

РАДИАЦИОННАЯ ХИМИЯ

УДК 544.54

РАДИОЛИТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ *COCHLODINIUM POLYKRIKOIDES* И *ALEXANDRIUM CATENELLA* ПРИ НИЗКИХ ПОГЛОЩЕННЫХ ДОЗАХ

© 2020 г. Ю. Ким^а, А. В. Пономарев^{б, *}

^аEB Tech Co., Ltd. 170-9, Techno 2-ro Yuseong-gu Daejeon, 34028 Republic of Korea

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской Академии наук,
Ленинский просп., 31, стр. 4, Москва, 119071 Россия

*E-mail: ponomarev@ipc.rssi.ru

Поступила в редакцию 26.03.2020 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 20.04.2020 г.

Исследовано воздействие электронного пучка на токсичные микроводоросли *Cochlodinium polykrikoides* и *Alexandrium catenella*, участвующие в явлении цветения морской воды, известном как красные приливы. Это ежегодное бедствие вызывает массовую интоксикацию и гибель морских обитателей. Облучение электронным пучком при поглощенной дозе до 1 кГр приводит к инактивации свыше 2/3 популяции микроводорослей за счет нарушения целостности клеточных стенок, повреждения хлоропластов и агрегации клеток. Радиолит разрушает паралитические токсины, включая наиболее опасные из них. Благодаря низким дозам и простоте облучения, электронно-лучевая обработка воды может стать перспективным методом инактивации и детоксикации фитопланктона, участвующего в красных приливах.

Ключевые слова: электронный пучок, *Cochlodinium polykrikoides*, *Alexandrium catenella*, инактивация, детоксикация, хлорофилл-*a*

DOI: 10.31857/S0023119320050101

Явления, известные как “эвтрофикация” (насыщение водоема биогенными элементами, сопровождающееся ростом его биологической продуктивности) и “красные приливы” (цветение морской воды) относятся к глобальным причинам массовой гибели морских рыб и животных [1–3]. Эти сезонные явления возникают во всем мире, и их значимость стремительно растет по мере урбанизации и глобального потепления. Несбалансированная эвтрофикация провоцирует бурное развитие фитопланктона и появление в воде цианобактерий, выделяющих токсины, способные вызывать отравление живых организмов. Потребление человеком морепродуктов, отравленных этими токсинами, приводит даже к летальному исходу. Избыточные скопления микроводорослей при красных приливах препятствуют проникновению солнечных лучей вглубь воды и, как следствие, ослабляет фотосинтез у донных растений, а значит и выработку кислорода. Каждый раз эти явления приносят колоссальные убытки рыбным хозяйствам [4, 5].

В мире были разработаны и опробованы различные методы [3], позволяющие ограничивать распространение красных приливов, включая флотационные, реагентные, ультразвуковые, СВЧ, филь-

трационные, плазмохимические и др. Эти методы дают возможность частичного управления либо фитопланктоном, либо вторичными загрязнениями, но не предоставляют возможности для простого и удобного решения комплекса возникающих проблем. Настоящая работа посвящена исследованию влияния низкой дозы ионизирующего излучения на развитие и свойства микроводорослей, участвующих в явлении красных приливов в Тихоокеанском бассейне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроводоросли и их инкубация

Исследовали две разновидности микроводорослей, наносящих в последние годы наибольший ущерб рыбоводческим хозяйствам на южном побережье Республики Корея и на Дальнем Востоке России: *Cochlodinium polykrikoides* и *Alexandrium catenella* [4]. Эти микроводоросли обуславливают отравление рыбы и моллюсков нейротоксинами, главным образом сакситоксином, ответственным за паралитическое отравление морских животных и людей [6, 7]. Образцы водорослей были собраны в период красных приливов и далее выращивались в лабораторных усло-

