

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК: 663.1; 582.26

К. БОЛАТХАН^{1,*}, Н.Р. АКМУХАНОВА¹, Б.К. ЗАЯДАН^{1,*}, А.К. САДВАКАСОВА¹, М.А. СИНЕТОВА², Д.А. ЛОСЬ²

¹ Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы Казахстан, 480078

² ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева» Российской академии наук, Москва, 127276

e-mail: zbolatkhan@mail.ru

Выделение и характеристика токсичных цианобактерий из различных природных источников

В поисках токсин-образующих цианобактерий из источников ущелья Тургень (Казахстан), источников Карловы Вары (Чехия) и из озера Шар-Нуур Баян-Улгийского аймака (Монголия) выделено 7 альгологических и [5] бактериологически чистых культур цианобактерий. Из них наиболее высокую токсичность в отношении тест-объекта *Daphnia magna* проявили штаммы *Desertifilum* sp. и *Nostoc* sp.: полная гибель всех клеток тест-объекта наблюдалась через 48 ч. Эти же штаммы оказывали и наибольшее ингибирующее действие на пролиферацию линии раковых клеток *HeLa*. Штаммы *Anabaena* SP-35 и *Nostoc* SP-4 также оценены как сильно токсичные. Модельные штаммы цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, а также выделенный в данной работе *Synechococcus* SP-55 оценены как слаботоксичные. Масс-спектрометрический анализ позволил отнести токсины цианобактерий к классу циклических депсипептидов. В экстрактах *Desertifilum* sp. обнаружено два циклических депсипептида – микропептин Т и осциллапептин. В экстракте *Nostoc* sp. обнаружен криптофицин и (в небольшом количестве) циклический депсипептид микропептин SD.

Ключевые слова: биотоксины, токсины, цианобактерии, цитотоксины.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-3-57-66

Цианобактерии служат модельными организмами для изучения оксигенного фотосинтеза, фиксации атмосферного азота, клеточного деления, получения водорода и для решения целого ряда других фундаментальных и прикладных задач. Эти организмы характеризуются относительной легкостью культивирования, высокой скоростью роста и пластичным метаболизмом [1, 2]. Цианобактерии способны метаболизировать природные ароматические углеводороды и ксенобиотики [3]. Цианобактериальные сообщества используют для очистки воды и почвы от нефтяных загрязнений,

поскольку они способны использовать сырую нефть и алканы в качестве источников углерода и энергии [4]. Цианобактерии также являются эффективными биологическими сорбентами металлов в водной среде. Полисахариды оболочек цианобактерий *Microcystis aeruginosa* и *Aphanothece halophytica* эффективно сорбируют ионы тяжелых металлов, таких как медь, свинец или цинк [5].

Приспосабливаясь к существованию в экстремальных условиях, цианобактерии стали продуцентами различных вторичных метаболитов, включая цитотоксины и биотоксины. *Цитотоксины*

Болатхан Кенжегуль, Акмуханова Нурзия Рахмедиевна, Заядан Болатхан Казыханович, Садвакасова Асемгуль Каликумаровна, Синетова Мария Андреевна, Лось Дмитрий Анатольевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; MSI — ионизованные молекулы; m/z — масс-заряд; PDA — ультрафиолетовый полихроматический детектор.

* Авторы для переписки.

влияют на отдельные функции клеток, в частности, являются ингибиторами ферментов. Цитотоксины цианобактерий при попадании в воду могут вызывать массовые отравления людей и животных, сопровождающиеся поражениями печени и почек. Некоторые цитотоксины убивают клетки водорослей и бактерий [6]. Активность цитотоксинов исследуют на клеточных культурах млекопитающих, часто на опухолевых клетках. В свою очередь, *биотоксины* разделяют на две группы: гепатотоксичные циклические пептиды, вызывающие гибель лабораторных животных (мышей) в течение 1—4 ч, и нейротоксичные алкалоиды, вызывающие гибель в течение 2—30 мин [7].

Однако несмотря на то, что токсины цианобактерий представляют опасность для людей и животных, некоторые из них могут оказаться полезными в качестве компонентов фармацевтических препаратов. К примеру, штаммы *Microcystis* продуцируют эругинозины с уникальным аминокислотным участком (2-карбокси-6-гидрокси-октагидроиндол), которые ингибируют сериновые протеазы. Трициклические депсипептиды из токсичных штаммов *Microcystis viridis* и *Lyngbia* sp. являются ингибиторами тирозинкиназы и эластазы [8].

По химической структуре токсины цианобактерий делятся на три основные группы: пептиды (циклические и линейные), алкалоиды и липополисахариды [1]. Первые и вторые являются вторичными метаболитами, т.е. не участвуют в центральном метаболизме. Третьи представляют собой структурные компоненты наружной клеточной стенки. Кроме нейротоксичности токсины могут обладать иммунотоксичностью, эмбриотоксичностью, дерматотоксичностью, мутагенными и канцерогенными свойствами [9, 10].

Разнообразие цианобактерий из различных ареалов обитания гарантирует обнаружение у них таких типов вторичных метаболитов, которые наверняка могут быть использованы в качестве новых медицинских препаратов.

