

Влияние фуллеренов C_{60} и C_{70} на развитие и фотосинтез культуры водоросли *Scenedesmus quadricauda*

© 2021. Г. А. Даллакян, к. б. н., с. н. с., В. И. Ипатова, к. б. н., с. н. с.,
И. В. Михеев, к. х. н., ассистент, А. М. Лазарева, магистр,
С. И. Погосян, д. б. н., профессор,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
e-mail: honaris@bk.ru

В связи с возрастающим производством фуллеренов и вероятностью их поступления в окружающую среду исследования эффектов воздействия их на биологические системы, в частности, – на водные организмы, становятся особенно актуальными. В работе описаны эффекты воздействия водной дисперсии фуллеренов C_{60} и C_{70} в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на численность клеток, эффективность фотосинтеза и долю живых клеток в накопительной культуре традиционного растительного тест-объекта зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda*. Наши и литературные данные показывают, что одна из возможных причин стимуляции роста и эффективности фотосинтеза водорослей связана с антиоксидативными и мембранотропными свойствами фуллеренов. Показан значимый стимулирующий эффект на изменение численности клеток и эффективность фотосинтеза. В присутствии 10 мг/л фуллерена C_{60} или C_{70} в питательной среде стимуляция величины эффективности фотосинтеза культуры составляла соответственно до 25 и 14% по сравнению с контролем, а концентрации 1 и 5 мг/л не оказали достоверного воздействия. При этом при воздействии 10 мг/л фуллерена C_{60} и C_{70} численность клеток водоросли увеличивалась на 27 и 20% соответственно, а при 5 мг/л фуллерена C_{60} стимулирующий эффект был менее выражен. При добавлении в среду как фуллерена C_{60} , так и фуллерена C_{70} , в диапазоне исследованных концентраций 1, 5 и 10 мг/л в процессе опыта клетки оставались жизнеспособными, при этом доля живых клеток была на уровне контроля (98–99%).

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , фуллерен C_{70} , *Scenedesmus quadricauda*, эффективность фотосинтеза, численность клеток.

The effect of fullerenes C_{60} and C_{70} on the growth and photosynthesis of the algae culture *Scenedesmus quadricauda*

© 2021. G. A. Dallakyan ORCID: 0000-0003-2477-7477
V. I. Ipatova ORCID: 0000-0002-7035-6913, I. V. Mikheev ORCID: 0000-0002-2383-1697
A. M. Lazareva ORCID: 0000-0002-5596-5593, S. I. Poghosyan ORCID: 0000-0002-1773-2014
Lomonosov Moscow State University,
119234, Russia, Moscow, Leninskie Gory, 1–12,
e-mail: honaris@bk.ru

Because of the increasing production of fullerenes and the likelihood of their release into the environment, studies of the effects of their impact on biological systems, on aquatic organisms, are becoming especially relevant. The effects of the action of an aqueous dispersion of fullerenes C_{60} and C_{70} at concentrations of 1, 5, and 10 mg/L on the cell number, the efficiency of photosynthesis, and the proportion of living cells in the culture of a traditional test object *Scenedesmus quadricauda* are described. Our and published data show that one of the possible reasons for stimulating the growth and efficiency of photosynthesis of algae is associated with the antioxidative and membranotropic properties of fullerenes. A significant stimulating effect on the change of the cell number and the efficiency of photosynthesis is shown during the experiment. In the presence of 10 mg/L fullerene C_{60} or C_{70} , the stimulation of the photosynthesis efficiency of the culture was up to 25 and 14%, respectively, compared to the control, and concentrations of 1 and 5 mg/L did not cause a significant effect. At the same time, when exposed to 10 mg/L of fullerene C_{60} and C_{70} , the cell number increased by 27 and 20%, respectively, and with 5 mg/L of fullerene C_{60} , the stimulating effect was less expressed. When both fullerene C_{60} and fullerene C_{70} were added to the medium, in the range of 1–10 mg/L, the cells remained viable during the experiment, while the proportion of living cells was at the control level (98–99%).

Keywords: fullerene C_{60} , fullerene C_{70} , *Scenedesmus quadricauda*, photosynthesis efficiency, cell number.

Производство фуллеренов неуклонно возрастает, начиная с 1990 г. В настоящее время объём производства фуллереновой сажи составляет несколько тонн в год. Для научных и практических целей используют стабильные, высококонцентрированные водные дисперсии

фуллеренов (ВДФ C_{60} и C_{70}). Они представляют собой коллоидные растворы с размером частиц до 200 нм [1].

