

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.583:582.263:574.63

DOI: 10.36946/0869-7922-2020-3-19-25

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ШУНГИТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ

Г.А. Даллакян

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

Показано, что перекись водорода, синглетный кислород и шунгит разнонаправленно влияют на развитие популяции цианобактерии *Anabaena variabilis* PCC 6803. Рост культуры цианобактерии замедляется в присутствии фотосенсибилизатора и перекиси водорода. При этом численность клеток зависит от количества в среде шунгита. Цианобактерии *Anabaena variabilis* и *Synechocystis sp. PCC 6803* растут лучше в присутствии 10 г/л шунгита, но рост подавлялся при 100 г/л. При содержании 10 г/л шунгит защищал культуру от токсического действия бенгальского розового и перекиси водорода, что было установлено по уровню эффективности фотосинтеза и численности клеток. Показано, что рост *Anabaena variabilis* (по оптической плотности при 680 нм) в присутствии только перекиси водорода замедляется по отношению к контролю. Рост культуры *Anabaena variabilis* в присутствии шунгита и перекиси водорода восстанавливается до уровня контрольных проб. Численность клеток цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803* в присутствии синглетного кислорода замедляется значительно. При совместном воздействии шунгита синглетного кислорода шунгит частично инактивирует действие бенгальского розового. В конце опыта рост культуры восстанавливается до 60% по сравнению с контролем. Аналогичная зависимость наблюдается при оценке по эффективности фотосинтеза цианобактерии *Anabaena variabilis* и *Synechocystis sp. PCC 6803*. Таким образом, синглетный кислород более токсичен, чем перекись водорода. Возможно, это связано с разными механизмами действия перекиси водорода и синглетного кислорода на рост цианобактерии. Шунгит, в зависимости от количества в воде, может стимулировать рост клеток цианобактерии, подавлять их рост, или инактивировать действие токсиканта.

Ключевые слова: цианобактерии, *Anabaena variabilis*, *Synechocystis sp. PCC 6803*, активные формы кислорода, шунгит, рост и клеток, эффективность фотосинтеза.

Цит: Г.А. Даллакян. Совместное действие активных форм кислорода и шунгита на рост и развитие цианобактерии. Токсикологический вестник. 2020; 3:19-25.

Введение. Классическими объектами для изучения целого ряда биологических процессов, таких как фотосинтез, азотфиксация, адаптация к изменяющимся условиям окружающей среды являются цианобактерии. С точки зрения резистентности к токсикантам и экологии водных организмов сравнительно малоизученными являются *Anabaena variabilis* и *Synechocystis sp. PCC*

6803. Известно, что антропогенные факторы среды могут привести к нарушениям авторегуляции механизмов самоочищения водной среды и изменению формированию качества воды. Органические и неорганические вещества в водных экосистемах включаются в систему многокомпонентных и разнохарактерных окислительных и восстановительных реакций. В связи с этим

