

УДК 582.251.72

В.М. МОКРОСНОП, Е.К. ЗОЛОТАРЁВА

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,

ул. Терещенковская, 2, 01601 Киев, Украина

**ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДОВ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ
МИКРОВОДОРОСЛИ *EUGLENA GRACILIS* KLEBS
(*EUGLENOPHYTA*)**

Изучено влияние фунгицидов на рост культуры микроводоросли *Euglena gracilis*. Для подавления развития спор или мицелия патогенных грибов в культуре *E. gracilis* применяли 4 препарата фунгицидов, широко используемых в сельском хозяйстве для защиты растений от грибковых инфекций. Проанализировано действие пропина, манкоцеба, беномила и смеси фамоксадона и цимоксанила (1:1), которые добавляли в жидкую и агаризованную минеральные питательные среды, содержащие глютаминовую кислоту в качестве экзогенного источника углерода. Показано, что контактные фунгициды пропин и манкоцеб в исследуемых концентрациях убивали клетки микроводоросли, однако не препятствовали росту грибов. Беномил, а также комбинированный препарат, содержащий фамоксадон и цимоксанил (1:1), подавляли рост грибов и не ингибировали рост клеток микроводоросли *E. gracilis*. Установлено, что беномил в концентрации 60 мкг/мл эффективно освобождает культуру *E. gracilis* от микотического загрязнения.

Ключевые слова: *Euglena gracilis*, фунгициды, беномил, грибковая контаминация.

Введение

Одноклеточная микроводоросль *Euglena gracilis* — простейший известный и древнейший эвкариотический организм, способна расти как за счет фотосинтеза (автотрофно), так и гетеротрофно, за счет экзогенных органических источников углерода (глюкоза, глютаминовая кислота, ацетат, лактат, этанол, метанол). Она неприхотлива к условиям культивирования, имеет относительно широкий оптимум pH и температуры роста, способна выживать в анаэробных условиях (Hoffmeister et al., 2004). Её клетки содержат значительное количество белка, β -каротина, α -токоферола, витамина С, а также полиненасыщенных жирных кислот, поэтому культивирование этой микроводоросли имеет несомненную биотехнологическую перспективу (Takeyama et al., 1997).

Для работы с *E. gracilis*, как и любым другим микроскопическим объектом, необходима стерильность для достижения за минимальный период времени высокого выхода биомассы, незагрязненной посторонними включениями. Экспериментально установлено, что быстрый рост

© В.М. Мокросноп, Е.К. Золотарева, 2012

культуры *Euglena gracilis* достигается в условиях гетеротрофного или фотогетеротрофного питания. При таком способе культивирования существенно возрастает вероятность загрязнения культуры другими организмами, в частности грибами. Выращивание культуры в подкисленной среде, которая часто используется для подавления размножения бактерий, также как и внесение органических соединений, создает благоприятные условия для прорастания спор и роста грибного мицелия. Подобное загрязнение суспензии *E. gracilis* может привести к потере зараженных суспензий (Громов, 1976).

Для решения проблемы контаминации суспензий водорослей представителями царства грибов предлагаются разнообразные способы: физические, химические, механические. Каждый из них имеет свои ограничения или трудности в использовании относительно того или иного биологического объекта или условий поставленного эксперимента и др. (Andersen, 2005).

В растениеводстве, ветеринарии и медицине для борьбы с грибковыми инфекциями широко используются разнообразные фунгициды. Фунгициды (от лат. fungus – гриб и caedo – убиваю) – химические соединения или биологические организмы, которые используются для уничтожения или задержки роста грибов и их спор. Например, в растениеводстве используют фунгициды профилактические (защитные), предотвращающие заражение растений или останавливающие развитие и распространение возбудителя в месте скопления инфекции до того, как произойдет заражение, подавляющие, главным образом, его репродуктивные органы. К этому классу относится большинство фунгицидов. Вторая группа – лечебные (искореняющие) фунгициды действуют на мицелий, репродуктивные органы и зимующие стадии возбудителя, становясь причиной их гибели после заражения растения. По характеру распределения между тканями растений фунгициды разделяют на контактные (локальные) и системные (внутрирастительные). Контактные фунгициды при обработке растений остаются на поверхности и вызывают гибель возбудителя при соприкосновении с ним. Системные фунгициды проникают внутрь растения, распространяются по сосудистой системе и подавляют развитие возбудителя вследствие непосредственного действия на него или в результате обмена веществ в растении (www.fertilizersandpesticides.com).

