

УДК 574.583:582.263:574.63

ИНАКТИВАЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИХРОМАТА КАЛИЯ ШУНГИТОМ НА РАЗВИТИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Г.А. Даллакян, С.И. Погосян,
В.И. Ипатова, И.В. Агеева

Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова,
119991, г. Москва, Российская
Федерация

Изучали влияние шунгита из расчета 100 г/л и бихромата калия в концентрации 3 мг/л на культуру зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Br&F. В присутствии шунгита наблюдали стимуляцию роста культуры, а в присутствии бихромата калия происходило угнетение ее роста по сравнению с контролем. Показано, что при комбинированном воздействии бихромата калия и шунгита на популяцию *Scenedesmus quadricauda* токсические действие бихромата калия снимается. Наиболее быстрый рост культуры происходил, когда в культуральную среду был добавлен только шунгит, при этом эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток в присутствии шунгита в среде увеличивались. По-видимому, шунгит в культуральной среде действует, с одной стороны, как сорбент, а с другой – изменяет окислительно-восстановительное состояние среды. Механизм действия шунгита неспецифичен и его можно использовать как универсальное средство для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

Ключевые слова: *Scenedesmus quadricauda*, бихромат калия, шунгит, жизнеспособность клеток, флуоресценция, эффективность фотосинтеза.

Введение. Многие токсиканты, как природного, так и антропогенного происхождения, могут приводить к стрессу или гибели водных организмов. При этом механизмы их токсического действия на организмы различаются. Они могут снижать темп деления клеток, снижать эффективность фотосинтеза, усиливать окислительные процессы в организме и влиять на другие жизненно важные процессы в клетках. В связи с этим возникает необходимость поиска новых, в том числе и универсальных способов инактивации этих соединений, действующих по разному механизму. Как было показано нами ранее [1], повреждающее действие синглетного кислорода, образующегося в присутствии фотосенсибилизаторов, можно инактивировать с помощью шунгита.

Природный композит шунгит в основном состоит из аморфного, глобулярного, фуллереноподобного углерода. В Зажогинской породе Карелии его доля составляет 30 %, а остальная

часть приходится на силикатные минералы, равномерно распределенные в углеродной матрице, и минеральные включения кремния, алюминия, железа, магния, калия, серы, кальция, фосфора и др. [2]. Фуллерен был обнаружен в шунгитах Карелии в 1992 г. [3]. Известно, что фуллерены могут встраиваться в биологические мембраны, влиять на их структуру, изменять каталитическую активность мембранных ферментов. При этом механизмы биологического действия фуллеренов зависят от их агрегатного состояния [4, 5]. Разнонаправленное действие фуллеренов на биологические объекты объясняется особыми свойствами водных сферических оболочек этих соединений [6].

Способность шунгита очищать воду известна давно. Первые фильтры для очистки воды на основе шунгита были созданы в 1995 г. Показано, что вода, пропущенная через шунгит, обладает благоприятным действием на многие организмы. Однако действие шунгита на различные биоло-

Даллакян Генарис Арменакович (Dallakyan Genaris Armenakovich), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, honaris@bk.ru

Погосян Сергей Иосифович (Pogosyan Sergei Iosifovich), доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Pogosyan@biophys.msu.ru

Ипатова Валентина Ивановна (Ipatova Valentina Ivanovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, viipatova@hotmail.com

Агеева Ирина Вадимовна (Ageeva Irina Vadimovna), научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ageev@phys.chem.msu.ru

гические объекты изучено недостаточно, особенно в присутствии в среде разных токсических соединений, в том числе и тяжелых металлов. В настоящей работе рассмотрен один из важных вопросов, имеющий научно-практическое значение, – способность шунгита снижать токсическое действие тяжелых металлов (на примере бихромата калия).

Целью настоящей работы было исследование структурных и физиологических параметров роста популяции микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. в накопительном режиме культивирования при комбинированном действии бихромата калия и шунгита.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования была альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb., которую выращивали в конических колбах объемом 100 мл в среде Успенского №1 при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов м²·с⁻¹.