большое значение имеет концентрация и соотношение активных форм кислорода (АФК) в воде водоема. Исследования, посвященные АФК, отличаются тем, что одни авторы в своих работах важную роль отводят окислительно-восстановительным процессам и содержанию перекиси водорода в среде [1], другие – активности супероксидного радикала или синглетному кислороду [2]. В зависимости от экологического состояния водной среды, роль отдельных форм АФК может быть определяющей в формировании качества воды. В природе перекись водорода образуется как побочный продукт при окислении многих веществ кислородом воздуха. Ее следы всегда содержатся в атмосферных осадках, а также образуются при воздействии на воду ультрафиолетовых лучей или озона. Увеличение концентрации перекиси водорода в водной среде может привести к окислительному стрессу гидробионтов. Однако, при нехватке перекиси водорода, содержание кислорода снижается в водоеме и окислительные процессы идут медленно, что приводит к ухудшению качества воды и к гибели большинства видов гидробионтов. Для роста и развития гидробионтов необходима не только перекись водорода, но и сбалансированность окислительно-восстановительных процессов с участием всех форм АФК. Показано, что синглетный кислород может окислять питательные вещества, переводить их в форму, хуже усваиваемую водорослями, что замедляет рост культуры [3]. Образование синглетного кислорода в водных экосистемах происходит, в основном, за счет фотохимических реакций с участием сенсibiliзирующих красителей. Среди природных веществ фотосенсибилизаторами могут быть некоторые экзометаболиты гидробионтов, а также вещества, попадающие в водную среду в результате лизиса клеток, например, хлорофилл, флавины, фикобилины, порфирины и промежуточные продукты их синтеза, ряд антибиотиков, хинин, рибофлавин и др. Содержание АФК в водоемах зависит от температуры воды, активности бактерий. Оно также может увеличиваться в водной среде в результате поступления отходов текстильной, фармакологической, лакокрасочной, косметической и др. отраслей промышленности. В настоящее время известно более 1250 веществ природного и антропогенного происхождения, обладающих свойствами генерировать АФК. В зависимости от физико-химических особенностей такие вещества могут очищать сточные воды, подавлять цветение вод, защищать материалы от обрастаний. В связи с возможным вредоносным действием таких веществ возникает необходимость поиска новых, в том числе и универсальных, способов их инактивации. Повреждающее действие синглетного кислорода, образующегося в присут-

ствии фотосенсибилизаторов на водоросли, может быть инактивировано с помощью шунгита. [4]. В шунгите Зажогинской породы (Карелия) обнаружены кремний, алюминий, железо, магний, калий, сера, кальций, фосфор, фуллерены и др. [5]. Фуллерены являются своеобразными донорами и акцепторами электронов, в связи с чем они влияют на структуру биологических мембран, изменяют каталитическую активность мембранных ферментов, регулируя окислительно-восстановительные процессы в водных системах [6,7,8]. Внимание исследователей разных специальностей (биологов, медиков, физиков, химиков), фуллерены привлекают из-за своей противовирусной активности, антирадикальных свойств, способности генерировать активные формы кислорода. В настоящее время применение и исследование фуллеренов ограничивается их высокой стоимостью, которая связана с низкой экономической эффективностью технологий получения и самих фуллеренов и их производных. Все вышесказанное о свойствах фуллеренов имело определяющее значение при выборе более доступных протекторов для активных форм кислорода в наших исследованиях. В связи с этим, для возможной защиты гидробионтов от действия АФК, нами был выбран шунгит, содержащий в своей структуре фуллерены. Способность шунгита очищать воду известна давно. Первые фильтры для очистки воды на основе шунгита были созданы в 1995 г. Предполагают, что вода, пропущенная через шунгит, обладает благоприятным действием на организм человека, в связи с чем продажа и популярность этого минерала успешно растет. В связи с привлечением внимания к терапевтическому и санитарному назначению шунгита возрастает интерес к исследованию механизмов и закономерностей его биологического действия.

В настоящей работе рассматривается влияние синглетного кислорода и перекиси водорода на рост и развитие популяции цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Anabaena variabilis* и изменение их резистентности в присутствии шунгита в культуральной среде.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния бенгальского розового, перекиси водорода и шунгита в различных сочетаниях на развитие культур цианобактерий.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Anabaena variabilis* выращиваемые в конических колбах объемом 300 мл на среде BG 11 при круглосуточном освещении 15 микромоль квантов/м² с и температуре среды 25°C. Численность клеток подсчитывали в камере Горяева и оценивали по оптической плотности на спектрофотометре «Спекорд» UV-VIS при 680 нм. Ко-