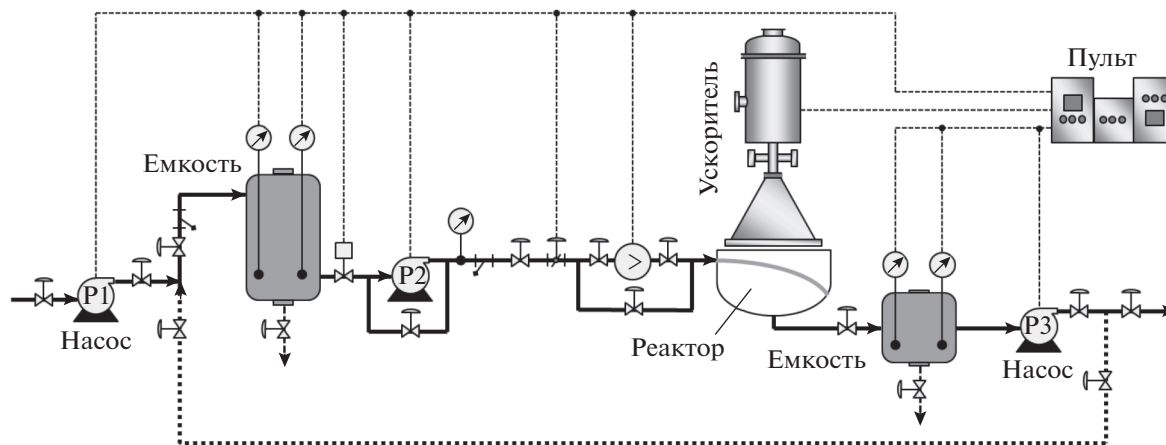


Рис. 1. Схема лабораторной установки для облучения морской воды в струйном режиме.

виях в Национальном институте исследований и разработок в области рыбного хозяйства Республики Корея. Культуральную среду готовили на морской воде с двойной фильтрацией. В экспериментах использовали *Cochlodinium polykrikoides* в среде f/2-Si и *Alexandrium catenella* в среде SWII [8, 9]. Чтобы обеспечить корректность сравнений, микроводоросли после облучения культивировались в тех же условиях, что и исходные.

Облучение

Радиолиз осуществляли с помощью ускорителя ЭЛВ в EV Tech Co., Ltd. пучком электронов с энергией 2.5 МэВ при токе пучка от 2.0 до 13.0 мА и скорости раствора 1.2 дм³/мин. Схема установки для облучения воды в струйном режиме представлена на рис. 1. Для дозиметрии использовали пленки сополимера с феназиновым красителем СО ПД(Ф)Р-5/50 (ГСО 7865-2000) [10].

Тестирование инактивации и детоксикации микроводорослей

Радикалы, генерируемые в воде под действием ионизирующего излучения, реагируют с материалом клеточных стенок, что может вызывать разрушение стенок и гибель микроводорослей [11]. Радиолитическое повреждение клеток нередко изменяет кинетику роста и гибели микроводорослей, а также провоцирует выделение внутриклеточного вещества в воду. Исходные образцы содержали 5000–7000 особей микроводорослей в см³ воды. Показателями гибели клеток служит уменьшение их количества и нарушение фотосинтеза из-за разрушения хлоропластов [12]. В работе регистрировалось изменение концентрации хлорофилла-а с помощью флуоресцентной спектрометрии. За морфологическими изменениями микроводорослей вследствие облучения следи-

ли с помощью просвечивающего электронного микроскопа (модель JEM-1010). Токсины, порождаемые фитопланктоном, легко сорбируются жабрами рыб, вызывая удушье последних [7, 13]. Вместе с потребляемыми рыбой и моллюсками, биотоксины могут попадать в человека и вызывать его отравление. В процессе культивирования облученных микроводорослей следили за изменением pH, динамики их гибели, содержанием хлорофилла-а, токсинов, растворимого белка, растворимых углеводов и показателя общего химического потребления кислорода растворенными продуктами (ХПК_р) [14, 15]. Для анализа растворимых углеводов и протеинов использовали методы Антрона (Anthrone) и Лоури (Lowery), соответственно [14, 15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические показатели

Рисунок 2 демонстрирует изменение показателей pH, щелочности и содержания растворенных соединений в образцах *Cochlodinium polykrikoides* и *Alexandrium catenella*, обусловленное ростом поглощенной дозы. Наблюдается снижение pH с 8.0 до 7.6 и щелочности со 105 до 75 мг/дм³, что может быть обусловлено, с одной стороны, небольшим радиолитическим подкислением воды [10], а с другой стороны, радиолитическим разрушением фитопланктона с выделением кислотных компонентов цитоплазмы. Метаболиты в клетках водорослей представлены в основном углеводами и белками. Показатель ХПК_р является наглядной характеристикой выделения растворимой фракции этих веществ в воду. Так по мере роста поглощенной дозы до 0.3 кГр, ХПК_р в растворе *Cochlodinium polykrikoides* увеличивается в 1.47 раз, а в растворе *Alexandrium catenella* – в 1.96 раз. В свою очередь при дозе 1 кГр значения ХПК_р в этих рас-

