

УДК 574.583:582.263:574.632

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЦИАНОБАКТЕРИИ SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803 В ПРИСУТСТВИИ ТОКСИКАНТА И СТИМУЛЯТОРА РОСТА В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Даллакян Г.А., Агеева И.В.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: honaris@bk.ru

Исследовано влияние синглетного кислорода на рост популяции цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803* в средах обогащенных шунгитом и бенгальским розовым. Рост культуры цианобактерии снижается в присутствии фотосенсибилизатора. Нарушается окислительно-восстановительный баланс среды. Степень выживания популяции клеток зависит от концентрации в среде шунгита. Культура цианобактерии растет лучше в присутствии 10 мг/л шунгита, и, наоборот, рост культуры снижается в среде 5 мг/л бенгальского розового без шунгита. Одновременно шунгит защищает рост культуры от токсического воздействия бенгальского розового при совместном присутствии в среде культивирования. По сравнению с зелеными водорослями цианобактерии более чувствительны к шунгиту, если 10 г/л шунгита достаточно для стимулирования роста цианобактерии, то для зеленых водорослей необходимо 100 г/л. Цианобактерии в 10 раз чувствительнее к шунгиту, чем зеленые водоросли. Показано, что удельная активность выделения кислорода на единицу хлорофилла снижается в условиях, когда в среде только фотосенсибилизатор. Присутствие в среде шунгита повышает удельную активность выделения кислорода цианобактерии. В начале стационарной фазы роста процент мертвых клеток намного больше в условиях, когда в среде только бенгальский розовый. В присутствии 10 г/л шунгита в среде токсическое действие бенгальского розового инактивируется и количество мертвых клеток становится меньше. Таким образом, шунгит в зависимости от концентрации может стимулировать рост клеток цианобактерии, подавлять их рост или инактивировать действие токсиканта.

**Ключевые слова:** цианобактерии, бенгальский розовый, шунгит, кислород, численность, живые мертвые

## FEATURES OF THE DEVELOPMENT OF BACTERIUM SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803 IN THE PRESENCE OF A TOXICANT AND A GROWTH PROMOTER IN A CULTURE MEDIUM

Dallakyan G.A., Ageeva I.V.

Moscow State University Lomonosov, Moscow, e-mail: honaris@bk.ru

The effect of singlet oxygen on the growth of the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803* in environments enriched with shungite and rose bengal. Cyanobacteria growth is reduced in the presence of a photosensitizer. Disturbed redox balance of the medium. The degree of survival of a cell population depends on the concentration in the environment of shungite. The cyanobacteria culture grows better in the presence of 10 mg / l of shungite and, conversely, the growth of the culture decreases in the presence of Bengal pink without shungite in the medium of 5 mg / l. At the same time, shungite protects the growth of the culture from the toxic effects of the Bengal rose, when co-present in the culture medium. Compared with green algae, cyanobacteria are more susceptible to shungite, if 10g / l of shungite is enough to stimulate the growth of cyanobacteria, then for green algae 100g / l is needed. Cyanobacteria are 10 times more sensitive to shungite than green algae. It is shown that the specific activity of oxygen evolution per chlorophyll unit decreases under conditions when there is only a photosensitizer in the medium. The presence in the environment of shungite increases the specific activity of oxygen release of cyanobacteria. At the beginning of the stationary phase of growth, the percentage of dead cells is much greater under conditions when there is only Bengal pink in the medium. In the presence of 10g / l of shungite in the environment, the toxic effect of rose Bengal is inactivated and the number of dead cells becomes smaller. Thus, shungite, depending on the concentration, can stimulate the growth of cyanobacteria cells, inhibit their growth, or inactivate the action of the toxicant.

**Keywords:** Cyanobacteria, Bengal pink, shungite, oxygen, abundance, living dead

Для изучения таких важнейших биологических процессов, как азотфиксация, фотосинтез, исследование генома, влияние антропогенных факторов среды, используется хорошо приспособленная для исследования культура цианобактерии. С точки зрения резистентности к токсикантам, сравнительно малоизученным являющимся *Synechocystis sp.* Известно, что антропогенные факторы среды могут привести к нарушению авторегуляции механизмов формирования качества воды и самоочищения

