

УДК 582.272:632.4.01/.08:57.022:543.9

ТОКСИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МИКРОМИЦЕТОВ В БУРЫХ ВОДОРОСЛЯХ СЕМЕЙСТВ FUCACEAE И LAMINARIACEAE ИЗ БЕЛОГО МОРЯ

© 2021 г. А. А. Буркин¹, Г. П. Кононенко^{1,*}, А. А. Георгиев², М. Л. Георгиева^{2,3}

¹Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко, Москва 123022, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва 119234, Россия

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва 119021, Россия

*e-mail: kononenkogp@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 05.02.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

В бурых водорослях *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* и *Saccharina latissima* из Кандалакшского залива Белого моря с помощью иммуноферментного анализа проведен поиск низкомолекулярных метаболитов, известных как микотоксины микромицетов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др. В талломах *A. nodosum*, и *F. vesiculosus* выявлены Т-2 токсин, диацетоксисцирпенол, дезоксиниваленол, зеараленон, фумонизины группы В, альтернариол, охратоксин А, цитринин, PR-токсин, микофеноловая кислота, афлатоксин В₁, стеригматоцистин, циклопиазоновая кислота, эмодин, роридин А и эргоалкалоиды. Показано, что в *F. vesiculosus* присутствуют почти все перечисленные токсины в значительном количестве. *P. canaliculata* уступает *A. nodosum* по содержанию PR-токсина, микофеноловой кислоты, эмодина и роридина А, содержание остальных веществ существенно не различается. У *L. digitata* и *S. latissima* анализируемые микотоксины не обнаружены, за исключением следовых количеств эргоалкалоидов.

Ключевые слова: макроводоросли, *Fucus*, *Ascophyllum*, *Pelvetia*, *Laminaria*, *Saccharina*, микотоксины, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S0134347521010022

Грибы способны продуцировать многообразие вторичных метаболитов, представляющих собой вещества с низкой молекулярной массой, среди которых особый интерес представляет группа микотоксинов. Природная роль этих веществ, распространение, факторы и условия окружающей среды, влияющие на их синтез, — активно развивающаяся область исследований. Значительный прогресс в изучении ассоциативных связей микромицетов с другими организмами во многом достигнут благодаря уникальным возможностям скринингового анализа вторичных метаболитов. В лишайниках и травянистых растениях с помощью унифицированного подхода на основе иммуноферментного анализа (ИФА) обнаружены микотоксины, свойственные грибам из родов *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees, *Penicillium* Link, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller и др., и выявлен так называемый метаболический профиль — соотношение их качественного состава и количественного содержания (Буркин, Кононенко, 2013; Кононен-

ко, Буркин, 2019). Грибы данной таксономической принадлежности, обычные для морских биотопов (Höller et al., 2000; Park et al., 2014; Киричук, Пивкин, 2015; Raghukumar, 2017), обладают способностью к биосинтезу разных структурных типов токсичных веществ, в том числе биосинтетических предшественников и аналогов известных микотоксинов (Jiang et al., 2002; Nicoletti, Trincone, 2016; Zhang et al., 2016). Отечественные исследователи подтвердили присутствие потенциально токсигенных видов *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus* в микобиоте массовых видов бурых водорослей семейств Fucaceae и Laminariaceae из прибрежной зоны Белого моря (Бубнова, Киреев, 2009; Коновалова, Бубнова, 2011), однако поиск микотоксинов в этих макрофитах не проводился. Цель настоящей работы — изучение встречаемости токсичных метаболитов, синтезируемых микромицетами родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др., в бурых водорослях из семейств Fucaceae и Laminariaceae.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования были бурые водоросли *Fucus vesiculosus* Linnaeus, *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis и *Pelvetia canaliculata* (Linnaeus) Decaisne & Thuret (семейство Fucaceae), а также *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux и *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders (семейство Laminariaceae). Талломы водорослей отбирали 8–9 мая 2019 г. в Кандалакшском заливе Белого моря на северном берегу о-ва Кривой (66°30' N, 33°08' E) в типичных местообитаниях данных видов. *A. nodosum* (6 талломов) и *F. vesiculosus* (9 талломов) отбирали в средней и нижней литорали, *P. canaliculata* (5 талломов) – в верхней зоне литорали и супралиторали. В сублиторали отбирали *L. digitata* (5 талломов) и *S. latissima* (5 талломов), у которых отделяли стволик (многолетнюю часть) и три фрагмента пластины: основание (зону роста), середину и дистальную часть. У трех талломов *S. latissima* дистальную часть прошлогодней и сильно обросшей пластины делили на старый и отмирающий фрагменты.