В экспериментах использовали шунгит с Зажогинского месторождения от компании «Арго» и бихромат калия (K₂Cr₂O₇), широко используемый в международной практике токсикологических исследований как эталонный токсикант. Шунгит из расчета 100 г/л и бихромат калия в концентрации 3 мг/л добавляли в среду однократно на 3-й день после посева культуры. Шунгит предварительно обрабатывали согласно инструкции изготовителя с учетом специфики выращивания водорослей. Для этого гранулы шунгита про-

мывали холодной водой, затем высыпали в 3-литровую стеклянную банку и настаивали в воде в течение 2 суток, после чего снова промывали дистиллированной водой для удаления посторонних примесей и автоклавились при 1 атм. 30 мин. После обработки шунгит добавляли в культуральную среду.

Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом. Определение живых и мертвых клеток в культуре осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Carl Zeiss Axioscop 2 FS Plus в проходящем свете. При облучении объекта короткими сине-фиолетовыми лучами получали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, а мертвые – зеленое. Интенсивность флуоресценции хлорофилла рассчитывали по показателям F₀ и F_m, которые измеряли на приборе «МЕГА-25» [7]. Контролем служил рост водорослей в чистой среде без добавления шунгита и бихромата калия.

Эксперименты проводили в трех повторностях длительностью 25 суток. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2003 с использованием пакета анализа данных, для чего рассчитывали доверительный интервал и критерий Стьюдента для уровня значимости 0,05.

Результаты и обсуждение. На рисунке 1 представлены данные по изменению численности клеток культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита (100 мг/л), бихромата калия (3 мг/л) и при

