

БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ ЗА ПО-ДОБРО БЪДЕЩЕ

Юбилеен сборник, посветен на
50-годишнината от основаването
на Пловдивския университет
„Паисий Хилендарски“



УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
UNIVERSITY OF PLOVDIV „PAISII HILENDARSKI“
ЮБИЛЕЕН СБОРНИК • 2012 • 237–249
БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ ЗА ПО-ДОБРО БЪДЕЩЕ

АНАЛИЗ НА ВОДИТЕ НА ЯЗОВИРИТЕ „КРУШОВИЦА“, „ЕНИЦА“ И „ВЪЛЧОВЕЦ“ (СЕВЕРНА БЪЛГАРИЯ) ЗА НАЛИЧИЕ НА ЦИАНОТОКСИНИ

Пламен Стоянов, Детелина Белкинова,
Румен Младенов, Иванка Тенева

Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“
Биологически факултет, Катедра „Ботаника“

РЕЗЮМЕ

Настоящото изследване представя данни за доминиращите видове *Cyanoprokaryota* и резултати от токсикологичния анализ по отношение на наличие на цианотоксини в три сравнително малки язовира на територията на област Плевен (Северна България), а именно язовирите „Крушовица“, „Вълчовец“ и „Еница“. Цианопрокаримите видове *Planktothrix agardhii*, *Anabaena spiroides* и *Aphanizomenon flos-aquae*, съобщавани многократно като продуценти на хепато- и невротоксини, са доминиращи в изследваните водни басейни с цъфтежни концентрации от 1,03 mg/L до 10,5 mg/L. Анализът на водните проби за наличие на цианотоксини е проведен с помощта на ELISA кит за микроцистини/нодуларини, ELISA кит за сакситоксини, HPLC, както и *in vitro* тестове за цитотоксичност. Отчетено е наличие на микроцистини/нодуларини в пробите от язовир „Еница“ и „Крушовица“ и сакситоксини в пробата от язовир „Вълчовец“.

Ключови думи: *Cyanoprokaryota*, цианотоксини, язовири, повърхностни води.

ВЪВЕДЕНИЕ

От няколко десетилетия насам масовите „цъфтежи“ на цианопрокароти в сладките и солените водни басейни по света са обект на интензивни наблюдения и изследвания. Една от причините за този засилен интерес е способността на някои представители от тази група водорасли да продуцират хепатотоксини, невротоксини или дерматотоксини, които при цъфтеж могат да достигнат концентрации, представляващи истинска заплаха за водните организми и здравето на човека (Van Apeldoorn et al., 2007). Това налага необходимостта от мониторинг както на цъфтежите, така и на наличието на цианотоксини във водите, използвани за питейни нужди, напояване, риболов или отдих.

Данните за наличието на цианотоксини от сладководните басейни в България, включително и язовири, са ограничени. Има данни за наличието на микроцистини във водни проби от 15 български язовира и езера (Pavlova et al., 2006). Данните показват, че концентрацията на микроцистини (MC-LR, MC-RR и MC-YR) в биомасата варира от 8 до 1070 µg/g (d. w.). Проучвания на фитопланктона и контрола на цианотоксини в язовир „Тракиец“ са показали наличието на сакситоксини (0,01 ng/mL), както и на микроцистини (0,18 µg/L) в събраните водни проби (Teneva et al., 2009).

Анатоксин-а, микроцистини и сакситоксини са детектирани във водни проби от язовир „Боровица“ и язовир „Въча“ (Teneva et al., 2010a; Teneva et al., 2010b) – и двата използвани като източници на питейна вода.

Настоящото изследване представя данни за доминиращите видове *Cyanoprokaryota* и резултати от токсикологичния анализ по отношение на наличие на цианотоксини в три сравнително малки язовира на територията на област Плевен (Северна България), които са част от ресора на Басейнова дирекция „Дунавски район“, а именно язовирите „Крушовица“, „Вълчовец“ и „Еница“. И трите язовира са обект на стопански и любителски риболов, а язовир „Вълчовец“ е от голямо значение за водоснабдяването на градовете Долна Митрополия и Тръстеник, село Победа и квартал „Сторгозия“ в Плевен.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Описание на язовирите и физикохимичен анализ на водата

И трите язовира, обект на настоящото изследване, спадат към езерен тип L₁₆. Язовир „Еница“ е разположен на надморска височина от 130 метра. От трите язовира той е най-дълбокият (34 метра максимална дълбочина) и най-голям по площ (4,43 км²). Язовирите „Вълчовец“ и „Крушовица“ заемат площ от съответно 0,65 и 0,5 км² и се характеризират с надморска височина от 89 метра (яз. „Вълчовец“) и 111 метра (яз. „Крушовица“).

