

УДК 574.583:582.263:574.63

## ЗАЩИТА ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАТА КАДМИЯ ШУНГИТОМ В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ МИКРОВОДОРОСЛИ

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

Федеральное государственное  
бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московский  
государственный университет имени  
М.В.Ломоносова», 119991, г. Москва,  
Российская Федерация

Исследовали комбинированное действие 1,5 мг/л сульфата кадмия и шунгита 100 г/л на развитие культуры зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Показано, что в присутствии шунгита наблюдается стимуляция роста культуры водорослей, а в присутствии сульфата кадмия, наоборот, происходит полное угнетение ее роста по сравнению с контролем. При комбинированном воздействии сульфата кадмия и шунгита на популяцию *Scenedesmus quadricauda* токсическое действие сульфата кадмия снимается. Наиболее интенсивный рост культуры происходил, когда в культуральную среду был добавлен только шунгит, при этом эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток в присутствии шунгита увеличивались. При этом в присутствии шунгита наблюдалось удлинение стационарной фазы роста и более поздний переход культуры к фазе отмирания, т.е. происходило увеличение продолжительности жизни популяции. По-видимому, шунгит в культуральной среде действует, с одной стороны, как сорбент, а, с другой - изменяет окислительно-восстановительное состояние среды, способствуя благоприятному росту культуры. Механизм действия шунгита может быть разным и его можно использовать как универсальное средство для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

**Ключевые слова:** *Scenedesmus quadricauda*, сульфат кадмия, 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 и 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. Защита от токсического действия бихромата калия шунгитом показано в нашей предыдущей работе [2]. 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. [3]. Фуллерен был обнаружен в шунгитах Карелии в 1992 г. [4]. 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 [5,6]. Разнонаправленное действие фуллеренов на биологические объекты объясняется особыми свойствами водных сферических оболочек этих соединений [7].

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

**Даллакян Генарис Арменакович (Dallakyan Genaris Armenakovich)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, honaris@bk.ru  
**Ипатова Валентина Ивановна (Ipatova Valentina Ivanovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, viipatova@hotmail.com  
**Агеева Ирина Вадимовна (Ageeva Irina Vadimovna)**, научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ageev@phys.chem.msu.ru

благоприятным действием на многие организмы. Однако действие шунгита на различные биологические 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 сульфата кадмия, являющимся одним из сильнодействующих токсикантов. В последние годы кадмий широко используется во многих отраслях промышленности, в следствие чего его содержание в водной среде стало неуклонно расти. Кадмий относят к веществам II класса опасности (как высоко опасные).

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

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования была альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb., которую выращивали в конических колбах емкостью 250 мл на среде Успенского № 1 (100 мл) при температуре 25°C и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

В экспериментах использовали шунгит с Зажогинского месторождения от компании «Арго» и сульфат кадмия (CdSO<sub>4</sub>), широко используемый в международной практике токсикологических исследований как эталонный токсикант. Шунгит из расчета 100 г/л и сульфат кадмия в концентрации 1,5 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 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.

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 синеволновыми лучами получали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, а мертвые – зеленое. Кривые индукции флуоресценции были построены на основе данных, полученных на приборе «МЕГА-25». Интенсивность флуоресценции

хлорофилла была рассчитана по показателям флуоресценции Fo и Fm, [8]. Контролем служил рост водорослей в чистой среде без добавления шунгита и сульфата кадмия.

Эксперименты проводили в трех повторностях длительностью 30 суток. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2010 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 г/л), сульфата кадмия (1,5 мг/л) и при их совместном присутствии в культуральной среде (100 г/л шунгита+1,5 мг/л сульфата кадмия).

В присутствии шунгита наблюдали достоверную стимуляцию роста культуры, начиная с 15 суток, по сравнению с ростом контрольной культуры в чистой среде. Одновременно происходило удлинение стационарной фазы роста культуры водорослей и более поздний переход культуры к фазе отмирания, т.е. наблюдалось увеличение продолжительности жизни популяции. Воздействие сульфата кадмия приводило к подавлению роста культуры по сравнению с контролем на протяжении всего 30-суточного эксперимента. При этом, начиная с 5-х суток, клетки практически не делились и численность клеток постепенно уменьшалась за счет их гибели и лизиса.