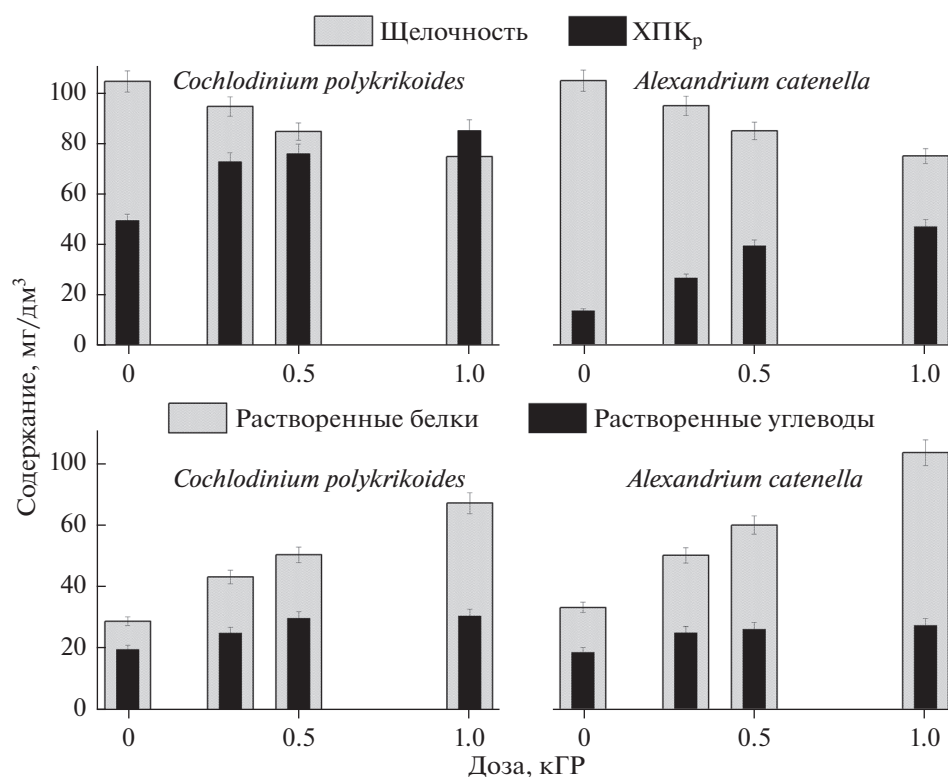


Рис. 2. Изменение щелочности, химического потребления кислорода растворенными соединениями (ХПК_p), содержания растворенных белков и углеводов в зависимости от поглощенной дозы.

творях в 1.72 и 3.16 раз выше, чем в соответствующих необлученных образцах.

Изменение жизнеспособности микроводорослей

Исходное количество особей водорослей варьируется в зависимости от их природы и условий выращивания. Однако общие закономерности влияния облучения на гибель микроводорослей поддаются надежной оценке посредством камеры Седжвика–Рафтера (рис. 3а). В образцах *Cochlo-dinium polykrikoides* смертность популяции составила в среднем 53.2% при дозе 0.3 кГр и 79.0% при дозе 1 кГр. В этих же условиях смертность популяции *Alexandrium catenella* достигала 21.2 и 82.0% соответственно. Обе исследованные разновидности микроводорослей содержат хлоропласты и, соответственно, способны к фотосинтезу. Повреждение хлоропластов и хлорофилла-а может рассматриваться как косвенный показатель гибели микроводорослей. Оценка этого показателя может быть проведена на основе измерения эффективности фотосинтеза [14, 15] посредством флуоресцентной спектроскопии (рис. 3б). Судя по концентрации хлорофилла-а, облучение при дозе 1 кГр приводит к повреждению около 86% *Cochlo-dinium polykrikoides* и около 70% *Alexandrium catenella*. Более того, культивирование микроводорослей,

выживших после облучения, выявляет гибель еще около 60% из них в течение 24 ч, так что смертность популяции может достигать не менее 90%. По сравнению с необлученными образцами, в ходе культивирования облученных водорослей наблюдается снижение концентрации хлорофилла-а и повышение содержания растворенных белков до 3 раз. К тому же, происходит образование и осаждение агрегатов микроводорослей, как ранее наблюдалось в [11]. Несомненно, столь высокая результативность привлекает внимание к электронно-лучевой обработке как к весьма перспективному методу контроля микроводорослей, бурно размножающихся каждое лето во всех тихоокеанских прибрежных водах.