Физикохимичните параметри, включително температура на водата, рН, общото количество на азот и фосфор, са измерени с помощта на фотометър pHotoFlex® (WTW GmbH, Weilheim, Германия) на място (в момента на събиране на пробите) или в лабораторията.

Колекциониране на проби и анализ на фитопланктона

За качествен анализ на фитопланктона пробите бяха събирани в периода 4 – 05 юли 2009 г. от повърхностния слой (0,5 м) с помощта на планктонна мрежа и съхранявани в 4% формалдехид. За количествен анализ на фитопланктона пробите бяха събирани в Майерови шишета от 1 л и запазени в Луголов разтвор. Фитопланктонните анализи са проведени както върху свежи, така и върху консервирани (в 4% формалдехид) проби чрез инвертен микроскоп (PZO, Полша) съгласно с методиката на Lund et al. (1958), като са използвани седиментационни камери за утаяване и определяне на фитопланктона и оценка на клетъчната плътност.

Водните проби за химически и токсикологични анализи бяха събрани по същото време и от едно и също място, както фитопланктонните проби.

In vitro тестове за цитотоксичност

За *in vitro* изследване на токсичния потенциал на водните проби беше използвана една комерсиална клетъчна линия от бозайници – HeLa (човешки цервикални епителни аденокарциномни клетки, ECACC 91100402).

HeLa клетките бяха култивирани при 37°C, висока влажност и 5% CO₂ в 75 см³ маграчета в DMEM среда (Gibco™, Paisley, Scotland, UK), допълнена с 10% инактивиран чрез загряване телешки серум (FCS; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 100 U/ml пеницилин и 100 µg/ml стреп-

томицин (Sigma, Steinheim, Germany). Трипсинизирането и субкултивирането бяха проведени в съответствие с протоколи от Invitox (The Ergatt/Frame, 1990, 1992). Преди залагането на клетките в плаки жизнеността им бе отчетена с трипан блу-тест (Berg et al., 1972).

Преди третирането клетките бяха заложени в 96-гнездни плаки с гъстота $1,5 \times 10^4$ в 200 μ l DMEM среда с 10% FCS. След 24 часа средата бе заменена с 10% от тестразтвор (водна проба). Към контролните клетки бе добавено еквивалентно количество йонизирана вода. Клетките бяха третирани в продължение на 24 и 48 часа, след което бе проведен МТТ тест за цитотоксичност.

МТТ изследването бе проведено в съответствие с метода, описан от Edmondson et al. (1988). Този метод се базира на способността на митохондриалната дехидрогеназа да превръща разтворимата жълта тетразолиева сол в неразтворим пурпурно-син формазанов продукт. След определеното време за третиране на клетките с водните проби (24 или 48 часа) във всяко гнездо бяха добавени директно 20 μ l от 0,5%-овия разтвор МТТ и плаката бе инкубирана за 3 – 4 часа на тъмно при 37°C. След инкубирането средата заедно с неусвоеното багрило бе аспирирана. С цел да се улесни разтварянето на формазановия продукт към всяко гнездо бяха добавени 100 μ l DMSO. Плаката бе поставена за кратко на шейкър, след което бе измерена абсорбцията при 570 nm.