Целью данной работы был скрининг штаммов цианобактерий, собранных в разных местах обитания, по содержанию потенциально токсичных соединений, а также выделение и частичная характеристика этих токсинов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Пробы из воды и альгобактериальных матов отбирали в летний период из следующих источников: (1) горячий источник ущелья Тургенъ Алматинской области (Казахстан) с температурой 55° и рН 5,0; (2) горячий источник в регионе Кар-

ловых Вар (Чехия) с температурой воды 50° и рН 6,5; (3) озеро Шар-Нуур Баян-Улгийского аймака (Монголия) с температурой 35° и рН 6,0. Всего было отобрано 12 альгологических проб. Для классификации цианобактерий использовали определители серии «Определители сине-зеленых водорослей СССР» [11]. Для выделения альгологически чистых культур применяли стандартные микробиологические методы. Бактерии и грибы из природных ассоциаций с микроводорослями удаляли обработкой их на агаризованных средах смесью антибиотиков гентамицина, пенициллина, тетрациклина и нистатина в конечной концентрации 5—50 мкг/мл. Использовали минеральные среды 04, Громова № 6, Тамия, Зарукка и BG-11 [12].

Токсичность определяли в биомассе цианобактерий, выращенной в жидкой среде при оптимальных условиях роста и лиофильно высушенной в аппарате LyoQuest (Telstar, Террасса, Испания). Токсичность цианобактерий исследовали в кратковременных (острых) опытах на тест-объекте *Daphnia magna* Straus. Для эксперимента отбирали трехсуточных половозрелых самок ракообразных средних размеров без партеногенетических зародышей и проводили эксперимент по следующей схеме: составляли серию концентраций (10,0 мг/мл, 1,0 и 0,1 мг/мл) лиофилизованной биомассы цианобактерий в стеклянных стаканах (100 мл) со средой объемом 20 мл. Контролем служил вариант без добавления биомассы [13].

Оценку цитотоксичности проводили в лаборатории биотехнологии и водорослей Института микробиологии, г.Тршебонь, Чехия. Для этой цели навеску лиофилизованной биомассы цианобактерий (200 мг) растирали в течение 2—3 мин в ступке с постепенным добавлением 6 мл 70%-ного метанола. Полученную смесь выдерживали в течение 1 ч при 22—24° и центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин. Супернатант перемещали в колбу и оставляли в холодильнике до начала опыта. Для исследования цитотоксичности экстрактов из цианобактерий использовали линию клеток *M HeLa*. Культивирование опухолевых клеток проводили согласно общепринятой методике [14]. Клеточные культуры с плотностью 50 тыс. клеток/мл помещали в 96-луночные планшеты по 100 мкл в лунку. Через 24 ч после посева культуральную среду удаляли и заменяли средой с различными концентрациями метанольных экстрактов цианобактерий. Инкубацию клеток с экстрактами проводили в течение 72 ч. В качестве контроля использовали 70%-ный метанол без экстрактов.

Разделение и анализ экстрактов цианобактерий проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-спектрометром Agilent HP 1100 LCMC (Agilent Technologies, Hewlett Packard, США) [15]. Циклические пептиды разделяли на аналитической колонке Zorbax XDB-C18 (4,6×150 мм; Agilent Technologies). Мобильную фазу составляли метанол—вода (линейный градиент от 30 до 100% метанола в течение 30 мин) со скоростью потока 0,6 мл/мин при 30°. Объем анализируемого экстракта был равен 20 мкл. Пики на выходе из колонки регистрировали с помощью двух датчиков: масс-спектрометра типа «ion-trap» и ультрафиолетового полихроматического детектора (PDA). Циклические пептиды выявляли на хроматографе при 230 нм (время удерживания 10—25 мин). В ходе тандемной масс-спектрометрии определяли масс-заряды (m/z) ионизированных молекул (MSI). Идентификацию токсинов осуществляли путем сравнения молекулярных масс (масс-зарядов) соединений, соотнося их со временем выхода при хроматографии соответствующих циклических пептидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение альгологически и бактериологически чистых культур цианобактерий

В горячем источнике ущелья Тургень было обнаружено максимальное количество видов (16) и разновидностей цианобактерий, что, вероятно, связано со слабым течением и широким разбросом температур воды (28—45°). При температуре ~ 40° микробные маты имели ярко-изумрудный цвет; в них встречались представители р. *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Gloeocapsa*, *Anabaena*, *Phormidium*.

Из горячего источника Карловы Вары выделено 12 представителей цианобактерий. Среди них в основном встречались виды порядков Chroococcales, Nostocales и Oscillatoriales, последний из которых доминировал.

В озере Шар-Нуур обнаружено 10 представителей цианобактерий. Среди них также доминировали бактерии порядка Oscillatoriales, реже встречались представители родов *Nostoc* и *Anabaena*.

В итоге из всех исследованных экосистем получили 7 накопительных культур, из которых путем последовательных пересевов удалось выделить альгологически чистые культуры цианобактерий (табл. 1).