В данной работе было изучено действие фунгицидов контактного и системного действия на культуру клеток *E. gracilis* с целью выявления препаратов, способных подавлять рост спор и мицелия грибов без подавления роста клеток микроводоросли.

Материалы и методы

Препараты фунгицидов были получены от ТМ «Зеленый мир» (Киев). Все четыре препарата используются для защиты и лечения растений от грибковых болезней. Пропинеб – высокоэффективный контактный фунгицид разностороннего действия, убивает конидии при контакте с

ними, ингибирует прорастание спор патогенов на клеточном уровне, влияя на дыхание, метаболизм углеводов и белков, также действует на уровне клеточных мембран. Пропинеб является производным дитиокарбаминовой кислоты ([2-[(дитиокарбоксил)амино]-1-метилэтил]карбамодитиоато](2-)-kS,kS'цинк). Таким же контактным фунгицидом с защитным действием, производным дитиокарбаминовой кислоты, является манкоцеб ([2-[(дитиокарбоксил)амино]этил]карбамодитиоато](2-)-kS,kS'магний (цинк), ингибирующий дыхание. Наибольшая эффективность контактных фунгицидов достигается при профилактическом использовании (www.rupest.ru).

В работе анализировалось действие препарата, относящегося к системным фунгицидам и содержащего равные количества фамоксадона (оксазол; 5-метил-5(4-феноксифенил)-3-(фениламино)-2,4-оксазолидинедион) и цимоксанила (цианоацетамид оксим; 2-циано-N-[(этиламино)карбонил]-2-(метоксимино)ацетамид). Фамоксадон действует, главным образом, как контактное защитное вещество, предотвращая дифференциацию спорангиев в зооспоры. Цимоксанил имеет системные и лечебные свойства, способен блокировать рост мицелия и споруляцию. Таким образом, данный препарат действует на всех стадиях развития патогена. Четвертый фунгицид – беномил (метил [1-[(бутилкарбонил)-1H-бензимидазол-2-ил] карбамат), системный фунгицид с защитным и лечебным действием, ингибирующий митоз и деление клеток (Abeliovich 1977; Summerbell, 1993; Mahan, 2005).

Концентрации фунгицидов были выбраны с учетом эффективности действующего вещества, которая, в свою очередь, определялась по концентрации препарата, рекомендованной для защиты растений от грибковых заболеваний. Использовали концентрации 60 мкг/мл беномила, 7 мкг/мл (1:1) фамоксадона и цимоксанила, 47 мкг/мл пропинеба, 154 мкг/мл манкоцеба, которые добавляли в жидкую и твердую питательные среды BBM (Andersen et al., 2005), pH 4, с добавлением 12 мкг/мл глютаминовой кислоты при 24 °C и освещении 150 мкмоль/м²·с.

Указанные фунгициды тестировали на токсичность относительно клеток культуры *E. gracilis* и возможность использования для очистки данной культуры от грибов. В каждую из четырех типов жидких питательных сред вносили, а на твердые среды высевали клетки *E. gracilis* и споры грибов.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов показали, что контактные фунгициды пропинеб и манкоцеб убивают все клетки микроводоросли *E. gracilis* уже на следующие сутки после их добавления (рис. 1). Это согласуется с данными экотоксичности действующих веществ и инструкции рекомендованного дозирования, согласно которым токсичность исследуемых фунгицидов в отношении клеток зеленых водорослей значительно выше, чем грибов (Ma, 2007, www.rupest.ru).

В то же время в работе К.М. Махана (Mahan, 2005) было показано, что фунгицид системного действия беномил в концентрации 20 мкг/мл, достаточной для подавления роста грибов, не влияет на рост зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Исходя из этих данных, в настоящей работе мы проверяли действие 20–100 мкг/мл беномила на суспензию клеток *E. gracilis*, содержащую споры грибов. Как видно из рис. 1, после внесения в суспензию 60 мкг/мл беномила клетки *E. gracilis* не погибали, а концентрация их продолжала возрастать. Такой же результат был получен при добавлении других фунгицидов системного действия – смеси (1:1) фамоксадона и цимоксанила (рис. 1).

