

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2019, 29(3): 267–277

<https://doi.org/10.15407/alg29.03.267>

ГОЛЬДИН Е.Б.

Русское географическое общество, Санкт-Петербург 190000, Россия

Общество микробиологов Украины им. С.М. Виноградского,

154, ул. Академика Д.К. Заболотного, Киев 03680, Украина

Evgenygoldin5@gmail.com

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ГИСТОПАТОЛОГИЯ У НАСЕКОМЫХ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ПИТАНИЯ

Изучено влияние различных составляющих биологической активности цианобактерий на членистоногих с различным типом питания. В исследованиях использованы патогистологические методы. Установлено, что цианобактерии обладают избирательным действием на членистоногих в зависимости от типа питания. Их влияние носит сложный, многосторонний и противоречивый характер. В модельных опытах с использованием альгологических, энтомологических и гистологических методов прослеживались гистопатологические отклонения от нормы у тест-объектов с различным типом питания (например, полифага – американской белой бабочки и олигофага – колорадского жука). Бицидная активность цианобактерий определяет общий ингибирующий эффект, включающий в основном токсичную и детеррентную составляющие, которые вызывают необратимые изменения, прежде всего, в пищеварительном тракте и других органах. Сравнительный анализ действия цианобактерий выявил некоторые различия в гистопатологических изменениях у тест-объектов, в первую очередь, в среднем отделе кишечника и жировом теле. Это обусловлено различной морфологической структурой защитных систем у полифагов и олигофагов, однако во всех случаях в результате проникновения токсичных и/или биологически активных веществ цианобактерий наблюдается деградация и некроз пищеварительной системы. У американской белой бабочки патологические изменения происходят быстрее и чаще, чем у колорадского жука, и разрушительное действие наступает в течение 5–7 дней. Американская белая бабочка более восприимчива к действию цианобактерий, чем колорадский жук. Распад пищеварительной системы влечет за собой необратимые аномальные изменения в выделительной системе обоих тест-объектов. Эти процессы представляют собой часть общего ингибирования жизненных ритмов у членистоногих. Бицидные свойства цианобактерий можно определить, скорее, как детеррентные, чем токсичные.

Ключевые слова: бицидная активность, жировое тело, патологическая гистология, питание, средняя кишка, цианобактерии, членистоногие

© Гольдин Е.Б., 2019

Введение

Биологически активные вещества цианобактерий занимают особое место в функционировании водных экосистем, однако ученые придерживаются различного мнения относительно роли альгометаболитов в природе. Существует широкий спектр многосторонних симбиотических, антагонистических и паразитических связей между цианобактериями и растительноядными членистоногими («grazers»), зависящих от комплекса эколого-биохимических взаимоотношений. Разнообразные и многогранные явления, существующие в системе «цианобактерии – членистоногие» порождают ряд их интерпретаций. Многие авторы приводят доказательства защитной роли веществ, продуцируемых цианобактериями, и их заметных отличий от известных токсинов, которые поражают теплокровные организмы и различные гидробионты во время «цветения» воды и «красных приливов» (Amsler, 2008; Berry et al., 2008; Ger et al., 2016). Биоцидная активность цианобактерий вызывает всевозможные избирательные и многоплановые проявления у членистоногих, связанные с их трофическими особенностями. Этот процесс имеет сложную и неоднородную природу: метаболиты цианобактерий являются источником стрессовых, тератогенных, репеллентных и детеррентных эффектов. Они влияют на питание, поведение и, в конечном итоге, на выживаемость членистоногих, но не всегда приводят к их гибели (Shaw et al., 1997; Jüttner et al., 2001). По сути, вторичные метаболиты цианобактерий обладают защитным действием, оказывая значительное влияние на жизненные функции конкурентных и/или растительноядных организмов (Гольдин, 2013). Комплексный характер взаимоотношений между цианобактериями и членистоногими-фитофагами имеет большое значение для наземных и водных экосистем.

В данной работе мы попытались определить роль разных векторов биоцидной активности цианобактерий по отношению к членистоногим, используя патогистологическое направление в альгологических исследованиях. Предложенный подход оправдан рядом причин. Гистопатологическое изучение изменений в организме членистоногих с использованием цианобактерий позволяет понять сущность воздействия возможных факторов, определяющих процессы ингибирования жизненных функций фитофагов и/или их смертности, как и механизмы межвидовых отношений в природе.

