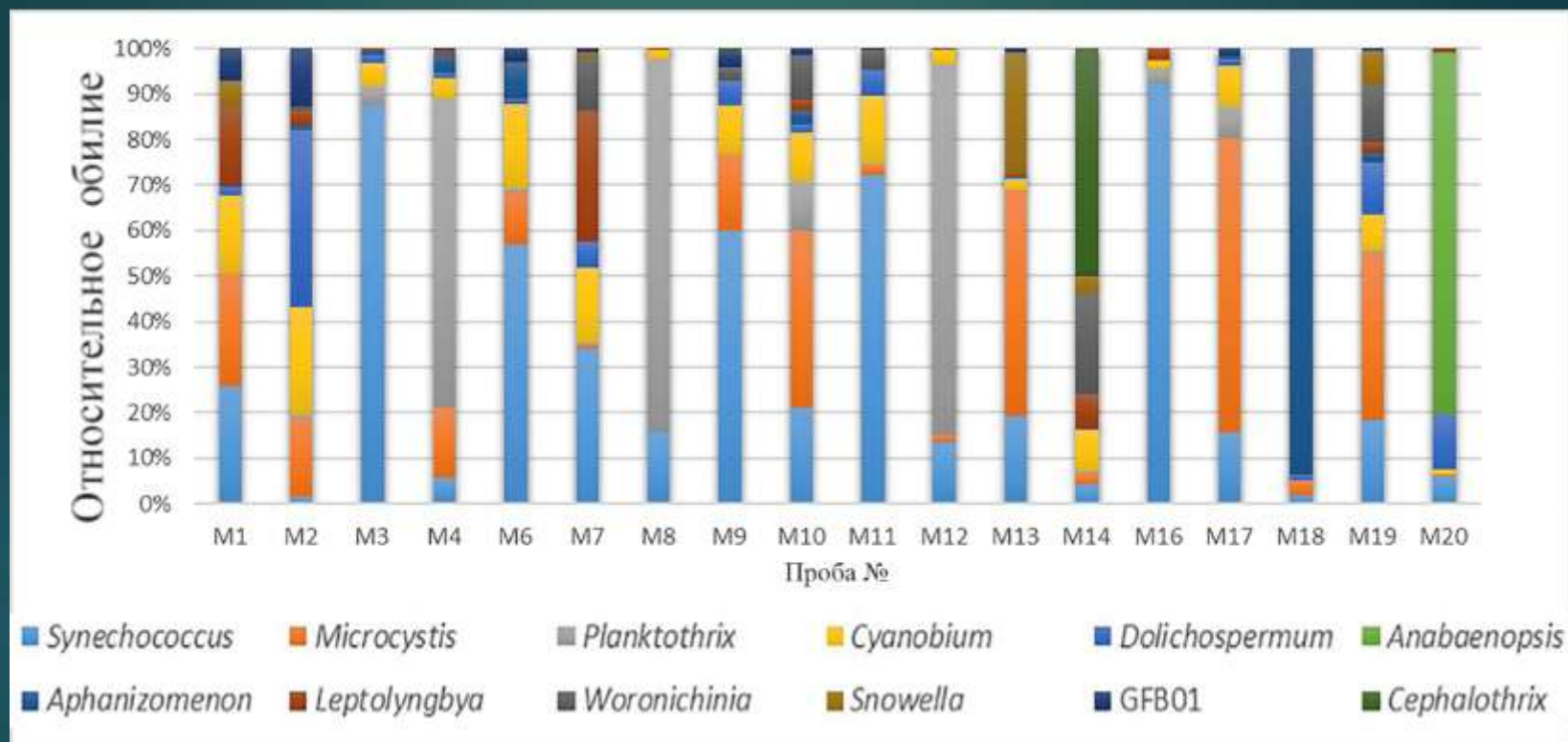


Рис. 14. Распределение 12 родов с максимальным обилием прочтений (%) в сообществах цианобактерий в водоемах г. Москвы в июне 2024 года по результатам ДНК-метабаркодинга по региону V3–V4 16S рРНК.

В результате изучения фиксированных проб фитопланктона методом световой микроскопии выявлено **12** видов цианобактерий из **9** родов, **4** порядков и **4** семейств.