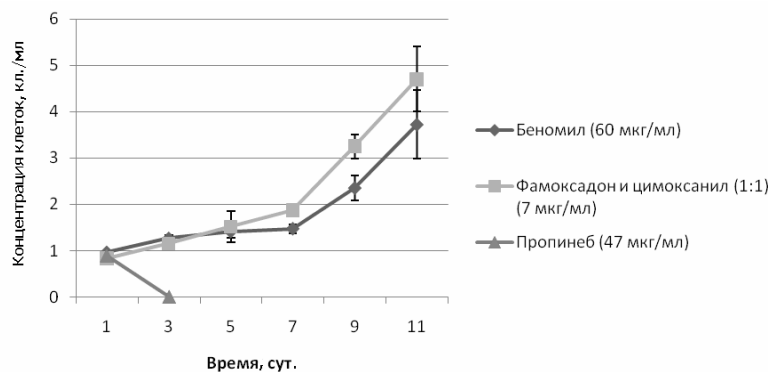


Рис. 1. Кривые роста клеток микроводоросли *Euglena gracilis* в присутствии беномила, смеси фамоксадона и цимоксанила, пропинеба

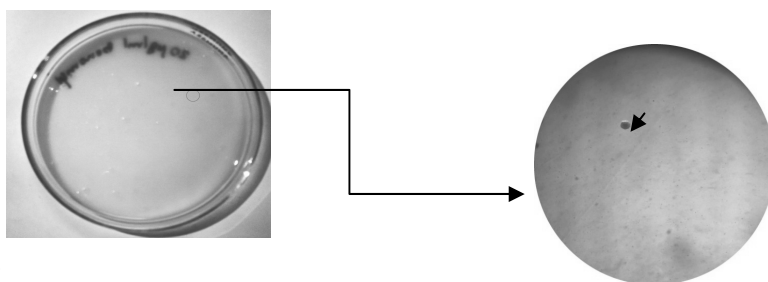
Параллельно проведенный контрольный эксперимент (без добавления фунгицидов в среду) показал, что на 5-е сутки как в суспензии, так и на твердой питательной среде появляются видимые гифы грибов. На твердой питательной среде с контактными фунгицидами пропинебом и манкоцебом также проросли споры грибов, в отличие от вариантов с системными фунгицидами (рис. 2).

Таким образом, нам удалось выявить препараты, которые могут быть использованы для борьбы с грибами в жидких и агаризованных питательных средах, предназначенных для выращивания микроводоросли *E. gracilis*. Ими оказались фунгициды системного действия – беномил и комбинация соединений 1:1 фамоксадон и цимоксанил. Для наблюдения за влиянием этих веществ на рост *E. gracilis* было исследовано действие возрастающих концентраций каждого из фунгицидов и построены кривые роста микроводоросли (рис. 3, 4).

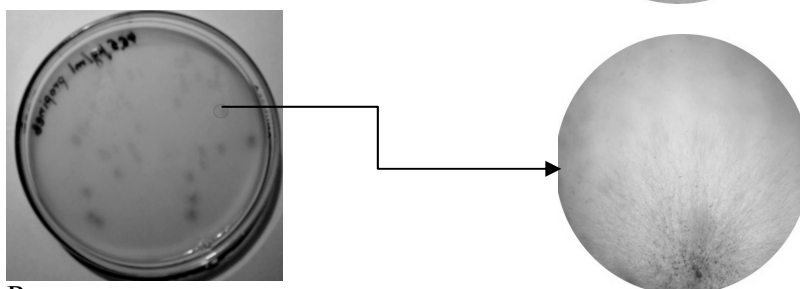
Из представленных графиков следует, что ни беномил, ни фамоксадон и цимоксанил (1:1) в исследованных концентрациях практически не влияют на рост культуры *E. gracilis*. Но, на 12-е сутки культивирования в световом микроскопе фиксировалось появление проросших спор грибов во всех образцах *E. gracilis*, инкубировавшихся в присутствии различных концентраций фамоксадона и цимоксанила (1:1). В то же время,

в суспензиях с беномилом мицелий грибов не был выявлен на протяжении всего эксперимента.

А



Б



В

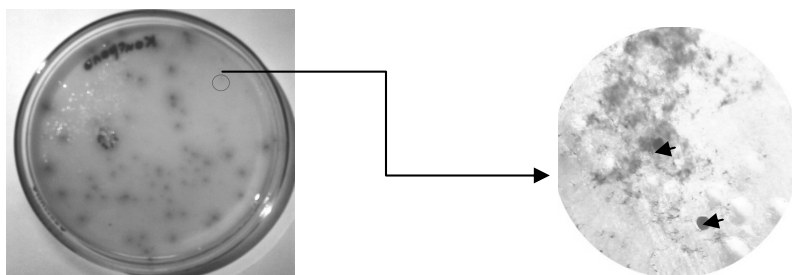


Рис. 2. Изображение чашки Петри на 12-е сутки после посева культуры микроводоросли *Euglena gracilis*, загрязненной спорами грибов, на твердые питательные среды с 20 мкг/мл беномила (А), 47 мкг/мл пропинеба (Б) и без добавления фунгицидов – контроль (В). Кривыми Стрелками показана выделенная часть на чашке Петри при увеличении, короткие стрелки указывают на колонии клеток *E. gracilis*