На следующем этапе полученные альгологически чистые культуры цианобактерий очищали от бактерий-спутников, поскольку во всех культурах присутствовала сопутствующая микрофлора. Сопутствующая микрофлора выделенных цианобактерий состояла в основном из грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и плесени. Очистка выделенных культур от бактерий представляет собой очень сложный трудоемкий процесс, поскольку между цианобактериями и бактериями существуют плотные биоценотические связи [16]. Слизистые оболочки цианобактерий служат источником питания и укрытием для микроорганизмов.

Для очистки использовали смеси антибиотиков широкого спектра действия против грамположительных, грамотрицательных бактерий и грибов [17], так как сопутствующая микрофлора по-разному реагировала на отдельные антибиотики. В качестве противогрибкового агента во всех вариантах использовали фунгицидный антибиотик нистатин. В результате обработки смесью антибиотиков были получены 5 аксеничных культур цианобактерий, в то время как две культуры (SP-3 и SP-6) очистить от бактерий-спутников не удалось. Повышение концентрации антибиотиков оказывало ингибирующее действие не только на бактерии, но и на культуры цианобактерий.

Полученные в итоге аксеничные культуры цианобактерий были отнесены к следующим родам: SP-35 — *Anabaena*, SP-4 и SP-45 — *Nostoc*, SP-55 — *Synechococcus*, SP-6 — *Spirulina*, SP-3 — *Merismopedia* и SP-D — *Desertifilum* (см. табл. 1).

Изучение токсичности выделенных штаммов цианобактерий с использованием тест-системы *Daphnia magna*

Биотестирование с использованием дафний широко применяется при оценке качества природных вод [12]. Показателем острой токсичности является гибель 50% и более рачков в анализируемой воде по сравнению с контролем в течение 24 или 48 ч. Время гибели рачков отмечали по наступлению неподвижности (иммобилизации): дафнии опускались на дно стакана, плавательные движения отсутствовали и не возобновлялись при легком прикосновении струи воды или покачивании стакана.

В течение первых часов смертность *D. magna* в присутствии испытанных концентраций лиофилизованной биомассы всех цианобактерий была невелика, кроме культур SP-D (*Desertifilum* sp.) и SP-45 (*Nostoc* sp.). При концентрации био-

Изолированные альгологически и бактериологически чистые культуры цианобактерий
Isolated algologically and bacteriologically pure cultures of cyanobacteria

Обозначение культуры Culture designation	Род Genus	Место выделения Territory of isolation	Наличие бактериологически чистых культур Occurrence of bacteriologically pure cultures
SP-35	<i>Anabaena</i>	Монголия Mongolia	+
SP-55	<i>Synechococcus</i>	Тургеньский источник Turgenskii source	+
SP-4	<i>Nostoc</i>	Тургеньский источник Turgenskii source	+
SP-45	<i>Nostoc</i>	Карловы Вары Karlovy Vary	+
SP-D	<i>Desertifilum</i>	Монголия Mongolia	+
SP-3	<i>Merismopedia</i>	Карловы Вары Karlovy Vary	–
SP-6	<i>Spirulina</i>	Карловы Вары Karlovy Vary	–

массы 1—10 мг/мл происходило значительное изменение движения рачков, что, по-видимому, объясняется поведенческой реакцией на действие токсикантов. При испытании культур SP-D (*Desertifilum* sp.) и SP-45 (*Nostoc* sp.) смертность дафний при концентрации биомассы 1 мг/мл составила 82—83% через 24 ч. Увеличение концентрации биомассы цианобактерий до 10 мг/мл вызвало 100%-ную гибель тест-моделей. При анализе токсичности контрольных культур цианобактерий Se-7942 (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) и S-6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803), а также полученной в этой работе культуры SP-55 (*Synechococcus* sp.) наблюдались незначительные изменения в выживаемости рачков при воздействии биомассы цианобактерий на протяжении 1 и 6 ч. Гибель 11—16% дафний наблюдалась только через 48 ч при концентрации биомассы 10 мг/мл (табл. 2).

По 4-балльной шкале токсичности Строганова [18] культуры цианобактерий распределились следующим образом:

4 балла — сильно токсичные штаммы SP-D (*Desertifilum* sp.) и SP-45 (*Nostoc* sp.), экстракты которых вызывали полную гибель тест-объектов за 48 ч;

3 балла — токсичные штаммы SP-35 (*Anabaena* sp.) и SP-4 (*Nostoc* sp.), в присутствии экстрактов которых смертность дафний за 48 ч составила 80—84%;

1 балл — слабо токсичные штаммы Se-7942 (*Synechococcus elongatus* PCC 7942), S-6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) и SP-55 (*Synechococcus* sp.). Гибель дафний через 48 ч составила 11—16%.