Водорастворимые фуллерены C_{60} и C_{70} – это молекулярные соединения, состоящие из 60 и 70 углеродных атомов, широко используемые в физических, химических, медицинских и биологических исследованиях в связи с их донорно-акцепторными и антиоксидативными свойствами. Благодаря своей уникальной геометрической форме и электронной структуре, фуллерены и их производные рассматриваются в качестве основы для получения новых эффективных лекарственных средств. В настоящее время как применение, так и исследование фуллеренов сдерживаются их высокой стоимостью, которая связана с низкой экономической эффективностью технологий получения и самих фуллеренов, и их производных. Однако, в связи с высокой вероятностью попадания фуллеренов в окружающую среду, особенно актуальной становится задача исследования эффектов их воздействия на биологические системы, в частности, – на водные организмы.

Изучение биологических свойств производных фуллеренов показало, что они способны проникать через биомембраны клетки, благодаря их липофильности, и обладают следующими видами активности: антиоксидантной, антибактериальной, противораковой, радиозащитной, мембранотропной, а также могут служить ингибиторами биосинтеза белков [2].

Водоросли являются важным компонентом водных экосистем, неотъемлемым звеном трофических цепей в водных сообществах. Водные организмы в ходе своей предшествующей эволюции никогда не сталкивались со многими синтезированными человеком веществами, в том числе и с ВДФ, поэтому не исключена постепенная аккумуляция фуллеренов в водоёмах, что может иметь непредсказуемые последствия для водной экосистемы в целом [3]. К настоящему времени проведены многочисленные исследования воздействия ВДФ C_{60} на водные микроорганизмы и ракообразных, однако их результаты носят противоречивый характер. Известны работы, в которых показано наличие токсичных свойств у ВДФ C_{60} при их экспонировании с бактериальными культурами штаммов *Escherichia coli* K-12 и *E. coli* B-23 [4, 5]. В то же время имеются исследования об отсутствии угнетающего действия фуллеренов на *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и почвенные микроорганизмы [6, 7]. Есть данные о стимулирующем воздействии фуллеренов на микробиоценоз сточных вод и рост растений [8, 9].

В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния ВДФ C_{60} и C_{70} в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на биологические показатели в накопительной культуре водоросли *Scenedesmus quadricauda*.

Объекты и методы исследования

Тест-объектом исследования служила альгологически чистая культура зелёной хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.), широко распространённая в пресных водоёмах Южного и Северного полушария и являющаяся важным звеном в трофических цепях.

S. quadricauda получена из коллекции культур водорослей кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (DMMSU, штамм S-3). Данный вид водорослей относится к ценобиальным организмам. Чаще встречаются 2- и 4-клеточные ценобии, реже – 8–16-клеточные. При размножении в каждой клетке образуются автоспоры, которые внутри материнской клетки слагаются в молодую колонию. Данный вид широко используется при биотестировании качества водной среды в мировой практике.

Культуру выращивали на среде Успенского № 1 (состав, г/л: 0,025 KNO_3 , 0,025 $MgSO_4$, 0,1 KH_2PO_4 , 0,025 $Ca(NO_3)_2$, 0,0345 K_2CO_3 , 0,002 $Fe_2(SO_4)_3$; pH 7,0–7,3 ед.) в люминостате при освещённости 3 клк со сменой дня и ночи (12 : 12 ч), температуре $22 \pm 2^\circ C$ и перемешивали 2 раза в сут во избежание оседания клеток.

Действие фуллеренов C_{60} и C_{70} на культуру *S. quadricauda* оценивали при концентрациях 1, 5 и 10 мг/л. Опыты длительностью 17 сут проводили в конических колбах ёмкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл среды, в трёх повторностях для каждой концентрации и контроля.

Биотестирование проводили, руководствуясь рекомендациями, описанными в литературе [10, 11], используя как общепринятые интегральные показатели, так и физиологические показатели состояния культуры.

Основными показателями для оценки состояния культуры служили изменение численности клеток, соотношения живых и мёртвых клеток, эффективности фотосинтеза в динамике её развития.

Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом, все повторности каждой концентрации подсчитывали по 4 раза. Определение живых и мёртвых клеток в культурах осуществляли с помощью

люминесцентного микроскопа Axioscop 2 FSPlus (CarlZeiss, Германия) на препарате «раздавленная капля» в камере Горяева, подсчитывая по 200 клеток в каждой повторности каждой концентрации. При облучении объекта коротковолновым сине-фиолетовым светом и наблюдали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, отмирающие – от оранжевого до жёлтого, а мёртвые – зелёное.

Функциональное состояние водорослей измеряли по эффективности работы их фотосинтетического аппарата на импульсном флуориметре «МЕГА-25» (Россия, МГУ). На основании измерений интенсивностей флуоресценции хлорофилла при открытых (F_o) и закрытых (F_m) реакционных центрах фотосинтетического аппарата определяли эффективность фотосинтеза суспензии водорослей по безразмерному параметру $(F_m - F_o)/F_m$ [12].

Получение водной дисперсии фуллерена C_{60} и C_{70} проводили по методике замены растворителя – толуола на воду с помощью ультразвука [13]. В работе использовали коммерчески доступный образец C_{60} и C_{70} (ООО «НеоТекПродакт», Россия). Отсутствие функционализации поверхности доказывали с помощью метода МАЛДИ-МС (матричноактивированная лазерная десорбция/ионизация). Содержание остаточного толуола и летучих органических компонентов в дисперсиях фуллерена контролировали с помощью статического парового газохроматографического анализа, содержание этих примесей не превышало 0,1 мкг/л. Средний кластер фуллерена составил 130 ± 5 нм с величиной электрокинетического потенциала – $33,2 \pm 0,5$ мВ (измерения проводили в среде деионизованной воды). С помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой установлено, что содержание в дисперсии As составляло не более 5 мкг/л, а Pb, Cd, Zn и Cu – не более 1 мкг/л. Работы по получению ВДФ C_{60} и C_{70} были выполнены на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ.

Результаты опытов статистически обработаны с использованием критерия Стьюдента. Оценку токсического действия проводили на основании достоверности различий опытных значений по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Численность клеток *S. quadricauda* во всех пробах с фуллереном C_{60} во время роста культуры была на уровне или выше, чем в контроле (рис. 1). Начиная с 10 сут опыта, отмечена

достоверная стимуляция роста тест-культуры в пределах 8–12% при 5 мг/л и 12–27% при 10 мг/л фуллерена C_{60} . А в присутствии 1 мг/л рост культуры находился на уровне контроля на протяжении всего опыта.

При концентрации 10 мг/л фуллерена C_{60} , начиная с 3-х сут роста культуры, величина эффективности фотосинтеза увеличивалась и достигала максимума на 14 сут (20% по отношению к контролю), а при концентрациях 1 и 5 мг/л достоверных различий не обнаружено (рис. 2).

Таким образом, фуллерен C_{60} оказывает стимулирующее действие как на изменение численности клеток водоросли, так и на величину эффективности фотосинтеза.

Влияние фуллерена C_{70} на численность клеток было исследовано в таком же диапазоне концентраций (1–10 мг/л) (рис. 3). Концентрации 1 и 5 мг/л не оказали значимого влияния на изменение численности клеток. А при 10 мг/л в процессе роста наблюдали достоверную стимуляцию роста культуры на 4–20%, начиная с 3-х сут опыта.

При концентрации 10 мг/л фуллерена C_{70} , начиная с 3-х сут роста культуры, эффективность фотосинтеза увеличивалась и достигала своего максимума (14% по отношению к контролю) на 14 сут роста (рис. 4), а в концентрациях 1 и 5 мг/л достоверных различий по эффективности фотосинтеза не обнаружено. Полученные данные по действию фуллеренов на величину эффективности фотосинтеза во время роста культуры свидетельствуют о том, что действие фуллерена C_{70} слабее, чем фуллерена C_{60} .

Таким образом, данные по численности клеток хорошо согласуются с данными по эффективности фотосинтеза.

Результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оценённой с помощью метода люминесцентной микроскопии, при добавлении в среду в диапазоне исследованных концентраций 1–10 мг/л как фуллерена C_{60} , так и фуллерена C_{70} , показали, что на протяжении двух экспериментов в контроле доля мёртвых клеток составляла всего 1–2%, а во всех опытных образцах была на уровне контроля.