Для установления жизнеспособности спор грибов в суспензиях микроводоросли *E. gracilis* с фунгицидами их аликвоты были высеяны на агаризованую питательную среду без добавления противогрибковых средств (рис. 5). Результаты данного эксперимента показали, что в присутствии разных концентраций фамоксадона и цимоксанила (1:1) споры из 10 мкл изначально посеянной культуры *E. gracilis* развивались до спороношения и на твердой среде прорастали тысячи спор грибов. В присутствии беномила количество жизнеспособных спор было незначительным и зависело от концентрации фунгицида. Таким образом, из четырех исследованных фунгицидов (беномил, фамоксадон и цимокса-

нил (1:1), пропинеб, манкоцеб) только беномил оказался эффективным в борьбе с грибной контаминацией культуры микроводоросли *E. gracilis*.

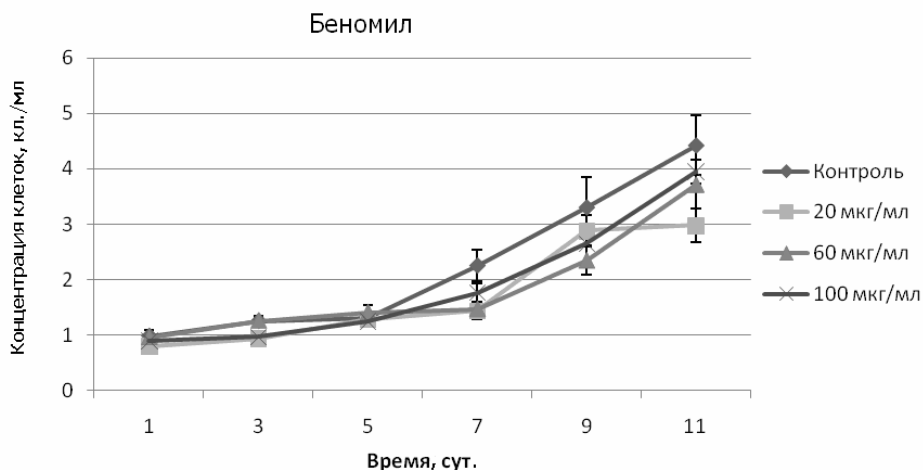


Рис. 3. Кривые роста культуры клеток *Euglena gracilis* в присутствии разных концентраций беномила и суспензии без него (контроль)

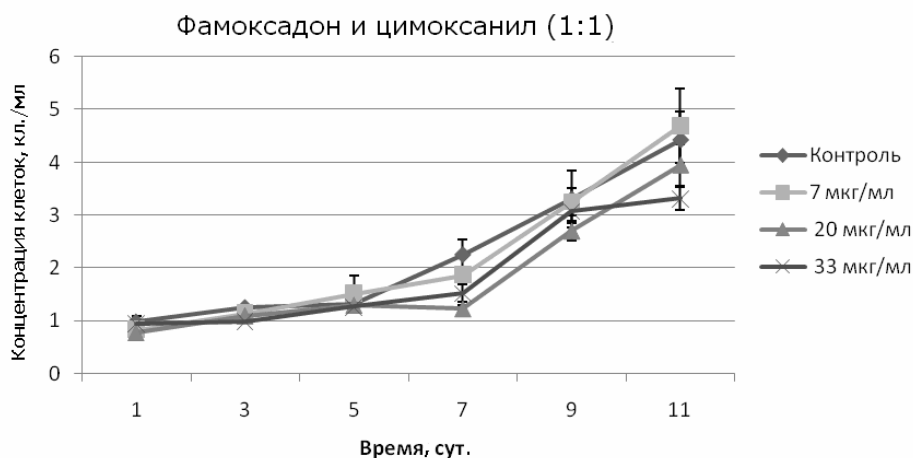


Рис. 4. Кривые роста культуры клеток *Euglena gracilis* в присутствии разных концентраций смеси фамоксадона с цимоксанилом и в суспензии без добавления фунгицидов (контроль)

Действующие вещества изученных препаратов имеют как контактный, так и системный механизм действия, причем при применении первых у грибов не отмечено возникновение резистентности. В то же время, частое использование системных фунгицидов увеличивает веро-

ятность привыкания к ним грибов и, как следствие, снижение их фунгицидного действия.