В течение 1–2 ч после сбора образцы водорослей сушили в токе воздуха при температуре 60°C и транспортировали, сохраняя в суховоздушном состоянии; затем их измельчали в лабораторной мельнице. Для экстракции применяли смесь ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84 : 16 при расходе 10 мл на 1 г навески. Экстракты после 10-кратного разбавления буферным раствором использовали в непрямом конкурентном ИФА. Микотоксины – Т-2 токсин (Т-2), диацетоксисцирпенол (ДАС), дезоксиниваленол (ДОН), зеараленон (ЗЕН), фумонизины (ФУМ), альтернариол (АОЛ), охратоксин А (ОА), цитринин (ЦИТ), афлатоксин В₁ (АВ₁), стеригматоцистин (СТЕ), циклопиазоновую кислоту (ЦПК), микрофеноловую кислоту (МФК), PR-токсин (PR), эмодин (ЭМО), роридин А (РОА) и эргоалкалоиды (ЭА) анализировали с помощью аттестованных иммуноферментных тест-систем (Кононенко, Буркин, 2018, 2019). Нижний предел количественных измерений соответствовал 85% уровню связывания антител.

Данные обсчитывали в программе Microsoft Office Excel и представляли в виде среднего арифметического значения M и ошибки выборочной средней $\pm SEM$; для статистической обработки использовали непараметрический суммарный непарный критерий Вилкоксона в программе R version 3.4.3 (McDonald, 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В талломах двух видов семейства Laminariaceae *L. digitata* и *S. latissima* микотоксины не обнаружены, за исключением следовых количеств ЭА (от 2

до 8 нг/г), которые были найдены в зонах роста и в средних частях пластин. В то же время во всех трех видах семейства Fucaceae – *A. nodosum*, *P. canaliculata* и *F. vesiculosus* – присутствовал полный набор искомым метаболитов (табл. 1). По интенсивности накопления четко прослеживались ряды: для фузариотоксинов – ДАС > ДОН > ФУМ > ЗЕН > Т-2, для токсинов грибов *Aspergillus* и *Penicillium* – PR, МФК, ЦПК > ЦИТ, ОА, СТЕ > АВ₁. Отдельные виды водорослей не различались по содержанию Т-2, ЦИТ и СТЕ, а в отношении остальных метаболитов этой группы наблюдались признаки как сходства, так и различия. У *F. vesiculosus* содержание метаболитов было достоверно выше, чем у двух других видов семейства. *A. nodosum* отличался от *P. canaliculata* лишь более выраженным накоплением PR и МФК при сходстве или незначимых колебаниях содержания остальных компонентов. Содержание ЭМО и РОА у всех трех видов макрофитов существенно различалось. Сверхвысокие уровни накопления – более 10 тыс. нг/г – определены для ДАС (у всех трех видов), PR (у *A. nodosum* и *F. vesiculosus*) и ЭА (у *F. vesiculosus*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полный набор анализируемых микотоксинов у водорослей семейства Fucaceae указывает на существование в этих макрофитах комплекса биосинтетических путей, известных для отдельных видов микроскопических грибов. *F. vesiculosus* практически по всем компонентам отличался большей интенсивностью метаболического профиля, чем *A. nodosum* и *P. canaliculata*, которые обильно ассоциированы с эндофитным аскомицетом *Stigmatium ascophylli* (Cotton) Aptroot (см.: Коновалова и др., 2012). Учитывая возможность влияния микобионта на биохимическую систему организма-хозяина, снижение интенсивности накопления метаболитов без изменения компонентного состава можно объяснить некоторым эффектом сдерживания метаболических процессов без блокирования или стимулирования отдельных реакций.