Заключение

Таким образом, разными методами, используя различные показатели состояния, изучаемого тест-объекта, было показано, что добавка фуллеренов C_{60} и C_{70} в среду культивирования приводит к лучшему росту культуры *S. quadricauda* как по интегральному

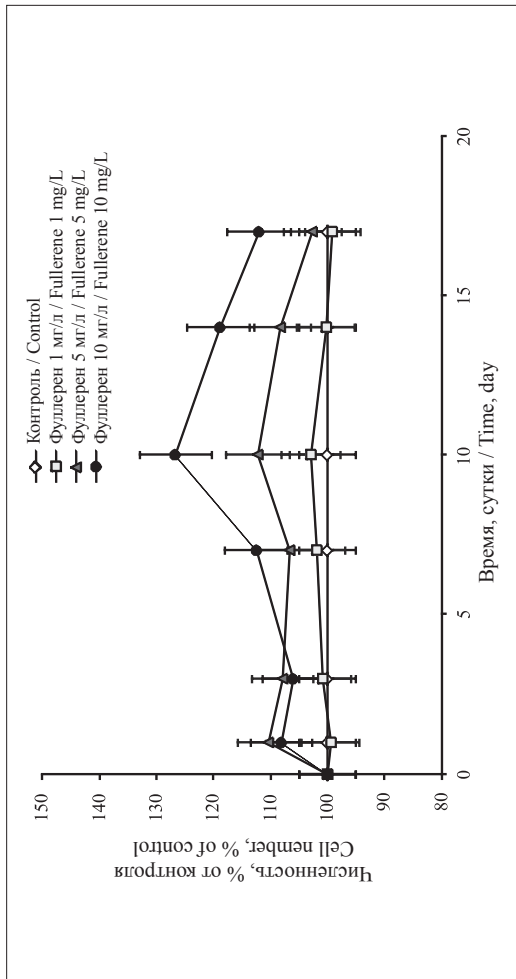


Рис. 1. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в процессе роста в присутствии фуллерена C_{60} / **Fig. 1.** Change in the relative cell number in the presence of fullerene C_{60} during the growth of the culture *Scenedesmus quadricauda*

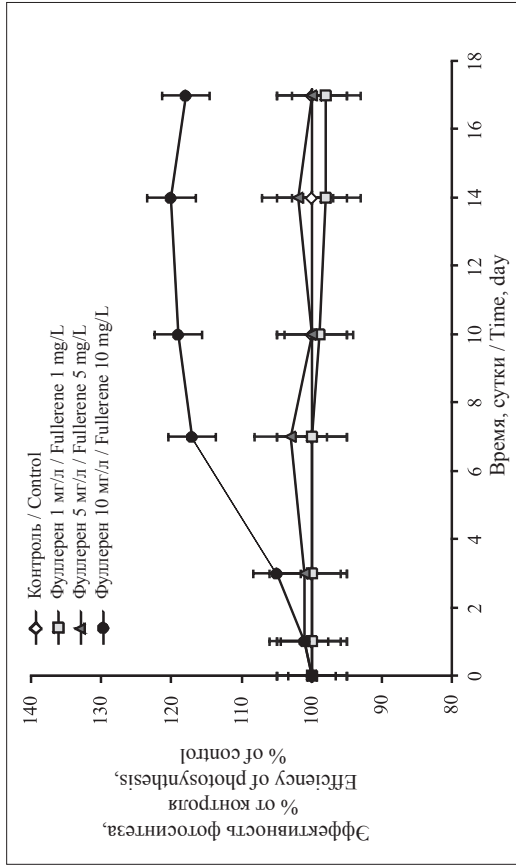


Рис. 2. Влияние фуллерена C_{60} на эффективность фотосинтеза (F_v/F_m , %) в процессе роста культуры *Scenedesmus quadricauda* / **Fig. 2.** The effect of fullerene C_{60} on the efficiency of photosynthesis (F_v/F_m , %) during the growth of the culture *Scenedesmus quadricauda*