Разрушение клеток

Рисунок 4а показывает, что в исходной *Cochlo-dinium polykrikoides*, органеллы располагаются в строгой последовательности и заполняют внутренность клетки. Однако в результате облучения, клеточная стенка микроводоросли повреждается и содержимое распространяется за пределы клетки (рис. 4б). Это явление хорошо согласуется с вышеуказанным изменением ХПК_p (рис. 2), свидетельствующем о существенном повышении кон-

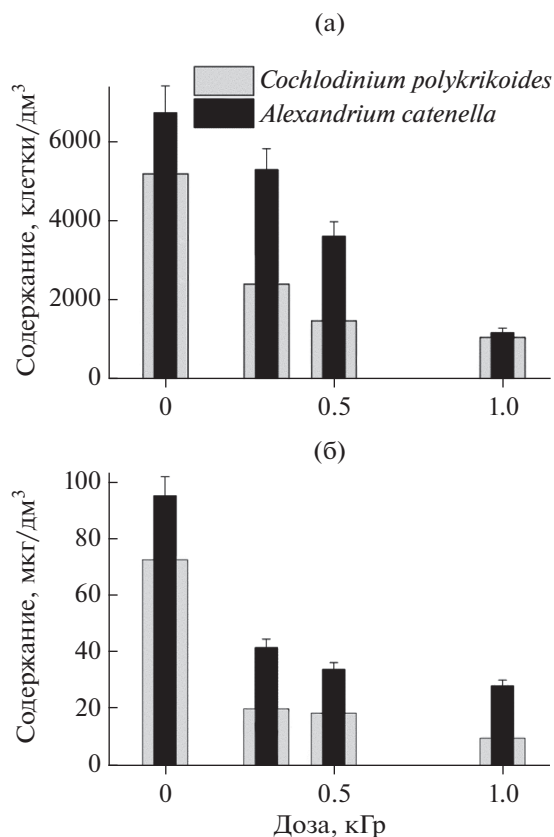


Рис. 3. Изменение количества клеток (а) и содержания хлорофилла-а (б) в зависимости от поглощенной дозы.

центрации растворенных соединений в облученных образцах.

В результате метаболизма и разложения, клетки высвобождают высокомолекулярные соединения, относящиеся к полисахаридам, нуклеиновым кислотам, белкам и т.д. Эти внеклеточные биополимеры играют роль коллагена, объединяющего клетки в агрегаты и увеличивающего вязкость раствора между ними. Рисунок 3 (нижняя часть) показывает изменение содержания внеклеточных биополимеров в воде вследствие облучения. Видно, что в образцах и *Cochlodinium polykrikoides* и *Alexandrium catenella* при дозе 1 кГр содержание растворенного белка возрастает почти в 2.5 раза, а углеводов — примерно в 1.5 раза. Это является еще одним подтверждением нарушения целостности клеточных стенок микроводорослей вследствие радиолиза.

Изменение токсичности

В процессе размножения *Alexandrium catenella* порождает спящие споры, прорастание которых происходит не сразу. В споровой форме микроводоросли могут переноситься морскими течениями, попадать в судовые балластные воды, поглощаться морскими обитателями и, таким образом распространяться по большому пространству. Как известно, *Alexandrium catenella* обуславливает выработку сильнодействующих природных токсинов — сакситоксинов — паралитических ядов у моллюсков, и, соответственно, влияние облуче-