Различия в накоплении двух фузариогенных трихотец-9-енов (ДАС и Т-2) у водорослей оказались весьма значительными. Возможно, в этих организмах условия обитания продуцирующего гриба или группы грибов в большей мере способствуют реализации биосинтеза ДАС. Бóльшее количество ДАС, чем Т-2, отмечено ранее у травянистых растений, что рассматривалось как редкая аномалия (Kononenko et al., 2015). При изучении макрофитов Белого моря из внутренней части талломов *A. nodosum* и *P. canaliculata* получены единичные изоляты рода *Fusarium* неустановленной видовой принадлежности (Коновалова, Бубнова, 2011), однако у *F. vesiculosus*, в котором со-

Таблица 1. Содержание микотоксинов в талломах бурых водорослей *Pelvetia canaliculata*, *Ascophyllum nodosum* и *Fucus vesiculosus*

Метаболит	Содержание микотоксина, нг/г, $M \pm SEM$		
	<i>P. canaliculata</i> (n = 5)	<i>A. nodosum</i> (n = 6)	<i>F. vesiculosus</i> (n = 9)
Т-2	34 ± 2 ^a	29 ± 2 ^a	37 ± 6 ^a
ДАС	13520 ± 717 ^{ab}	12200 ± 821 ^a	22860 ± 3135 ^b
ДОН	1740 ± 54 ^a	1660 ± 195 ^a	4490 ± 859 ^b
ЗЕН	165 ± 15 ^a	175 ± 13 ^a	510 ± 98 ^b
ФУМ	790 ± 79 ^a	765 ± 67 ^a	1700 ± 225 ^b
АОЛ	255 ± 13 ^a	265 ± 16 ^a	1040 ± 245 ^b
ОА	130 ± 9 ^a	115 ± 18 ^a	505 ± 82 ^b
ЦИТ	450 ± 27 ^a	750 ± 118 ^a	630 ± 73 ^a
АВ ₁	71 ± 8 ^a	125 ± 17 ^{ab}	160 ± 35 ^b
СТЕ	355 ± 12 ^a	390 ± 19 ^a	510 ± 60 ^a
ЦПК	1080 ± 52 ^a	2165 ± 354 ^b	1910 ± 279 ^{ab}
PR	4660 ± 521 ^a	13540 ± 1486 ^b	21700 ± 1676 ^c
МФК	2460 ± 170 ^a	4460 ± 454 ^b	2945 ± 390 ^a
ЭМО	91 ± 8 ^a	240 ± 40 ^b	1075 ± 357 ^c
РОА	52 ± 4 ^a	180 ± 29 ^b	540 ± 54 ^c
ЭА	255 ± 50 ^a	930 ± 293 ^a	16560 ± 2944 ^b

Примечание. Надстрочные латинские буквы указывают на значимость различий при $p < 0.05$. Значения считаются достоверно различными при отсутствии совпадающих букв. Расшифровка сокращенных названий метаболитов приведена в главе “Материал и методика”.

держание всех анализированных фузариотоксинов было значительно выше, представители этого рода не найдены (Бубнова, Киреев, 2009).

Содержание АОЛ в талломах фукуса было выше, чем в талломах аскофиллума и пельвеции (табл. 1), а один из потенциальных продуцентов этого микотоксина – *Alternaria alternata* (Fr.) Keisler, был отмечен в составе микобиоты на талломах первых двух видов водорослей (Бубнова, Киреев, 2009; Коновалова, Бубнова, 2011).

По данным микологического анализа, грибы из родов *Penicillium* и *Aspergillus* были достаточно широко представлены в живых талломах исследованных макрофитов как по распространенности, так и по видовому разнообразию, среди них *P. brevicompactum* Dierckx, *P. chrysogenum* Thom и *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. (см.: Бубнова, Киреев, 2009; Коновалова, Бубнова, 2011) – известные продуценты МФК, PR (Frisvad et al., 2004) и СТЕ (Cole, Cox, 1981). В перечень обнаруженных нами токсинов этих грибов входили также ОА, ЦИТ, АВ₁ и ЦПК.

Наблюдаемая стабильность содержания ЦИТ и СТЕ, биосинтетических предшественников ОА и АВ₁, с одной стороны, и межвидовое варьирование количеств конечных продуктов биосинтеза – с другой, свидетельствуют о том, что продуцентами каждого метаболита могут быть разные микроми-

цеты. Известное для отдельных видов *Penicillium* и *Aspergillus* совмещение биосинтеза МФК и PR, а также АВ₁ и ЦПК представляется маловероятным из-за несовпадающей направленности изменения их содержания от одного макрофита к другому.

