

# ВЛИЯНИЕ **ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ** на РОСТ *Scenedesmus acutus* и *Gloeocapsa SP.* В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

**Впервые в отечественной гидробиологии проведены лабораторные эксперименты по выявлению аллелопатического воздействия цианотоксинов на микроводоросли с использованием метода добавок их чистых форм. Несмотря на то, что влияние микроцистинов и цилиндроспермопсина оказалось видоспецифичным, полученные данные указывают на наличие возможного аллелохимического эффекта. Обосновывается необходимость постановки полевых экспериментов для более корректного изучения аллелопатической активности цианотоксинов.**

## Введение

Одним из основных факторов, ухудшающих качество воды в континентальных водоемах, является эвтрофирование, сопровождающееся «цветением» воды синезелеными водорослями (цианобактериями). Их массовое развитие вызывает ряд негативных последствий, среди которых наиболее опасным является отравление животных и человека токсическими вторичными метаболитами цианобактерий. Токсины по определению являются ядами биологического происхождения [1], так называемые продукты вторичного метаболизма цианобактерий, не участвующие в основных процессах жизнедеятельности, в частности, обозначаются в современной литературе как цианотоксины [2]. За рубежом систематическое изучение цианотоксинов проводится более 20 лет. За это время идентифицированы десятки токсинов, наиболее распространенными в пресноводных водоемах являются гепатотоксины (микроцистины, цилиндроспермоп-

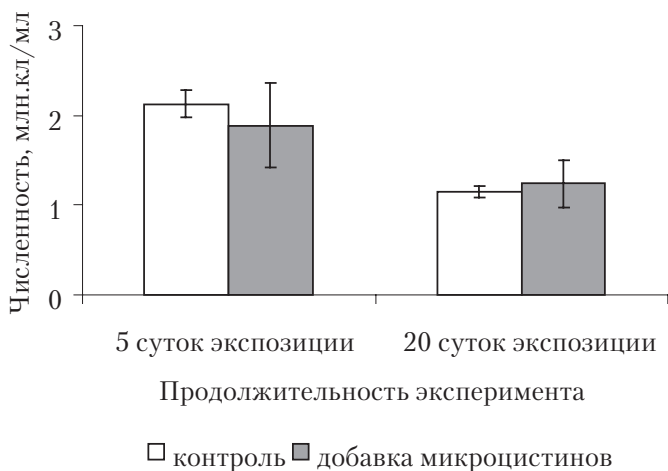
**С.И. Сиделёв\***, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры экологии и зоологии, ФГБОУ ВПО Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

син) и нейротоксины (анатоксин-а), которые продуцируются представителями родов *Microcystis* Kütz. ex Lemm., *Anabaena* Bory, *Aphanizomenon* Morr., *Planktothrix* Anagn. et Kom., *Oscillatoria* Vauch. ex Gom. [3].

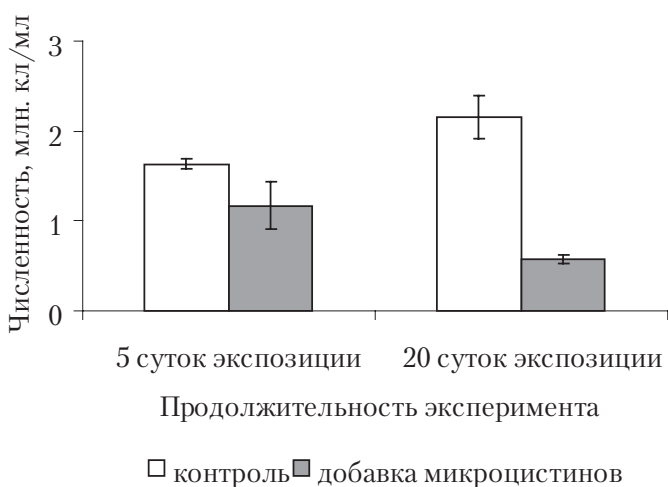
Термин «цианотоксины» исторически связан с выявлением случаев отравления домашнего скота на водопоях при массовом развитии в воде цианобактерий, а затем и с исследованиями летального эффекта вторичных метаболитов цианобактерий на организм человека и наземных животных [4]. В связи с этим, основные современные направления исследований цианотоксинов сконцентрированы на мониторинге уровней их содержания в водоемах, проведении токсикологических экспериментов на животных, разработке методов их детекции [3]. Однако подобные исследования лишь отвечают на вопрос: «Как? Каким образом цианотоксины воздействуют на организм человека и животных?». Меньше внимания уделяется фундаментальным проблемам, в частности, вопросу: «Зачем цианобактерии синтезируют токсины?». До сих пор не известны и не понятны их внутри- и внеклеточные функции.