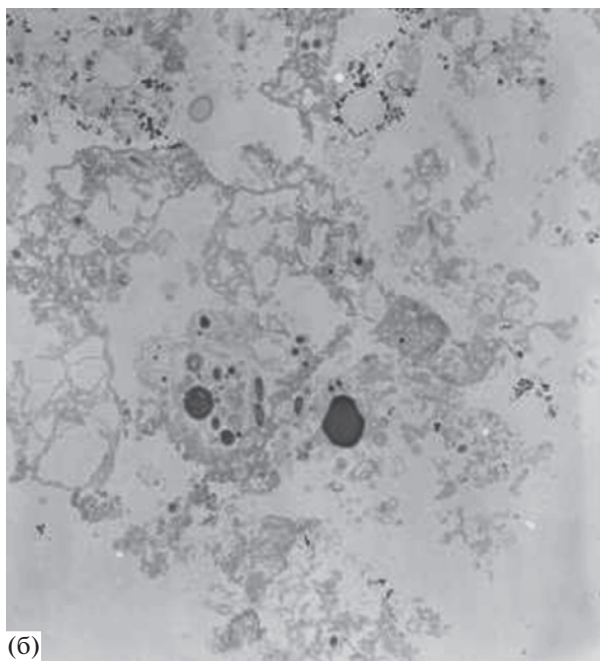
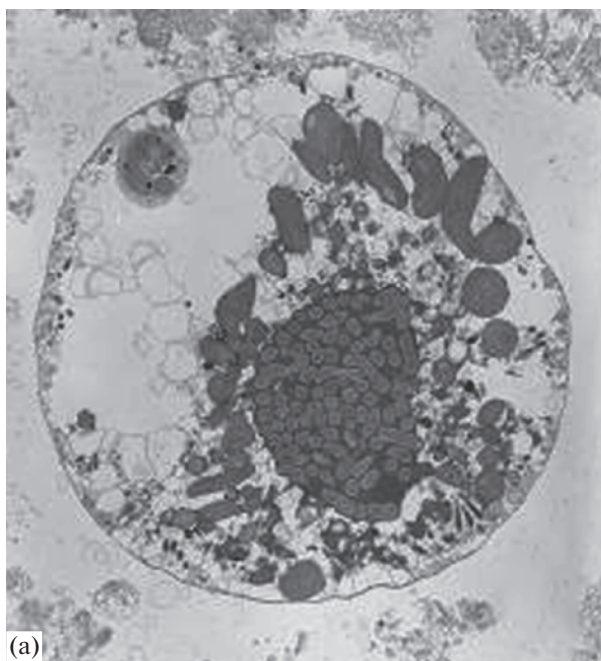


Рис. 4. Сравнение *Cochlodinium polykrikoides* до (а) и после (б) воздействия облучения с дозой 1 кГр. Просвечивающая электронная микроскопия с кратностью увеличения: а — 2000, б — 2750.

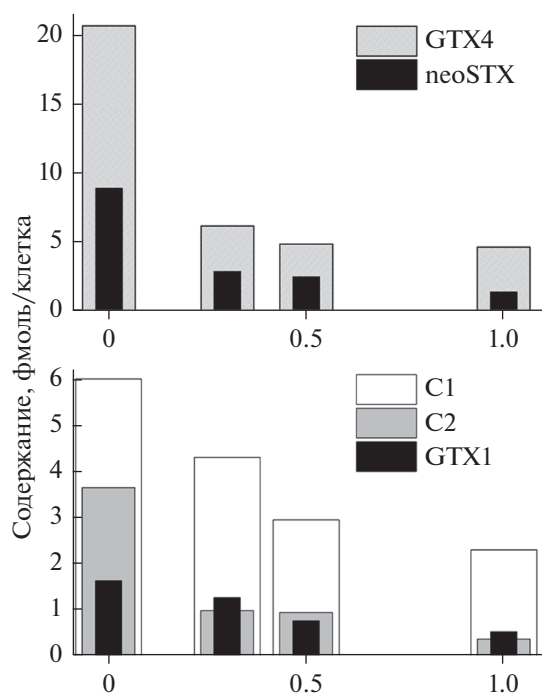


Рис. 5. Изменение содержания основных токсинов в образце *Alexandrium catenella* в зависимости от поглощенной дозы.

ния на *Alexandrium catenella* вызывает повышенный интерес. Основными токсинами, обнаруживаемыми в пробах *Alexandrium catenella* являются карбаматные (гониатоксины GTX 1, GTX 3, GTX 4 и NEO) и сульфокарбамоильные (C1 и C2) токсины [16, 17]. Содержание основных токсинов в облученных и необлученных пробах показано на рис. 5.