Применение гистологических методов имеет очевидные преимущества. В частности, можно проследить происходящие процессы в нескольких сферах: 1) изучить действие цианобактерий на организм членистономого в динамике; 2) выявить стадии в состоянии тест-объекта по происходящим изменениям; 3) определить аспекты развития патологического процесса у различных видов; 4) оценить действие отдельных компонентов в комплексном влиянии цианобактерий и их

метаболитов; 5) идентифицировать видовую специфику в проявлении активности цианобактерий, включая уровень восприимчивости тест-объектов, тип питания и т.д.

Мы провели ряд модельных опытов по изучению гистологических отклонений от нормы у тест-объектов с разным типом питания:

– полифаг американская белая бабочка *Huphantria cunea* Drury: в рационе вида 636 различных растений, это рекорд в мире насекомых (Worth, 2009);

– олигофаг колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say: питается только на пасленовых Solanaceae.

Материалы и методы

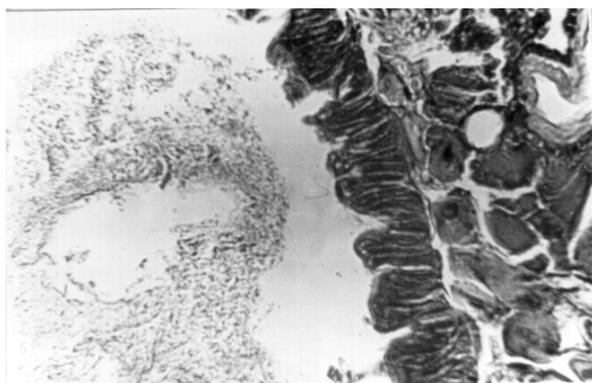
Листья наиболее типичных растений-хозяев (клен ясенелистный [*Acer negundo*] *Acer negundo* L. для американской белой бабочки и картофель *Solanum tuberosum* L. для колорадского жука) опрыскивали водными суспензиями (0,5 и 1,0%) сухого порошка на основе цианобактерий (*Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenk. из днепровских местообитаний). Для получения экспериментальных образцов биомассу цианобактерий обрабатывали тепловым (37 °С), лиофильным или ацетоновым способами и перемалывали. Контрольным особям скармливали необработанные листья. Для определения биоцидной активности цианобактерий наблюдали за питанием (% потребленной листовой поверхности в расчете на одну особь), пищевой реакцией, ростом, метаморфозом и выживаемостью личиночных стадий второго возраста. Параллельно в течение 7 сут проводили гистопатологические исследования. Растительных насекомых собирали в природе и помещали в стеклянные сосуды объемом 1 л, по 10–15 особей в каждом.

Обезглавленные личинки фиксировали в растворе Буэна в течение 24 ч, затем отмывали в 70-градусном этаноле до полной прозрачности и обезжировали, проводя через серию спиртов (80°, 90°, по 3 ч; 96°, абсолютный, по 6–12 ч). Полученный материал обрабатывали с использованием стандартной гистологической техники: выдерживали в спирте и ксилоле (15–30 мин), пропитывали смесью парафина с ксилолом (1 : 1), помещали в парафин, готовили серию срезов (5–6 мкм) и окрашивали гематоксилин-эозином. Некоторые препараты окрашивали по Ван-Гизону, например для изучения состояния мышечных волокон (Ромейс, 1953; Кисели, 1962).

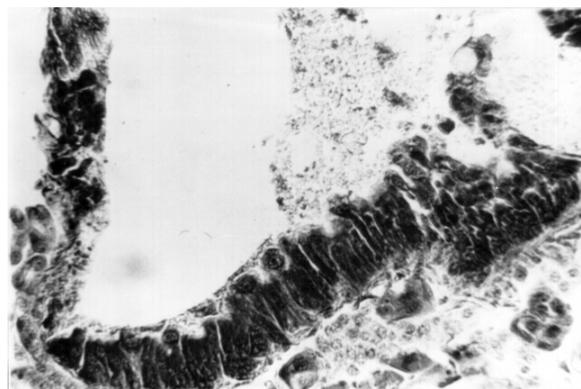
Результаты и обсуждение

В данной работе мы попытались определить природу механизма патологического процесса у насекомых с разным типом питания. Биоцидное действие цианобактерий показало специфический общий ингибирующий эффект, включающий преимущественно детеррентный и