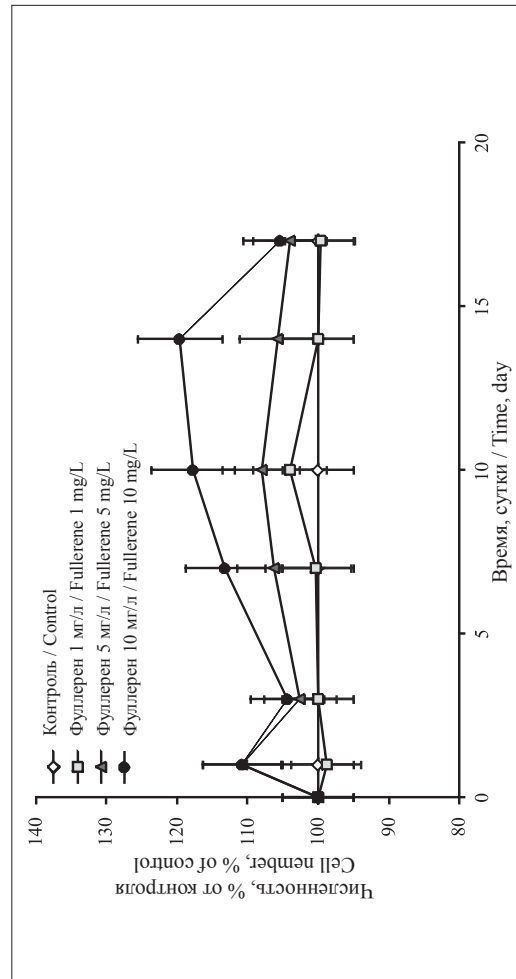


Рис. 3. Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в процессе роста в присутствии фуллерена C_{70} / **Fig. 3.** Change in the relative cell number in the presence of fullerene C_{70} during the growth of the culture *Scenedesmus quadricauda*

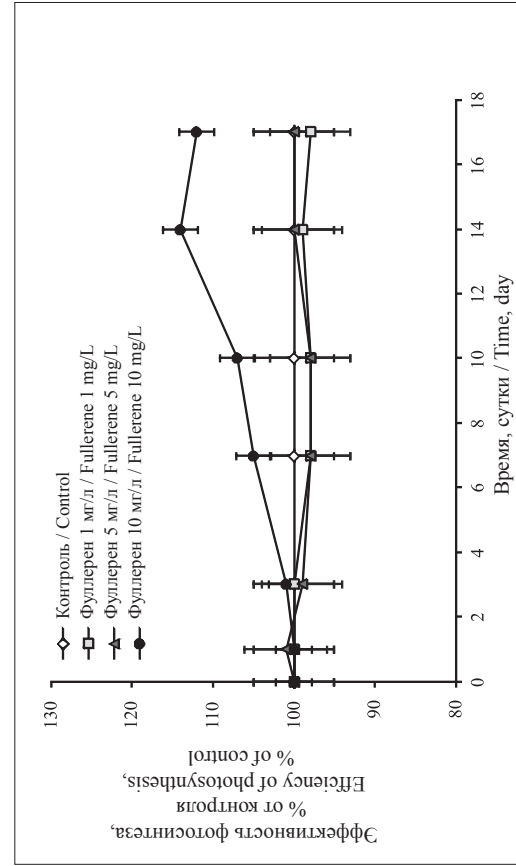


Рис. 4. Влияние фуллерена C_{70} на эффективность фотосинтеза (F_v/F_m , %) в процессе роста культуры *Scenedesmus quadricauda* / **Fig. 4.** The effect of fullerene C_{70} on the efficiency of photosynthesis (F_v/F_m , %) during the growth of the culture *Scenedesmus quadricauda*

общебиологическому показателю – численности клеток, так и по функциональному показателю – величине эффективности фотосинтеза, характеризующему физиологическое состояние изучаемого тест-объекта. При этом фуллерен C_{60} оказывает более сильное стимулирующее действие на рост культуры, уже начиная с концентрации 5 мг/л, в отличие от фуллерена C_{70} , который оказывает стимулирующее действие при концентрации 10 мг/л.

На основании данных литературы можно предположить, что одна из возможных причин стимуляции роста водорослей связана с антиоксидативной активностью фуллеренов [2], которые стабилизируют свободнорадикальные процессы в клетке и инактивируют активные формы кислорода, образующиеся в среде культивирования во время роста культуры. Кроме того, фуллерены, проникая в клетку благодаря своим мембранотропным свойствам [9], по-видимому, влияют на темп деления клеток, способствуя усиленному росту клеток водорослей. Ранее в нашей работе было показано, что фуллерен C_{60} стимулировал рост природного и аквариального бактериопланктона [2]. Стимуляция бактериальной флоры в питательной среде может также способствовать росту клеток водорослей.