Крайне высокое содержание ДАС (более 10 тыс. нг/г) выявлено у всех трех видов фукусовых водорослей, обнаружены также высокие значения PR у аскофиллума и фукуса. У обитающих на суше лишайников и высших сосудистых растений содержание этих токсинов было гораздо ниже. Так, верхние пределы концентраций ДАС и PR в лишайнике гипогимния вздутая были на порядок ниже (Буркин, Кононенко, 2013), как и в луговых травах (клевере луговом, чине луговой), содержание ДАС в которых достигало лишь тысяч нг/г (Кононенко, Буркин, 2018, 2019).

Содержание антрахинона ЭМО и макроциклического трихотецена РОА у водорослей разных видов достоверно различалось, но в целом было умеренным и варьировало от десятков до сотен и тысяч нг/г. Для сравнения, у лишайников рода ксантория содержание ЭМО достигало 100 тыс. нг/г, а РОА обнаружен только в следовых количествах в единичных образцах гипогимнии вздутой (Буркин, Кононенко, 2013). Причины столь значительных различий содержания ЭМО и РОА в био-

объектах остаются неясными из-за дискуссии о путях их биогенеза (Izhaki, 2002).

Сверхвысокую концентрацию ЭА у *F. vesiculosus*, на порядок превышающую таковую у *P. canaliculata* и *A. nodosum*, можно считать неожиданным научным фактом. Сравнимые уровни контаминации известны для культурных и дикорастущих злаков, пораженных агрессивной G3 линией эпифитного гриба *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne, а также для луговых и сеянных трав, заселенных высоко токсигенными специфическими эндофитами (Gerhards et al., 2014). Наличие специфической эндофитной микобиоты подтверждено как для ламинариевых, так и для некоторых фукусовых водорослей (Flewelling et al., 2013). Эндофитный гриб *S. ascophylli* был выявлен во всех частях талломов беломорских макрофитов *P. canaliculata* и *A. nodosum* (см.: Коновалова, Бубнова, 2011; Коновалова и др., 2012), поэтому его способность продуцировать ЭА представляет несомненный интерес.

В последние годы серьезную обеспокоенность исследователей вызывает появление новых природных зон с высокой контаминацией биообъектов эргоалкалоидами. Обширное распространение в Ваттовом море солероса *Spartina anglica* С.Е. Hubbard, интенсивно пораженного *Claviceps purpurea* var. *spartinae*, и возможность длительной миграции его склероциев линии G3 в морской воде несут реальную угрозу для пастбищных животных на прибрежных территориях европейских стран (Boestfleisch et al., 2015). Следует отметить, что в склероциях спорыньи, интенсивно заселяющей низкорослые злаковые травы на побережье Белого моря, содержание ЭА достигает таких же критических значений (наши неопубликованные данные).

У видов *L. digitata* и *S. latissima* из семейства Laminariaceae микотоксины не обнаружены. Полученная информация представляет особую ценность, так как эти водоросли являются объектами промысла и марикультуры и широко используются в пищевых целях. Возможно, ламинариевые наделены уникальными механизмами, позволяющими ограничивать рост микромицетов, блокировать их метаболическую активность или вызывать глубокую трансформацию биосинтетических путей, завершающихся продуктами с измененной структурой.

Таким образом, нами впервые показано, что у бурых морских водорослей семейства Fucaceae, как и у обитающих на суше лишайников и травянистых растений, формируется свойственный микроскопическим грибам многокомпонентный профиль микотоксинов, который отсутствует у видов семейства Laminariaceae. Обнаружение настолько контрастной альтернативной ситуации у близких по систематическому положению и ме-

