

# ВЛИЯНИЕ ШУНГИТА

## на ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *Scenedesmus quadricauda*

**Добавление шунгита в среду культивирования приводит к увеличению эффективности фотосинтеза и приросту численности водорослей *Scenedesmus quadricauda*.**

**Шунгит значительно ослабляет действие фотодинамического красителя бенгальского розового на развитие водорослей. Обсуждаются возможные механизмы действия шунгита на функциональную активность водорослей.**

### Введение

**В**нешние факторы водной среды способны в значительной степени изменять функциональную активность водорослей. Они играют большую роль в природных фитопланктонных сообществах и могут оказаться существенным фактором модификации состояния микроорганизмов, культивирования для целей фотобиотехнологии. Многие неблагоприятные факторы среды как природного, так и антропогенного происхождения приводят к окислительному стрессу водных организмов. Этому способствует увеличение концентрации активных форм кислорода (АФК) в водной среде, таких как синглетный кислород, супероксидный анион радикал, перекись водорода и др. [1, 2]. Обнаружено, что в проходящей через шунгит воде быстро окисляются органические молекулы и свободные радикалы. При этом содержание в ней бактерий снижается в десятки раз.[3].

Природный композит шунгит состоит, в основном, из аморфного, глобулярного, фуллереноподобного углерода. В Зажогинской породе Карелии его 30 %, остальная часть приходится на силикат-

### Г.А. Даллакян\*

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, кафедры гидробиологии биологического факультета, ГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
**И.В. Агеева**, научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета, ГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ные минералы, равномерно распределенные в углеродной матрице, и минеральные включения кремния, алюминия, железа, магния, калия, серы, кальция, фосфора и др. [4]. Молекулы фуллерена обнаружили в 1985 г. при исследовании масс-спектров паров графита [5]. В 1992 г. в шунгитах Карелии был обнаружен фуллерен [6]. 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 [7, 8]. Разнонаправленное действие фуллеренов на биологические объекты объясняется особыми свойствами водных сферических облочков этих соединений [9, 10].

Способность шунгита очищать воду известна давно. Первые фильтры для очистки воды на основе шунгита были созданы в 1995 г. Установлено, что вода, пропущенная через шунгит, обладает благоприятным воздействием на организм. Однако механизм влияния шунгита на биологические объекты исследован недостаточно.

Целью настоящей работы является исследование изменения основных физиологических параметров популяции водорослей *Scenedesmus quadricauda* во время роста культуры, в условиях наличия в среде бенгальского розового (БР) или шунгита в отдельности и совместно.

### Материалы и методы исследования

**О**bjectом исследования была альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda*. Ее выращивали в конических колбах объемом 200 мл в среде Успенского №1 при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Численность клеток подсчи-

\*Адрес для корреспонденции: honaris@bk.ru

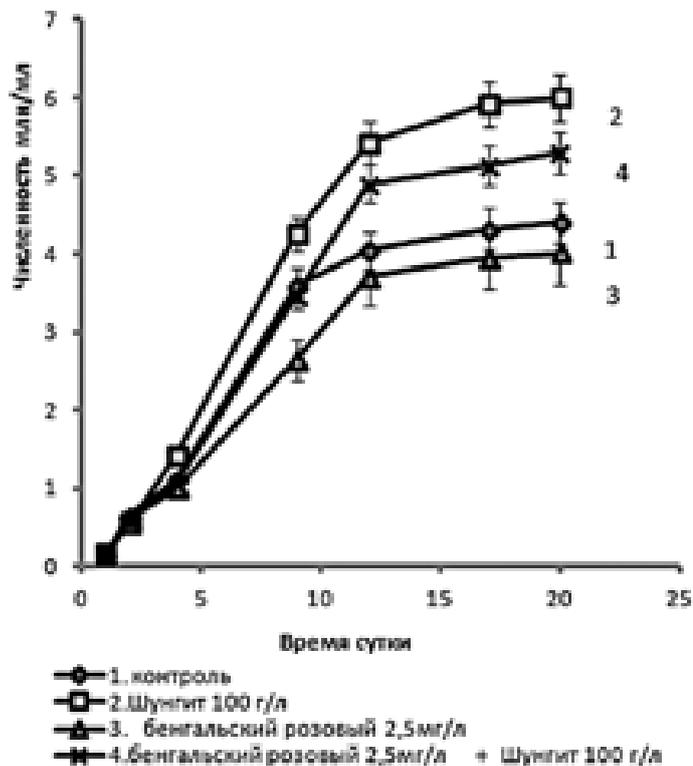


Рис. 1. Влияние Шунгита и БР на численность клеток *Scenedesmus quadricauda*.