токсический компоненты, и приводящий к необратимым изменениям в пищеварительном тракте и других органах. Их сравнительный анализ позволил выявить некоторые различия в гистопатологии наблюдаемых тест-объектов. В первые дни экспериментов процессы десквамации эпителия средней кишки были выражены в большей степени у колорадского жука, чем у американской белой бабочки. Это происходит благодаря более совершенной защитной системе у полифагов, чем у олигофагов. Об этом свидетельствует обилие бокаловидных клеток у американской белой бабочки. С другой стороны, у колорадского жука отсутствует перитрофическая мембрана, поэтому биологически активные вещества цианобактерий находятся в непосредственном контакте с эпителием средней кишки (рис. 1).



А



Б

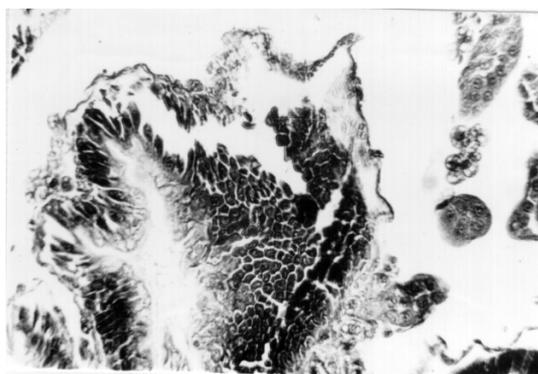
Рис. 1. Средняя кишка колорадского жука: А – структура средней кишки в норме, 16×6,3, окраска по Ван-Гизону; Б – патологическая деградация: десквамация эпителия, обнажение мышечного слоя и разрушение стенки кишки на 7-е сут опыта. Объектив ×16, окуляр ×6,3, окраска по Ван-Гизону

У американской белой бабочки развитие патологического процесса носит иной характер, чем у колорадского жука. Питание личинок обработанным кормом коррелирует с необратимыми изменениями в

средней кишке (рис. 2). На 3-и сут эксперимента десквамация эпителия в средней кишке выражена слабее, но отмечена значительная гиперсекреция в кишечнике, в этом случае число бокаловидных клеток увеличивается. На 5-е сут патологические изменения усиливаются: десквамация эпителия средней кишки прогрессирует одновременно с повышением уровня гиперсекреции. На 7-е сут деструктивный процесс разрушения средней кишки интенсифицируется до полной десквамации эпителия и обнажения мышечного слоя (см. рис. 2).



А

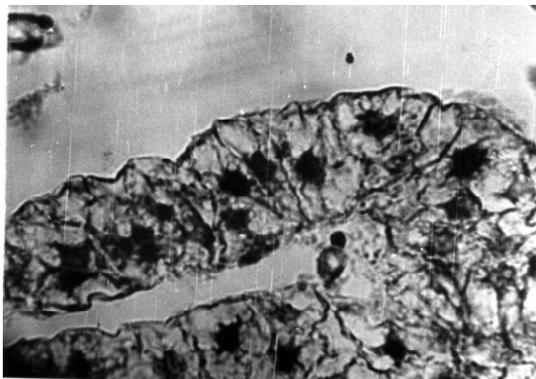


Б

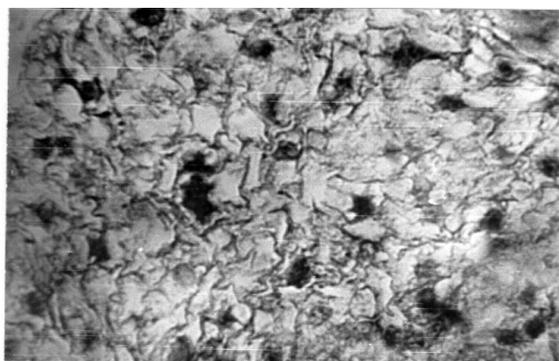
Рис. 2. Сравнительное гистологическое состояние средней кишки американской белой бабочки: *А* – структура в норме, эпителиальная выстилка представлена цилиндрическими и бокаловидными клетками; *Б* – патологическая деградация: пролиферация, десквамация эпителия и разрушение мышечного слоя. Объектив $\times 16$, окуляр $\times 6,3$, окраска по Ван-Гизону