Безусловно, возникновение способности у цианобактерий продуцировать соединения, называемые токсинами из-за их негативного влияния на наземных животных и человека, эволюционно не связано с давлением отбора со стороны последних. Долгое время популярной была гипотеза о роли водных планктонных животных как «пускового фактора», определившего появление у цианобактерий способности синтезировать токсины. Несъедобность многих цианобактерий для зоопланктона традиционно объясняется их токсичностью, поэтому экологическая роль цианотоксинов

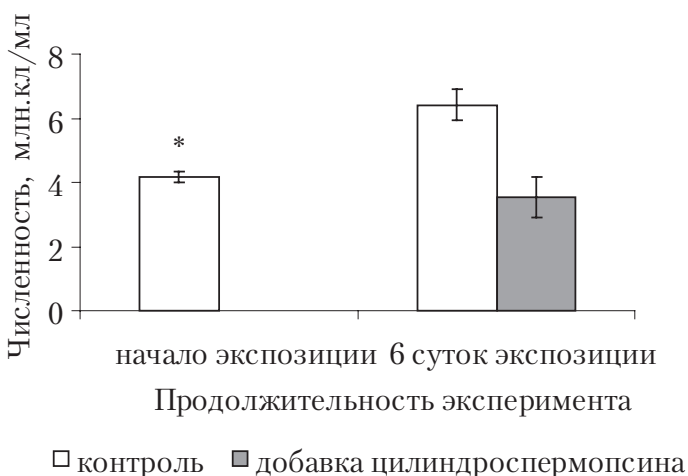
\*Адрес для корреспонденции: sidelev@mail.ru



**Рис. 1.** Изменение численности живых клеток зеленой водоросли *Scenedesmus acutus* при добавлении микроцистинов. Здесь и на рис. 2 и 3 представлены средние значения из повторностей  $\pm$  стандартная ошибка.



**Рис. 2.** Изменение численности живых клеток цианобактерии *Gloeocapsa* sp. при добавлении микроцистинов.



**Рис. 3.** Изменение численности живых клеток цианобактерии *Gloeocapsa* sp. при добавлении цилиндроспермопсина. \* — исходная средняя численность живых клеток цианобактерии *Gloeocapsa* sp. во всех повторностях перед началом эксперимента.