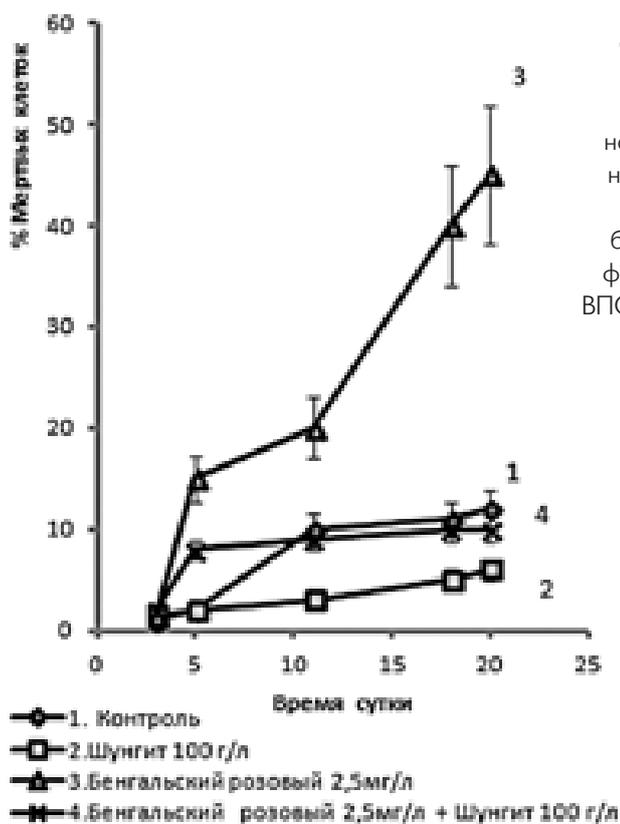


Рис. 2. Изменение числа мертвых клеток водорослей при различных воздействиях во время роста культуры.

**Л.Б. Братковская**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета, ГОУ ВПО Московского

тывали в камере Горяева. Состояние клеток оценивали с применением люминесцентной микроскопии. В наших опытах использовали шунгит с Зажогинского месторождения от компании «Арго». БР (фирмы «Apolda») и шунгит добавляли в среду на 3 сут. после посева культуры из расчета 2,5 мг/л и 100 г/л, соответственно. Перед тем, как добавить в среду шунгит его предварительно обрабатывали согласно инструкции изготовителя с учетом специфики выращивания водорослей. Гранулы шунгита предварительно промывали холодной водой, затем высыпали в 3-литровую стеклянную банку и настаивали в воде в течение 2 сут. Затем шунгит еще раз промывали дистиллированной водой для удаления различных примесей и добавляли в культуральную среду. В наших опытах шунгит и БР находились в среде в течение всего эксперимента

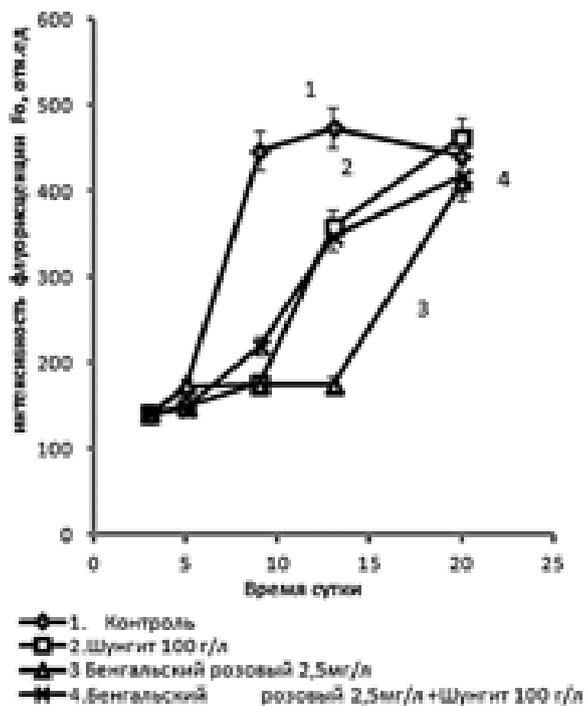
Интенсивность флуоресценции хлорофилла Fo и Fm измеряли на приборе «МЕГА-25» [11]. Полученные результаты обрабатывали статистически.