Анализ за наличие на цианотоксини чрез HPLC

HPLC хроматографията беше проведена с помощта на система ÄKTApurifier® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) и софтуер UNICORN V5.11. Използвана бе аналитична колона Discovery® C18 (5x4mm I.D. 5 μ m) от Supelco (Bellafonte, PA, USA). Мобилната фаза бе смес от разтвор А (10 mM амониев ацетат, pH 5,5) и разтвор Б (10 mM амониев ацетат : ацетонитрил, 80:20, v/v) както следва: 0% от Б в нулева минута, 100% от Б от 45-ата до 65-ата минута при използване на линеарен градиент. Скоростта бе 0,8 mL/min, а UV детекцията бе проведена при 238 nm. Всички анализи бяха проведени при стайна температура. Колоната бе калибрирана между отделните анализи с 8 mL от разтвор А. Всеки стандарт бе анализиран самостоятелно (Nodularin 5 μ g/ml, MC-LR 5 μ g/ml, STX 40,5 μ g/ml, 200 μ l инжектиран обем), както и смес от всички стандарти със същата концентрация в 200 μ l. Инжектираният в системата обем от всяка проба за HPLC анализ бе 200 μ l. Пиковите на пробите бяха сравнени с тези от стандартите на база времето на детекция на пика.

Анализ за наличие на цианотоксини чрез ELISA

Сакситоксини

Пробите бяха анализирани чрез Ridascreen™ ELISA кит за детекция на сакситоксини (R-Bopharm, Darmstadt, Germany). Това е конкурентен ELISA метод за количествен анализ на сакситоксини. Дъното на микротитърната плака при този кит е покрито със слой антитела срещу сакситоксини. Към плаката бяха добавени стандарти, проби и ензиммаркиран сакситоксин. Свободният и ензиммаркираният сакситоксин се конкурират за местата за свързване на антителата. Несвързаният ензиммаркиран сакситоксин беше отмит при една от работните стъпки. Доказателството за наличие на този вид токсин в пробите идва след добавяне на субстрат и хромоген. Свързаният ензим-конюгат превръща безцветния хромоген в цветен краен продукт. Фотометричното измерване бе извършено при 450 nm. Екстинкцията на разтвора е обратнопропорционална на концентрацията на токсина в пробата. Границата на детекция на кита е 0,010 ppb (μ g/L).

Микроцистини и нодуларини

Анализът на водните проби за наличието на микроцистини и нодуларини беше осъществен с помощта на Microcystins ELISA кит (Abraxis LLC, Warminster, PA). Както и при ELISA кита за детекция на сакситоксини, това е конкурентна имуносорбентна ELISA за количествен анализ на микроцистини и нодуларини във водните проби. Границата на детекция на Microcystins ELISA кита е 0,10 ppb (μ g/L).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Физикохимични параметри

Видовата композиция и сезонната вариация на фитопланктона се определят от взаимодействието между физичните и химичните фактори на околната среда (например температура, pH, електропроводимост, разтворен кислород, азотни съединения, общ азот, органофосфати, общ фосфор, прозрачност и мътност на водата), които също са обект на настоящото изследване и чиито стойности и/или отношения дават важна информация за екологичното състояние на водния басейн. Въпреки че причините, предизвикващи „цъфтежа“ както на токсични, така и на нетоксични видове, не са достатъчно добре изучени, се предполага, че фактори като наличие на азот и фосфор, температура, светлина, микро-

елементи (Fe, Mo), рН и алкалност, хидрологични и метеорологични условия повлияват появата на цъфтежи. В Таблица 1 са представени физикохимичните параметри на изследваните язовири, отношението общ азот към общ фосфор, Catalan индексът и TSI индексът, които са показателни за екологичното състояние на тези водни басейни.

И при трите язовира отношението TN/TP е < 14, което говори за лимитиране на азота на ниво съобщество. Трофичният индекс (TSI), който е показател за биологична продуктивност на даден воден басейн, е в рамките на 65 – 75, което ни дава основание да определим (според класификацията на Carlson) язовирите „Крушовица“ и „Вълчовец“ като еутрофични басейни, а язовир „Еница“ – като воден басейн, характеризиращ се като хипертрофичен в периода на изследването. Някои автори считат, че еутрофикацията на водните басейни води до „цъфтеж на водата“. Имайки предвид това, можем да кажем, че данните, отнасящи се до трофичния статус на изследваните от нас язовири, са в корелация с отчетените в периода на изследването „цъфтежи“ на синьо-зелени водорасли (Таблица 2).

Таблица 1. Физикохимични параметри на водата в язовирите „Крушовица“, „Вълчовец“ и „Еница“ (2009 г.)