водной среды. При этом важное значение имеет количественная корреляция активных форм кислорода (АФК). Работы, посвященные АФК, отличаются тем, что одни авторы в своих работах важную роль придают окислительно-восстановительному потенциалу среды и перекиси водорода [1], иные исследователи – синглетному кислороду или супероксидному радикалу [2]. Эти исследования не расходятся между собой, напротив, взаимодополняют наши представления о роли АФК. Состояния водной

среды в зависимости от экологической нагрузки антропогенного фактора, концентрации отдельных форм АФК в формировании качества воды становятся определяющими. Образование синглетного кислорода в водных экосистемах является следствием фотохимических реакций с участием фотосенсибилизаторов. Количество фотосенсибилизаторов в водоемах увеличивается за счет отходов химической, текстильной и нефтяной промышленности. Кроме непосредственного влияния синглетного кислорода на клеточную структуру популяции активированный кислород может изменять окислительно-восстановительный баланс водной среды. Показано, что синглетный кислород, реагируя с химическим составом среды, приводит его в более окисленное состояние, что способствует торможению роста культуры, т.е. питательные вещества становятся трудноусвояемыми для водорослей [3]. Токсические вещества, генерирующие АФК антропогенного и природного происхождения, приводят к экологическому стрессу и гибели водных организмов. Факторы среды, такие как температура воды, численность и видовой состав бактерии, а также количество фотосинтезирующих организмов в водоеме, являются определяющими для изменения концентрации АФК. Фотосенсибилизаторами природного происхождения являются хлорофиллы, фикобилины, порфирины, антибиотики, хинин, рибофлавин и промежуточные продукты их синтеза. Некоторые экзометаболиты, а также вещества, находящиеся в водной среде, вследствие лизиса клеток являются источником образования АФК. В настоящее время исследовано более тысячи соединений, генерирующих радикальные формы кислорода. Содержание АФК в водной среде увеличивается в результате попадания туда промышленных отходов, таких как отходы лакокрасочной, текстильной, фармакологической и косметической индустрии. При различных физико-химических условиях водной среды радикальные формы кислорода могут привести к летальному фотоокислению планктона или очистить сточные воды. Повреждающее действие синглетного кислорода на рост зеленых водорослей можно инактивировать шунгитом [3].

Цель исследования: изучить физиологические параметры роста цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803, в условиях культивирования с бенгальским розовым и шунгитом, по сравнению с зелеными водорослями *Scenedesmus quadricauda*; поиск новых, универсальных и экономически эффективных способов инактивации этих токсикантов.

## Материалы и методы исследования

Биологическим объектом исследования были цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803, выращенные на среде BG 11 в конических колбах объемом 200 мл, при круглосуточном освещении 15 мкм кв. С<sup>-1</sup> м.<sup>-2</sup>, температура среды 25 °С. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Концентрацию кислорода определяли на полярографе с закрытым платиновым электродом. Выделения кислорода на единицу хлорофилла (удельную активность) рассчитывали по ранее описанной методике. Спектр поглощения хлорофилла измеряли на спектрофотометре «Спекорд» UV-VIS. Для выделения хлорофилла использовали 90% ацетон. [4]. Процент живых и мертвых клеток в культуре измеряли на люминесцентном микроскопе Carl ZeissAxioscop 2 FS Plus. При облучении цианобактерии синевioletовыми лучами получали видимое свечение объекта: мертвые клетки имели зеленое свечение, а живые клетки – ярко-красное. В качестве источника синглетного кислорода использовали фотосенсибилизатор бенгальский розовый (Б.Р) 5 мг/л. Ингибитором активных форм кислорода был шунгит в количестве 10 г/л. Фотосенсибилизатор и шунгит добавляли в культуральную среду на третий день роста цианобактерии. Результаты исследования обрабатывали статистически, в программе Microsoft Office Excel 2010. Для графического отображения полученных результатов рассчитывали доверительный интервал. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок проводили при помощи критерия Стьюдента для уровня 0,05.

## Результаты исследования и их обсуждение

Первые фильтры для очистки воды на основе шунгита были созданы в 1995 г., при этом вода, пропущенная через шунгит, обладает благоприятным действием на организм человека. Известно, что природный композит шунгит в основном состоит из углерода. В шунгите Зажогинской породы Карелии обнаружены практически все элементы таблицы Менделеева, кальций, алюминий, железо, кремний, магний, фосфор калий, сера и др. В 1992 г. в шунгитах Карелии был обнаружен фуллерен [5]. Показано, что фуллерены могут влиять на биологические мембраны, их структуру, изменять активность мембранных ферментов. В то же время механизм влияния на биологические объекты фуллеренов зависит от многих факторов [6]. Токсичность, нейтральность или положительное действие водорастворимых фуллеренов на клеточном, ферментативном и организменном уровнях зависят от способов получения, чистоты этого соединения, концентрации, а также особых свойств водных сферических оболочек фуллеренов, являющихся одновременно донором и акцептором электронов [2, 6].