В наших экспериментах мы исследовали изменение роста культуры при комбинированном воздействии шунгита и сульфата кадмия. При этом наблюдалось значительное отклонение численности клеток от проб с присутствием только сульфата кадмия особенно после 5-х суток опыта, что свидетельствует об инактивации токсического действия сульфата кадмия. Ранее в наших работах [9] было показано, что шунгит защищает от повреждающего действия фотодинамических красителей на популяцию клеток *S. quadricauda*. При этом шунгит дезактивирует синглетный кислород, образующийся красителем, и тем самым защищает водоросли от его токсического действия. В этом процессе фуллереноподобные соединения, входящие в состав шунгита, проявляют себя как антиоксиданты [9]. Защита от токсического действия бихромата калия на популяции водорослей показано нами ранее [2]. В присутствии же сульфата кадмия в среде синглетный кислород не образуется. По видимому, инактивация сульфата кадмия происходит за счет образования комплекса с шунгитом, что приводит к снижению концентрации металла в среде и переводу его в неактивную и недоступную для клетки форму. Этот комплекс не может проникнуть в клетку из за большого размера или заряда.

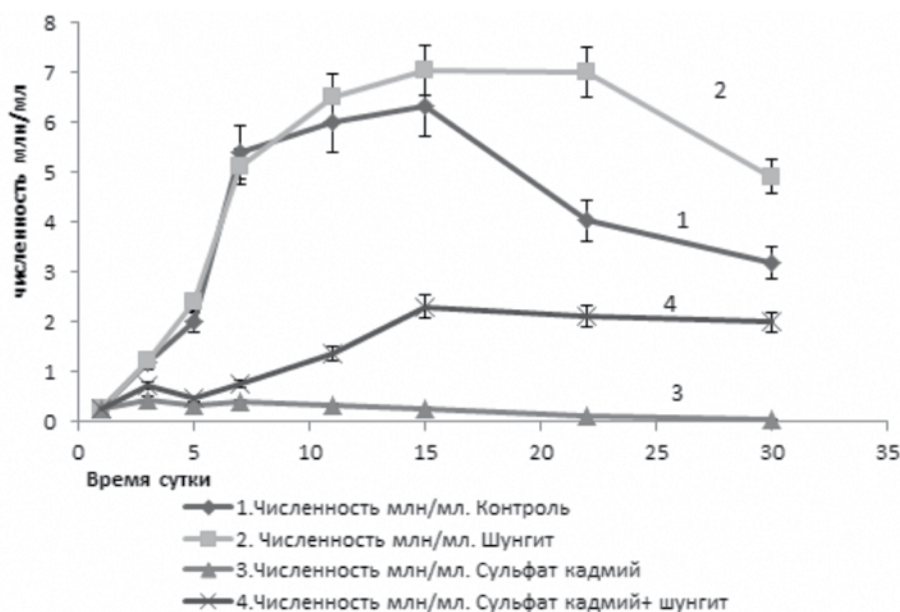


Рис. 1. Влияние шунгита и сульфата кадмия на изменение численности клеток (в млн. кл/мл) *Scenedesmus quadricauda*