часто сводилась к их защитной функции против выедания цианобактерий планктонными животными [5]. Однако недавние филогенетические исследования биосинтеза наиболее распространенных цианотоксинов — микроцистинов — опровергли возможность подобных предположений, поскольку гены синтеза микроцистинов появились значительно раньше, чем все известные ракообразные и другие планктонные животные [6]. Исследования функций токсинов внутри клеток цианобактерий и их экологической роли немногочисленны, в нашей стране подобные работы не проводятся. Практически все зарубежные исследования в данной области сфокусированы на выявлении функций микроцистинов, представляющих собой гепатотоксические циклические пептиды [3]. Так, существует предположение, что у современных цианобактерий микроцистины являются побочными продуктами метаболизма, не принимающими участия в физиолого-биохимических процессах [7]. У древних предков цианобактерий микроцистины, по-видимому, выполняли важную, но неизвестную нам функцию, которая по непонятным причинам была утрачена или исчезла во многих группах современных цианобактерий. Многие исследователи полагают, что энергетические затраты клеток, идущие на биосинтез молекул микроцистина, не могут не компенсироваться их важными функциями у современных цианобактерий. В настоящее время большинство исследований проводятся в рамках проверки двух гипотез — сигнальной и аллелопатической [8, 9]. Известно, что цианобактерии — самые древние фотосинтезирующие организмы в биосфере [10]. Можно предположить, что изначально цианотоксины могли играть не защитную роль против выедания их животными, появившимися на планете значительно позже, а участвовать во взаимодействиях с другими прокариотическими, а затем и эукариотическими микроорганизмами. Согласно первой гипотезе микроцистины являются «сигнальными» молекулами, с помощью которых популяции токсигенных видов могут регулировать собственный рост в зависимости от конкретных экологических условий [9]. Вторая гипотеза является широко распространенной и общепринятой в современной экологии: роль токсических соединений растительного и микробного происхождения часто оценивают как «хи-

мический инструмент» подавления видов при конкурентных взаимоотношениях [11].

Исследования по выявлению функций других распространенных цианотоксинов фактически отсутствуют.

Цель данной работы — экспериментальная проверка возможной аллелопатической роли микроцистинов и цилиндроспермопсина в фитопланктоне на примере зеленой водоросли *Scenedesmus acutus* Meyen и цианобактерии *Gloeocapsa* sp.

## Материалы и методы исследования

В качестве тест-объектов были выбраны альгологически чистые культуры зеленой водоросли *Scenedesmus acutus* и цианобактерии *Gloeocapsa* sp., которые выращивали в среде Прата при температуре 22 °С и круглосуточном освещении с интенсивностью фотосинтетически активной радиации 30 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>·с, измеряемой квантометром Fieldscout («Spectrum Technologies», США). Эксперименты проводились в культуральных планшетах («Greiner bio-one», Германия) при условиях, описанных выше. В работе использовался метод добавок химически чистых форм цианотоксинов к культурам, что, в отличие от традиционного в практике исследования аллелопатии перекрестного культивирования, позволяет исключить влияние конкуренции между видами или действия других веществ неизвестной природы [2]. Конечная концентрация смеси разных изоформ микроцистинов в культуральной среде составила 1,5 мкг/мл, цилиндроспермопсина — 1 мкг/мл. Выбранные концентрации соответствовали наибольшему уровню содержания данных цианотоксинов в природных водоемах [3]. Варианты экспериментов (контроль и опыт) экспонировались в трех повторностях. Численность живых клеток *Scenedesmus acutus* и *Gloeocapsa* sp. определяли в счетной камере Нажотта с использованием флуоресцентного микроскопа Axioscop 40L («Carl Zeiss», Германия). Планы проведения экспериментов различались. В экспериментах с добавками микроцистинов подсчет живых клеток *Scenedesmus acutus* и *Gloeocapsa* sp. в контрольном и опытном вариантах проводили на 5 и на 20 сут после внесения цианотоксина. В эксперименте с добавками цилиндроспермопсина определяли начальную численность живых клеток *Gloeocapsa* sp. и её изменение на 6 сут после добавления токсина. Статистический анализ

**Ключевые слова:** микроцистин, цилиндроспермопсин, эксперимент, аллелопатическая гипотеза

результатов экспериментов включал расчет средних значений и стандартных ошибок из повторностей. Для обнаружения статистически значимых различий средних значений численностей тестируемых водорослей в контроле и опыте применялся ранговый U-критерий Манна-Уитни. В качестве критического уровня значимости принято значение  $p = 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

Зеленая хлорококковая водоросль *Scenedesmus acutus* оказалась устойчивой к воздействию микроцистинов на протяжении всего эксперимента, длившегося 20 сут (рис. 1). Различия средних значений численности клеток в опытных вариантах эксперимента относительно контроля были статистически незначимы (критерий Манна-Уитни,  $p > 0,05$ ).