Общее содержание токсичных соединений в исходной культуре *Alexandrium catenella* составляет 41.34 фмоль/клетку. В свою очередь, при поглощенной дозе 0.3 кГр их содержание уменьшается до 16.21 фмоль/клетку, т.е. на 68%. При этом, снижение концентрации непосредственно биотоксинов составляет около 50%. При поглощенной дозе 1 кГр, общее содержание токсичных продуктов снижается до 9.8 фмоль/клетку, т.е. на 76%. Содержание сакситоксина нео-STX, относящегося к наиболее токсичным, за время облучения снижается с 9.0 до 2.95 фмоль/клетку при дозе 0.3 кГр, т.е. на 67%. В свою очередь, поглощенная доза 1 кГр обеспечивает снижение содержания нео-STX на 84%, что почти на 8% выше, чем общее снижение содержания токсичных соединений. Таким образом, электронно-лучевая обработка образцов *Alexandrium catenella* приводит к весьма эффективному разрушению структуры паралитических ядов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование радиационной стойкости двух видов микроводорослей, *Cochlodinium polykrikoides* и *Alexandrium catenella*, участвующих в красных приливах и типичных для прибрежных вод Республики Корея и Дальнего востока России. С целью моделирования практических методов контроля быстрорастущих токсичных микроводорослей в морской воде, в исследованиях использовался промышленный ускоритель, пригодный для крупномасштабного облучения больших расхо- дов воды. Различными методами была выявлена пригодность малых поглощенных доз (до 1 кГр) вызывать повреждения у 86% особей и приводить к гибели почти 80% популяции микроводорослей. Методом просвечивающей микроскопии на примере представителей *Cochlodinium polykrikoides* показано разрушение клеточных стенок микроводоросли, сопровождающееся элюированием органелл и потерей жизнеспособности клеток. При дозе 1 кГр высвобождение растворимых белков и углеводов увеличивается в 2.5 и 1.5 раза, соответственно. Важным результатом электронно-лучевой обработки микроводорослей является разрушение химической структуры паралитических токсинов с эффективностью детоксикации около 84% при поглощенной дозе 1 кГр.

Электронно-лучевая обработка воды может быть реализована в крупнотоннажном режиме с пропускной способностью 200000 м³ в сутки и даже более [18]. С учетом низкой дозы, необходимой для подавления жизнедеятельности микроводорослей, электронно-лучевая обработка выглядит весьма перспективным методом регулирования численности токсичного фитопланктона в прибрежных водах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chislock M.F., Doster E., Zitomer R.A., Wilson A.E. // Nature Education Knowledge. 2013. Т. 4. № 4. С. 10.
2. Matthijs H. C. P., Janžula D., Visser P.M., Maršálek B. // Aquat. Ecol. 2016. Т. 50. С. 443.
3. Stroom J., Kardinaal W.E.A. // Aquat. Ecol. 2016. Т. 50. С. 541.
4. Anton A., Teoh P.L., Mohd-Shaleh S.R., Mohammad Noor N. // Harmful Algae. 2008. Т. 7. № 3. С. 331.
5. Shimizu Y. Chemistry and mechanism of action. Seafood and freshwater toxins. Ed. by L. M. Botana. New York, Marcel Dekker. 2000. С. 151.
6. Han M.S., Jeon J.K., Kim Y.O. // J. Plankton Res., 1992. Т. 14. С. 1067.
7. Botana L.M., Hess Ph., Munday R., Nathalie A., De-Grasse S.L., Feeley M., Suzuki T., Berg van den M., Fattori V., Gamarro E. G., Tritscher A., Nakagawa R., Karunasagar I. // Trends in Food Science & Technology. 2017. Т. 59. С. 15.
8. Pachiappan P., Prasath B.B., Perumal S., Ananth S., Devi A.S., Kumar S.D., Jeyanthi S. In: Perumal S., A.R. T.,

- Pachiappan P. (eds.) *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*. Springer, New Delhi. 2015.
9. *Algal Culturing Techniques*. 1st Edition. *Andersen R.A.* (ed.). Academic Press. San Diego, United States. 2005.
10. *Woods R.J., Pikaev A.K.* *Applied Radiation Chemistry Radiation Processing*. Wiley Inter Science, 1994.
11. *Chulkov V.N., Bludenko A.V., Ponomarev A.V.* // *High Energy Chem.* 2018. T. 52. № 5. С. 449.
12. *Luckas B., Hummert C., Oshima Y.* Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson and A.K. Cembella (eds.), Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, France., 2003. С. 191.
13. *Sekiguchi K., Sato S., Kaga S., Ogata T., Kodama M.* // *Fisheries science*. 2001. T. 67. С. 301.
14. *Plummer M., Plummer D.T.* *An Introduction to Practical Biochemistry*, Tata McGraw Hill Publishing Company, N.Y. 2001.
15. *Waterborg J.H.* The Lowry Method for Protein Quantitation. In: *Walker J.M.* (eds.) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, N.J. 2009.
16. *Pearson L., Mihali T., Moffitt M., Kellmann R., Neilan B.* // *Mar. Drugs*. 2010. T. 8. С. 1650.
17. *Daranas A.H., Norte M., Fernández J.J.* // *Toxicon*. 2001. T. 39. № 8. С. 1101.
18. *Ponomarev A.V.* // *Radiat. Phys. Chem.* 2020. T. 172. С. 108812.