## Результаты и их обсуждение

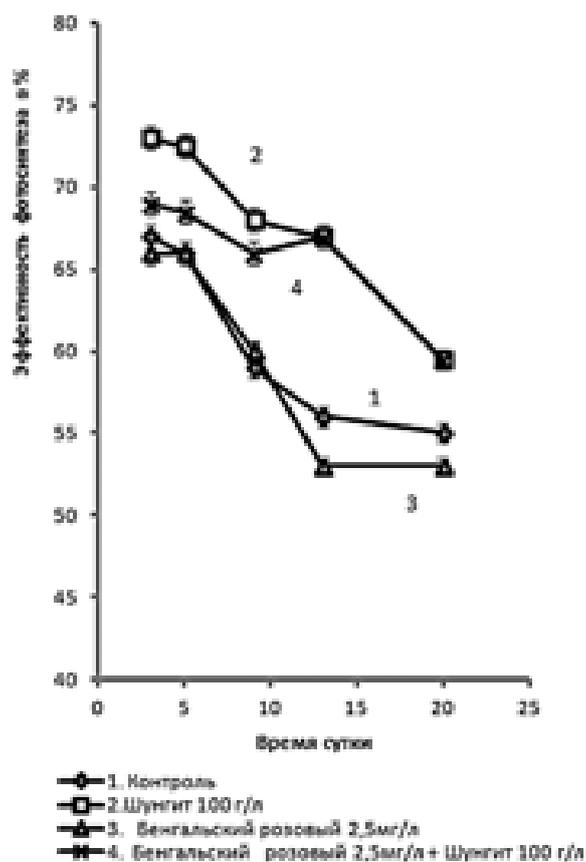
На рис. 1 представлено изменения численности клеток *Scenedesmus quadricauda* при добавлении шунгита и БР по отдельности и вместе в культуральную среду водорослей.

Ранее нами было показано, что в присутствии БР скорость роста водорослей снижается [12]. Как видно из рис. 1, синглетный кислород, образующийся при фотодинамическом действии БР в концентрации 2,5 мг/л, подавляет рост культуры (рис. 1, кр. 3.). При комбинированном воздействии БР и шунгита на водоросли рост культуры стимулируется. Наиболее быстрый рост культуры микроводорослей происходит, когда в культуральную среду добавлен только шунгит (рис. 1, кр. 2).

При исследовании состояния клеток на флуоресцентном микроскопе обнаружено, что процент мертвых клеток наибольший при воздействии БР (рис. 2, кр. 3). В этом случае образующийся синглетный кислород действует на клетки, вызывая их летальное повреждение. Меньше всего мертвых клеток образуется, когда в среде присутствует шунгит. На основании этих данных можно предположить, что шунгит изменяет структуру воды таким образом, что среда для водорослей становится более благоприятной



**Рис. 3.** Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла  $F_o$  во время роста водорослей с шунгитом и БР в культуральной среде.



**Рис. 4.** Эффективность фотосинтеза  $\psi = F_v/F_o$  в средах с шунгитом и БР.

для роста культуры. При этом повреждающее действие БР инактивируется шунгитом. Таким образом, возможно, что шунгит действует как антиоксидант (рис. 2, кр. 4). В наших опытах по численности водорослей и по живым и мертвым клеткам водорослей можно сказать, что АФК действует как токсический фактор, а шунгит как стимулятор роста культуры.

Для более подробного анализа роста культуры одновременно были исследованы параметры флуоресценции хлорофилла водорослей *Scenedesmus quadricauda* (рис. 3).

Интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах фотосистемы II  $F_o$  соответствует содержанию пигментов в фотосинтетическом аппарате исследованных водорослей [11]. Из рис. 3 видно, что наиболее быстро накопление пигментов происходит в контроле. Самое медленное накопление пигментов наблюдается у водорослей в присутствии БР в среде. При выращивании водорослей с шунгитом или вместе с БР в среде культивирования скорость накопления пигментов очень близка. На рис. 4 представлены изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы II или эффективность фотосинтеза  $\psi = F_v/F_m$ , рассчитанная по формуле  $\psi = (F_m - F_o)/F_m$ , где  $F_m$  — интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах фотосистемы II [11]. При сопоставлении данных эффективности фотосинтеза (рис. 4) и общего числа клеток (рис. 1), а также процента доли мертвых клеток (рис. 2) обнаружены схожие результаты.

Во всех случаях клетки водорослей в присутствии шунгита в среде растут лучше, т.е. эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток становятся больше. Сопоставляя результаты  $F_o$  (рис. 3) и численность мертвых клеток (рис. 2), при воздействии БР (рис. 1), видно, что на 15 сутки БР снижает интенсивность флуоресценции, как в случае с численностью и количеством живых клеток (рис. 1-3). Далее, на 20 сут. интенсивность флуоресценции  $F_o$  в пробах с БР усиливается, но остается меньше, чем в остальных пробах. Это можно объяснить тем, что БР к этому времени полностью окисляется [2]. Интенсивность флуоресценции  $F_o$  в контрольной пробе в логарифмической фазе роста, до 15 сут, выше, чем в пробах с шунгитом. Это, по-видимому, связано с тем, что в пробах с шунгитом во-

доросли находятся в более благоприятных условиях, поскольку эффективность фотосинтеза у них выше, чем в других пробах. Далее, на 20 сут, когда популяция водорослей переходит на стационарный уровень,  $F_0$  становится для всех проб относительно близким по интенсивности флуоресценции, кроме проб с шунгитом. На протяжении всего времени культивирования водорослей происходит увеличение концентрации метаболитов в среде. Известно что, накопление метаболитов отрицательно влияет на рост культуры, однако в пробах с шунгитом это не так заметно. По ряду показателей и микроскопическим наблюдениям водоросли намного лучше растут, когда в среде присутствует шунгит. Это видно под микроскопом — клетки водорослей с шунгитной средой более крупные, большей частью 4-х ценонные, по сравнению с другими пробами.

## Заключение

**Ф**уллерен в составе шунгита находится в виде особых, полярных, донорно-акцепторных комплексов с другими химическими соединениями, при этом в шунгитах, в основном, присутствует фуллерен C60 и составляет около 0,04 мас.% [13, 14]. 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 [7, 8]. С другой стороны, известно, что шунгит является хорошим сорбентом [4]. Возможно, что после логарифмической фазы роста, когда накапливаются продукты метаболизма (в наших опытах после 10 сут роста) часть шунгита выступает как сорбент и тем самым инактивирует действие токсических метаболитов.

С помощью метода флуоресцентных зондов показано, что все исследованные производные водорастворимых фуллеренов C60 и C70 взаимодействуют с фосфолипидными мембранами. При этом образуется прочный комплекс фуллерен — краситель за счет электростатических взаимодействий, в результате чего осуществляется тушение возбужденного состояния красителя в комплексе [15]. Частичное стимулирование роста культуры водорослей, в случае комбинированного воздействия БР и шунгита, возможно, связано с тем, что часть фуллере-

**Ключевые слова:** шунгит, активные формы кислорода, водоросли, флуоресценция, фуллерен

ноподобных соединений образуют комплекс с фотосенсибилизатором и инактивируют действие БР. Другая часть фуллереноподобных соединений изменяет структуру воды или редокс-потенциал среды и, тем самым, создает условия для стимуляции роста культуры, поскольку известно, что фуллерены даже при сверхнизких концентрациях проявляют свою активность [10].

Сравнивая полученные результаты с данными вышеуказанных работ, можно предположить, что вода с шунгитом становится более благоприятной для роста водорослей. По-видимому, шунгит в культуральной среде действует, с одной стороны, как антиоксидант, с другой — как сорбент. Кроме того, он может изменять редокс состояния среды.

Таким образом, шунгитовая вода инактивирует действие синглетного кислорода и стимулирует рост популяции водорослей *Scenedesmus quadricauda*.