Кроме того, патологическая морфология жирового тела у американской белой бабочки и колорадского жука заметно отличается. В первом случае наблюдаются некробиотические отклонения от нормы наряду с быстрым уменьшением объема. Например, на 3-и сут интенсификация поражения жирового тела достигает высокого уровня, что проявляется в увеличении числа аномальных клеток, разрушении

ядер и клеточных стенок (Gol'din, 2004). В дальнейшем эти процессы интенсифицируются, особенно на 5–7-е сут опыта (рис. 3). Жировое тело колорадского жука характеризуется некробиотическими и дистрофическими дегенеративными изменениями, но его редукция менее выражена, чем у американской белой бабочки (рис. 4).



А

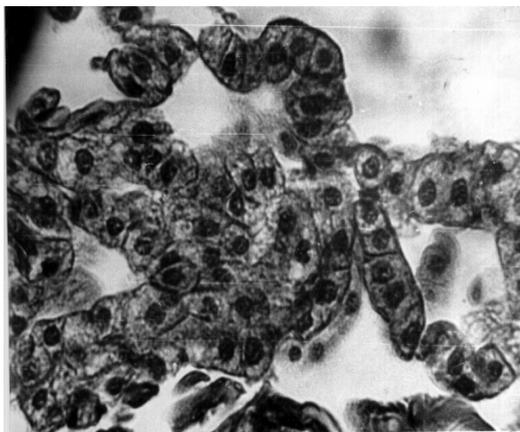


Б

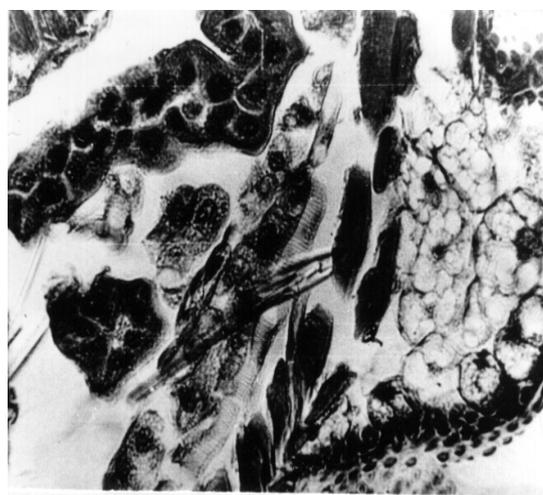
Рис. 3. Жировое тело американской белой бабочки: А – структура в норме; Б – патологическое состояние на 5-е сут опыта: клетки лишены ядер, очаги структурной деградации. Объектив $\times 16$, окуляр $\times 6,3$, окраска по Ван-Гизону

Состояние жирового тела представляет собой чувствительный индикатор биологической активности и/или токсичности цианобактерий. Прежде всего, разрушение жирового тела – типичный морфологический признак детеррентного эффекта и нарушения процесса питания; уменьшение его размера – доказательство неблагоприятного положения в кишечнике. Дистрофия и некроз этой субстанции происходят в результате проникновения биологически активных и/или токсических веществ цианобактерий. Наблюдается широкое распространение вакуолизации цитоплазмы, стирание границ между клетками и, как следствие, цитолизис. В большинстве случаев эти весьма интенсивные и быстрые отклонения от нормы выявлены у американской белой бабочки намного чаще, чем у колорадского жука, а

разрушительный эффект происходит в течение 5 сут. У некоторых особей жировое тело распадается полностью, у других — сохраняется в виде небольших островков.