стообитанию водорослей служит убедительным доводом в пользу продолжения разносторонних и углубленных исследований роли грибов, генетически детерминированных на биосинтез токсичных вторичных метаболитов, в процессах жизнедеятельности морских организмов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бубнова Е.Н., Киреев Я.В. Сообщества грибов на талломах бурых водорослей рода *Fucus* в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 5. С. 388–397.
- Буркин А.А., Кононенко Г.П. Особенности накопления микотоксинов в лишайниках // Прикл. биохимия и микробиол. 2013. Т. 49. № 5. С. 522–530.
- Киричук Н.Н., Пивкин М.В. Мицелиальные грибы морской травы *Zostera marina* Linnaeus, 1753 бухты Рифовой (залив Петра Великого, Японское море) // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 5. С. 319–323.
- Коновалова О.П., Бубнова Е.Н. Грибы на бурых водорослях *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. Вып. 3. С. 240–248.
- Коновалова О.П., Бубнова Е.Н., Сидорова И.И. Биология *Stigmidium ascophylli* – гриба-симбионта фукусовых водорослей в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. Вып. 6. С. 353–360.
- Кононенко Г.П., Буркин А.А. Вторичные метаболиты микромицетов в растениях семейства Fabaceae рода *Trifolium* // Изв. РАН. Сер. биол. 2018. № 2. С. 150–157.
- Кононенко Г.П., Буркин А.А. Вторичные метаболиты микромицетов в растениях семейства Fabaceae родов *Lathyrus*, *Vicia* // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 3. С. 229–235.
- Boestfleisch C., Drotleff A.M., Ternes W. et al. The invasive ergot *Claviceps purpurea* var. *spartinae* recently established in the European Wadden Sea on common cord grass is genetically homogenous and the sclerotia contain high amounts of ergot alkaloids // Eur. J. Plant Pathol. 2015. V. 141. P. 445–461.
- Cole R.J., Cox R.H. Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic Press. 1981.
- Flewelling A.J., Ellsworth K.T., Sanford J. et al. Macroalgal endophytes from the Atlantic coast of Canada: a potential source of antibiotic natural products? // Microorganisms. 2013. V. 1. P. 175–187.

- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A.* Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* // *Stud. Mycol.* 2004. V. 49. P. 201–241.
- Gerhards N., Neubauer L., Tudzynski P., Li S.-M.* Biosynthetic pathways of ergot alkaloids // *Toxins.* 2014. V. 6. P. 3281–3295.
- Izhaki I.* Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants // *New Phytologist.* 2002. V. 155. P. 205–217.
- Jiang Z., Barret M.-O., Boyd K.G. et al.* JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species // *Phytochemistry.* 2002. V. 60. № 1. P. 33–38.
- Höller U., Wright A.D., Mathee G.F. et al.* Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites // *Mycol. Res.* 2000. V. 104. № 11. P. 1354–1365.
- Kononenko G.P., Burkin A.A., Gavrilova O.P., Gagkaeva T. Yu.* Fungal species and multiple mycotoxin contamination of cultivated grasses and legumes crops // *Agric. Food Sci.* 2015. V. 24. P. 323–330.
- McDonald J.H.* Handbook of Biological Statistics. (3rd ed.). Sparky House Publishing. Baltimore, Maryland. 2014.
- Nicoletti R., Trincone A.* Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin // *Mar. Drugs.* 2016. V. 14. art. ID 37. <https://doi.org/10.3390/md14020037>
- Park M.S., Fong J.J., Oh S.-Y. et al.* Marine-derived *Penicillium* in Korea: diversity, enzyme activity, and antifungal properties // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014. V. 106. P. 331–345.
- Raghukumar S.* Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems: Marine fungi. New York: Springer-Verlag. 2017. 383 p.
- Zhang P., Li X., Wang B.-G.* Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: Chemical diversity and biological activity // *Planta Med.* 2016. V. 82. P. 832–842.

Toxic Metabolites of Micromycetes in Brown Algae of the Family Fucaceae and Laminariaceae from the White Sea

A. A. Burkin^a, G. P. Kononenko^a, A. A. Georgiev^b, and M. L. Georgieva^{b, c}

^aFederal Scientific Center – K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences, Moscow 123022, Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russia

^cGause Institute of New Antibiotics, Moscow 119021, Russia

Low-molecular-weight metabolites known as mycotoxins of micromycetes from the genera *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, etc. were studied by enzyme immunoassay in the brown algae *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, and *Saccharina latissima* collected from the Kandalaksha Gulf, White Sea. T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins of group B, alternariol, ochratoxin A, citrinin, PR-toxin, mycophenolic acid, aflatoxin B₁, sterigmatocystin, cyclopiazonic acid, emodin, roridin A, and ergot alkaloids were detected in thalli of *A. nodosum*, *P. canaliculata*, and *F. vesiculosus*. The latter species was found to contain almost all of the above-listed mycotoxins in significant amounts. *P. canaliculata* had lower levels of PR-toxin, mycophenolic acid, emodin, and roridin A than those recorded from *A. nodosum*, whereas the levels of the other substances did not differ significantly between these species. *L. digitata* and *S. latissima* contained only ergot alkaloids in trace amounts, and no other mycotoxins were detected.

Keywords: algae, *Fucus*, *Ascophyllum*, *Pelvetia*, *Laminaria*, *Saccharina*, mycotoxins, enzyme immunoassay