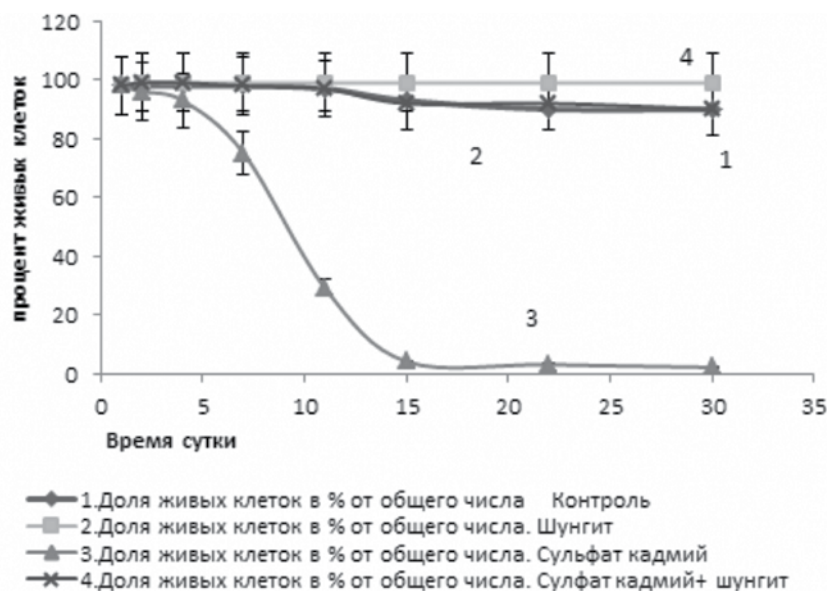
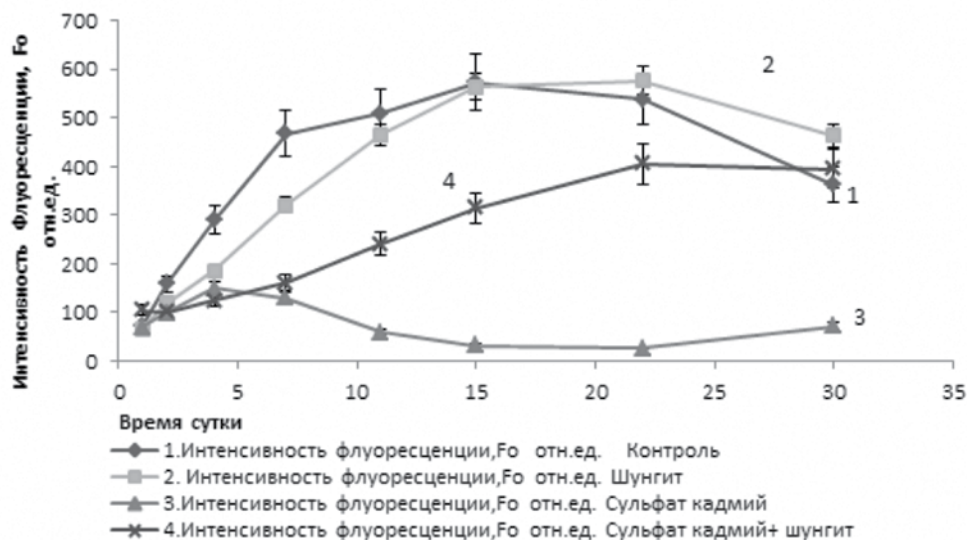


Рис. 2. Доля живых клеток в культуре *S. quadricauda* (в % от общего количества) в присутствии шунгита и сульфата кадмия.

Стимуляцию роста водоросли в присутствии шунгита после 15 суток роста, по сравнению с ее ростом в чистой среде можно объяснить, в частности, тем, что шунгит восстанавливает различные окислители, сенсibilизаторы и другие соединения, входящие в состав метаболитов, переводя их в неактивное состояние. В присутствии шунгита наблюдалось удлинение стационарной фазы роста и более поздний переход культуры к фазе отмирания, т.е. происходило увеличение продолжительности жизни популяции. Таким свойством обладают фуллерены, входящие в состав шунгита. Фуллерен в составе шунгита находится в виде особых, полярных, донорно-ак-

цепторных комплексов с другими химическими соединениями, при этом в шунгитах, в основном, присутствует фуллерен C<sub>60</sub>, который составляет около 0,04 % [10].

На рисунке 2 представлены результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии. В присутствии 1,5 мг/л сульфата кадмия количество живых клеток в культуре со временем постепенно уменьшалось и к 15 суткам составляла около 4 %, а доля мертвых – соответственно со временем увеличивалась. В присутствии шунгита доля живых клеток в культуре была на или выше уровне контроля. При комби-



**Рис. 3.** Изменение интенсивности флуоресценции  $F_o$  в процессе развития культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита и сульфата кадмия.