Таким образом, среди выделенных нами штаммов цианобактерий наиболее токсичными по отношению к тест-объекту *D. magna*, который считается очень чувствительным к цианотокси-

Смертность, %, тест-объекта *Daphnia magna* в присутствии различных концентраций лиофилизованной биомассы цианобактерий
Lethality, %, of *Daphnia magna* test object in the occurrence of various concentrations of cyanobacteria lyophilized biomass

Культура Culture	Длительность тестирования, ч Time of testing, h											
	1			6			24			48		
	Концентрация лиофилизованных клеток цианобактерий, мг/мл Concentration of lyophilized cyanobacteria cells, mg/ml											
	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10
Se-7942*	0	0	0	0	0	6	0	2	9	0	2	12
S-6803*	0	0	0	0	2	4	0	2	5	0	4	11
SP-55	0	0	0	0	0	3	0	1	10	0	4	16
SP-4	8	20	31	12	25	50	17	54	69	20	71	84
SP-35	9	15	27	10	21	45	14	47	65	14	54	80
SP-45	10	27	32	14	30	56	28	82	94	47	95	100
SP-D	14	30	39	17	36	67	32	83	97	45	98	100

*Se-7942 – контрольный штамм *Synechococcus elongatus* PCC 7942; S-6803 – контрольный штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803.
* Se-7942 is the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 control strain; S-6803 is the *Synechocystis* sp. PCC 6803 control strain.

нам [19, 20], оказались штаммы SP-D (*Desertifilum* sp.) и SP-45 (*Nostoc* sp.).

Изучение токсичности выделенных штаммов цианобактерий с использованием тест-системы раковых клеток *HeLa*

Мы также провели оценку токсичности метанольных экстрактов из цианобактерий, используя в качестве тест-объекта клеточную линию раковых клеток *HeLa* (табл. 3). Экстракты клеток SP-4 (*Nostoc* sp.) и SP-35 (*Anabaena* sp.) ни при одной из изученных концентраций не проявили цитотоксичность выше 50% (см. табл. 3). Наибольший эффект (43—45% погибших клеток) наблюдали при добавлении к раковым клеткам *HeLa* экстракта этих цианобактерий в концентрации 5 мкг/мл ?.

В экстрактах клеток SP-D (*Desertifilum* sp.) и SP-45 (*Nostoc* sp.) с увеличением концентрации

повышалась их цитотоксичность. При концентрации экстрактов цианобактерий 5 мкг/мл гибель опухолевых клеток достигала 92—97%. Это согласуется с литературными данными, свидетельствующими о том, что представители порядков Oscillatoriales (к которому относится *Desertifilum* sp.) и Nostocales способны продуцировать цитотоксины, главным образом циклические депсипептиды [20, 21]. В частности, криптофицины, изолированные из *Nostoc* sp. являются многообещающими кандидатами на роль противоопухолевых препаратов [22].

Таким образом, экстракты из выделенных природных штаммов цианобактерий обладают разной цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам *HeLa*, что можно объяснить различным составом и количеством токсинов в исследуемых культурах. Наибольшим ингибирующим действием обладают экстракты клетки SP-D (*Desertifilum* sp.) и SP-45 (*Nostoc* sp.).

Цитотоксичность, %, экстрактов лиофилизированных клеток цианобактерий по отношению к клеточной линии раковых клеток *HeLa*
Cytotoxicity, %, of extracts of cyanobacteria lyophilized biomass to *HeLa* tumor cell line

Культура Culture	Концентрация экстрактов лиофилизированных клеток цианобактерий, мкг/мл Concentration of cyanobacteria lyophilized cells extracts, µ/ml						
	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5
SP-45	68	75	76	76	80	82	92
SP-35	35	37	38	39	42	42	45
SP-4	32	36	36	40	40	41	43
SP-D	82	83	89	89	89	90	97

Определение токсинов, продуцируемых культурами цианобактерий *Desertifilum sp.* и *Nostoc sp.*

Как уже говорилось выше, по химической структуре токсины цианобактерий делятся на три основные группы: пептиды (циклические и линейные), алкалоиды и липополисахариды [23].

Идентификация соединений, присутствующих в метанольных экстрактах лиофилизированных клеток цианобактерий, показала наличие в биомассе цианобактерии SP-D (*Desertifilum sp.*) по крайней мере двух циклических депсипептидов — микропептина Т и осциллапептина С (рис. 1) с количественным преобладанием микропептина Т с m/z 1051. Этот широко распространенный токсин, впервые выделенный из пресноводной цианобактерии *Microcystis aeruginosa* [24], является ингибитором химотрипсина. Микропептины найдены также у планктонных пресноводных видов, принадлежащих к родам *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Microcystis*, *Nostoc* и *Oscillatoria* [20]. Осциллапептин С (m/z 1060) также относится к циклическим депсипептидам.

В экстракте лиофилизованной биомассы культуры SP-45 (*Nostoc sp.*) обнаружен криптофицин, соответствующий пику 673 m/z , а также небольшое количество циклического депсипептида — микропептина SD с m/z 1003 [24, 25] (рис. 2). Циклические депсипептиды, содержащие 3-амино-6-гидрокси-2-пиперидон, были выделены из токсичных и нетоксичных штаммов *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* и *Nostoc*. Ряд соединений этого класса не являются собственно токсинами, однако

известно, что некоторые из них оказывают ингибирующее воздействие на сериновые протеазы и тирозинкиназы [24, 25].

Таким образом, обнаруженные в экстрактах биомассы штаммов SP-D (*Desertifilum sp.*) и SP-45 (*Nostoc sp.*) токсины принадлежат к классу циклических депсипептидов, к которым также относятся анабенопептилиды, микропептины, микроцистилиды, осциллопептины, цианопептолины, эругинопептины и др. [26]. Циклические депсипептиды, или криптофицины [26, 27], являются мощными противоопухолевыми и противогрибковыми депсипептидами, которые были впервые выделены из цианобактерий, принадлежащих к семейству Nostocaceae.