эффицент корреляции оптической плотности (с учётом светорассеяния) от численности клеток составляет ($R^2= 0,99$). Генератором синглетного кислорода служили фотосенсибилизатор бенгальский розовый $C_{20}H_{12}Cl_4I_4Na_2O_5$ (фирмы Arola) 5 мг/л. Перекись водорода (3%) для наших опытов была разбавлена до $2 \times 10^{-5} M$. В качестве ингибитора активных форм кислорода применялся шунгит 10 г/л. Шунгит предварительно обрабатывали, согласно инструкции изготовителя, с учетом специфики выращивания водорослей. Для этого гранулы шунгита промывали 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 автоклавировали при 1 атм. 30 мин. После обработки шунгит добавляли в культуральную среду. В экспериментах использовали шунгит с Зажогинского месторождения от компании «Арго». Краситель, перекись водорода и шунгит добавляли в среду на 3-ий день после посева культуры. Кривые эффективности фотосинтеза были построены на основе данных, полученных на приборе «МЕГА-25» [9]. Интенсивность флуоресценции хлорофилла была рассчитана по показателям F_0 и F_m , [9]. Контролем служил рост водорослей в чистой среде без добавления шунгита, перекиси водорода и бенгальского розового.

Полученные результаты обрабатывали статистически. Статистическую обработку результа-

тов проводили в программе Microsoft Office Excel 2010 с использованием пакета анализа данных. Для графического отображения полученных результатов, рассчитывали среднее число клеток водорослей и доверительный интервал. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок проводили при помощи критерия Стьюдента для уровня значимости 0,05.

Результаты и обсуждение. Для выбора количества шунгита в целях использования его как протектора от АФК была подсчитана численность клеток цианобактерий в течение 15 суток при разных концентрациях вещества в питательной среде (рис. 1). Обнаружено, что 10 г/л шунгита благоприятствуют росту клеток, вместе с тем 50 г/л и 100 г/л замедляли рост культуры. Ранее в наших работах было показано, что для зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* содержание шунгита 100 г/л является оптимальным условием для развития культуры, при более высоких концентрациях 200 г/л [3,4] и выше рост зеленых водорослей замедлялся. Цианобактерии были в 10 раз чувствительнее к действию шунгита, чем *Scenedesmus quadricauda*. При этом, в зависимости от содержания шунгита в среде, он может стимулировать рост клеток цианобактерии, подавлять их рост, или инактивировать действие токсиканта.

На рисунке 2 показано изменение роста клеток *Synechocystis sp. PCC 6803* при комбинированном воздействии бенгальского розового и шун-

