

УДК 582.232 + 543.42.061

ОБНАРУЖЕНИЕ ТОКСИНОВ ЦИАНОПРОКАРИОТ В ПЛАНКТОНЕ НИЖНЕГО ДОНА МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2006 г. академик Г.Г. Матишов^{1,2}, член-корреспондент РАН Д.Г. Матишов^{1,2}, Т.В. Фунштейн², М.И. Руднев¹, В.Г. Соьер¹, Д.В. Зимаков¹

В пробах планктона из нижнего течения р. Дон впервые идентифицированы токсины цианопрокариот микроцистин-RR и анатоксин-а. Определение токсинов проведено методом тандемной масс-спектрометрии с применением МСⁿ-спектрометра "Thermo Finnigan LCQ Deca XP MAX" с ионизацией электроспреем при положительной полярности. Изложены методики отбора альгологических проб и последующей обработки материала. Обоснована возможность и необходимость мониторинга токсинов цианопрокариот в природных водах равнинной части Северного Кавказа.

В последние десятилетия во внутренних водоемах многих стран участились случаи вредоносных цветений микроводорослей, вызывающих гибель водных организмов, заболевания сельскохозяйственных животных и людей. Установлено, что причиной ущерба служили токсины цианопрокариот (Cyanophyta) [1–3].

Токсины цианопрокариот были обнаружены не только при массовом развитии вредоносных видов, но и при невысокой плотности их популяции. В ряде работ данный эффект объяснен свойствами вегетирующего штамма [4–6]. В то же время отмечено, что не все штаммы токсичных видов вредоносны, а количество продуцируемых ими токсинов зависит от множества факторов: трофности водоема, физиологического состояния популяции цианопрокариот, сезона.

По рекомендациям Всемирной организации здравоохранения [7], содержание токсинов цианопрокариот, в том числе микроцистина-RR и анатоксина-а, в питьевой воде и рекреационных водоемах не должно достигать концентраций, угрожающих здоровью и жизни человека, и поэтому подлежит мониторингу. Установлено [7], что даже низкие концентрации гепатотоксичных микроцистинов могут быть причиной рака печени.

В Российской Федерации контроль токсинов законодательно не предусмотрен, поэтому исследование цианопрокариот с целью определения их токсичности проводится только в научных целях

на водоемах Северо-Запада России [8–10]. Тот факт, что вредоносные "цветения воды" наблюдали в регионе, расположенном на краю ареала теплолюбивых таксонов, указывает на актуальность проблемы в России в целом. Для Ростовской области проблема еще более важна, поскольку цианопрокариоты являются естественным компонентом экосистемы равнинных водоемов [11, 12], группой, доминирующей на протяжении всего летнего сезона. Их появление не связано напрямую с антропогенной эвтрофикацией.

В 2005 г. в Южном научном центре РАН начаты исследования токсичности планктона, обусловленной цианопрокариотами. В протоке Свиное Гирло на территории биостанции Южного научного центра РАН в пос. Кагальник Азовского района Ростовской области 16 октября 2005 г. была отобрана батометрическая проба и произведен лов планктона сетью Апштейна. Отбор выполнили при сильном северо-западном ветре во время дождя, при температуре воды в реке +8 °С. Вода имела оливково-бурую окраску, обусловленную сезонной вспышкой развития динофлагеллаты *Peridiniopsis penardi* (Lemmermann) Bourrelly.

Подсчет клеток в световом микроскопе в камере Ножжотта под увеличением 200 × показал, что плотность популяции этого вида достигала 8,4 млн кл./л. Сопутствующими видами были *Isoselmis simplex* Butcher и *Plagioselmis punctata* Butcher (Cryptophyta), численность которых составляла 3,8 и 4,2 млн кл./л соответственно. Обильны были также *Pyramimonas semiglobosa* Pascher (Prasinophyta), *Monoraphium contortum* (Korschikoff) Hindák (Chlorophyta), *Cryptomonas*

¹ Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону.

² Азовский филиал Мурманского морского биологического института Кольского научного центра Российской академии наук, Ростов-на-Дону.

erosa Ehrenberg, emend. von Stein (Cryptophyta). Цианопрокариоты в сообществе не были обнаружены. Однако это не означает отсутствия представителей отдела в водоеме. Сетной планктон на 100% был сформирован двумя видами цианопрокариот. Преобладал *Microcystis flos-aquae* (Wittrock in Wittrock & Nordstedt) Kirchner, численность которого достигала 88 млн кл/л. *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs ex Borne et Flahault был относительно редок: 3–4 тыс. трихомов в литре при средней длине трихома 250 мкм. Оба вида для региональной флоры обычны, максимум их развития в р. Дон и Таганрогском заливе приходится на конец лета и начало осени.