Итогом проделанной работы стало выделение пяти аксеничных штаммов цианобактерий. Среди метанольных экстрактов, полученных из лиофилизированных клеток этих штаммов, наибольшую токсичность по отношению к тест-системам — рачкам *Daphnia magna* и опухолевым клеткам *HeLa* — обнаружили экстракты из *Desertifilum sp.* (SP-D) и *Nostoc sp.* (SP-45). ВЭЖХ экстрактов цианобактерий показала наличие в них циклических депсипептидов — микропептина Т и осциллапептина у *Desertifilum sp.*, а также криптофицина и микропептина SD у *Nostoc sp.*

Данная работа подчеркивает важность и перспективность изучения природных штаммов цианобактерий как объектов для нужд биотехнологии и медицины.

Авторы благодарят профессора кафедры биофизики МГУ Д.Н. Маторина за плодотворное

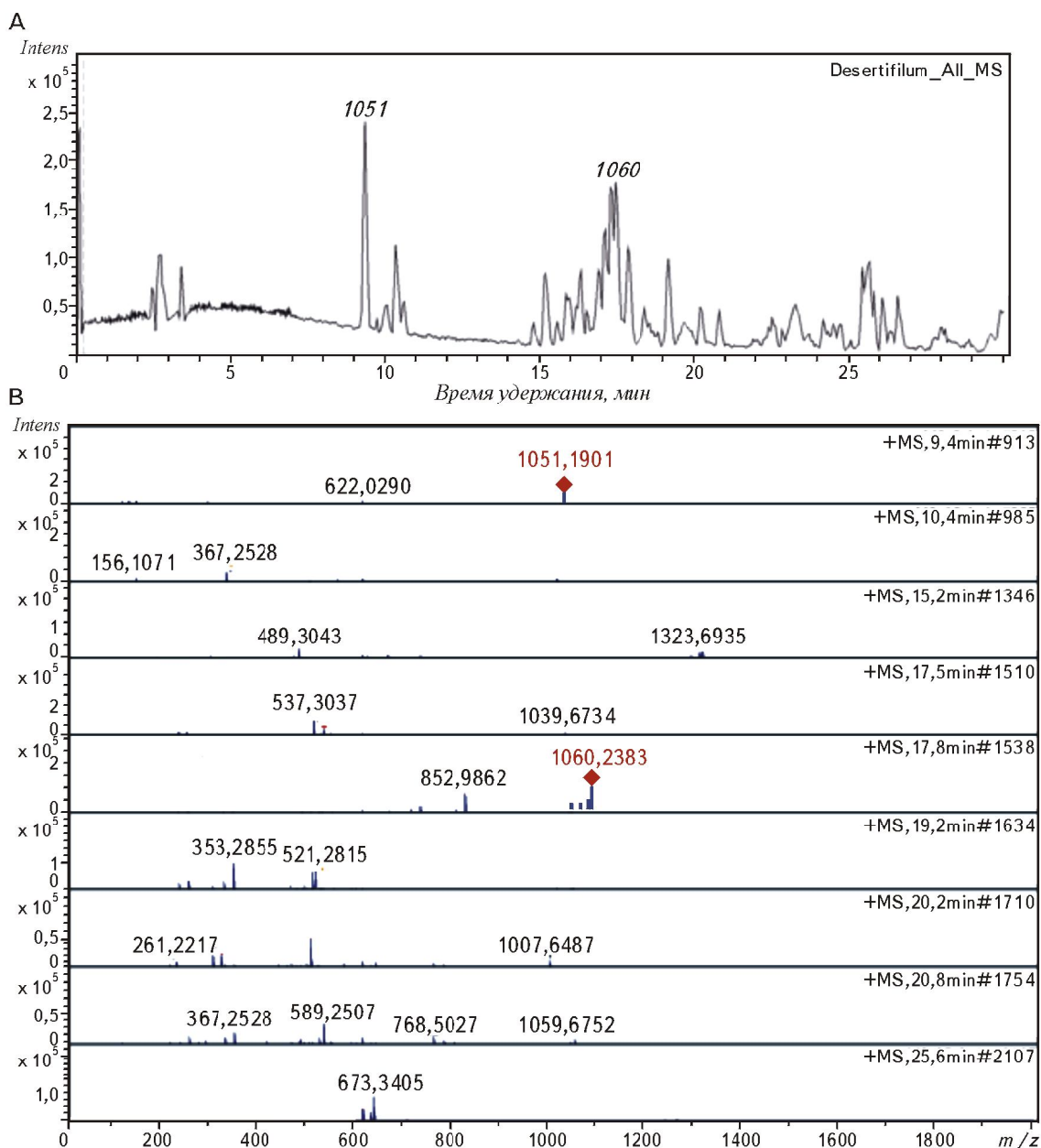


Рис. 1. Результаты ВЭЖХ экстрактов лиофилизованной биомассы SP-D (*Desertiifilum* sp.) (А) и их фрагментации в жидкостном хроматографе с масс-спектрометром (В). Цифрами отмечены значения m/z токсинов: 1051 — микропептин Т; 1060 — осциллапептин С

Fig. 1. HPLC of extracts of lyophilized SP-D (*Desertiifilum* sp.) biomass (А) and their fragmentation in liquid chromatograph-mass-spectrograph (В). Figures mean m/z of toxins: 1051, micropeptin T; 1060, oscillapeptin

обсуждение работы. Работа поддержана Казахстанским фондом фундаментальных исследований (проект № ГФ2015, № госрегистрации 015РК00290) и Российским научным фондом (грант № 14-14-00904).

itful discussion of the results. The work was supported by the Kazakhstan Fund for Basic Investigations (Project GF2015, Number of State Registration 015K00290) and Russian Research Fund (Project Number 14-14-00904).