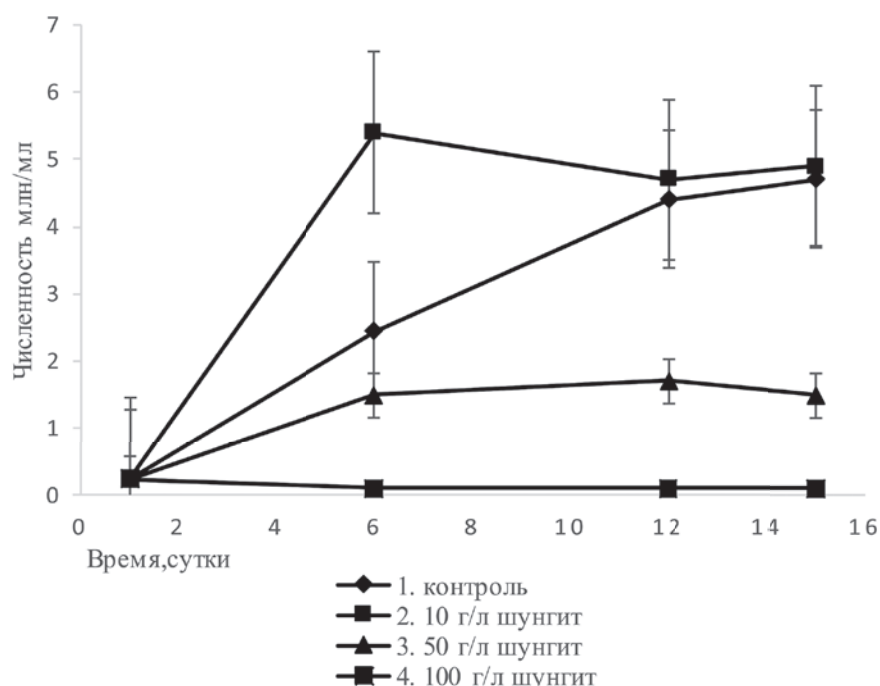


Рис.1. Изменение численности клеток (млн /мл) цианобактерии в зависимости от содержания шунгита в питательной среде.

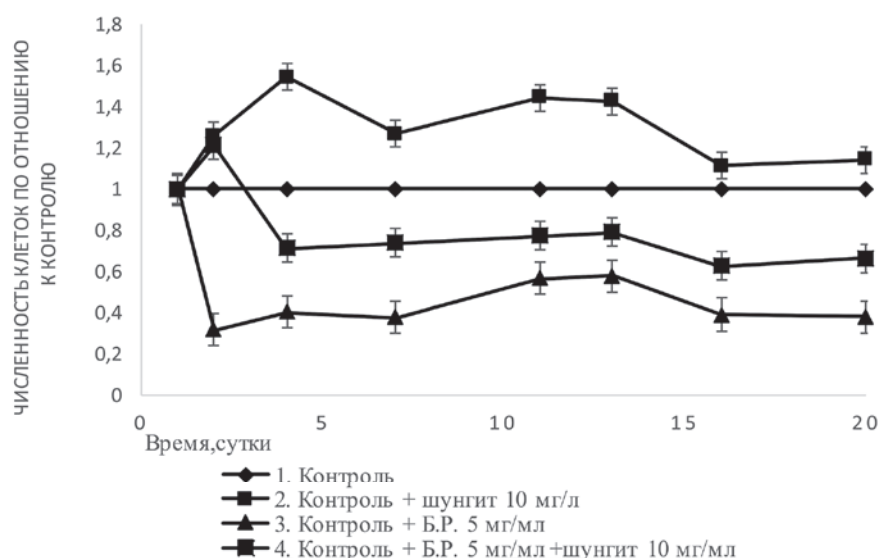


Рис. 2. Влияние бенгальского розового и шунгита на численность клеток *Synechocystis sp. PCC 6803* по отношению к контролю.

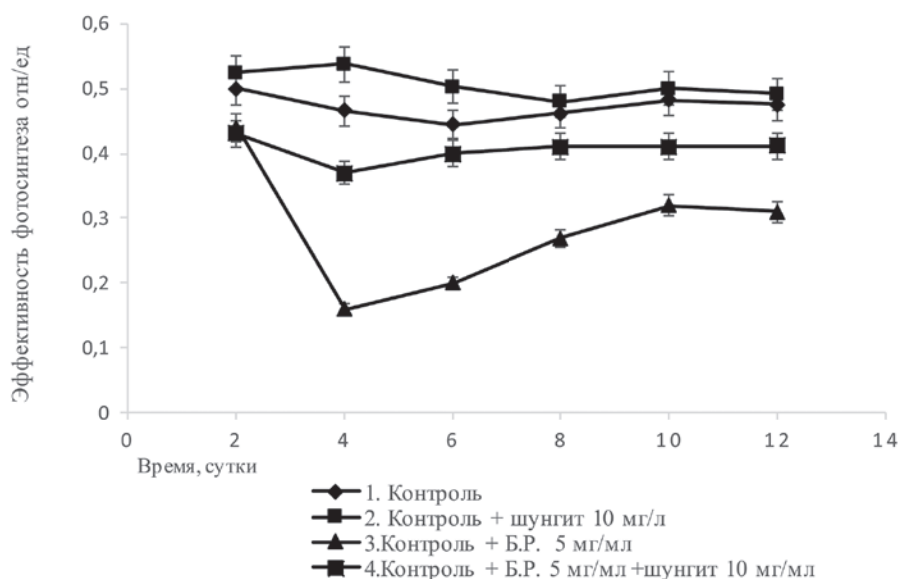


Рис. 3. Эффективность фотосинтеза клеток *Synechocystis sp. PCC 6803* при комбинированном воздействии бенгальского розового и шунгита