Вторая проба представляла собой высохшую бирюзово-зеленую пленку цианопрокариот на солоmine *Phragmites communis* L. Материал был собран на левом берегу р. Дон на перекате Донецкий, в 4 км выше пос. Колузаево. Планктон осел на побегах тростника в результате ветрового сгона за четыре дня до отбора материала. Для определения видов и химического анализа с фрагмента соломины длиной 5 см был взят соскоб пленки планктона. Воздушно-сухая масса материала составляла 11,8 мг. Материал был рассмотрен в световом микроскопе в водных препаратах под увеличением 400 ×. В пробе присутствовали деформированные клетки *Microcystis* sp. Колонии и трихомы цианопрокариот были разрушены, идентификация видов не представлялась возможной.

Фильтрация клеток и экстрагирование токсинов цианопрокариот проведены на основе методики, обеспечивающей степень извлечения микроцистина более 99% и минимальный уровень обнаружения микроцистина 0,01 мкг/л [13].

Пробу цианопрокариот, отобранную сетью в протоке Свиное Гирло, объемом 100 мл фильтровали через стекловолоконный фильтр GMF 5 удельной плотностью 75 г/м² и диаметром 47 мм. Полученный на фильтре прерывистый слой клеток микроводорослей замораживали при –18 °С в течение суток. Для извлечения токсинов из клеток фильтр пятикратно перемораживали по схеме (20 мин при –18 °С ↔ 10 мин при +20 °С), затем помещали в 5 мл метанола. Экстракт, полученный из слоя клеток после обработки ультразвуком в бане с ледяной водой в течение 60 мин, упаривали при температуре +20 °С в токе аргона насухо. Остаток растворяли в 0,40 мл метанола с добавкой 0,1% трифторуксусной кислоты и центрифугировали при 4000 оборотах в минуту (≈ 3000 g) в течение 6 мин с последующим переносом супернатанта в хроматографическую вialу.

Токсины цианопрокариот определяли методом tandemной масс-спектрометрии с применением MSⁿ-спектрометра “Thermo Finnigan LCQ Deca XP MAX” с ионизацией электроспреем при положительной полярности*. Применен прямой ввод экстракта пробы со скоростью 5 мкл/мин. Напряжение на конусе оптимизировали для каждого соединения. Спектры MS/MS и MS/MS/MS получали с применением ионной ловушки и нормализованной энергии столкновений, обеспечивающей воспроизводимость результатов для различных приборов. Во время каждого MSⁿ-эксперимента величины заряда ионов определяли с использованием функции ZoomScan.

Согласно методикам идентификации токсинов [14–16], в которых использовали эталонные образцы токсинов цианопрокариот, для анатоксина-а идентификационным признаком является молекулярный монопротонированный катион [M + H]⁺ с m/z 166,2; для микроцистина-RR в качестве идентификационного признака** выбран двухзарядный молекулярный катион [M + 2H]²⁺ с m/z 520. При отнесении масс-спектров исключены ионы ассоциатов метанола с добавкой 0,1%-ной трифторуксусной кислоты.

В результате исследования двух проб по выбранным идентификационным признакам микроцистина-RR и анатоксина-а установлено: проба цианопрокариот, полученная с тростниковой соломины, содержит анатоксин-а в концентрации не менее 1,67 мкг/г сухой массы пленки (рис. 1А); проба цианопрокариот, отобранная сетью в протоке Свиное Гирло, содержит микроцистин-RR и анатоксин-а в количестве не менее 2,2 · 10⁻² пкг на клетку (рис. 1Б) и 5 · 10⁻² пкг на трихом соответственно***. Определение точного количества токсинов в каждой пробе микроводорослей требует применения стандартов токсинов, отсутствующих в начале исследований, поэтому строгий количественный анализ содержания токсинов в пробах не проводили. Однако микроцистин-RR, обнаруженный в сетной пробе, имеет концентра-

* Использованы термины, рекомендованные Всероссийским масс-спектрометрическим обществом [17].

** Среди наиболее распространенных циклолигопептидных токсинов цианопрокариот (нодуларин, микроцистины –LR, –YR и –RR) только микроцистин-RR содержит два остатка аргинина с легко протонируемыми фрагментами гуанидина, что для молекулярных ионов токсинов обуславливает заряд (z = 2 для микроцистина-RR и z = 1 для остальных циклолигопептидов).