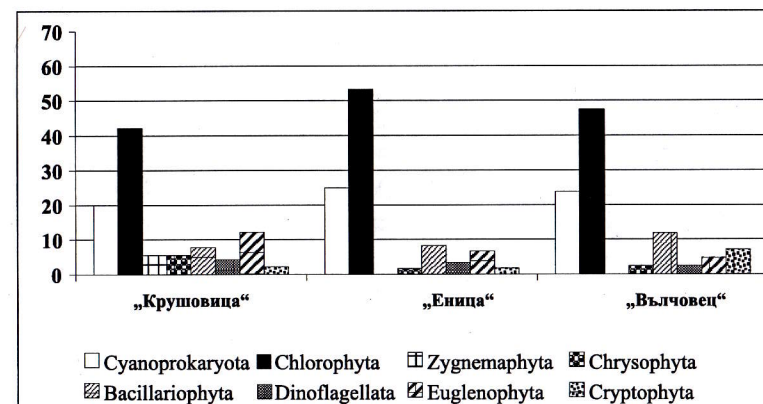
Язовир	Тип	Прозрачност (м)	Хл (мг/л)	Т (°C)	рН	рO ₂	%рO ₂	TP	TN	TN/TP	TSI index	Catalan index
„Крушовица“	L ₁₆	0,6	22,6	11,2	9,29	11,9	111	0,112	0,8	7	67	3,22
„Вълчовец“	L ₁₆	0,7	9,15	10,2	8,96	7,9	70	0,078	0,9	12	65	3,59
„Еница“	L ₁₆	0,35	68,7	9,2	8,02	4,9	44	0,187	2,1	11	75	10,77

Таксономичен състав и структура на фитопланктона в изследваните язовири с акцент върху представителите на отдел *Cyanoprokaryota*

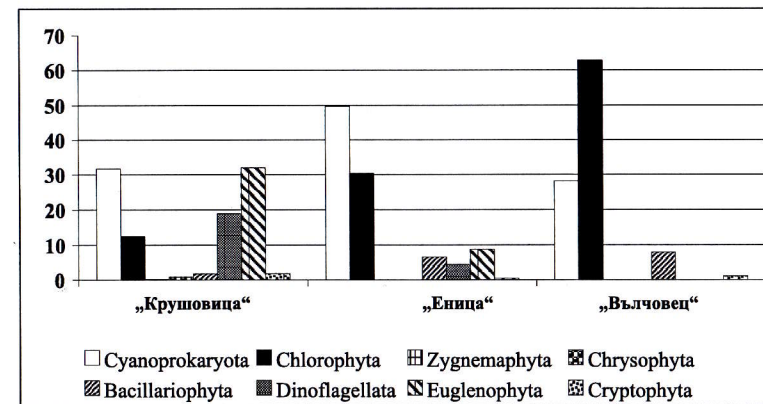
Относителното обилие на фитопланктона в трите изследвани от нас водни басейна е представено на Фиг. 1 и Фиг. 2. Анализът на структурата на фитопланктона показва наличие на водорасли, принадлежащи към 7 отдела, а именно: *Cyanoprokaryota*, *Chlorophyta* (включително и *Zygnemaphyceae*), *Dinoflagellata*, *Euglenophyta*, *Bacillariophyta*, *Cryptophyta* и *Chrysophyta*. Впечатление прави сравнително високият процент представители на отдел *Cyanoprokaryota* спрямо другите отдели водорасли

– 23% за язовир „Вълчовец“, 32% за язовир „Крушовица“ и 49% за язовир „Еница“. Доминиращите видове от отдел *Cyanoprokaryota*, голяма част от които са в цъфтежни концентрации (Таблица 2), са и многократно съобщавани като потенциални продуценти на токсини.

Тяхното наличие в изследваните от нас язовири, и то в цъфтежни концентрации в рамките 1,03 – 10,5 mg/L, обяснява и детектираните в хода на изследването цианотоксини.