нированном действии сульфата кадмия и шунгита доля живых клеток составляла 98-99 % на протяжении всего эксперимента и была близка к контролю. Полученные результаты также свидетельствуют о снижении токсического действия сульфата кадмия на культуру *S. quadricauda* в присутствии шунгита.

Для более детального изучения влияния токсиканта на пигментный состав водорослей были исследованы – начальный уровень флуоресценции ( $F_o$ ), отражающий содержание пигментов, эффективность фотосинтеза и кинетика флуоресценции [8].

Как видно из рисунка 3, количество пигментов в пробах с шунгитом (3, 4) во время роста культуры всегда меньше, чем в пробах без него (1,2). Это связано с тем, что в пробах (3,4) присутствует сульфат кадмия. При этом в пробе № 4 (шунгит+кадмий) шунгит частично инактивирует действие сульфата кадмия. Подавление флуоресценции (кривая 3) отражает токсическое действие сульфата кадмия. В присутствии токсиканта, начиная с 5-х суток роста, количество пигментов в клетках непрерывно уменьшалось, рост культуры прекращался, а количество живых клеток уменьшалось и составляло около 4% уже на 15 суток (рис. 1, 2, 3). В экспериментах специально было исследовано влияние высокой концентрации сульфата кадмия 1,5 мг/л (1500 раз выше ПДК) для оценки защитного свойства шунгита. Относительно большее количество пигментов в контрольной пробе до 15 суток роста культуры по отношению к пробе № 2 связано с тем, что в пробах с шунгитом фаза отмирания культуры сдвигается на более поздний срок, поэтому, начиная с 15 суток, количество пигментов в пробе № 2 становится больше, чем в контроле. 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.

На рисунке 4 представлены данные изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы II или эффективности фотосинтеза  $\psi = F_v/F_m$  (в %), рассчитанной по формуле  $\psi = (F_m - F_o)/F_m$ , где  $F_m$  – интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах фотосистемы II [8]. Данные по эффективности фотосинтеза (рис. 4) хорошо согласуются с данными по общей численности клеток (рис. 1), а также доле живых клеток в культуре (рис. 2). Во всех случаях, как в присутствии шунгита, так и при одновременном присутствии в среде шунгита и сульфата кадмия, 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 сульфата кадмия. Эффективность фотосинтеза была наиболее низкой в пробах с сульфатом кадмия. Близкие значения (в пределах ошибки измерения) эффективности фотосинтеза после 10-х суток роста водорослей во всех остальных 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.

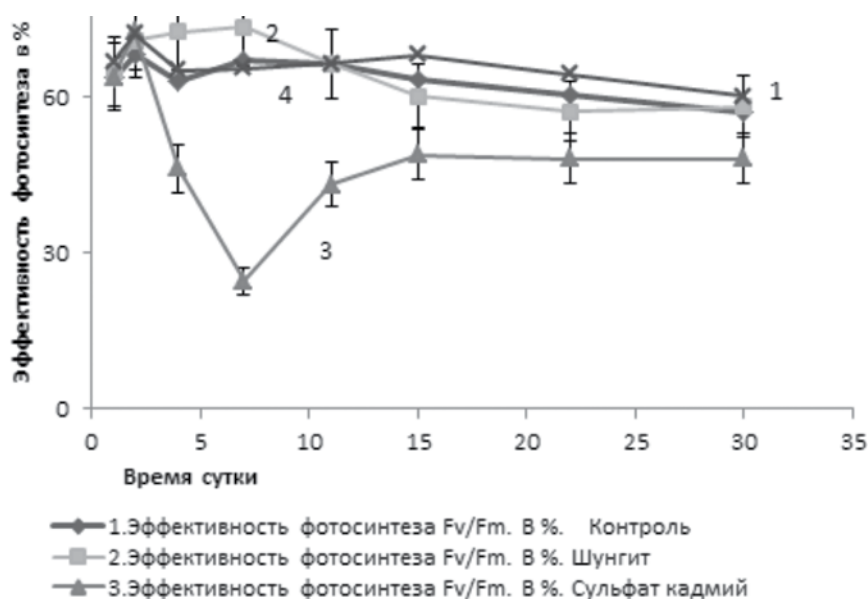


Рис. 4. Эффективность фотосинтеза *S. quadricauda* в присутствии шунгита и сульфата кадмия.