А



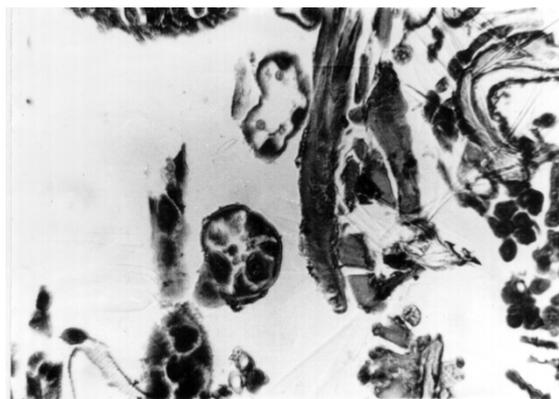
Б

Рис. 4. Жировое тело колорадского жука: А — структура в норме; Б — патологическая деградация в субкутикулярной зоне: вакуолизация цитоплазмы, лизис ядер, безъядерные пространства, очаги структурной деградации. Объектив $\times 16$, окуляр $\times 6,3$, окраска гематоксилин-эозином

Разрушение пищеварительного тракта вызывает необратимые аномальные изменения в выделительной системе обоих тест-объектов, например в мальпигиевых канальцах (кариолизис, десквамация эпителиальных клеток, деградация и некроз, большая часть клеток лишена ядер, в первую очередь это относится к американской белой бабочке), и этот процесс можно рассматривать как следствие общей интоксикации (рис. 5). Разрушение (дистресс) выделительной системы приводит к увеличению интоксикации организма.



А



Б

Рис. 5. Гистопатологическое состояние у колорадского жука: А – нормальная структура мальпигиевых канальцев и трахеи в жировом теле колорадского жука; Б – патологическая деградация: лизис ядер, десквамация эпителия на 7-е сут опыта. Объектив $\times 16$, окуляр $\times 6,3$, окраска гематоксилин-эозином

Параллельно с этими процессами происходит дезинтеграция мышечных волокон, включая гомогенизацию цитоплазмы в их клетках, патологическое истончение и кариопикноз в миоблестах. Дальнейшая дистрофия мышечных волокон последовательно продолжается. Эти процессы могут быть этапом завершения патологического процесса – общего разрушения целостности организма насекомого и его жизненных ритмов. Несмотря на преимущественно кишечный характер влияния цианобактерий (MoA) на организм насекомого, действие суспензии при нанесении на личинки негативно отражается на кутикуле, поверхностной части дыхательной системы и жировом теле в субкутикулярной зоне.

В этом случае элиминация личинок возрастает с каждым днем и большая их часть отмирает в течение 10 сут.

Выводы

1. Взаимоотношения между цианобактериями и членистоногими характеризуются комплексной и многосторонней спецификой в экосистемах, что подтверждается результатами модельных опытов на насекомых с различным типом питания.

2. Вероятную причину смертности насекомых можно объяснить не только токсическим, но и трофическим фактором, поэтому биоцидная характеристика влияния цианобактерий может быть определена, скорее, как детеррентная, чем токсичная.

3. Последовательное накопление патологических признаков в различных органах и тканях приводит к потере функциональной активности организма членистоногого и его гибели.

4. Цианобактерии и их метаболиты обладают специфическим влиянием на разные виды членистоногих, американская белая бабочка более восприимчива к биоцидному влиянию цианобактерий, чем колорадский жук.

5. Жировое тело членистоногих может рассматриваться как индикатор биоцидной активности цианобактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гольдин Е.Б. 2013. Биологическая активность микроводорослей и ее значение в межвидовых взаимоотношениях. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*. 9: 49–76.
- Кисели Д. 1962. *Практическая микротехника и гистохимия*. Будапешт: Изд-во АН Венгрии. 399 с.
- Ромейс Б. 1953. *Микроскопическая техника*. М., Л.: Изд-во иностр. лит. 719 с.
- Amsler C. 2008. *Algal chemical ecology*. Berlin, London: Springer. 314 p.
- Berry J.P., Gantar M., Perez M.H., Berry G., Noriega F.G. 2008. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Mar. Drugs*. 6(2): 117–146.
- Ger K.A., Urrutia-Cordero P., Frost P.C., Hansson L.A., Sarnelle O., Wilson A.E., Lüring M. 2016. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. *Harmful Algae*. 54: 128–144.
- Gol'din E.B. 2004. Harmful cyanobacteria – invertebrates relations: histopathological picture in fall webworm. In: *Harmful Algae 2002: Xth HAB Int. Conf.* Florida. Mar. Res. Inst., Florida Fish. and Wildlife Commis., Florida Inst. Oceanography. IOC UNESCO: 476–478.
- Jüttner F., Todorova A.K., Walch N., von Philipsborn W. 2001. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. *Phytochemistry*. 57: 613–619.
- Shaw B.A., Andersen R.J., Harrison P.J. 1997. Feeding deterrent and toxicity effects of apo-fucoxanthinoids and phycotoxins on a marine copepod (*Tigriopus californicus*). *Mar. Biol.* 128(2): 273–280.
- Worth R.A. 2009. Greatest Host Range. *Univ. Florida Book Insect Records*. Ch. 2: 1–5.