Фигура 1. Относително обилие на фитопланктона (брой видове, %)



Фигура 2. Относително обилие на фитопланктона (биообем, %)

Таблица 2. Видов състав и количествена характеристика на *Cyanooprokaryota*

Язовир (дата на колекциониране на пробата)	Цианопрокаротионни видове (видове в цъфтеж)*	Биомаса (mg/L)	Степен на цъфтеж
„Крушовица“ (04.10.2009)	<i>Planktothrix agardhii</i> (*)	2,62	II-ра
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	-	-
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-
„Вълчовец“ (04.10.2009)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	-	-
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-
„Еница“ (05.10.2009)	<i>Planktothrix agardhii</i> (*)	10,5	II-ра
	<i>Anabaena spiroides</i> (*)	2,36	I-ва
	<i>Microcystis flos-aquae</i> (*)	1,71	I-ва

Токсичност на водните проби *in vitro*

За отчитане на цитотоксичната активност на водните проби, колекционирани през периода на изследването, бе използвана човешка цервикална епителна аденокарциномна клетъчна линия (HeLa). Продължителността на експозиция на клетките бе 24 и 48 часа. Клетките реагираха по различен начин на третирането с 10% водни проби в зависимост от времето на експозиция. Данните (Фиг. 3) показват липса на токсичен ефект след 24-часово третиране на клетките с водна проба и слаб цитотоксичен ефект в рамките на 15 – 20% и при трите язовира след 48-часова експозиция.



Фигура 3. Цитотоксичен ефект на водните проби върху клетки *in vitro*

Анализ на водните проби за присъствие на цианотоксини

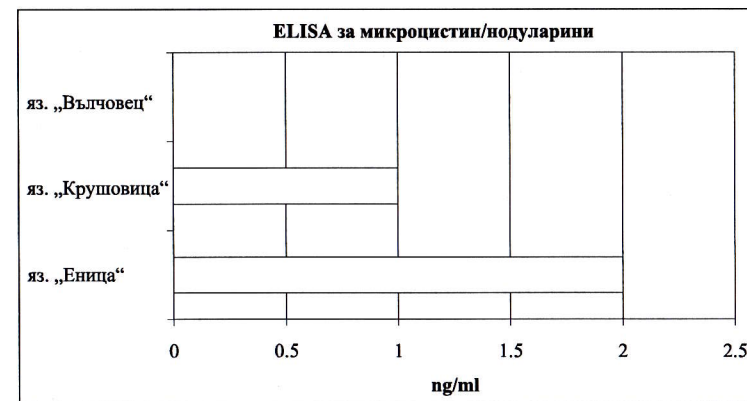
Колекционираните водни проби бяха тествани за наличие на цианотоксини чрез използването на два метода – ELISA и HPLC.

ELISA метод

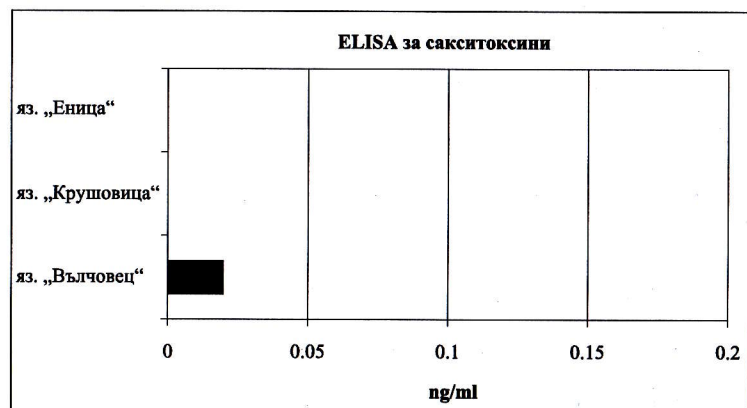
Проведените ELISA тестове отчетоха наличие на микроцистини/нодуларини в пробите, събрани от язовир „Крушовица“ и язовир „Еница“ в концентрации съответно 1 и 2 ng/ml (Фиг. 4) и сакситоксини в пробата от язовир „Вълчовец“ с концентрация 0,02 ng/ml (Фиг. 5). Детектираните хепатотоксини са продуцирани най-вероятно от цианопрокаротионните видове в цъфтеж: *Planktothrix agardhii*, *Anabaena spiroides* и *Microcystis flos-aquae*, както и *Aphanizomenon flos-aquae* и *Microcystis aeruginosa*, макар и в концентрации под стойността на цъфтежните. Наличието на сакситоксини в пробата от язовир „Вълчовец“ можем да обясним с описаните там цианопрокаротионни видове *Aphanizomenon flos-aquae* и *Cylindrospermopsis raciborskii*.