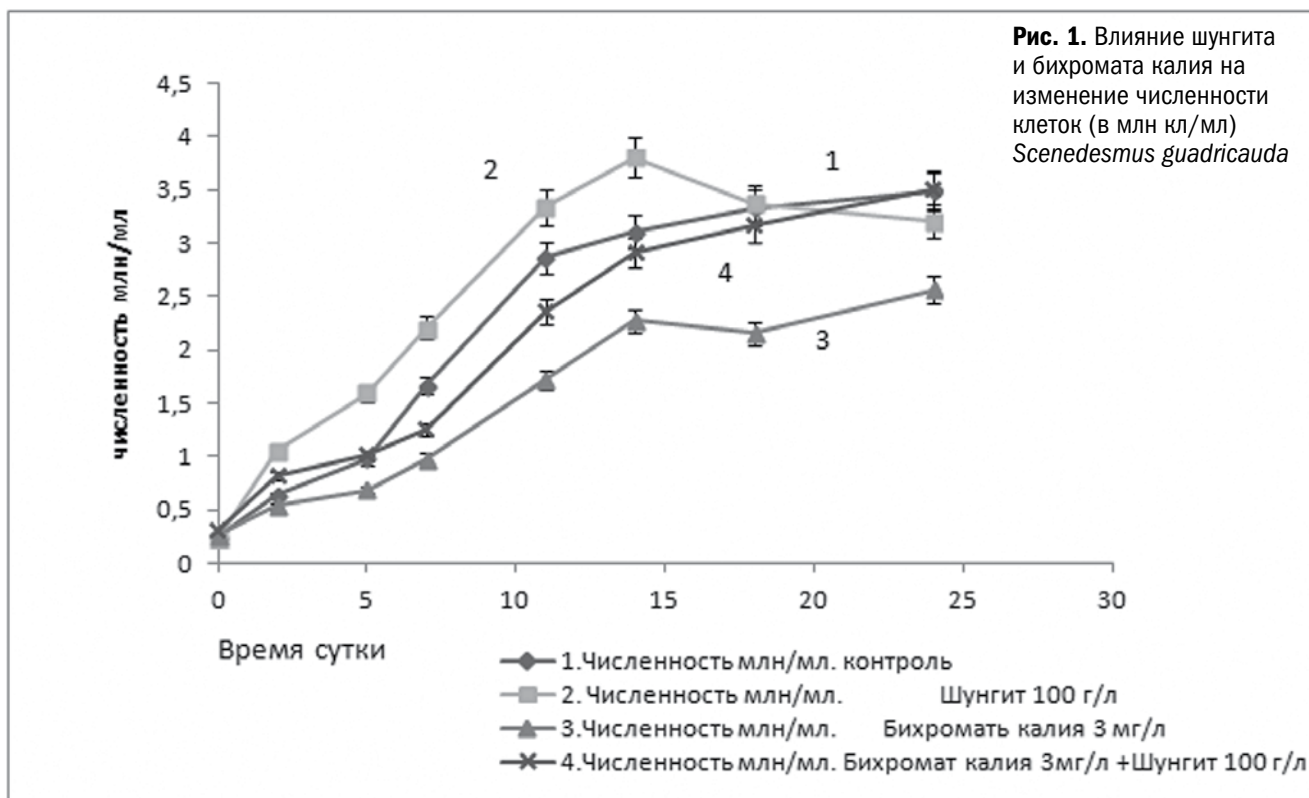


Рис. 1. Влияние шунгита и бихромата калия на изменение численности клеток (в млн кл/мл) *Scenedesmus quadricauda*

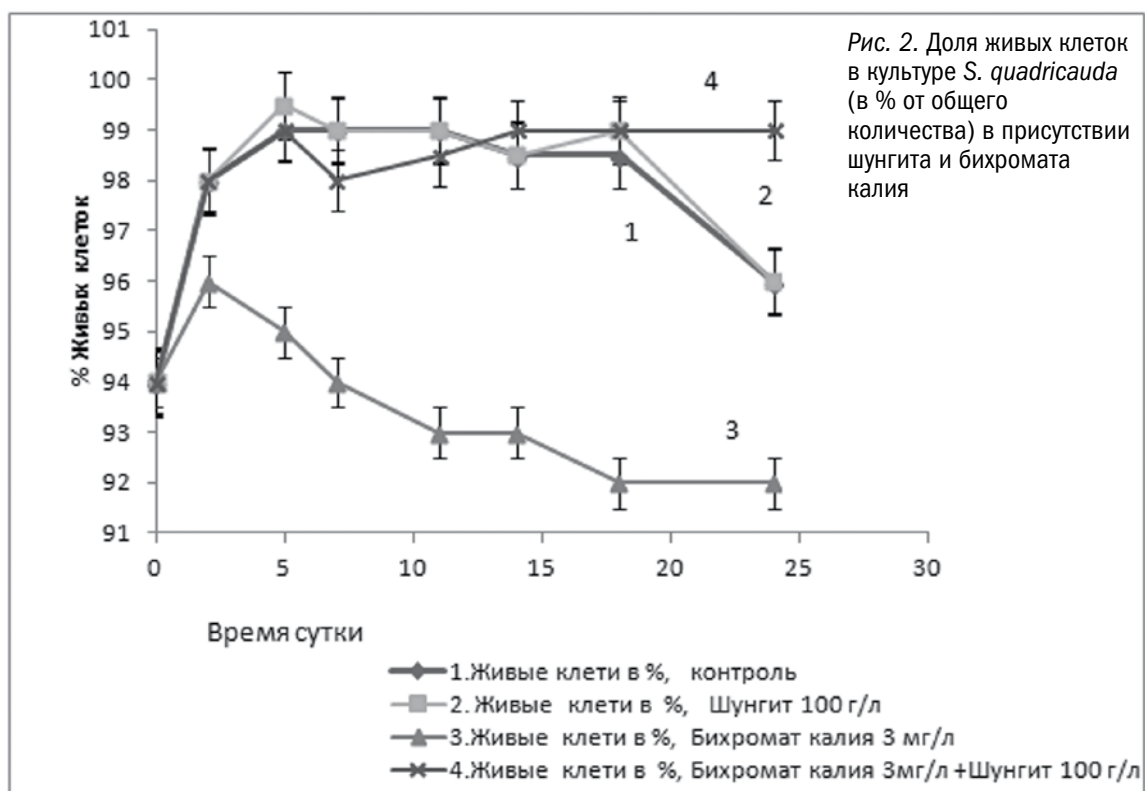
их совместном присутствии в культуральной среде (100 мг/л шунгита+3 мг/л бихромата калия).