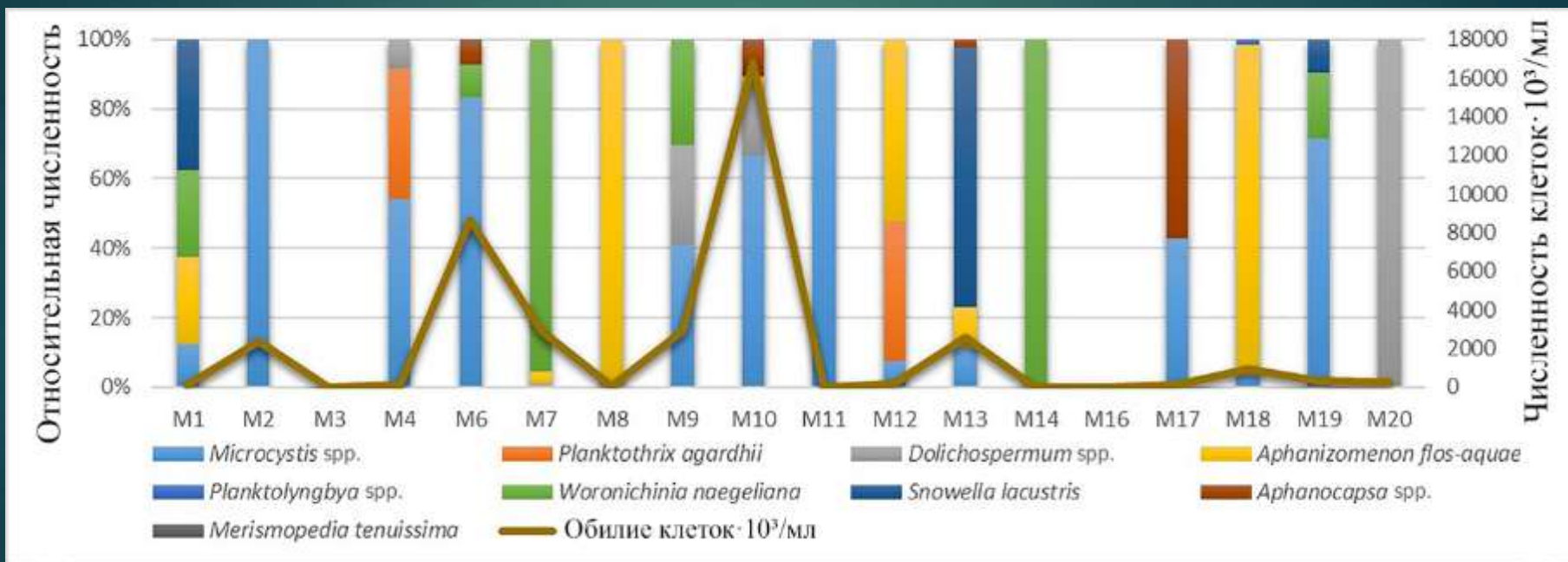
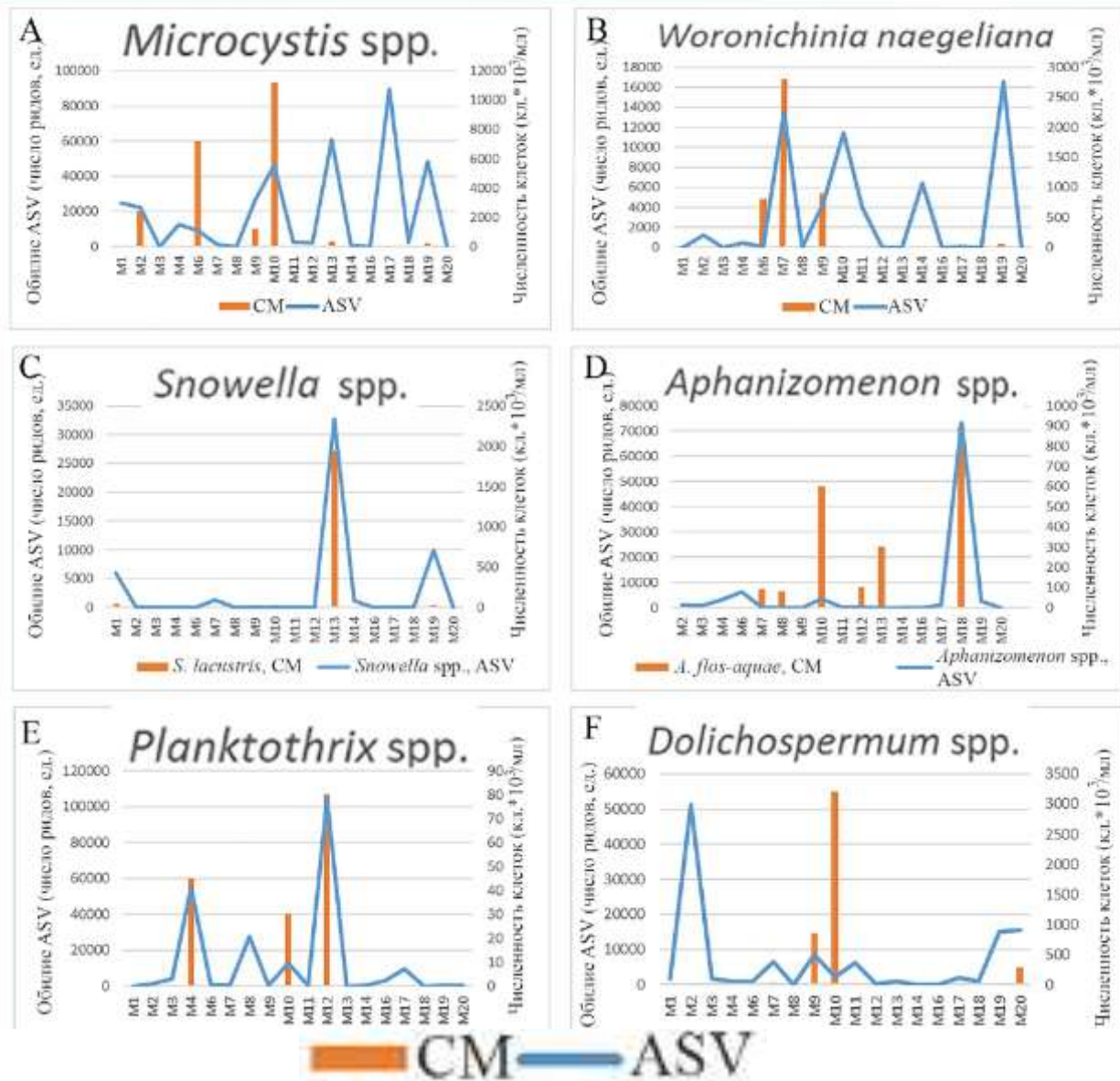