HPLC метод

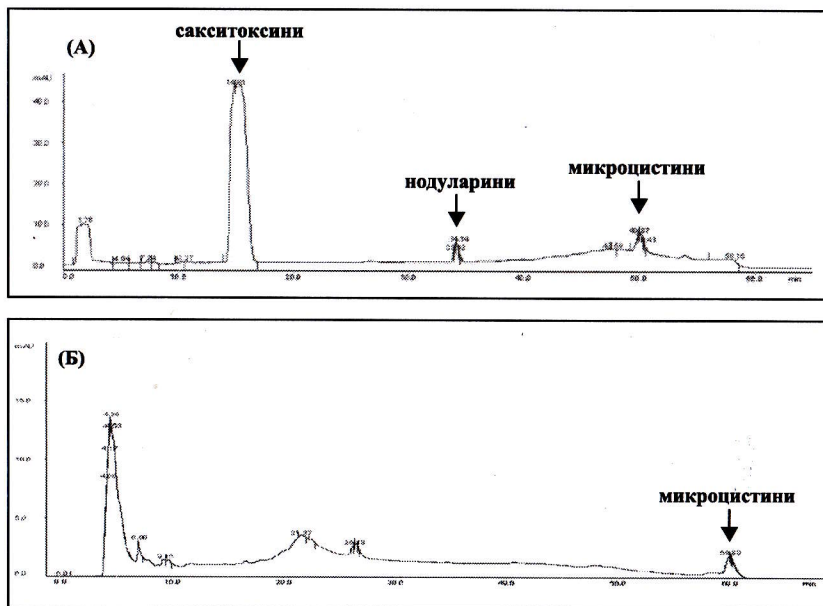
Анализът чрез HPLC показва наличие на различни изомерни форми на микроцистин във водните проби, колекционирани от язовирите „Крушовица“ и „Еница“ и сакситоксини в пробата от язовир „Вълчовец“. Това потвърждава детектираните чрез ELISA метода три групи токсини.



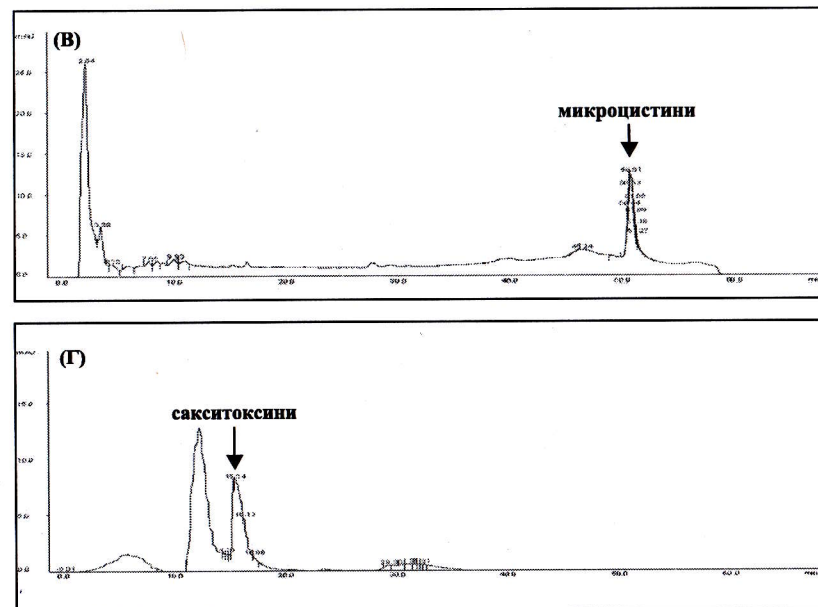
Фигура 4. Наличие на микроцистини/нодуларини (ng/ml) във водните проби, колекционирани през 2009 г. и тествани чрез ELISA китове



Фигура 5. Наличие на сакситоксини (ng/ml) във водните проби, колекционирани през 2009 г. и тествани чрез ELISA китове



Фигура 6. HPLC хроматограма на: (А) стандарти на цианотоксини; (Б) водна проба, колекционирана през 2009 г. от язовир „Крушовица“;



Фигура 6. HPLC хроматограма на: (B) водна проба, колекционирана през 2009 г. от язовир „Еница“; (Г) водна проба, колекционирана през 2009 г. от язовир „Вълчовец“

На Фигура 6 е представена HPLC хроматограмата на стандартите, където са включени сакситоксини, нодуларини и микроцистин-LR, както и хроматограми на тестваните водни проби.