В присутствии шунгита наблюдали достоверную стимуляцию роста культуры до 15 суток по сравнению с ростом контрольной культуры в чистой среде. При воздействии бихромата калия происходило достоверное угнетение роста культуры по сравнению с контролем на протяжении всего 25-суточного эксперимента. Подавление развития водорослей в диапазоне концентраций 1–10 мг/л бихромата калия и выше описывается рядом исследователей [8, 9]. При этом токсичность разных соединений хрома отличается: наиболее токсичны соединения шестивалентного хрома [10], причем бихроматы более ядовиты, чем хроматы, а менее токсичны соединения трехвалентного хрома. Вредное влияние соединений хрома зависит не только от валентности хрома, но также от состава воды (содержание кислорода и органических веществ) и видовой устойчивости организмов.

В наших экспериментах мы исследовали изменение роста культуры при комбинированном воздействии шунгита и бихромата калия. При одновременном присутствии в среде шунгита и бихромата калия отклонения численности клеток от контроля были незначительными, что свидетельствует об инактивации токсического действия бихромата калия. Ранее в наших работах [11] было показано, что шунгит защищает от повреждающего действия фотодинамических красителей на популяцию клеток *S. quadricauda*. При

этом шунгит дезактивирует синглетный кислород, образующийся от красителя, и тем самым защищает водоросли от его токсического действия. В этом процессе фуллереноподобные соединения, входящие в состав шунгита, проявляют себя как антиоксиданты [11]. В присутствии же бихромата калия в среде синглетный кислород не образуется. Поскольку соединения шестивалентного хрома более токсичны, чем трехвалентного, одним из возможных механизмов защиты популяции водоросли *S. quadricauda* от токсического действия бихромата калия в присутствии шунгита является переход шестивалентного хрома в менее токсичный трехвалентный: $K_2Cr_2^{+6}O_7 + Sh \rightarrow Cr_2^{+3}Sh$, где Sh – активные соединения, входящие в состав шунгита (ионы переменной валентности, фуллерены и др. соединения), восстанавливающие бихромат калия и снижающие его токсичность. Не исключается также возможность образования комплекса $K_2Cr_2^{+6}O_7$ с шунгитом, который становится менее токсичным для микроводоросли.

Стимуляцию роста водоросли в присутствии шунгита по сравнению с ее ростом в чистой среде можно объяснить, в частности, тем, что шунгит восстанавливает различные окислители, сенситизаторы и др. соединения, входящие в состав метаболитов, переводя их в неактивное состояние. Таким свойством обладают фуллерены, входящие в состав шунгита. Фуллерен в составе шунгита находится в виде особых, полярных, донорно-акцепторных комплексов с другими хими-