*** Схемы ионизации молекул каждого соединения, полученные при использовании возможностей tandemного MSⁿ масс-спектрометра, согласуются с молекулярными структурами микроцистина-RR и анатоксина-а, подтверждая обнаружение токсинов в пробах.

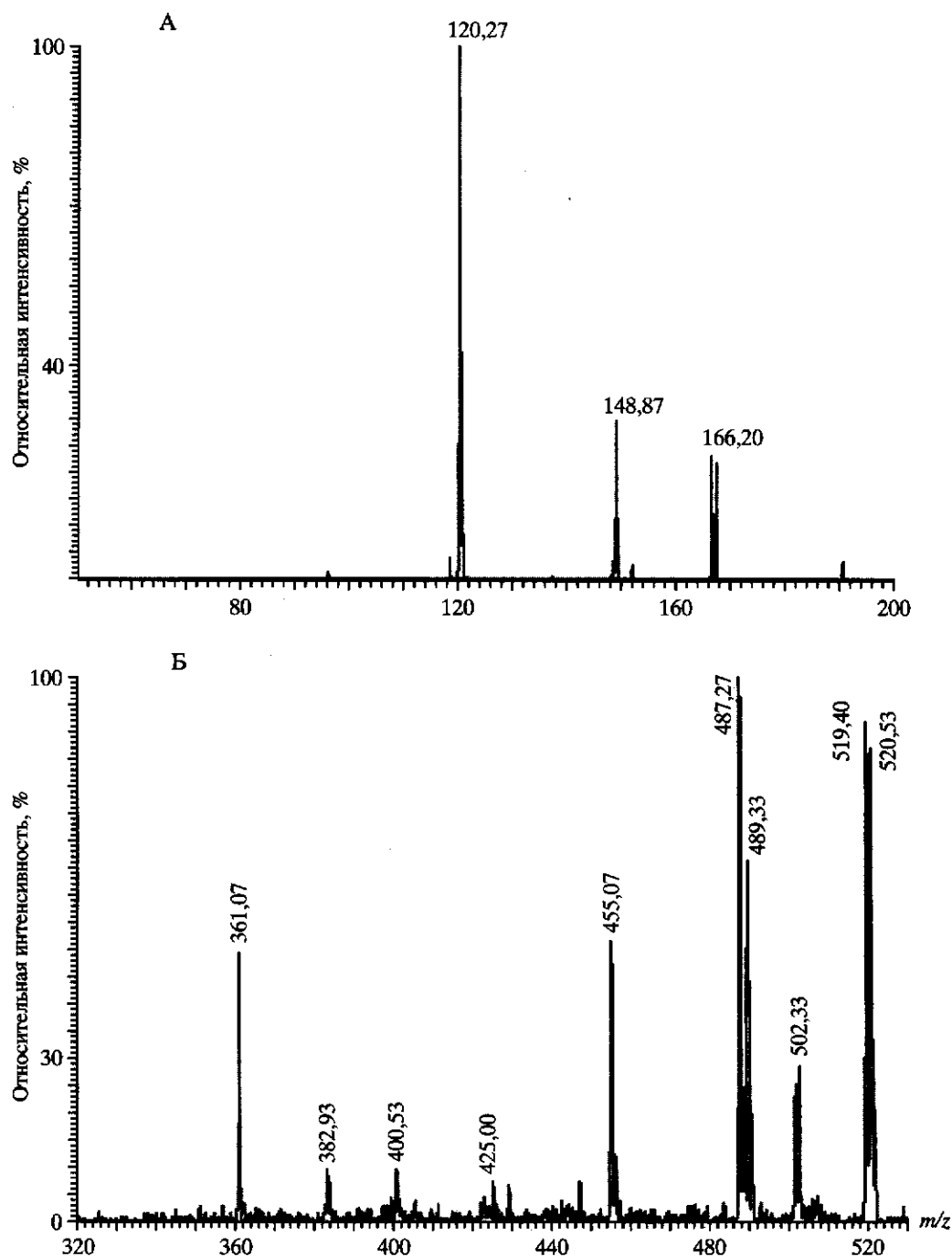


Рис. 1. Масс-спектр анатоксина-а (А) и микроцистина-RR (Б), полученные методом ВЭЖХ/МС в режиме электроспрея для положительных ионов с $m/z = 166$ (А) при напряжении 30 В и $m/z = 520$ (Б) при напряжении 35 В соответственно.