Продажа и реклама шунгита продолжает увеличиваться, в то же время исследование влияния этого соединения на биологиче-

ские объекты и на организм человека мало исследовано. Применение фуллеренов как в медицине, так и в научных исследованиях на биологические объекты, мало изучено в связи с их высокой стоимостью. Высокая цена фуллерена имела основное значение при выборе для наших исследований шунгита как возможного протектора от токсического действия синглетного кислорода на развитие гидробионтов, в то же время – это вещество в своей структуре содержит фуллерен. Фотохимические реакции с участием сенсibilизаторов в водоеме приводят к образованию АФК, в связи с этим в нашей работе был использован шунгит из Зажогинского месторождения, как возможного ингибитора радикальных форм кислорода.

Как видно из рис. 1, культура цианобактерии растет лучше в присутствии 10 мг/л шунгита по сравнению с контролем и наоборот, рост культуры снижается при наличии в среде 5 мг/л бенгальского розового. Одновременно шунгит защищает рост культуры от токсического воздействия БР при совместном присутствии в среде культивирования.

По сравнению с зелеными водорослями цианобактерии более чувствительны к шунгиту, и если 10 г/л шунгита достаточно для стимулирования роста цианобактерии, то для зеленых водорослей необходимо 100 г/л [3]. В специальных опытах было показано, что при концентрациях шунгита 200 г/л рост культуры зеленых водорос-

лей *Scenedesmus quadricauda*, подавляется в 2 раза. В более высоких концентрациях – 300 г/л шунгит тормозит рост практически полностью. В опытах с цианобактериями стимулирование роста культуры начинается с 1 г/л шунгита, более выражено при 10 г/л шунгита. Увеличение роста культуры цианобактерии на 7-й день роста по сравнению с контрольным в присутствии шунгита 10 г/л составляет 25%. Заметное торможение роста цианобактерии начинается с 30 г/л и составляет 35% процентов от роста контрольных проб. При более высоких концентрациях – 60 г/л шунгита рост культуры цианобактерии останавливается практически полностью. То есть цианобактерии в 10 раз чувствительнее к шунгиту, чем зеленые водоросли. Это очень важно учесть при использовании шунгита для очистки воды от высокой концентрации АФК. Культура *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бенгальского розового 5 г/л окрашивается, что свидетельствует о проникновении красителя внутрь клеток. Таким образом при определенных концентрациях можно стимулировать рост одних видов и подавлять рост других видов микроорганизмов.

Как видно из рис. 2, в начале стационарной фазы на 15 сутки роста процент мертвых клеток намного больше (23%), когда в среде только бенгальский розовый 5 мг/л (4). Присутствие 10 г/л шунгита в среде, токсическое действие БР частично инактивируется (3).