гита. Известно, что поглощение видимого света приводит к переходу молекулы бенгальского розового в возбужденное синглетное состояние (*R). $R_0 + h\nu \rightarrow *R$. Далее бенгальский розовый реагирует с O_2 и переводит его в возбужденное синглетное состояние. $*R + O_2 \rightarrow R_0 + {}^1O_2$. Затем синглетный кислород (1O_2) окисляет молекулу

субстрата (P). $P + {}^1O_2 \rightarrow PO_2$. Как видно из рисунка 2 при добавлении в среду 10 г/л шунгита рост культуры заметно активизировался по отношению к контролю в то время, как бенгальский розовый подавлял развитие культуры. Вместе с тем шунгит частично ослаблял токсическое действие 5 мг/л бенгальского розового при их сочетанном

воздействии. Ранее [3] было показано, что шунгит полностью подавлял токсическое действие бенгальского розового на клетки зеленых водорослей в аналогических условиях. Рост зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* восстанавливался до контрольного уровня, что свидетельствует о разной степени чувствительности этих микроорганизмов и к синглетному кислороду.

На рисунке 3 показана эффективность фотосинтеза (ψ), т.е. изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы (ФС) II в различных условиях культивирования *Synechocystis* sp. PCC 6803. $\psi = Fv/Fm$, рассчитанная по формуле $\psi = (Fm - Fo)/Fm$, где Fo – интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах (РЦ), Fm – интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах.

Как видно из рисунка, эффективность фотосинтеза снижалась при наличии бенгальского розового в среде. При совместном присутствии шунгита и бенгальского розового токсическое действие синглетного кислорода частично ослаблялось шунгитом.

Далее проводилось исследование влияния перекиси водорода, как одной из форм АФК, на цианобактерий *Anabaena variabilis*. На рисунке 4 показано изменение оптической плотности растущих культур. Установлено, что шунгит стимулировал рост культуры. В присутствии в среде только перекиси водорода рост культуры замедлялся. В присутствии в среде шунгита и перекиси водорода рост клеток восстанавливался до уровня контроля начиная с 7 дня. Это связано

с тем, что перекись водорода и синглетный кислород обладают разной степенью окислительной активности и отличаются механизмами воздействия на цианобактерии.

На рисунке 5 показано изменение эффективности фотосинтеза клеток цианобактерии. Как и в случае с оптической плотностью культуры (рис. 3) шунгит стимулировал рост клеток. При совместном присутствии в культуральной среде шунгита и перекиси водорода эффективность фотосинтеза снижалась на 4 день меньше, чем в присутствии только перекиси водорода. Далее, в обоих случаях, эффективность фотосинтеза восстанавливалась до уровня в контрольных пробах (рис.5). В присутствии синглетного кислорода и шунгита в среде эффективность фотосинтеза на 4 день снижалась, а в присутствии только синглетного кислорода снижение роста культуры заметно усиливалось (рис. 3). При этом эффективность фотосинтеза не восстанавливалась до уровня контроля в конце опыта.

Как видно, эффективность фотосинтеза в первые сутки для *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Anabaena variabilis* близка по значениям, но токсическое действие в течение роста культуры отличалось. Похожая зависимость наблюдалась при оценках по численности клеток (рис. 2 и 4). Эти факты свидетельствуют о том, что механизм повреждения клеток перекисью водорода и синглетным кислородом отличается.

Закключение. Ответные реакции популяции клеток цианобактерии, используемых в опытах (эффективность фотосинтеза, численность.