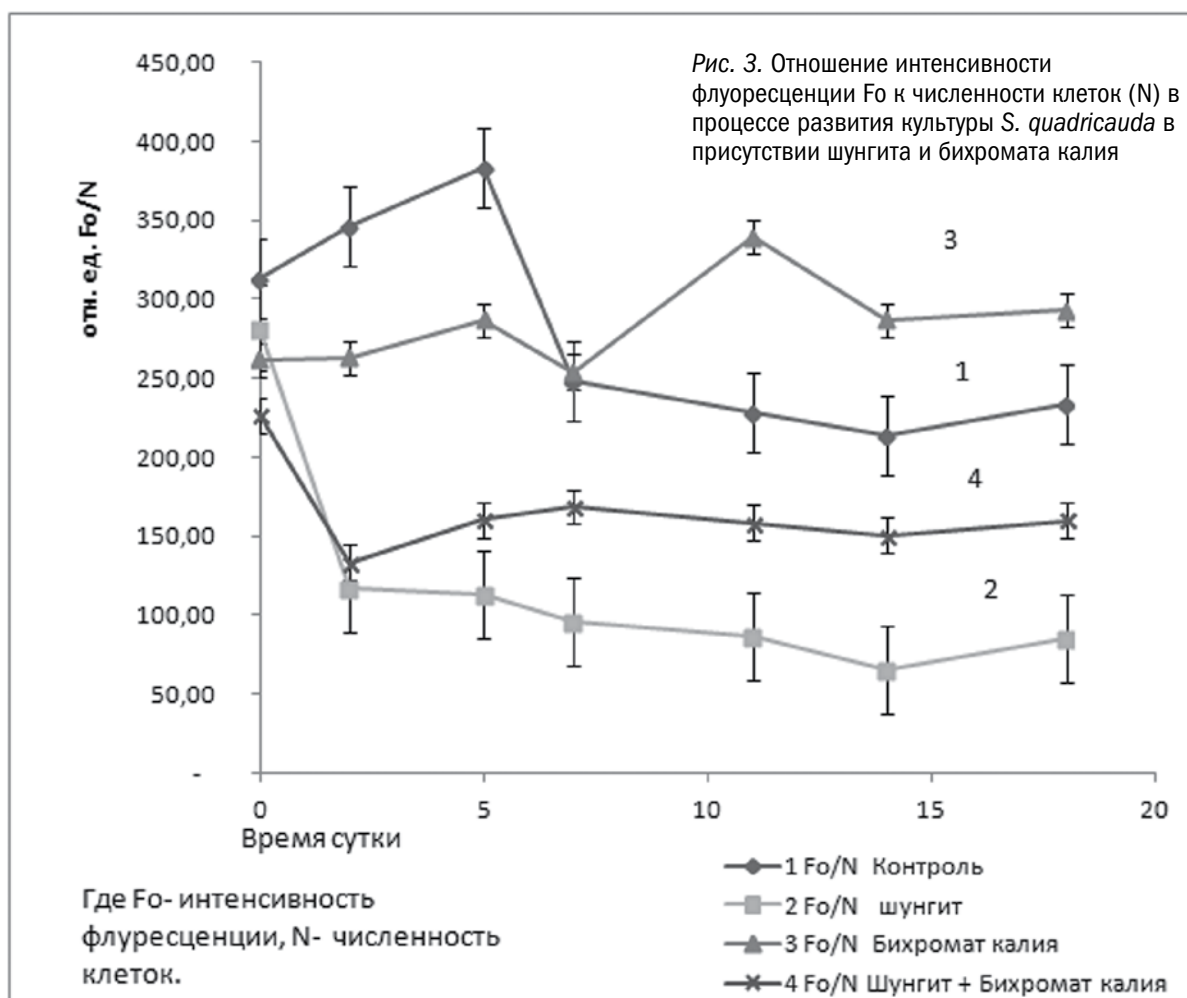
ческими соединениями, при этом в шунгитах, в основном, присутствует фуллерен C_{60} , который составляет около 0,04% [12].

На рисунке 2 представлены результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии. В присутствии 3 мг/л бихромата калия количество живых клеток в культуре со временем постепенно уменьшалось, а доля мертвых – соответственно увеличивалась. В присутствии шунгита доля живых клеток в культуре была на уровне контроля. При комбинированном действии бихромата калия и шунгита доля живых клеток составляла 98–99% на протяжении всего эксперимента и к концу эксперимента была даже выше уровня контроля. Полученные результаты также свидетельствуют о снижении токсического действия бихромата калия на культуру *S. quadricauda* в присутствии шунгита.

Отношение начальной флуоресценции F_0 к численности клеток N (F_0/N) служит косвенной характеристикой содержания пигментов на клетку.

Как видно из рисунка 3, количество пигментов в пробах шунгитом (2, 4) во время роста

культуры всегда меньше, чем в пробах без него (1, 3). Это связано с тем, что в присутствии шунгита клетки *S. quadricauda* по размеру были меньше, чем в его отсутствии (что визуально было отмечено при подсчете клеток в камере Горяева под микроскопом), поскольку скорость деления клеток в среде с шунгитом была выше. По нашим наблюдениям, с первых дней после добавления шунгита в культуральную среду происходило изменение свойств среды, способствовавших благоприятному росту культуры микроводоросли. Относительно большое количество пигментов в пробах с бихроматом калия (рис. 3) связано с его токсическим действием. В присутствии бихромата калия часть клеток погибала (рис. 1, 2), а оставшиеся живые, более устойчивые к токсиканту, клетки имели более крупные размеры, поэтому содержание пигментов в расчете на клетку было больше. Увеличение размеров клеток и торможение темпа деления в присутствии бихромата калия было отмечено и в других работах [8, 13]. Содержание пигментов в контроле до 5-х суток было больше, чем в остальных пробах, поскольку в этот период происходит адаптация культуры к но-