Рис. 15. Относительная численность родов (%) и общая численность цианобактерий (клеток · 10³/мл) в водоемах и водотоках г. Москвы в июне 2024 г., по данным световой микроскопии.

# Сравнение данных СМ и метабаркодинга по распространению и обилию шести родов

Рис. 16. Данные о численности ASV/клеток цианобактерий шести родов цианобактерий по данным метабаркодинга и световой микроскопии (СМ).

- A – *Microcystis* spp.,
- B – *Woronichinia naegeliana*,
- C – *Snowella* spp.,
- D – *Aphanizomenon* spp.,
- E – *Planktothrix* spp.,
- F – *Dolichospermum* spp.



# Метабаркодинг и световая микроскопия

24

**9 родов и 12 видов**  
по данным световой  
микроскопии

**76 родов**  
по данным  
метабаркодинга

**1239 ASV**  
вариантов ампликонных  
последовательностей

Подобные результаты были получены и в других исследованиях. Наши данные о том, что метабаркодинг выявляет большее разнообразие, чем световая микроскопия, согласуются с данными литературы (Li et al., 2019, MacKeigan et al., 2022, Gelis et al., 2024). Причины таких расхождений, связаны с различиями в объемах проб, методов выделения ДНК, наборах праймеров, методах биоинформатической обработки, неполнотой референсных баз данных и т.п.