Поступила 15.05.2019

Подписал в печать С.П. Вассер

REFERENCES

- Amsler C. 2008. *Algal chemical ecology*. Berlin, London: Springer. 314 p.
- Berry J.P., Gantar M., Perez M.H., Berry G., Noriega F.G. 2008. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Mar. Drugs*. 6(2): 117–146.
- Ger K.A., Urrutia-Cordero P., Frost P.C., Hansson L.A., Sarnelle O., Wilson A.E., Lüring M. 2016. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. *Harmful Algae*. 54: 128–144.
- Gol'din E.B. 2004. Harmful cyanobacteria – invertebrates relations: histopathological picture in fall webworm. In: *Harmful Algae 2002: Xth HAB Int. Conf.* Florida. Mar. Res. Inst., Florida Fish. and Wildlife Commis., Florida Inst. Oceanography. IOC UNESCO: 476–478.
- Gol'din E.B. 2013. Biological activity of microalgae and its importance in interspecific relations. *Ecosystems, their optimization and protection*. 9: 49–76.
- Jyttner F., Todorova A.K., Walch N., von Philipsborn W. 2001. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. *Phytochemistry*. 57: 613–619.
- Kiseli D. 1962. *The Practical Microscopic Technique and Histological Chemistry*. Budapest: Hungar. Acad. Sci. 399 p.
- Romeis B. 1953. *The microscopic technique*. Moscow, Leningrad: Izdatelstvo Inostrannoi Literatury. 718 p.
- Shaw B.A., Andersen R.J., Harrison P.J. 1997. Feeding deterrent and toxicity effects of apo-fucoxanthinoids and phycotoxins on a marine copepod (*Tigriopus californicus*). *Mar. Biol.* 128(2): 273–280.
- Worth R.A. 2009. Greatest Host Range. *Univ. Florida Book Insect Records*. Ch. 2: 1–5.

Algologia 2019, 29(3): 267–277

<https://doi.org/10.15407/alg29.03.267>

Gol'din E.B.

Russian Geographical Society,

St. Petersburg 190000, Russia

Vinogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine,

154 Academician D.K. Zabolotnyi St., Kyiv 03680, Ukraine

CYANOBACTERIAL ACTION AND HISTOPATHOLOGY IN INSECTS WITH A DIFFERENT TYPE OF NUTRITION

Cyanobacteria cause selective action in arthropods depending on their type of nutrition. This influence is complex, many-sided and diverse in nature. We aim to define the role of

different components in cyanobacterial activity in arthropod organisms, and to use pathological histology research to identify the various roles of these different components. Using several test objects possessing different ways of feeding (*e.g.*, polyphagous fall webworm and oligophagous Colorado potato beetle), histopathological abnormalities were evaluated in model assays using algological, entomological, and histological methods. Cyanobacterial biocidal action caused general and specific inhibitory effects, including mainly deterrent and toxic components, and induced irreversible changes first of all in the digestive tract and then in other organs. A comparative analysis of cyanobacterial action revealed some differences in histopathological abnormalities of the tested objects, most of all in midgut and fat body. Various morphological structures of defensive systems in polyphagous and oligophagous organisms are affective, but, in most cases, degradation and necrosis of the digestive system are the results of penetration of cyanobacterial biological active and/or toxic compounds. In most observations, we revealed these abnormalities in the fall webworm as very intensive and rapid, more frequently than in the Colorado potato beetle; the destructive effect took place during five – seven days. Degradation of the digestive tract produces irreversible abnormal changes in the excretory system of both tested objects. These processes are a part of the general inhibition of vital rhythms in the arthropod organism. Cyanobacterial biocidal characteristics are more likely to be determined as deterrent than toxic; and hereby the fall webworm is more susceptible to cyanobacterial influence than the Colorado potato beetle.

Key words: cyanobacteria, arthropods, nutrition, pathological histology, midgut, fat body, biocidal activity