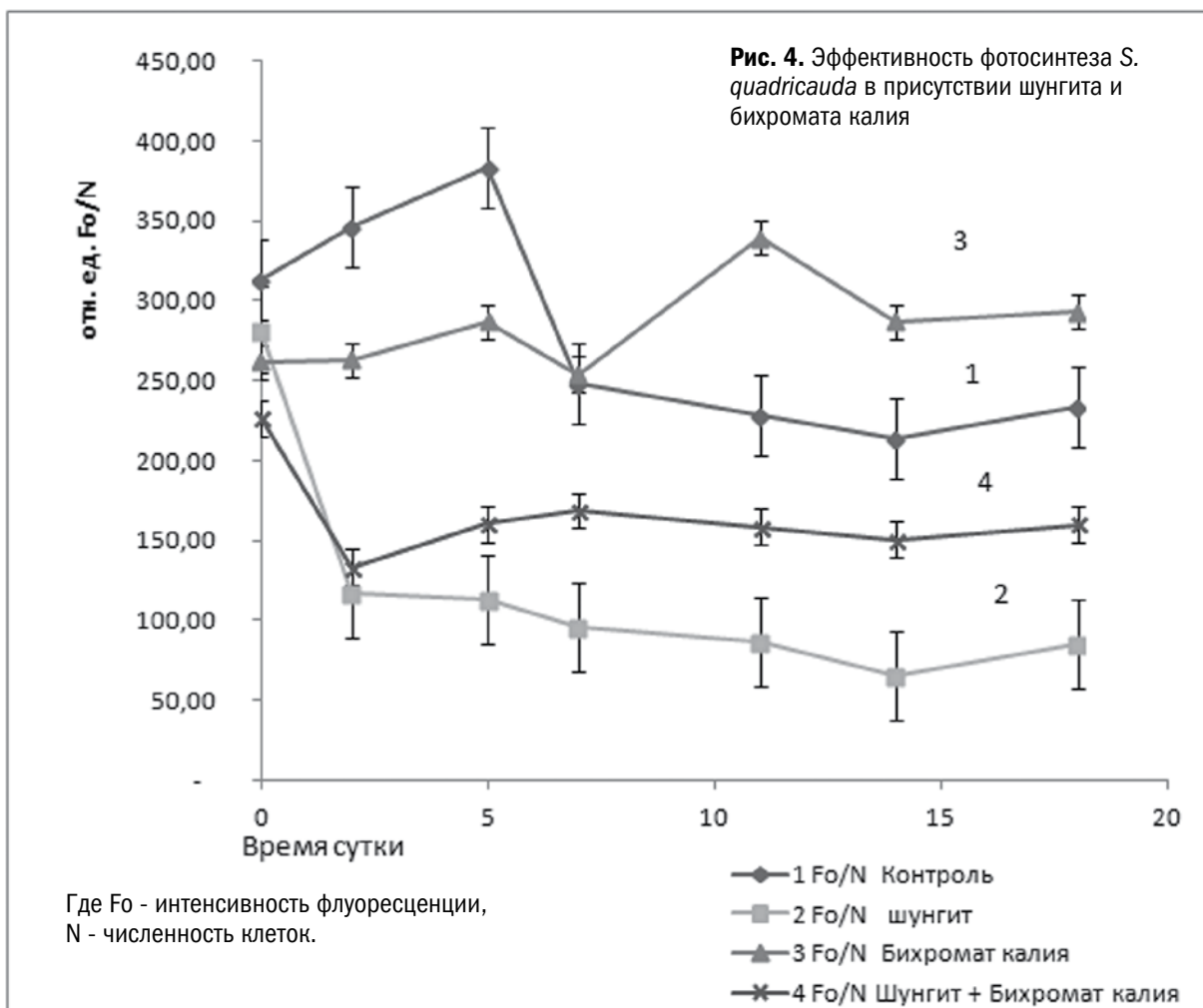


вым условиям после ее пересева в свежую среду, при этом деление клеток замедляется и клетки становятся большими по размеру. Начиная с 5-х суток скорость роста увеличивается, клетки делятся быстрее и поэтому уменьшаются в размерах, поэтому в контроле после 5-х суток содержание пигментов на клетку меньше, чем в присутствии бихромата калия.