The authors are grateful to Prof. D.N. Matorin, Dept. of Biophysics, Moscow State University, for fru-

Получено 23.03.16

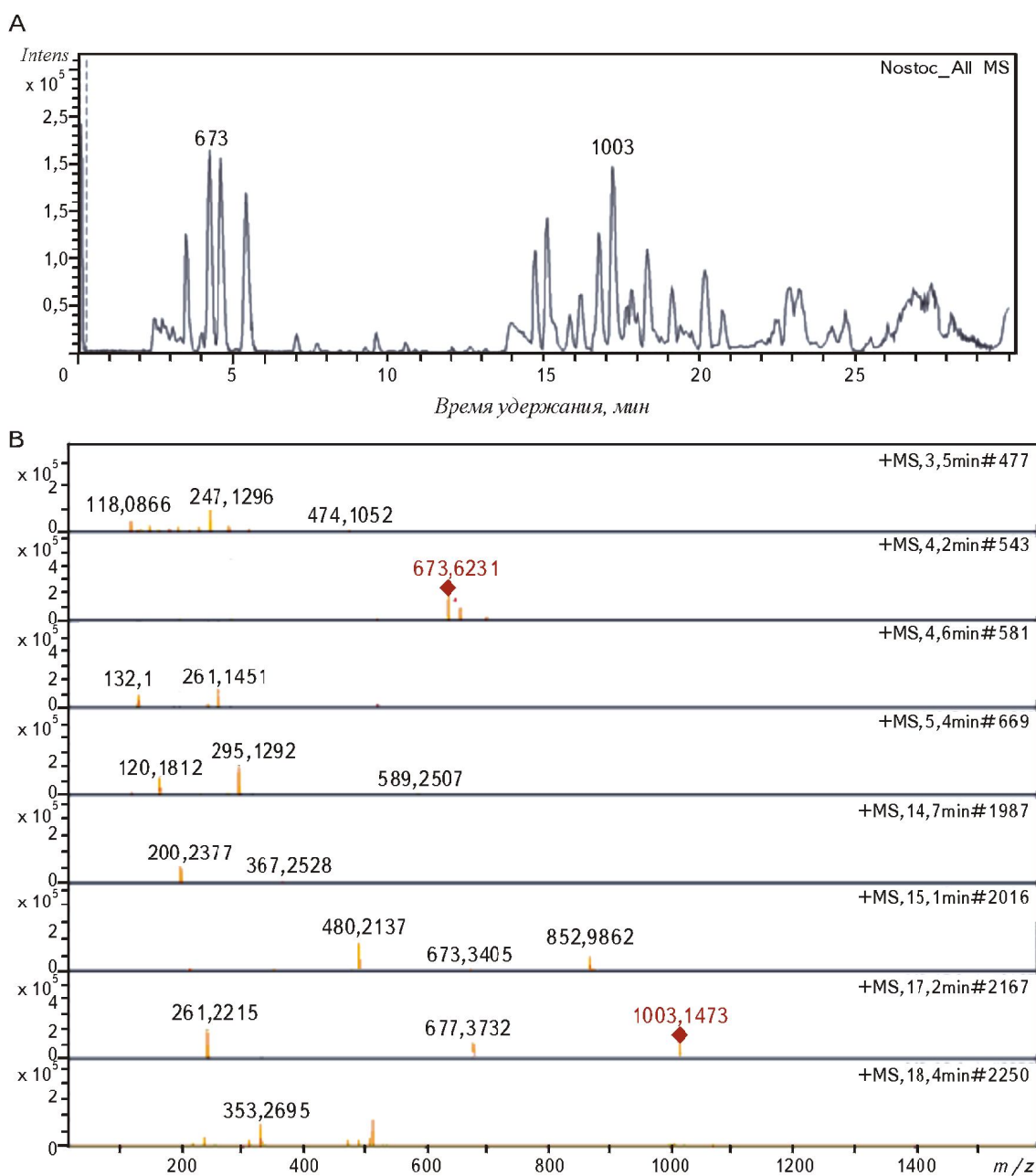


Рис. 2. Результаты ВЭЖХ экстрактов лиофилизованной биомассы SP-45 (*Nostoc* sp.) (А) и их фрагментации в жидкостном хроматографе с масс-спектрометром (В). Цифрами отмечены значения m/z токсинов: 673 — криптофycin; 1003 — микропептин SD

Fig. 2. HPLC of extracts of lyophilized SP-45 (*Nostoc* sp.) biomass (A) and their fragmentation in liquid chromatograph-mass-spectrograph (B). Figures mean m/z of toxins: 673, cryptophycin; 1003, micropeptin SD

ЛИТЕРАТУРА

1. Carmichael, W.W. The toxins of *Cyanobacteria* // *Sci. Amer.* — 1994. — N 1. — P. 78—86.
2. Заядан Б.К. Консорциумы микроорганизмов, перспективных при получении биоудобрения для рисовых культур / Б.К. Заядан, Д.Н. Маторин, Г.Б. Баймаханова, К. Бо-

латхан, Г.Д. Ораз, А.К. Саданов // *Микробиология.* — 2014. — Т. 83. — № 4. — С. 391—397.