Другой тест-объект — цианобактерия *Gloeocapsa* sp. — оказался более чувствительным к внесению микроцистинов (рис. 2). Рост цианобактерии *Gloeocapsa* sp. был подавлен в присутствии данного цианотоксина, статистически значимый эффект был обнаружен на 20 сут экспозиции (критерий Манна-Уитни,  $p = 0,024$ ) (рис. 2). Рост *Gloeocapsa* sp. был ингибирован и добавлением к культуре другого цианотоксина — цилиндроспермопсина (рис. 3). Средняя численность живых клеток в опытных вариантах через 6 сут экспозиции была достоверно ниже таковой в контроле (критерий Манна-Уитни,  $p = 0,02$ ) (рис. 3). Флуоресцентная микроскопия показала наличие фотосинтетически активных клеток *Gloeocapsa* sp. вплоть до окончания обоих экспериментов, что свидетельствовало об отсутствии быстрого летального эффекта для части клеток.

Результаты проведенных экспериментов показали, что прямой аллелопатический эффект микроцистинов в лабораторных условиях оказался видоспецифичным. Подобная закономерность отмечена и другими исследователями, в условиях лабораторных экспериментов разные виды водорослей реагировали на внесение микроцистинов неодинаково — эффект действия варьировал от отсутствия ингибирования до подавления или даже стимулирования роста [8]. Анализ литературных данных свидетельствует о значительной устойчивости зеленых хлорококковых водорослей к действию

микроцистинов [8], что хорошо согласуется с результатами настоящего исследования. В частности, в работе [12] показано отсутствие ингибирования роста хлорококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. sensu Chod., *Pediastrum duplex* Meyen, *Chlorella kesslerii* Fott et Novak. при добавках микроцистинов в количестве до 5 мкг/мл. Виды рода *Scenedesmus* при лабораторном культивировании (*S. quadricauda*, *S. armatus* Chod.) в большинстве случаев не испытывали угнетения роста даже в присутствии очень высоких концентраций микроцистинов [13, 14].

Подобная видоспецифичность эффекта действия микроцистинов, отражающая толерантность некоторых видов водорослей к их присутствию в среде при высоких концентрациях и длительном периоде экспонирования (до 2 недель) трактуется рядом исследователей как доказательство отсутствия аллелопатической роли микроцистинов в природном фитопланктоне [12]. Трудности однозначной интерпретации результатов лабораторных экспериментов, демонстрирующих отсутствие аллелопатического эффекта цианотоксинов, связаны, по крайней мере, с 2 аспектами. Во-первых, аллелопатический эффект зависит от внешних условий — при наличии лимитирующих факторов даже относительно толерантные организмы оказываются чувствительными к действию токсинов [2, 4]. Однако, в известной автору литературе не удалось найти сведений о влиянии чистых форм цианотоксинов в условиях, приближающихся к природным. При лабораторном же культивировании тест-объект находится в оптимальной для роста синтетической среде, чем и может объясняться часто наблюдаемое отсутствие ингибирующего влияния микроцистинов на рост микроводорослей. Кроме того, при неизменных скоростях роста многие исследователи фиксировали морфологические и физиолого-биохимические изменения в клетках зеленых водорослей в ответ на добавки микроцистинов [13, 14]. Это указывает на то, что изменение численности микроводорослей является менее чувствительным показателем в условиях нелимитированной среды и не всегда может отражать состояние тест-объекта.