На рисунке 4 представлены данные изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы II или эффективности фотосинтеза $\psi = Fv/Fm$ (в %), рассчитанной по формуле $\psi = (Fm - Fo)/Fm$, где Fm – интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах фотосистемы II [7]. Данные по эффективности фотосинтеза (рис. 4) хорошо согласуются с данными по общей численности клеток (рис. 1), а также доли живых клеток в культуре (рис. 2). Во всех случаях, как в присутствии шунгита, так и при одновременном присутствии в среде шунгита и бихромата калия, клетки водоросли растут лучше, при этом эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток становятся выше, чем в контроле или в присутствии в среде только бихромата калия. Эффективность фотосинтеза была

наиболее низкой в пробах с бихроматом калия. Близкие значения (в пределах ошибки измерения) эффективности фотосинтеза после 10-х суток роста водорослей во всех пробах можно объяснить тем, что происходила адаптация культуры к условиям среды. Клетки с низкой эффективностью фотосинтеза элиминировались и в популяции оставались только клетки с высокой эффективностью фотосинтеза.

Заключение. Стимуляция роста культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита по сравнению с ростом культуры в чистой среде и улучшение роста *S. quadricauda* при комбинированном действии бихромата калия и шунгита, по сравнению с ее ростом в присутствии только бихромата калия, возможно, связано с тем, что шунгитовые соединения образуют комплекс с бихроматом калия и инактивируют его действие. Кроме того, фуллереноподобные соединения изменяют свойства воды. Шунгитовые фуллерены плохо растворяются в воде, однако, при настаивании в воде несколько часов вокруг каждого фуллерена образуется многослойная оболочка из молекул воды, которую называют структурированной водой [4, 5], что создает условия для благоприятно-



го роста культуры. Возможно, что во время роста культуры, когда количество экзометаболитов в среде увеличивается, шунгит выступает как сорбент и тем самым ингибирует ингибирующее действие метаболитов.

Таким образом, шунгит стимулирует рост численности популяции микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, но при этом происхо-

дит уменьшение размеров клеток и содержание пигментов в них. Шунгит инактивирует действие бихромата калия, при этом механизм действия шунгита неспецифичен, что указывает на его возможное использование как универсального средства для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даллакян Г.А. Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным кислородом. Известия РАН. Серия биол. 1998; 6: 751–753.
 2. Каленин Ю.К. Экологический потенциал шунгита. Наука в России. 2008; 6: 39–44.
 3. Buseck P.R., Tshipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. Science. 1992; 257 (5067): 215–17.
 4. Andrievskiy G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostuctures in vitro and in vivo. Free Radical Biology Med. 2009; 47: 786–793.
 5. Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М., Думпис М.А., Киселев О.И. Механизмы биологического

действия фуллеренов – зависимость от агрегатного состояния. Психифармакол. биол. наркол. 2007; 7(2): 1548–1554.
 6. Ширинкин С.В., Шапошников А.А., Волкова Т.О., Андриевский Г.В., Давыдовский А.Г. Гидратированный фуллерен как инструмент для понимания роли особых структурных свойств водной среды живого организма для его нормального функционирования. Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. 2012; 9: 122–127. Available at: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyi-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturyh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego>
 7. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Применение флуориметра

«МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата. Вода: химия и экология. 2009; 6: 34–40.
 8. Артюхова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Чжао Ицзюнь. Изменение динамики роста культуры и размеров клеток *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. при действии бихромата калия. Журн. Известия РАН. Серия Биологическая. 1997; 3: 280–286.
 9. Прохоцкая В.Ю., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф. Оценка степени адаптации лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. к действию бихромата калия. Журн. Вестник московского ун-та. Серия 16. Биология. 2003; 3: 37–42.
 10. Nriagu J.O., ed. Aquatic Toxicology. New-York: Yohn Wiley & Sons. Inc.; 1983.

11. Даллакян Г.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*. Вода: химия и экология. 2013; 10: 102–106.
 12. Осипов Э. В., Калинин Ю.К., Резников В.А. Способ выделения фуллеренов из шунгита. Патент РФ, № 2270801; 2006.
 13. Артюхова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Чжао Ицзюнь. Последствие действия бихромата калия на культуру *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. при изменении токсической нагрузки. Журн. Известия РАН. Серия Биологическая. 1997; 4: 440–445.