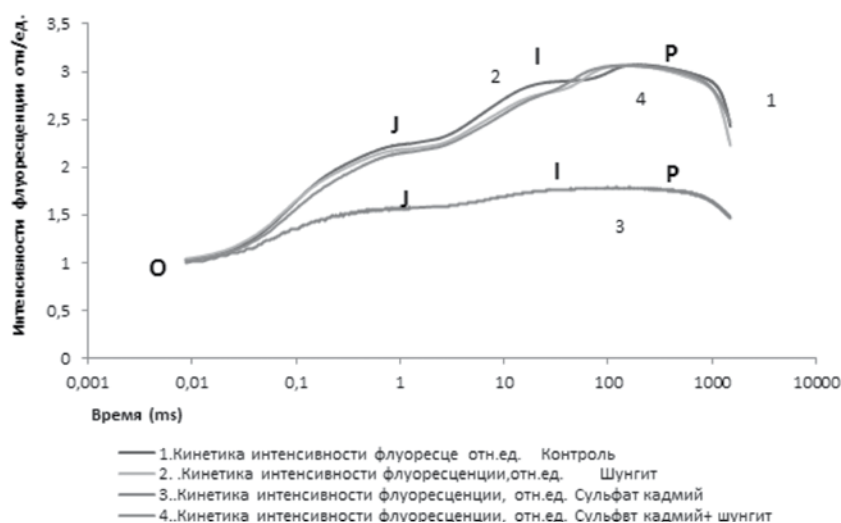


Рис. 5. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла на 15 день роста культуры *S. quadricauda*.

На рисунке 5 показана кинетика индукции хлорофилла на 15 день роста культуры во всех вариантах опыта, поскольку в это время наблюдались значительные отличия по численности клеток и доле живых и мертвых клеток в культуре.

Кинетика так называемых О-Ж-И-Р кривых отражает состояние фотосинтетического аппарата. Эти кривые построены в логарифмической шкале времени в микросекундах (ms). Кривая 3 (рис. 5) свидетельствует о значительном подавлении процесса фотосинтеза в присутствии сульфата кадмия. При этом в других пробах значимых нарушений фотосинтетического аппарата не обнаружено.

Таким образом, различными методами нами было показано, что с помощью шунгита можно

инактивировать токсическое действие сульфата кадмия в концентрации, превышающей ПДК рыбохозяйственных водоемов в 1500 раз. Необходимо также отметить, что каждый из способов оценки состояния популяции клеток водоросли, используемых в наших опытах, отражают различные состояния популяции и не могут заменить друг друга, хотя тенденция в реакции водоросли, обнаруженная разными методами, сходна.

**Заключение.** Значительное ускорение роста культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита по сравнению с ростом культуры в чистой среде происходит особенно после 15 суток опыта. Стимулирование роста *S. quadricauda* при комбинированном действии сульфата кадмия и шунгита, по сравнению с ее ростом в присутствии только

сульфата кадмия, возможно, связано с тем, что соединения входящие в природный композит шунгита образуют, комплекс с сульфатом кадмия и инактивируют его действие. Кроме того, фуллереноподобные соединения изменяют свойства воды. Фуллерены плохо растворяются в воде, однако при настаивании в течение несколько часов вокруг каждого фуллерена образуется многослойная оболочка из молекул воды, кото-

рую называют структурированной водой [5, 6], что создает условия для благоприятного роста культуры. Возможно, что во время роста культуры, когда количество экзометаболитов в среде увеличивается, шунгит выступает, и сорбентом метаболитов, инактивируя их ингибирующее действие. Таким образом, в присутствии шунгита происходит увеличение продолжительности жизни накопительной культуры.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даллакян Г. А. Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным кислородом. Известия РАН. Серия биол. 1998; 6: 751-53.
2. Даллакян Г. А., Погосян С. И., Ипатова В. И., Агеева И. В. Инактивация токсического действия бихромата калия шунгитом в присутствии микроводорослей. Токсикологический вестник. 2014, 5: 39-44
3. Каленин Ю. К. Экологический потенциал шунгита. Наука в России. 2008; 6: 39-44.
4. Buseck P.R., Tshipursky S.J., Hettich R.