Во-вторых, часто аллелопатию рассматривают как односторонний процесс подавления одного растительного организма другим за счет выделения метаболитов. С эволюционной точки зрения это взаимно

адаптивный процесс или коэволюция, у организмов-реципиентов неминуемо должны возникать защитные механизмы, компенсирующие ингибирующее действие токсинов. Это, в свою очередь, может стимулировать появление через механизмы естественного отбора химически разнообразных форм токсинов у организмов-доноров [2, 4, 11]. Полученные нами экспериментальные результаты можно интерпретировать подобным образом. В частности, отсутствие эффекта действия микроцистинов на рост *Scenedesmus acutus* указывает на наличие более эффективных механизмов детоксикации данного цианотоксина. Известно, что зеленые хлорококковые водоросли экологически сопряжены со многими микроцистин-продуцирующими цианобактериями; имея сходные местообитания, представители порядка Chlorococcales конкурируют с цианобактериями в высокоэвтрофных водоемах [15]. Сходство местообитаний может объяснять большую устойчивость именно этой группы водорослей в проведенных нами и другими исследователями экспериментах, что может отражать длительный процесс взаимной адаптации при аллелопатическом взаимодействии. Как известно, возникновение относительной толерантности у организмов-реципиентов к действию аллелопатического агента снижает конкурентные преимущества организма-донора, однако, в естественных условиях в фитопланктоне одновременно могут присутствовать десятки видов, часть из которых остается чувствительной. Поэтому при наступлении благоприятных условий для их роста развитие этих видов будет сдерживаться влиянием соответствующего метаболита [2].

Исходя из выше изложенного, попытки некоторых исследователей интерпретировать отсутствие отклика со стороны разных видов водорослей на внесение микроцистинов в оптимальных для роста искусственных условиях, как основание для опровержения аллелопатической гипотезы, по крайней мере, преждевременны.

Напротив, во многих лабораторных экспериментах выявлена аллелопатическая активность микроцистинов по отношению к цианобактериям [8], что подтверждается и настоящим исследованием. Это может указывать на наличие менее эффективных механизмов детоксикации микроцистинов у цианобактерий, для ингибирования роста которых в процессе конкурентных отношений, возможно, изначально продуцирова-



лись данные токсины. Кроме того, впервые продемонстрировано ингибирующее влияние на рост цианобактерии *Gloeocapsa* sp. мало изученного с точки зрения функций цианотоксина цилиндроспермопсина. Это первое сообщение о возможной аллелопатической роли этого токсина. Однако для более корректной проверки аллелопатической роли данных цианотоксинов необходима постановка полевых экспериментов, наиболее приближенных к естественным условиям.

Выявленное отсутствие быстрой гибели клеток *Gloeocapsa* sp. при действии микроцистинов и цилиндроспермопсина не согласуется с данными о быстром летальном эффекте, обнаруженном на многоклеточных животных [3]. Определенная часть клеток до конца экспериментов оставалась жизнеспособной, фотосинтетически активной. Это свидетельствует о разной резистентности клеток в культуре, а также о существовании различных механизмов токсического воздействия микроцистинов и цилиндроспермопсина на микроводоросли по сравнению с животными организмами. Так, известно, что микроцистины ингибируют активность серин/треонин-протеинфосфатаз 1 и 2А у животных и человека [2, 3]. Эффект действия на *Gloeocapsa* sp. частично мог быть связан с угнетением процесса деления клеток, что приводило к подавлению роста численности, но не вызывало быстрой гибели всех клеток.

## Заключение

**В** условиях лабораторного эксперимента показана возможная аллелопатическая роль микроцистинов и цилиндроспермопсина в фитопланктоне на примере нетоксигенной цианобактерии *Gloeocapsa* sp. Аллелопатическая активность цианотоксинов частично могла быть связана с ингибированием процесса деления клеток, что приводило к подавлению роста численности, но не вызывало быстрого лизиса всех клеток. Другой тест-объект — зеленая хлорококковая водоросль *Scenedesmus acutus* оказался устойчивым к влиянию микроцистинов, что указывает на наличие эффективных механизмов детоксикации данного токсина. Последнее можно интерпретировать как следствие длительного процесса взаимной адаптации в процессе аллелопатического взаимодействия зеленых хлорококковых

водорослей и токсигенных цианобактерий, встречающихся в сходных местообитаниях. Показана невозможность однозначной интерпретации результатов лабораторных экспериментов, демонстрирующих отсутствие аллелопатического эффекта цианотоксинов. Более корректным подходом для изучения аллелопатии в фитопланктоне является постановка полевых экспериментов с природным планктоальгоценозом.