цию порядка $\geq 10^{-2}$ пкг на одну клетку, что практически совпадает с концентрацией 0,2 пкг/кл. для родственного микроцистина-LR. Для рекреационных вод такая концентрация признана опасной для здоровья [7].

Таким образом, использованное при проведении работ аналитическое оборудование и методики подготовки проб позволяют обнаруживать

и идентифицировать токсины, продуцируемые цианобактериями. В водах Нижнего Дона в период спада активности микроводорослей идентифицированы анатоксин-а и микроцистин-RR ориентировочно в опасной для здоровья концентрации (на уровне более 0,01 мкг/л). Эта концентрация обычна для районов, где наблюдаются токсические "цветения воды". В природных условиях

воздушно-сухая пленка отмерших цианопрокариот сохраняет анатоксин-а в течение нескольких суток. Высокая токсичность этих веществ, тривиальность продуцирующих их водорослей и спорадический характер проявления токсических свойств свидетельствуют о целесообразности организации систематического мониторинга активности вредоносных водорослей в водных объектах равнинной части Северного Кавказа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Codd G.A. Cyanobacterial blooms and toxins in fresh-brackish and marine waters // Harmful Algae. Proc. VIII Int. Conf. Harmful Algae / Reguera B., Blanco J., Fernández M.L., Wyatt T. (Eds). Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission, 1998. P. 13–17.
2. Komárek J., Azevodo S.M.O., Domingos P., Komárková J., Tich M. Background of the Caryaru tragedy: a case taxonomic study of toxic cyanobacteria // Arch. Hydrobiol. Suppl. 2001. V. 140. P. 9–29.
3. Skulberg O.M., Carmichael W.W., Codd G.A., Skulberg R. Taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria) // Algal toxins in seafood and drinking water / Falconer I.R. (Ed). London: Academic Press, 1993. P. 145–164.
4. Underdal B., Nordstoga K., Skulberg O.M. Protracted toxic effects caused by saline extracts of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae: Cyanobacteria) // Aquatic Toxicology. 1999. V. 46. P. 269–278.
5. Vasconcelos V.M., Pereira E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal) // Wat. Res. 2001. V. 35. N 5. P. 1354–1357.
6. Will'en T., Mattsson R. Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981–1995 // Hydrobiologia. 1997. V. 353. P. 181–192.
7. Falconer I., Bartram J., Chorus I., Kuiper-Goodman T., Utkilen H., Burch M., Codd G.A. Safe levels and safe practices // Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences. World Health Organization Report / Chorus I., Bartram J. (Eds). E & FN Spon: London, N.Y., 1999. P. 155–177.
8. Громов Б.В., Мамкаева К.А., Волошко Л.Н. К изучению токсичных “цветений” в озерах Северо-Запада России // Эколого-физиологические исследования водорослей и их значение для оценки состояния природных вод. Ярославль: ЯГТУ, 1996. С. 22.
9. Gromov B.V., Mamkaeva K.A., Voloshko L.N. A survey of toxicity of cyanobacterial blooms in Lake Ladoga and adjacent water bodies // Hydrobiologia. 1996. V. 322. P. 149–151.
10. Gromov B.V., Titova N.N., Voloshko L.N. Toxic cyanobacterial water blooms in Lake Ladoga (North-West Russia) // Second Balkan Botanical congress: Abstracts. Istanbul, 2000. P. 79.
11. Аксенова Е.И. Наблюдения за “цветением”, вызываемым синезелеными водорослями в водоемах Нижнего Дона // Экология и физиология синезеленых водорослей. М.; Л.: Наука, 1965. С. 114–125.
12. Матишов Г.Г., Фуштей Т.В. К проблеме вредоносных “цветений воды” в Азовском море // Исследовано в России. <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/022.pdf>.
13. Lawton L.A., Edwards Ch., Codd G.A. Extraction and high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated water // Analyst. 1994. V. 119. P. 1525–1530.
14. Oehrle S.A., Westrick J. Analysis of various cyanobacterial Toxins by LC-MS // LCGC North America. 2003. V. 21. N 7. P. 634–640.
15. Rao R., Lu L., Powell M.W. Determination of anatoxin-a in drinking water samples by LC/MS // Thermo Quest LC/MS Application Report AN 506, 1999. 4 pp.
16. Rao R., Powell M.W. Analysis of environmental toxins in drinking water by LC/MS // Thermo Quest LC/MS Application Report AN 505, 1999. 4 pp.
17. Список принятых сокращений, русских и английских терминов // Масс-спектрометрия. 2004. Т. 1. № 1. С. 77–78.