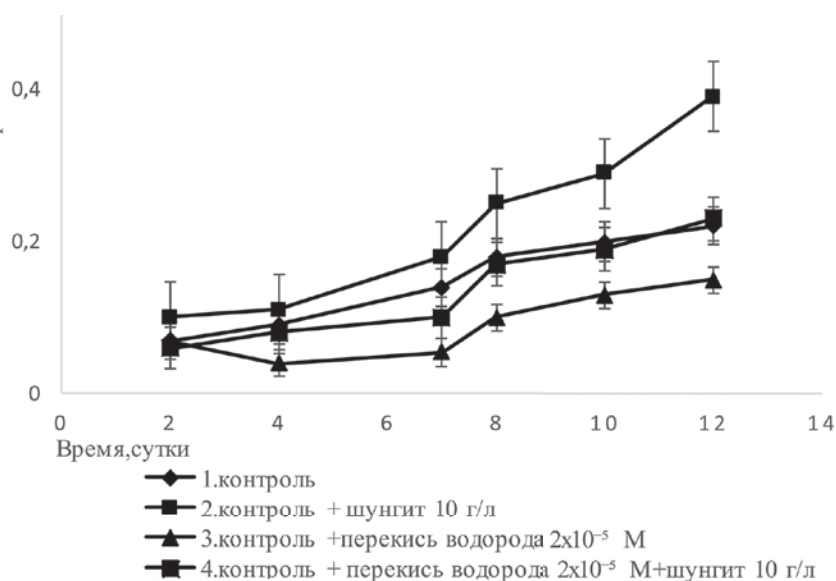


Рис .4. Изменение оптической плотности культур цианобактерии *Anabaena variabilis* ($D = 680$ нм) при комбинированном воздействии перекиси водорода и шунгита

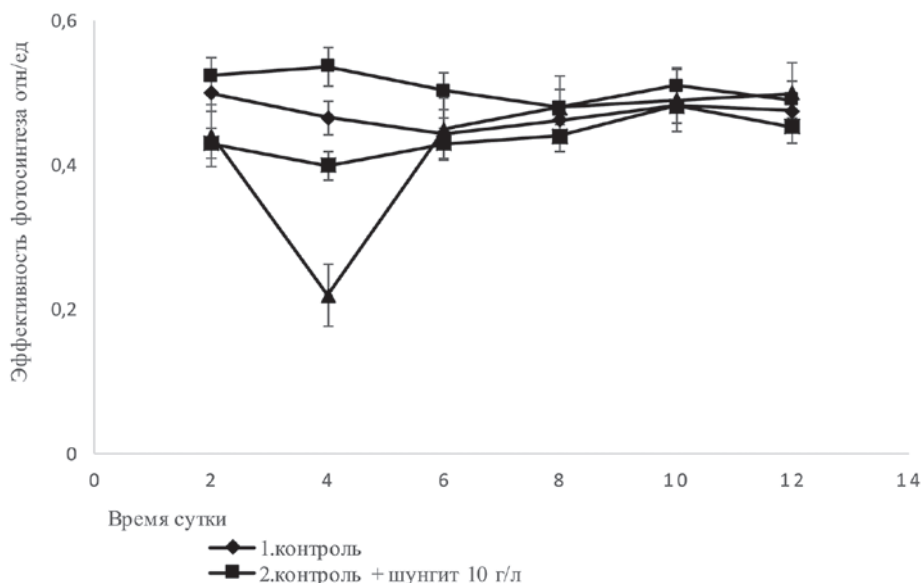


Рис.5. Эффективность фотосинтеза клеток *Anabaena variabilis* при комбинированном воздействии перекиси водорода и шунгита.