Zayadan, B.K. Consortia of microorganisms that are promising in obtaining of biofertilizers for rice cultures / B.K. Zayadan, D.N. Matorin, G.B. Baimakhanova, K. Bolatkhan, G.D. Oraz, and A.K. Sadanov // *Mikrobiologiya (Microbiology).* — 2014. — V. 83. — N 4. — С. 391—397.

3. *Ballot, A.* Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany / A. Ballot, J. Fastner, C. Wiedner // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — V. 76. — P. 1173—1180.
4. *Жубанова А.А.* Конструирование цианобактериального консорциума на основе аксеничных культур цианобактерий и гетеротрофных бактерий для биоремедиации загрязненных водоемов / А.А. Жубанова, А.К. Ерназарова, Г.К.Кайырманова, Б.К. Заядан, И.С. Савицкая, Г.Ж. Абдиева, А.С. Кистаубаева, Н.Ш. Акимбеков // *Физиол. растений.* — 2013. — Т. 60. — № 4. — С. 588—595.
Zhubanova, A.A. Construction of cyanobacterial consortium on the basis of axenic cyanobacteria cultures and heterotrophic bacteria for polluted water bodies bioremediation / A.A. Zhubanova, A.K. Ernazarova, G.K. Kaiyrmanova, B.K. Zayadan, I.S. Savitskaya, G.Zh. Abdieva, A.S. Kistaubayeva, and N.Sh. Akimbekov // *Phisiologiya Rasteniy (Plant Physiology).* — 2013. — V. 60. — N 4. — P. 588—595.
5. *Namikoshi, M.* Bioactive compounds produced by cyanobacteria / M. Namikoshi, K.L. Rinehart // *J. Industr. Microbiol. Biotechn.* — 1996. — V. 17. — P. 373—384.
6. *Harada, K.I.* Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria / K.I. Harada // *Chem. Pharm. Bull.* — 2004. — V. 5. — P. 889—899.
7. *McElhiney, J.* Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins / J. McElhiney, L.A. Lawton // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2005. — V. 203. — N. 3. — P. 219—230.
8. *Singh, R.K.* Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery / R.K. Singh, S.P. Tiwari, A.K. Rai, T.M. Mohapatra // *J. Antibiot.* — 2011. — V. 64. — P. 401—412.
9. *Chorus, I.* Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. V. 63. Berlin: Federal Environ. Agency, 2012. — P. 122.
10. *Brittain, S.* Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont / S. Brittain, Z.A. Mohamed, J. Wang, V.K.B. Lehmann, W.W. Carmichael, K.L. Rinehart // *Toxicon.* — 2000. — V. 38. — N 12. — P. 1759—1771.
11. *Определитель сине-зеленых водорослей СССР* [Отв. ред. М.М. Голлербах]. — Л.: Наука, 1951. — С. 1—14.
Manual for Systematization of Blue-Green Algae in USSR [M.M. Gollerbach, ed.]. — Leningrad: Nauka, 1951. — P. 1—14.
12. *Владимирова М.Г., Барцевич Е.Д., Жолдаков И.А., Епифанова О.О., Маркелова А.Г., Маслова И.П., Купцова Е.С.* IPPAS — коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР. Каталог культур коллекций СССР. — М.: Изд-во РАН, 1991. — С. 8—61.
Vladimirova, M.G., Bartsevich, E.D., Zholdakov, I.A., Epifanova, O.O., Markelova, A.G., Maslova, I.P., and Kuptsova, E.S. IPPAS, a Collection of Microalga Cultures of Timiriazev Institute for Plant Physiology, Acad. Sci. USSR. A Catalog of Cultures from USSR Collections. — Moscow: Izd-vo RAN, 1991. — С. 8—61.
13. 10-Day chronic toxicity test using *Daphnia magna* or *Daphnia pulex*. 1994. SOP N 2028. <https://clu-in.org/download/ert/2028-R00.pdf>
14. *Волошко Л.Н.* Токсины цианобактерий (Cyanobacteria, Cyanophyta) / Л.Н. Волошко, А.В. Плющ, Н.Н. Титова // *Альгология.* — 2008. — Т. 18. — №1. — С. 3—21.
Voloshko, L.N. Cyanobacterial toxins (Cyanobacteria, Cyanophyta) / L.N. Voloshko, A.V. Plush, N.N. Titova // *Algologiya (Algology).* — 2008. — V. 18. — N. 1. — P. 3—21.
15. *Dittman, E.* Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary routes / E. Dittman, D.P. Fewer, B.A. Neilan // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2013. — V. 37. — P. 23—43.
16. *Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М.* Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). — Кострома: Костромской печатный дом, 2014. — 215 с.
Temraleeva, A.D., Mincheva, E.V., Bukin, Yu.S., and Andreeva, A.M. Current methods in isolation, culturing and identification of green algae (Chlorophyta). — Kostroma: Kostromskoy Pechatnyy Dom, 2014. — 215 p.
17. *Jones, A.K.* The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae / A.K. Jones, M.E. Rhodes, S.C. Evans // *Brit. Phycol. J.* — 1973. — V. 8. — N. 1—2. — P. 185—196.
18. *Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование: учебное пособие* [Под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой]. — М.: Изд. центр “Академия”, 2007. — С. 243—246.
Biological Control of Environment. Bioindication and Biotesting. A manual [O.P. Melekhova and E.I. Egorova, eds]. — Moscow: Izd. Tsentr Akademiya. — 2007. — P. 243—246.
19. *Kurmayer, R.* Competitive ability of *Daphnia* under dominance of non-toxic filamentous cyanobacteria // *Hydrobiologia.* — 2001. — V. 442. — P. 279—289.
20. *Al-Sultan, E.Y.A.* The Isolation, the purification and the identification of hepatotoxin Microcystin-LR from two cyanobacterial species and studying biological activity on some aquatic organisms // *J. Basrah Res. (Sci.).* — 2011. — V. 37. — P. 39—57.
21. *Codd, G.A.* Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance // *Wat. Sci. Tech.* — 1995. — V. 32. — P.149—156.
22. *Chaganty, S.* Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224 / S. Chaganty, T. Golakoti, C. Heltzel, R.E. Moore, W.Y. Yoshida // *J. Nat. Prod.* — 2004. — V. 67. — P.1403—1406.
23. *Trimurtulu, G.* Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224 / G. Trimurtulu, J. Ogino, C.E. Helsel, T.L. Husebo, C.M. Jensen, L.K. Larsen, G.M.L. Patterson, R.E. Moore, S.I. Mooberry, T.H. Corbett, F.A. Valeriote // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1995. — V. 117. — P. 12030—12049.
24. *Okino, T.* Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* / T. Okino, M. Murakami, R. Haraguchi, H. Munekata, H. Matsu-