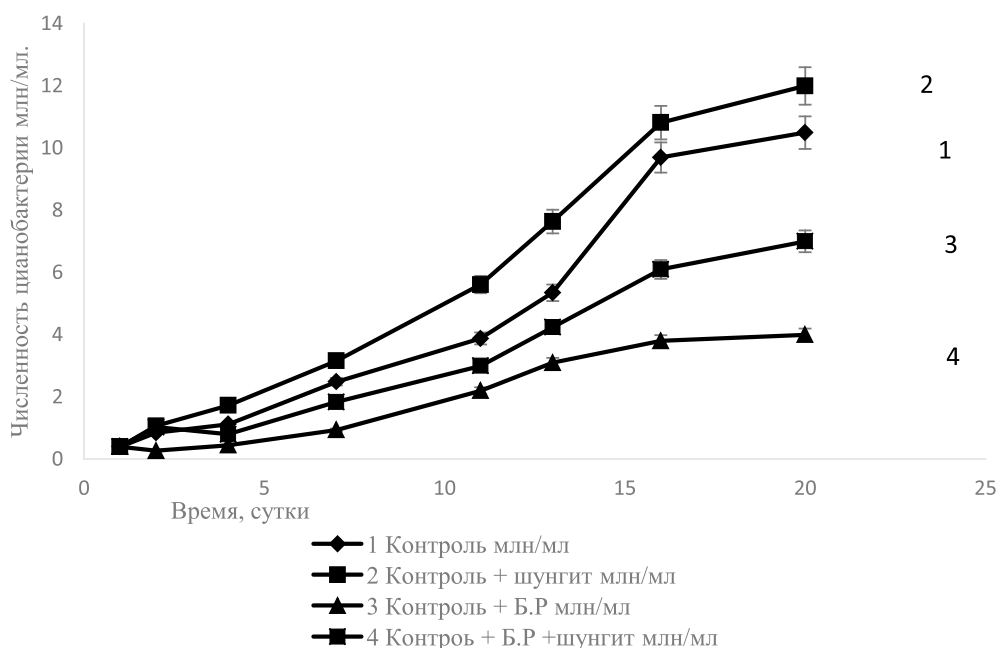


Рис. 1. Влияние бенгальского розового и шунгита на численность цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803*

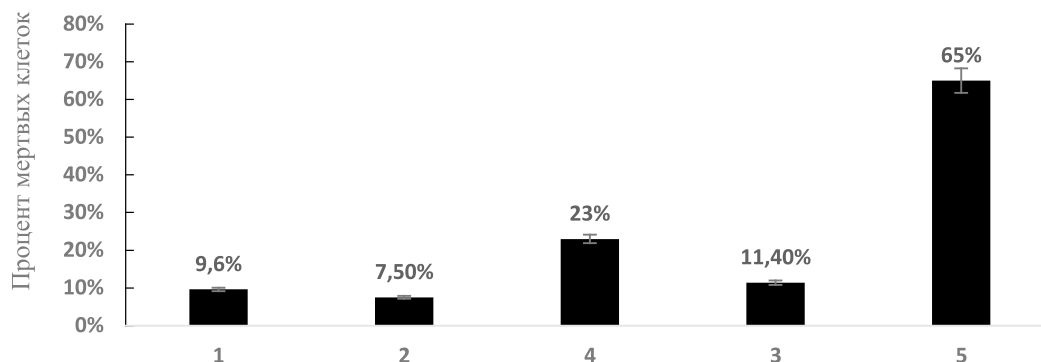


Рис. 2. Количество мертвых клеток цианобактерии в начале стационарной фазы роста с наличием бенгальского розового и шунгита в среде. 1. Контроль, 2. Контроль + шунгит 10 г/л, 3. Контроль + БР 5 г/л + шунгит 10 г/л, 4. Контроль + БР 5 г/л, 5. Контроль + шунгит 30 г/л

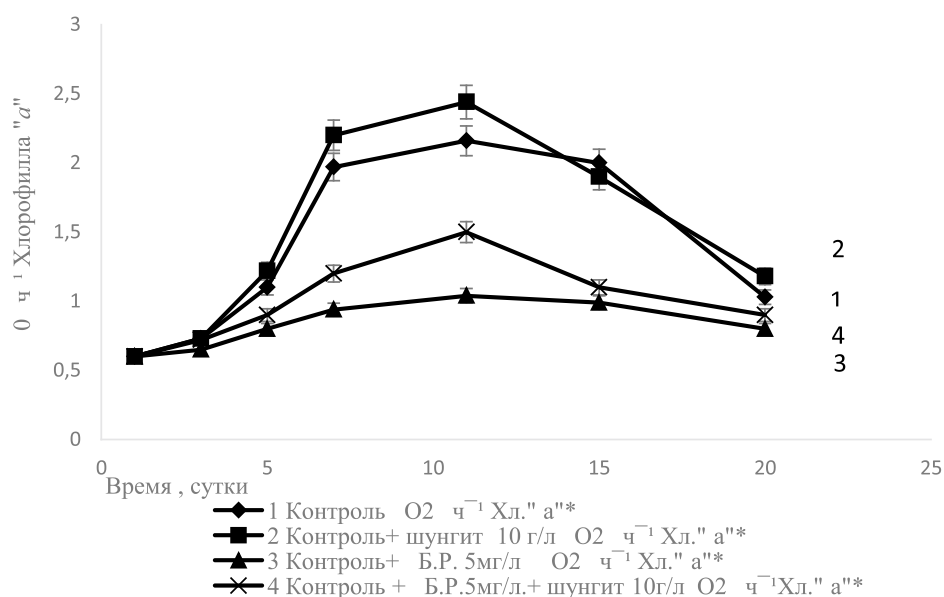


Рис. 3. Влияние бенгальского розового и шунгита на удельную активность выделения кислорода рассчитанного на единицу хлорофилла «а»

Наличие в среде 10 г/л шунгита уменьшает процент мертвых клеток цианобактерии до 7,5% рис. 2 (2), при 30 г/л шунгита число мертвых клеток увеличивается до 65% рис. 2. (5). Таким образом шунгит в зависимости от концентрации может стимулировать рост клеток цианобактерии, подавлять их рост, или инактивировать действие токсиканта.