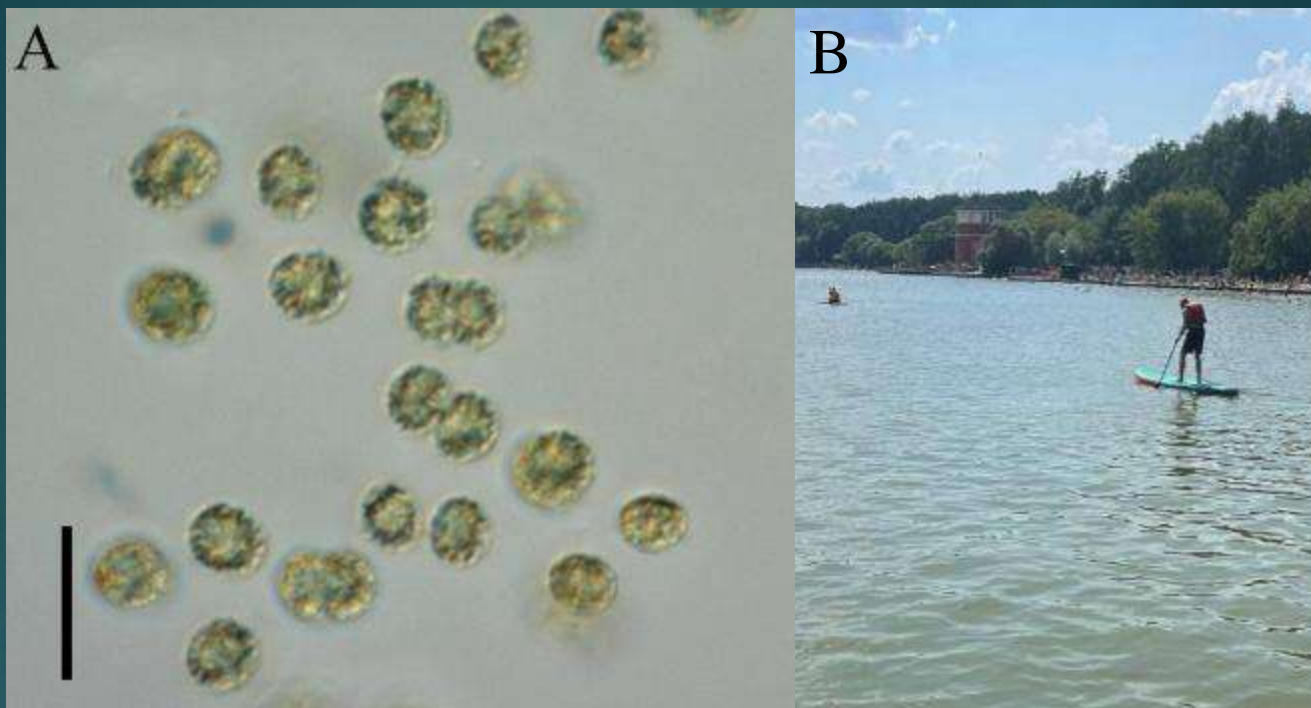


Рис. 17. А – микрофотография штамма *Microcystis aeruginosa* CBMC403m (масштабная линейка = 10 мкм), В – Мещерский пруд.

Анализ попарного сравнения последовательностей ( $p$ -distance) ASV *Microcystis* spp. и последовательностей токсичных штаммов *M. aeruginosa* выявил **100%** сходство с последовательностью ASV1 (*Microcystis* spp.), которая была обнаружена почти во всех исследованных пробах (в **16** из **18**), что свидетельствует о широком распространении потенциально токсичного вида *M. aeruginosa* в водоемах г. Москвы.

## **Мониторинг водоёмов**

результаты позволяют выделять объекты, требующие приоритетного наблюдения в период массового развития цианобактерий

## **Референсные последовательности**

выделенных штаммов могут использоваться для расшифровки данных метабаркодинга

## **Биобезопасность**

обнаружение микроцистин-продуцирующих штаммов важно для санитарно-экологической оценки городских вод

## Апробация

Результаты представлены в виде устного доклада на VI (XIV) Международной ботанической конференции молодых учёных, Санкт-Петербург, 21–25.04.2025.