оптическая плотность) в присутствии АФК и шунгита отражают различные состояния популяции и не могут заменить друг друга, хотя тенденция, обнаруженная разными методами, сходна. При низких концентрациях в среде культивирования шунгит стимулирует рост культуры, при более высоких – подавляет. В конечном итоге мы видим увеличение или снижение численности клеток и эффективности фотосинтеза по отношению к контролю. Шунгит дезактивирует АФК, и тем самым защищает водоросли от их токсического действия. В этом процессе шунгит проявляет себя как антиоксидант. Шунгит восстанавливает различные окислители, сенсibilизаторы и др. соединения, переводя их в неактивное состояние. Возможно также, что во время роста культуры, когда количество экзометаболитов в среде увеличивается, шунгит выступает как сорбент метаболитов, снижая их ингибирующее действие. Токсичное действие шунгита при больших концентрациях (100 г/л для цианобактерии и 200 г/л – для зеленых водорослей) связано с усилением каталитических абсорбционных свойств этого вещества и с увеличением пороговых концентраций ионов переменной валентности. Механизм биологического действия компонентов шунгита в настоящее время в литературе обсуждается с разных точек зрения, что связывают со свойствами фуллеренов.

Анализ наших данных показывает, что резистентность к шунгиту и АФК зеленых водоро-

слей и цианобактерии отличаются в десятки раз [4]. Это объясняется структурными особенностями строения клеток водорослей и бактерий.

Перекись водорода обладает менее выраженным токсическим действием, чем синглетный кислород. Известно, что перекись водорода вызывает разрушение клеточной стенки микроорганизмов. Такая бактерицидная активность перекиси водорода связана с высокой окислительной способностью этого вещества. Проникая в клетку перекись водорода, при взаимодействии с оксидазными ферментами, окисляется до воды и кислорода. Этим частично можно объяснить меньшую токсичность перекиси водорода. Синглетный кислород проникает в клетку и приводит к окислению многих биологически важных соединений.

На основании литературных данных и наших исследований вопрос об использовании шунгита, как протектора от действия токсикантов для очистки воды намного сложнее, поскольку резистентность цианобактерии и водорослей к АФК и шунгиту отличаются в десятки раз. Т.е., в зависимости от поставленной задачи (защита качества воды, подавление или стимуляция роста различных видов гидробионтов) выбор концентрации шунгита должен быть разным. При комбинированном действии шунгита и токсикантов механизм действия шунгита неспецифичен, что указывает на его возможное использование, как универсального средства для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пискарев И.М.; Образование перекиси водорода в водных растворах под действием УФ-с излучения; Химия высоких энергий; 2018;(3): 194-198.
2. Voeikov V.L., Vilenskaya N.D., Minh Ha Do, Malysenko S.I., Buravleva E.V., Yablonskaya O.I., Timofeev K.N. The stable nonequilibrium state of bicarbonate aqueous systems. *Journal of Physical Chemistry A*. 2012; 86; (9): 1407-1415.
3. Даллакян Г.А., Погосян С.И., Ипатова В.И. Комбинированное действие шунгита и тяжелых металлов на развитие популяции микроводорослей. *Биология внутренних вод*. 2018; (1): 107-112.
4. 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.
5. Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. *Science*. 1992; 257; (5067): 215-17.
6. Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М., Думпис М.А., Киселев О.И. Механизмы биологического действия фуллеренов - зависимость от агрегатного состояния. *Психофармакол. биол. наркол*. 2007; 7(2): 1548-54.
7. 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; *Науч. ведомости БелГУ. Сер. Естеств. Науки*; 2012; № 9: 122-129.
8. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostructures in vitro and in vivo. *Free Radical Biol. Med*; 2009; 47: 786-793.
9. 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.