## Литература

1. Voeikov V.L. Reactive oxygen species (ROS); pathogens or sources or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal pathologic physiology of living systems. // J. Altern. Complem Med. 2006. V. 12. № 2. P/ 111—118/
2. Даллакян Г.А. Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред обогащенных синглетным кислородом // Известия РАН, Серия биол. 1998. № 6. С.751-753.
3. Воейков В.Л. Природная технология очистки воды: физико-химические процессы, обеспечивающие очистку воды при ее просачивании через шунгит и доломит / В.Л. Воейков, Р.Р. Асфарамов, К.Н. Тимофеев, Т.А. Воейкова // Мат. Междунар. конф. «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах». М.: 2002.С. 16.
4. Каленин Ю.К. Экологический потенциал шунгита //Наука в России, 2008. № 6. С. 39-44.
5. H. W. Kroto. C60: Buckminsterfullerene / H. W. Kroto, J. R. Heath, S.C. O'Brien, R. F. Curl and R. E. Smalley //Nature. 1985. V. 318. № .6042. P. 162-163.
6. Peter R. Fullerenes from the geological environment / Peter R. Buseck, Semeon J. Tsipursky, Robert Hettich // Science. 1992: V. 257. № 5067. P. 215-217.
- 7.. Andrievsky G. V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in vitro and in vivo / G. V. Andrievsky, V. I. Bruskov, A. A. Tykhomyrov, S. V. Gudkov // Free Radical Biolo Med. 2009. V. 47.P. 786-793.

8. Пиотровский Л. Б. Механизмы биологического действия фуллеренов — зависимость от агрегатного состояния / Л. Б. Пиотровский, М. Ю. Еропкин, Е. М. Еропкина, М. А. Думпис, О. И. Киселев // Психофармакол. биол. наркол. 2007. Т. 7. № 2. С. 1548-1554.
9. Ширинкин С. В. Гидратированный фуллерен как инструмент для понимания роли особых структурных свойств водной среды живого организма для его нормального функционирования / С. В. Ширинкин, А. А. Шапошников, Т. О. Волкова, Г. В. Андриевский, А. Г. Давыдовский // Научные ведомости БелГУ. серия Естественные науки. 2012. № 9. С.122-127. (Электронный ресурс) URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyu-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturnyh-svoystv-odnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego> (дата обращения: 21.02.2013)
10. Воейков В. Л. Устойчиво неравновесное состояние бикарбонатных водных систем / В. Л. Воейков, Н. Д. Виленская, До Минь Ха, С. И. Малышенко, Е. В. Буравлева, О. И. Яблонская, К. Н. Тимофеев // Журнал физической химии. 2012. Т. 86. № 9. С. 1518-1527.
11. Погосян С. И. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата / С. И. Погосян, С. В. Гальчук, Ю. В. Казимирко, И. В. Колюхов, А. Б. Рубин // Вода химия и экология. 2009. № 6. С. 34-40.
12. Даллакян Г. А. Ингибирование роста микроводорослей фотосенсибилизатором бенгальским розовым / Г. А. Даллакян, М. М. Телитченко, И. В. Агеева, С. И. Погосян // Гдробиологический журнал. 1991. Т. 27. № 2. С. 49-52.
13. Рожкова Н. Н. Фуллерены в шунгитовом углеороде / Н. Н. Рожкова, Г. В. Андриевский // Сб. научн. трудов междунар. симпозиума «Фуллерены и фуллереноподобные структуры». Минск: Изд-во БГУ, 2000. С. 63-69.
14. Пат. 2270801РФ/ Осипов Э. В., Калинин Ю. К., Резнико В. А. Способ выделения фуллеренов из шунгита Заявлено 06.07.2001. Опубликовано 27.02.2006. БИ:30/2006. Приоритет 06.07.2001.
15. Полетаева Д. А. Мембранотропные свойства водорастворимых производных фуллеренов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 2012.

G.A. Dallakyan, I.V. Ageeva, L.B. Bratkovskaya

## SHUNGITE INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF MICROALGA SCENEDESMUS QUADRICAUDA

It was shown that shungite addition to culture medium leads to photosynthesis effectiveness increase and population growth of alga *Scenedesmus quadricauda*. Shungite significantly reduces effect of photoactivated dye rose Bengal on alga growth. Possible mechanisms of shungite action on alga functional activity are discussed.

**Key words:** shungite, reactive oxygen species, algae, fluorescence, fullerene.