## Публикации

По материалам работы опубликовано две научные статьи.



toxins



Article

### Comprehensive Study of Some Cyanobacteria in Moscow Waterbodies (Russia), Including Characteristics of the Toxigenic *Microcystis aeruginosa* Strains

Elena Kezlya <sup>1,\*</sup>, Elina Mironova <sup>1,2</sup>, Ekaterina Chernova <sup>3</sup>, Maria Gololobova <sup>3</sup>, Andrei Mironov <sup>1,2</sup>, Ekaterina Voyakina <sup>3</sup>, Yevhen Maltsev <sup>1</sup>, Dina Snarskaya <sup>2</sup> and Maxim Kulikovskiy <sup>5</sup>



phycology



Article

### Cyanobacteria in Waterbodies of the Biggest Anthropogenic Agglomeration: Combined DNA Metabarcoding, Microscopy, and Culture Analysis

Elena Kezlya <sup>1,\*</sup>, Elina Mironova <sup>1,2</sup>, Ekaterina Voyakina <sup>3,4</sup>, Sergey Kravchenko <sup>5</sup>, Andrei Mironov <sup>1,2</sup>, Vasilii Kuzmin <sup>2,5</sup>, Ekaterina Chernova <sup>3</sup>, Anton Iurmanov <sup>6</sup>, Yevhen Maltsev <sup>1</sup> and Maxim Kulikovskiy <sup>5</sup>

# Выводы

---

1. Впервые с использованием полифазного подхода проведено исследование цианобактерий в разнотипных водоемах г. Москвы, в ходе которого было получено 23 моноклональных штамма, принадлежащих к порядкам Nostocales (3 штамма, относящихся к 3 родам и 3 видам), Oscillatoriales (1 штамм, относящийся к *Argonema galeatum*) и Chroococcales (19 штаммов, относящихся к 2 родам и 2 видам), среди которых представители родов *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Anabaena* и *Microcystis* являются потенциально токсичными. Полученные для всех штаммов референсные последовательности могут использоваться в дальнейшем для расшифровки данных метабаркодинга;

---

2. Впервые проведен ПЦР-скрининг, выделенных из водоемов г. Москвы штаммов, на наличие генов биосинтеза цианотоксинов, в результате которого у двух штаммов *Microcystis aeruginosa* выявлены гены синтеза микроцистинов. Присутствие микроцистинов в биомассе этих штаммов подтверждено методом ВЭЖХ-МСВР. Полученные результаты говорят о важности отслеживания массового развития потенциально токсичных цианобактерий в водоемах города;

3. Метабаркодинг выявил более высокое биоразнообразие цианобактериальных сообществ в исследованных водоемах по сравнению с методом световой микроскопии (76 родов и 1239 ASV vs. 9 родов и 12 видов, соответственно). За исключением *Aphanocapsa* spp. и *Planktolyngbya* spp., все таксоны, идентифицированные методом световой микроскопии, были обнаружены в данных метабаркодинга. Результаты проведенного сравнения подтверждают важность сочетания обоих методов при исследовании сообществ и выявлении биоразнообразия;

## Выводы

---

4. Детальное сравнение динамики обилия ASV/клеток цианобактерий в изученных водоемах г. Москвы на примере шести родов (включая развивающиеся в массе и потенциально токсичные *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum* и *Aphanizomenon*) показало хорошую сходимость результатов, полученных методами световой микроскопии и метабаркодинга, что позволяет использовать последний как эффективный инструмент для мониторинга;
5. Короткий баркодовый регион V3-V4 16S рРНК часто не дает точного разрешения и не позволяет определить видовую принадлежность цианобактерий, в том числе широко распространенных и потенциально токсичных представителей родов *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum* и *Aphanizomenon*, что свидетельствует о необходимости дальнейшего пополнения БД хорошо задокументированными последовательностями верифицированных штаммов;

## Выводы

---

6. Анализ попарного сравнения последовательностей ASV *Microcystis* spp. и последовательностей токсичных штаммов *M. aeruginosa* выявил 100% сходство с последовательностью ASV1, которая была обнаружена почти во всех исследованных пробах (в 16 из 18), что, очевидно, свидетельствует о широком распространении потенциально токсичного вида *M. aeruginosa* в водоемах г. Москвы;

7. Изучение цианобактерий в водоемах г. Москвы с использованием полифазного подхода показало, что именно сочетание разных методов исследования позволяет получать наиболее полные и надежные данные по видовому разнообразию цианобактерий в исследуемых сообществах, оценивать обилие видов в сообществах, а также выявлять токсичные/потенциально токсичные штаммы и делать выводы об их распространении. Наличие в водоемах г. Москвы потенциально токсичных/токсичных цианобактерий, в том числе, способных вызывать «цветение» воды, таких как *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhi*, *Dolichospermum* spp. и *Aphanizomenon* spp., говорит о необходимости мониторинга фитопланктона водоемов города, особенно относящихся к рекреационным.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**