da, K. Yamaguchi // *Tetrahedron Lett.* — 1993. — V. 34. — N. 50. — P. 8131—8134.

25. Reshef, V. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* / V. Reshef, S. Carmeli // *Tetrahedron.* — 2001. — V. 57. — P. 2885—2894.

26. Calteau, A. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in *Cyanobacteria* / A. Calteau, D.P. Fewer, A. Latifi, T. Coursin, T. Laurent, J. Jokela, C.A. Kerfeld, K. Sivonen, J. Piel, M. Gugger // *BMC Genomics.* — 2014. — V. 15. — P. 977. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-977>

Al-Awar, R.S. Biological evaluation of cryptophycin 52 fragment A analogues: effect of the multidrug resistance ATP binding cassette transporters on antitumor activity / R.S. Al-Awar, T.H. Corbett, J.E. Ray, L. Polin, J.H. Kennedy, M.M. Wagner, D.C. Williams // *Mol. Cancer Ther.* — 2004. — V. 3. — N. 9. — P. 1061—1067.

K. BOLATKHAN^{1,*}, N.R. AKMUKHANOVA¹,
B.K. ZAYADAN^{1,*}, A.K. SADVAKASOVA¹,
M.A. SINETOVA², and D.A. LOS²

¹The Al-Farabi Kazakh National University, 480078, Almaty Kazakhstan

²The Timiryazev Institute for Plant Physiology, Russ. Acad. Sci., 127276, Moscow Russia

e-mail: zbolatkhan@mail.ru

Toxic Cyanobacteria from Various Natural Sources: Isolation and Characteristics

Searching for toxin-producing cyanobacteria from Turgan gorge (Kazakhstan), Karlovy Vary (Czech Republic) and Shar-Nuur Lake, Bayan Ulgii region (Mongolia) springs, we have isolated seven algologically and five bacteriologically pure cultures of cyanobacteria. Among these strains, the highest toxicity (according to the *Daphnia magna* test) was exerted by the *Desertifilum* sp. and *Nostoc* sp. strains: the complete destruction of *Daphnia* was observed after 48 h. These strains also demonstrated the highest inhibitory effect on the proliferation of cancer *HeLa* cells. The *Anabaena* sp. 35 and *Nostoc* sp. 4 cyanobacteria were also classified as very toxic. The cyanobacteria model strains, *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942, as well as *Synechococcus* sp. 55 isolated in this work, were rated as low toxic. The mass spectrometry analysis permitted to assign those strong cyanobacterial toxins to a type of cyclic depsipeptides. In extracts of *Desertifilum* sp., two cyclic depsipeptide, micropeptin T and oscillapeptin, were identified. In the extract of *Nostoc* sp., cryptophycin was detected together with a small amount of a cyclic depsipeptide, micropeptin SD.

Key words: biotoxins, cyanobacteria, cytotoxins, toxins.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, P. 57—66.

*Authors for correspondence.