Исследование поддержано грантом РФФИ, № проекта 12-04-31280 мол\_а, грантом Президента МК-1284.2013.5 и проектом Минобрнауки РФ 4.4532.2011.

## Литература

1. Краткий словарь терминов по водной токсикологии / Сост. Н.С. Строганов. Ярославль: ЯрГУ, 1982. 43 с.
2. Leflaive J. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins / J. Leflaive, L. Ten-Hage // *Freshwater Biol.* 2007. V. 52. P. 199-214.
3. Chorus I. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management / I. Chorus, J. Bartram. London: E&FN Spon, 1999. 416 p.
4. Berry J.P. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides / J.P. Berry, M. Gantar, M.H. Perez, G. Berry, F.G. Noriega // *Mar. Drugs.* 2008. №6. P. 117-146.
5. DeMott W.R. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia* / W.R. DeMott, Q-X. Zhang, W.W. Carmichael // *Limnol. Oceanogr.* 1991. V. 36. P. 1346-1357.
6. Rantala A. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis / A. Rantala, D.P. Fewer, M. Hisbergues, L. Rouhiainen, J. Vaitomaa, T. Borner, K. Sivonen // *PNAS.* 2004. V. 101. №2. P. 568-573.
7. Carmichael W.W. The toxins of cyanobacteria // *Sci. Am.* 1994. V. 270. P. 64 -70.
8. Babica P. Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms / P. Babica, L. Blaha, B. Marsalek // *J. Phycol.* 2006. V. 42. P. 9-20.
9. Kaplan A. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins) / A. Kaplan, M. Harel, R.N. Kaplan-Levy, O. Hadas, A. Sukenik, E. Dittmann // *Frontiers in Microbiology.* 2012. V. 3. P. 1-11.

10. Schopf J.W. Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence / J.W. Schopf, M.R. Walter // The biology of cyanobacteria. Ed. N.G. Carr, B.A. Whitton. Oxford, Blackwell. 1982. P. 543-564.
11. Райс Э. Аллелопатия. М.: Мир, 1978. 392 с.
12. Babica P. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs / P. Babica, K. Hilscherova, K. Bartova, L. Blaha, B. Marsalek // Phycologia. 2007. V. 46. P. 137-142.
13. Pietsch C. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors / C. Pietsch, C. Wiegand, M.V. Ame, A. Nicklisch, D. Wunderlin, S. Pflugmacher // Environ. Toxicol. 2001. V. 16. P. 535-542.
14. Mohamed Z.A. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem // Ecotoxicology. 2008. V. 17. P. 504-516.
15. Happy-Wood C.M. Ecology of freshwater planktonic green algae // Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton / Ed. C.D. Sandgren. New York, Cambridge University Press. 1988. P. 103-133.

S.I. Sidelev

## INFLUENCE OF CYANOBACTERIAL TOXINS ON GROWTH of *Scenedesmu sacutus* and *Gloeocapsa SP.* UNDER LABORATORY CONDITIONS

Laboratory experiments for evaluation of allelopathic impact of cyanotoxins on microalgae using toxin addition were carried out in national science for the first time. Although influences of microcystins and cylindrospermopsin were found to be species-specific obtained data show that allelochemical effect may be possible. Necessity of field experimentation for more correct study of allelopathic activity of cyanotoxins was demonstrated.

**Key words:** microcystin, cylindrospermopsin, experiment, allelopathic hypothesis