За язовирите на територията на България подобни изследвания са много ограничени. Като се има предвид важността на проблема, настоящото проучване представлява съществен принос за оценка на качеството на повърхностните води в България.

ЛИТЕРАТУРА

Berg, T., Boman, D., Selgen, P. O. 1972. Induktion of tryptophan oxygenase in primary rat liver cell suspensions by glucocorticoid hormone. *Exp. Cell Res.* 72: 571 – 574.

Edmondson, J. M., Armstrong, L. S., Martinez, A. O. 1988. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J. Tissue Cult. Meth.* 11: 15 – 17.

Invitox: The Ergatt/Frame., 1990. The frame cytotoxicity test. Protocol 3b.

Invitox: The Ergatt/Frame., 1992. DataBank of *in vitro* techniques in toxicology. Protocol 46.

Lund, J. W. G., Kipling, C., Le Cren E. D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting, *Hydrobiologia* 11: 143 – 170.

Pavlova, V., Babica, P., Todorova, D., Bratanova, Z., Marsalek, B. 2006. Contamination of some reservoirs and lakes in Republic of Bulgaria by microcystins. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 34: 437 – 441.

Teneva, I., Belkinova, D., Dimitrova-Dyulgerova, I., Mladenov, R. 2009. Phytoplankton assemblages and monitoring of cyanotoxins in Trakiets reservoir. *Scientific Researches of the Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv, Series B. Natural Sciences and the Humanities, Vol. XII*, 244 – 249. ISSN 1311 – 9192.

Teneva, I., Belkinova, D., Dimitrova-Dyulgerova, I., Vlaknova, M., Mladenov, R. 2010a. Composition and toxic potential of Cyanoprokaryota in Vacha Dam (Bulgaria). – *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(2SE): 26 – 32.

Teneva, I., Mladenov, R., Belkinova, D., Dimitrova-Dyulgerova, I., Dzhambazov, B. 2010b. Phytoplankton community of the drinking water supply reservoir Borovitsa (South Bulgaria) with an emphasis on cyanotoxins and water quality. *Cent Europ J Biol*, 5: 231 – 239.

Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J., Bakker, G. J. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 7 – 60.

ANALYSIS OF THE WATER IN THE RESERVOIRS KRUSHOVITSA, ENITSA AND VALCHOVETS (NORTHERN BULGARIA) FOR PRESENCE OF CYANOTOXINS

*Plamen Stoyanov, Detelina Belkinova,
Rumen Mladenov, Ivanka Teneva**

*University of Plovdiv „Paisiy Hilendarski“, Bulgaria
Faculty of Biology, Department of Botany
Plovdiv, 24, Tsar Asen Str.*

**Corresponding author: Ivanka Teneva, e-mail: teneva@uni-plovdiv.bg*

ABSTRACT

This study presents data on the dominant species Cyanoprokaryota and results from performed toxicological analysis of the water regarding presence of cyanotoxins in three relatively small reservoirs located in Pleven district (Northern Bulgaria): Krushovitsa reservoir, Valchovets reservoir and Enitsa reservoir. Cyanoprokaryotic species *Planktothrix agardhii*, *Anabaena spiroides* and *Aphanizomenon flos-aquae*, reported repeatedly as producers of hepato- and neurotoxins, were dominant in the studied reservoirs with bloom concentrations from 1,03 mg/L to 10,5 mg/L. Analysis of the water samples for presence of cyanotoxins was conducted using ELISA kits for microcystins/nodularins and for saxitoxins, HPLC, as well as *in vitro* cytotoxicity tests. Microcystins/nodularins were detected in the water samples collected from Enitsa reservoir and saxitoxins were found in the water samples from Valchovets reservoir.

Key words: *Cyanoprokaryota, cyanotoxins, water reservoirs, surface water*