REFERENCES:

1. Dallakyan G.A. Population growth of algae in culture media enriched with singlet oxygen. Izvestija RAN. Serija biol. 1998; 6: 751–753 (in Russian).
 2. Kalenin Ju.K. Ecological potential of shungit. Nauka v Rossii. 2008; 6: 39–44 (in Russian).
 3. Buseck P.R., Tshipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. Science. 1992; 257 (5067): 215–217.
 4. Andrievskiy G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostuctures in vitro and in vivo. Free Radical Biology Med. 2009; 47: 786–793.
 5. Piotrovskij L.B., Eroпкиn M.Ju., Eroпкиna E.M., Dumpis M.A., Kiselev O.I. Mechanisms of biological action of

fullerenes - dependence on the state of aggregation. Psihofarmakol. biol. narokol. 2007; 7(2): 1548–1554 (in Russian).
 6. Shirinkin S.V., Shaposhnikov A.A., Volkova T.O., Andrievskij G.V., Davydovskij A.G. Hydrated fullerene as a tool for understanding the role of specific structural properties of the aquatic environment of the living organism to its normal functioning. . Nauchnye vedomosti BelGU, Serija Estestvennye nauki. 2012; 9: 122–127. Available at: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyi-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturyh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego> (in Russian).
 7. Pogosjan S.I., Gal'chuk S.V., Kazimirko Ju.V., Konjukhov I.V., Rubin A.B. Application fluorometer «MEGA-25» to

determine the amount of phytoplankton and its assessment of the photosynthetic apparatus. Voda: himija i jekologija. 2009; 6: 34–40 (in Russian).
 8. Artyukhova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F., Chjao Itzun. The changing dynamics of the culture growth and cell size *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. under the action of potassium dichromate. Zhurn. Izvestija RAN. Serija Biologicheskaja. 1997; 3: 280–286 (in Russian).
 9. Prokhot'skaya V.Ju., Ipatova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F. Assessment of the degree of adaptation laboratory population of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. to potassium dichromate. Zhurn. Vestnik moskovskogo un-ta. Serija 16 Biologija. 2003; 3: 37–42 (in Russian).
 10. Nriagu J.O., ed. Aquatic Toxicology. New-York: Yohn Wiley & Sons. Inc.; 1983.

New-York: Yohn Wiley & Sons. Inc.; 1983.
 11. Dallakjan G.A., Ageeva I.V., Bratkovskaja L.B. Influence of shungit on the functional activity of microalgae *Scenedesmus quadricauda*. Voda: himija i jekologija. 2013; 10: 102–106 (in Russian).
 12. Osipov E. V., Kalinin Ju.K., Reznikov V.A. The method of separation of fullerenes shungit. Patent RF, № 2270801; 2006 (in Russian).
 13. Artyukhova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F., Chjao Itzun. Consequence of the potassium dichromate action on the culture of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. under changing toxic load. Zhurn. Izvestija RAN. Serija Biologicheskaja. 1997; 4: 440–445 (in Russian).

G.A.Dallakyan, S.I. Pogosyan, V.I. Ipatova, I.V. Ageeva

INACTIVATION OF POTASSIUM DICHROMATE TOXIC ACTION ON THE GROWTH OF MICROALGAE USING SHUNGITE

M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

The shungite effect on the culture of green chlorococcal microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb was studied based on the amount of 100 g / l potassium dichromate at a concentration of 3 mg / l. In the presence of shungite, the culture growth stimulation was observed, and in the presence of potassium dichromate the growth inhibition occurred compared to the control. It is shown that the combined action of potassium dichromate and shungite on the *Scenedesmus quadricauda* population eliminates toxic effect of potassium dichromate. The most rapid growth of the culture occurred when only shungite was added to the culture medium, while the photosynthesis efficiency, number of cells and proportion of living cells increased in the presence of shungite. Apparently, shungite in the culture medium acts, on one hand, as sorbent, and on the other alters the redox state of the medium. The mechanism of action of shungite is nonspecific and can be used as a universal remedy for water purification from various pollutants.

Key words: *Scenedesmus quadricauda*, potassium dichromate, shungite cell viability, fluorescence, photosynthetic efficiency.

Материал поступил в редакцию 25.06.2014 г.