REFERENCES:

1. Piskarev I.M. The formation of hydrogen peroxide in aqueous solutions under the action of UV-c radiation. *High-energy chemistry*. 2018; (3): 194-198. (in Russian)
2. Voeikov V.L., Vilenskaya N.D., Minh Ha Do, Malysenko S.I., Buravleva E.V., Yablonskaya O.I., Timofeev K.N. The stable nonequilibrium state of bicarbonate aqueous systems. *Journal of Physical Chemistry A*. 2012; 86; (9): 1407-1415.
3. Dallakyan G.A., Pogosyan S.I., Ipatova V.I. The combined effect of shungite and heavy metals on the development of the microalgae population. *Biology of inland waters*. 2018; (1): 107-112 (in Russian).
4. Dallakyan G.A., Ageeva I.V., Bratkovskaya L.B. The effect of shungite on the functional activity of *Scenedesmus quadricauda* microalgae. *Water: chemistry and ecology*. 2013; 10: 102-106 (in Russian).
5. Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. *Science*; 1992; 257: 215-17.
6. Piotrovskiy L.B., Eroplkin M.Yu., Eroplkina E.M., Dumpis M.A., Kiselev O.I. The mechanisms of the biological action of fullerenes - dependence on the state of aggregation. *Psychopharmacological biological narcology*. 2007; 7 (2): 1548-54 (in Russian).
7. Shirinkin S.V., Shaposhnikov A.A., Volkova T.O., Andrievskiy G.V., Davydovskiy A. G. Hydrated fullerene as a tool for understanding the role of the special structural properties of the aquatic environment of a living organism for its normal functioning. *Scientific statements BelSU. Ser. Natures Science*. 2012; 9: 122-129 (in Russian).
8. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostructures in vitro and in vivo. *Free Radical Biol. Med*. 2009; 47: 786-793.
9. Pogosyan S.I., Gal'chuk S.V., Kazimirko Yu.V., Konyukhov I.V., Rubin A.B. Use of fluorometer "MEGA-25" to determine the amount of phytoplankton and to assess the state of its photosynthetic apparatus. *Water: chemistry and ecology*. 2009; 6: 34-40 (in Russian).

G.A. Dallakyan

COMBINED EFFECT OF REACTIVE OXYGEN FORMS AND SHUNGITE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF CYANOBACTERIA

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

It has been shown that hydrogen peroxide, singlet oxygen and shungite affect the development of the population of cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis sp. PCC 6803* in different directions. The growth of cyanobacteria culture slows down in the presence of photosensitizer and hydrogen peroxide. In this case, the number of cells depends on the amount of shungite in the environment. Cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis sp. PCC 6803* grow better in the presence of 10 g/L shungite, but growth is suppressed at 100 g/L. Shungite at 10 g/L protects cultures from the toxic effects of Bengal pink and hydrogen peroxide, which was determined by the level of photosynthesis efficiency and cell amounts. The growth of *Anabaena variabilis* (in terms of optical density at 680 nm) has been found to slow down in the presence of only hydrogen peroxide relative to the control. The growth of *Anabaena variabilis* in the presence of shungite and hydrogen peroxide is restored to the level of control samples. The number of cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803* cells slows down significantly in the presence of singlet oxygen. Being combined with singlet oxygen, shungite partially inactivates the action of Bengal pink. At the end of the experiment, the growth of the culture is restored to 60% compared to the control. A similar relationship is observed when evaluating the effectiveness of photosynthesis of cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis sp. PCC 6803*. Thus, singlet oxygen is more toxic than hydrogen peroxide. This may be due to different mechanisms of action of hydrogen peroxide and singlet oxygen on cyanobacteria growth. Depending on the content in the water, shungite can stimulate or inhibit the growth of cyanobacteria cells, inactivate the action of a toxicant.

Keywords: cyanobacteria, *Anabaena variabilis*, *Synechocystis sp. PCC 6803*, reactive oxygen species, shungite, cell growth and photosynthesis efficiency.

Quote: G.A. Dallakyan. Combined effect of reactive oxygen forms and shungite on the growth and development of cyanobacteria. *Toxicological Review*. 2020; 3:19-25.

Переработанный материал поступил в редакцию 10.06.2019 г.