ON THE IDENTIFICATION OF CYANOPROKARYOTE TOXINES IN THE LOWER DON RIVER PHYTOPLANKTON WITH THE HELP OF THE MASS-SPECTROMETRY METHOD

Academician of RAS G.G. Matishov, Corresponding Member of RAS D.G. Matishov, T.V. Fushtey, M.I. Rudnev, V.G. Soyev, D.V. Zymakov

Microcystine-RR and anatoxine-a, cyanobacterial toxins being common in fresh and brackish waters, were identified in lower Don river plankton. The electrosprey tandem mass-spectrometry method was used in this investigation. Sampling methods and the method of analysis are discussed. The perspectives of toxic cyanobacteria monitoring are shown for water bodies of Northern Caucasus lowlands.

REFERENCES

1. Codd G.A. 1998. Cyanobacterial blooms and toxins in fresh- brackish and marine waters. *Harmful Algae. Proc. VIII Int. Conf. Harmful Algae.* (Eds B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt). Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission. P. 13–17.
2. Komárek J., Azevedo S.M.O., Domingos P., Komárková J., Tich M. 2001. Background of the Caryaru tragedy: a case taxonomic study of toxic cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 140: 9–29.
3. Skulberg O.M., Carmichael W.W., Codd G.A., Skulberg R. 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria). *Algal toxins in seafood and drinking water.* (Ed. I.R. Falconer). London, Academic Press: 145–164.
4. Underdal B., Nordstoga K., Skulberg O.M. 1999. Protracted toxic effects caused by saline extracts of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae: Cyanobacteria). *Aquatic Toxicology.* 46: 269–278.
5. Vasconcelos V. M., Pereira E. 2001. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Wat. Res.* 35(5): 1354–1357.
6. Willén T., Mattsson R. 1997. Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981–1995. *Hydrobiologia.* 353: 181–192.
7. Falconer I., Bartram J., Chorus I., Kuiper-Goodman T., Utkilen H., Burch M., Codd G.A. 1999. Safe levels and safe practices. *Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences. World Health Organization Report.* (Eds I. Chorus, J. Bartram). London; N.-Y., E & FN Spon: 155–177.
8. Gromov B.V., Mamkaeva K.A., Voloshko L.N. 1996. [To study the toxic “blooms” in the lakes of the North-West Russia]. In: *Ekologo-fiziologicheskie issledovaniya vodorosley i ikh znachenie dlya otsenki sostoyaniya prirodnykh vod.* [Ecological and physiological studies of algae and their importance for the assessment of natural waters]. Yaroslavl, Yaroslavl State Technical University: 22. (In Russian).
9. Gromov B.V., Mamkaeva K.A., Voloshko L.N. 1996. A survey of toxicity of cyanobacterial blooms in Lake Ladoga and adjacent water bodies. *Hydrobiologia.* 322: 149–151.
10. Gromov B.V., Titova N.N., Voloshko L.N. 2000. Toxic cyanobacterial water blooms in Lake Ladoga (North-West Russia). *Second Balkan Botanical congress: Abstracts.* Istanbul: 79.
11. Aksenova E.I. 1965. [Observations of “blooming” caused by Cyanobacteria in the reservoirs of the Lower Don]. In: *Ekologiya i fiziologiya sinezelenykh vodorosley.* [Ecology and physiology of the Cyanobacteria]. Moscow; Leningrad, Nauka Publ.: 114–125. (In Russian).
12. Matishov G.G., Fushtey T.V. 2003. [On the problem of malicious “algal blooms” in the Sea of Azov]. *Issledovano v Rossii.* URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/022.pdf>. (In Russian).
13. Lawton L.A., Edwards Ch., Codd G.A. 1994. Extraction and high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated water. *Analyst.* 119: 1525–1530.
14. Oehrle S.A., Westrick J. 2003. Analysis of various cyanobacterial Toxins by LC-MS. *LCGC North America.* 21(7): 634–640.
15. Rao R., Lu L., Powell. M.W. 1999. Determination of anatoxin-a in drinking water samples by LC/MS. *Thermo Quest LC/MS Application Report AN 506*, 4 pp.
16. Rao R., Powell M.W. 1999. Analysis of environmental toxins in drinking water by LC/MS. *Thermo Quest LC/MS Application Report AN 505*, 4 pp.
17. [List of abbreviations, Russian and English terms]. 2004. *Mass-spektrometriya.* 1(1): 77–78.