- Fullerenes from the geological environment. Science. 1992; 257 (5067): 215-17.
5. 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 Biology Med. 2009; 47: 786-93.
  6. Пиотровский Л. Б., Еропкина 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. Научные ведомости БелГУ, Серия Естественные науки. 2012; 9: 122-Аavailable at: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyi-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturnykh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego>
8. 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.
9. Даллакян Г. А., Агеева И. В., Братковская Л. Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*. Вода: химия и экология. 2013; 10: 102-6.
  10. Осипов Э. В., Калинин Ю. К., Резников В. А. Способ выделения фуллеренов из шунгита. Патент РФ, № 2270801; 2006

## REFERENCES:

1. Dallakyan G.A. Population growth of algae in culture media enriched with singlet oxygen. Izvestija RAN. Serija biol. 1998; 6: 751-53 (in Russian).
2. Dallakyan G.A., Pogosyan S.I., Ipatov V.I., Ageev I.V. The inactivation of the toxic effect of potassium dichromate in the presence of shungite microalgae. Toksikologicheskij vestnik. 2014, 5: 39-44 (in Russian).
3. Kalenin Ju.K. Ecological potential of shungit. Nauka v Rossii. 2008; 6: 39-44 (in Russian).
4. Buseck P.R., Tshipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment.

- Science. 1992; 257 (5067): 215-17.
5. 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 Biology Med. 2009; 47: 786-93.
  6. Piotrovskij L.B., Eroпкиn M.Ju., Eroпкиn E.M., Dumпис M.A., Kiselev O.I. Mechanisms of biological action of fullerenes – dependence on the state of aggregation. Psihofarmakol. biol. narkol. 2007; 7(2): 1548-54 (in Russian).
  7. 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-Аavailable at: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyi-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturnykh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego> (in Russian).
8. 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).
9. 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: 102-6 (in Russian).
  10. Osipov E. V., Kalinin Ju.K., Reznikov V.A. The method of separation of fullerenes shungit. Patent RF, N 2270801; 2006 (in Russian).

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

## PROTECTION AGAINST THE TOXIC EFFECT OF CADMIUM SULFATE IN THE PRESENCE OF SHUNGITE IN BATCH CULTURE OF MICROALGAE

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

A combined effect of 1.5 mg / l of cadmium sulfate and 100 g / l of shungite on the development of the culture of green chlorococcales microalgae *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb was studied. It is shown that stimulation of algal culture growth was observed in the presence of shungite, and in the presence of cadmium sulfate on the contrary, there is a complete inhibition of its growth as compared to the controls. Under the combined action of cadmium sulfate and shungite on the *Scenedesmus quadricauda*, cadmium sulfate toxic effect disappeared. The most intensive growth of the culture occurred when shungite was only added to the culture medium and herewith in the presence of shungite, the photosynthesis efficiency, number of cells and live cells percentage increased. In the presence of shungite, were observed lengthening of the growth stationary phase and a later transition of the culture to the die-away phase. It means, the population life span lengthens. Apparently, shungite in the culture medium acts as a sorbent on the one hand, and on the other hand alters the medium redox state, contributing to the culture favorable growth. The mechanism of shungite action could be various and it can be used as a universal remedy for purification of water from various pollutants.

**Keywords:** *Scenedesmus quadricauda*, cadmium sulfate, shungite, cell viability, fluorescence, photosynthesis efficiency.

Материал поступил в редакцию 19.06.2015 г.