В логарифмической фазе роста *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бенгальского розового 5 г/л и шунгита в расчете 100 г/л наблюдали незначительное уменьшение количества делящихся клеток и увеличение количества клеток покоящихся, в вышеуказанных концентрациях шунгит частично инактивировал токсическое действие БР В культуре *Synechocystis sp.* при тех же ус-

ловиях культивирования в логарифмической фазе роста быстро возрастает количество мертвых клеток, а количество делящихся клеток резко падает. Количество покоящихся клеток в культуре *Synechocystis sp.* в процессе культивирования относительно постоянно, и если покоящиеся клетки *Scenedesmus quadricauda* могут превращаться в делящиеся в процессе восстановления культуры, то у *Synechocystis sp.* этого не наблюдалось. Как видно из рис. 3, удельная активность выделения кислорода популяции цианобактерии имеет схожую зависимость в аналогичном случае при влиянии бенгальского розового и шунгита на численность клеток (рис. 1).

Известно, что выделение кислорода на единицу хлорофилла отражает эффективность фотосинтеза. Можно с уверенностью

сказать, что изменение вышеуказанных физиологических параметров роста культуры является следствием повреждения фотосистемы культуры. В работе показано, что при больших концентрациях красителя синглетный кислород проникает в клетку и изменяет различные параметры фотосинтеза и редок-с потенциал среды. В концентрациях ниже 4 мг/л изменяет только частично редок-с потенциал среды. Таким образом в зависимости от концентрации шунгита в среде культивирования (а также от вида культуры) редок-с потенциал среды становится более благоприятным, что способствует стимулированию роста данного вида культуры и наоборот, при более высоких концентрациях тормозит рост этой культуры. В конечном итоге мы видим увеличение или торможение численности клеток, удельной активности выделения кислорода (рис. 1, 3).

### Заключение

На основании полученных результатов показано, что концентрации шунгита для инактивации синглетного кислорода отличаются в 10 раз у водорослей и цианобактерии. Культура *Synechocystis sp.* более чувствительна к воздействию как шунгита, так и бенгальского розового. Большинство исследователей связывают механизм токсического, защитного или нейтрального действия шунгита на организменном уровне со свойством фуллеренов и количеством его содержания в шунгите. Полученные нами результаты согласуются с концепциями, изложенными в работах [2, 6].

Таким образом, на основании полученных наших и литературных данных, вопрос об использовании шунгита, как протектора токсикантов для очистки воды намного сложнее, чем это демонстрируют торгующие компании и некоторые исследователи. Резистентность к шунгиту у цианобактерии и водорослей отличается в 10 раз. Поэтому на вопрос, рост и развитие какого вида гидробионта мы хотим получить в водоеме, ответ будет разный.

С нашей точки зрения, без предварительного гидробиологического и гидрохимического анализов эти вопросы трудно решить.

*Работа выполнена в рамках темы по госзаданию (№ ЦИТИС: АААА-А16-116021660054-4).*

### Список литературы

1. Пискарев И.М. Образование перекиси водорода в водных растворах под действием УФ-с излучения // Химия высоких энергий. 2018. № 3. С. 194–198.
2. Voeikov V.L., Vilenskaya N.D., Minh Ha Do, Malyshenko 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. Т. 86. № 9. P. 1407–1415. DOI: 10.1134/S00360244120901.
3. Даллакян Г.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* // Вода: химия и экология. 2013. № 10. С. 102–106.
4. Даллакян Г.А., Погосян С.И., Ипатова В.И. Комбинированное действие шунгита и тяжелых металлов на развитие популяции микроводорослей // Биология внутренних вод. 2018. № 1. С. 107–112.
5. Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. *Science*. 1992. № 257 (5067). P. 215–217.
6. 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 Biolo Med*. 2009. V. 47. P. 786–93.