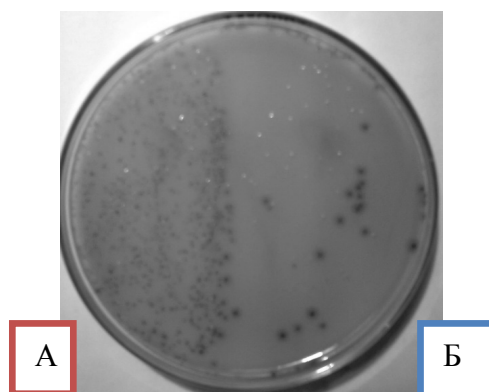


Рис. 5. Чашка Петри с высеванными на нее аликвотами (10 мкл) суспензий с фунгицидами разных концентраций: А – фамоксадон и цимоксанил (1:1) – 20 мкг/мл; Б – беномил – 60 мкг/мл

Выводы

1. Фунгициды контактного действия пропинеб и манкоцеб убивают клетки микроводоросли *Euglena gracilis* в концентрации, недостаточной для подавления роста грибов и прорастания спор.

2. Фунгициды, объединяющие контактные и системные свойства, беномил и фамоксадон с цимоксанилом (1:1) существенно не влияют на рост культуры *E. gracilis*. Так, фамоксадон и цимоксанил (1:1) в концентрациях 7–33 мкг/мл не ингибируют прорастание спор и спороношение грибов, а фунгицид беномил в концентрациях 20–100 мкг/мл существенно ингибирует прорастание спор грибов, задерживая спороношение.

3. Беномил в концентрациях 60–100 мкг/мл может быть рекомендован для очистки культур *E. gracilis* от микотического загрязнения.

Громов Б.В. Микроорганизмы – паразиты водорослей. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1976. – 160 с.

Abeliovich A., Dikbuck S. Factors affecting infection of *Scenedesmus obliquus* by a *Chytridium* sp. in sewage oxidation ponds // Appl. Environ. Microbiol. – 1977. – 34, N 6. – P. 832–836.

Andersen R.A. et al. Algal culturing techniques. – London: Elsevier Acad. Press, 2005. – 578 p.

- Hoffmeister M., van der Klei A., Rotte C. et al.* *Euglena gracilis* rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 21. – P. 22422–22429.
- Ma J., Wang P., Chen J. et al.* Differential response of green algal species *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* to six pesticides // *Polish J. Environ. Stud.* – 2007. – **16**, N 6. – P. 847–851.
- Mahan K.M., Odom O.W., Herrin D.L.* Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // *BioTechn.* – 2005. – **39**. – P. 457–458.
- Summerbell C. Richard.* The benomyl test as fundamental diagnostic method for medical mycology // *J. Clinic. Microbiol.* – 1993. – **31**, N 3. – P. 572–577.
- Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y. et al.* Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* // *Biotechnol. and Bioeng.* – 1997. – **53**. – P. 185–190.

Получена 03.01.2012

Рекомендовала к печати О.Н. Виноградова

V.M. Mokrosnop, E.K. Zolotareva

N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS Ukraine,
2, Tereshchenkovskaya St., 01601 Kiev, Ukraine

THE EFFECT OF SELECTED FUNGICIDES ON GROWTH OF *EUGLENA GRACILIS* KLEBS (*EUGLENOPHYTA*) CULTURE

Culture of *Euglena gracilis* growing mixotrophically is subject to fungal infection. 4 fungicides which widely used in agriculture to protect plants against fungal infections were tested for suppression of the development of spores or mycelia of pathogenic fungi in the *E. gracilis* culture. It was analyzed the effect of propineb, mancozeb, benomyl and the mixture (1:1) of famoxadon and cymoksanil added to the liquid and agar mineral nutrient medium containing glutamic acid as an exogenous carbon source. It is shown that the contact fungicides propineb and mancozeb in tested concentrations kill algal cells but do not suppress the growth of fungi. Benomyl, as well as a combined preparation of famoxadon and cymoksanil (1:1), inhibits the growth of fungi and did not suppress the cell growth of microalgae *E. gracilis*. The experiments, directed to detection of the viability of spores in the culture suspensions, showed that only benomyl at concentrations which do not affect the growth of microalgae, significantly reduces the number of viable spores. Thus, as a result of the study, it was found that benomyl at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ is of potential value in eliminating fungal contaminants from culture of *E. gracilis*.

Key words: *Euglena gracilis*, fungicides, benomyl, microfungus contamination.