Необходимы дальнейшие биохимические исследования влияния фуллеренов на рост водорослей для установления возможных причин их благоприятного воздействия на первичное звено водных экосистем. Проведение биотестирования вновь синтезированных веществ и соединений на стандартных тест-объектах с целью установления их токсичности или стимуляции роста позволит в будущем защитить водные экосистемы от их загрязнения.

Исследование выполнено в рамках темы государственного задания «Закономерности формирования качества воды, биоиндикация и оценка экологической безопасности водной среды» (№ ЦИТИС: АААА-А16-116021660054-4) и государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, часть 2 (тема № АААА-А16-116021660047-6).

References

1. Duncan L.K., Jinschek J.R., Vikesland P.J. C_{60} colloid formation in aqueous systems: effects of preparation method on size, structure, and surface charge // *Environmental Science & Technology*. 2008. V. 42. No. 1. P. 173–178. doi: 10.1021/es071248s
2. Dumpis M.A., Nikolaev D.N., Litasova E.V., Ilyin M.A., Brusina L.B. Biological activity of fullerenes – realities and prospects // *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarst-*

vennoy terapii. 2018. V. 16. No. 1. P. 4–20 (in Russian). doi: 10.17816/RCF1614-20

3. Mosharova I.V., Dallakyan G.A., Mikheev I.V., P'inskii V.V., Akulova A.Yu. Changes in the quantitative and functional characteristics of bacterioplankton under the influence of aqueous unmodified fullerene C_{60} dispersions // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2019. V. 487. No. 2. P. 217–222. doi: 10.31857/S0869-56524872217-220

4. Aquino A., Chan J., Giolma K., Loh M. The effect of a fullerene after suspension on the growth, cell viability, and membrane integrity of *Escherichia coli* B23 // *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. 2010. V. 14. P. 13–20.

5. Chae S.R., Wang S.Y., Hendren Z.D., Wiesner M.R., Watanabe Y., Gunsch C.K. Effects of fullerene nanoparticles on *Escherichia coli* K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control // *Journal of Membrane Science*. 2009. V. 329. No. 1–2. P. 68–75. doi: 10.1016/j.memsci.2008.12.023

6. Hadduck A., Hindagolla V., Contreras A., Li Q., Bakalinsky A.T. Does aqueous fullerene inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* or *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. V. 76. No. 24. P. 8239–8242. doi: 10.1128/AEM.01925-10

7. Tong Zh.-H., Bischoff M., Nies L., Carroll N.J., Applegate B., Turco R. Influence of fullerene (C_{60}) on soil bacterial communities: aqueous aggregate size and solvent co-introduction effects // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. Article No. 28069. doi: 10.1038/srep28069

8. Huang F., Ge L., Zhang B., Wang Y., Tian H., Zhao L., He Y., Zhang X. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria // *Chemosphere*. 2014. V. 108. P. 411–417. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.042

9. Panova G.G., Kanash E.V., Semenov K.N., Charykov N.A., Khomyakov Yu.V., Anikina L.M., Artemyeva A.M., Kornukhin D.L., Vertebny V.E., Sinyavina N.G., Udalova O.R., Kulenova N.A., Blokhina S.Yu. Derivatives of fullerene stimulate the production process, growth and resistance to oxidative stress in plants of wheat and barley // *Selskokhozyaystvennaya biologiya*. 2018. V. 53. No. 1. P. 38–49 (in Russian). doi: 10.15389/agrobiologia.2018.1.38eng

10. Fokina A.I. The use of physiological and biochemical reactions of microorganisms on the action of toxicants in bioassay // *Theoretical and Applied Ecology*. 2017. No. 3. P. 4–15 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-3-004-015

11. Olkova A.S. Modern trends in the development of bioassay methodology of aquatic environments // *Theoretical and Applied Ecology*. 2018. No. 3. P. 19–26 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2018-3-019-026

12. Pogosyan S.I., Galchuk S.V., Kazimirko Yu.V., Konyukhov I.V., Rubin A.B. The use of a MEGA-25 fluorimeter to determine the amount of phytoplankton and assess the state of its photosynthetic apparatus // *Voda: khimiya i ekologiya*. 2009. No. 6. P. 34–40 (in Russian).

13. Mikheev I.V., Khimich E.S., Rebrikova A.T., Volkov D.S., Proskurnin M.A., Korobov M.V. Quasi equilibrium distribution of pristine fullerenes C_{60} and C_{70} in a water-toluene system // *Carbon*. 2017. V. 111. P. 191–197. doi: 10.1016/j.carbon.2016.09.065