

## ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Даллакян Г.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: honaris@bk.ru

Поступила в редакцию: 18.06.2021

**Аннотация.** В начале наших исследований было выбрано водоросли *Scenedesmus quadricauda* являющимся тест-объекта фитопланктонных организмов в водной токсикологии. Исследовано воздействия водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub> в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на численность клеток, эффективность фотосинтеза и долю живых клеток в накопительной культуре. Концентрация 10 мг/л фуллерена C<sub>60</sub> в питательной среде стимулировала эффективность фотосинтеза до 25% по сравнению с контролем, при этом численность клеток водоросли увеличивалась на 27%. Стимулирующий эффект был менее выражен в концентрациях 1 и 5 мг/л фуллерена. Вторым этапом наших исследований, было планктонные ракообразные *ceriodaphnia dubia*, обладающие высокой чувствительностью к загрязнению водной среды потенциально токсичными веществами различной химической природы. Воздействию исследованных концентраций фуллерена 0,1 и 1 мг/л на цериодафний показало увеличение размеров тела до 6% и плодовитости до 144% у особей опытных групп по сравнению с контрольной. При воздействии большей концентрации 1 мг/л эти отличия более значимы. Таким образом в исследуемых организмах наблюдается стимуляция биологических показателей при добавлении в питательную среду фуллерена, при этом более чувствительны ракообразные *ceriodaphnia dubia*.

**Ключевые слова:** фуллерен C<sub>60</sub>, стимуляция, ракообразные, водоросли, фотосинтез, численность.

В связи с возрастающим производством фуллеренов и вероятностью их попадания в окружающую среду особенно актуальной становится задача исследования их воздействия на биологические системы, в частности – на водные организмы. Выбор исследуемых гидробионтов связано с тем, что, водоросли *Scenedesmus quadricauda* являющимся тест-объекта фитопланктонных организмов в водной токсикологии. При этом ракообразные являются важным звеном трофических цепей в водных сообществах и ценным кормовым объектом для рыб. Они обладают высокой чувствительностью к загрязнению водной среды потенциально токсичными веществами различной химической природы, и зачастую первыми реагируют на их присутствие в воде.

Водные организмы, в ходе своей предшествующей эволюции никогда не сталкивались со многими синтезированными человеком веществами, в том числе и с водной дисперсией фуллерена (ВДФ) (в дальнейшем – фуллерены), поэтому не исключена постепенная аккумуляция фуллеренов в водоемах, это может иметь непредсказуемые последствия для всей водной экосистемы в целом [1]. К настоящему времени проведены ряд исследования воздействия ВДФ C<sub>60</sub> на водные микроорганизмы, и ракообразных, однако их результаты носят противоречивый характер. Известны работы, в которых показано наличие токсичных свойств у ВДФ C<sub>60</sub> при их экспонировании с бактериальными культурами [2, 3]. В то же время имеются исследования, в которых показано об отсутствии угнетающего действия фуллеренов на микроорганизмы [4, 5]. Есть данные и о стимулирующем воздействии ВДФ C<sub>60</sub> на микробиоценозы сточных вод [6].

Целью настоящей работы было исследование влияние ВДФ C<sub>60</sub> на гидробионты разных трофических уровней в накопительной культуре. водорослей *Sc. quadricauda*, и ракообразных *Ceriodaphnia dubia* в лабораторной культуре.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВДФ C<sub>60</sub> были получены по методике ультразвуковой замены растворителя из толуола [7]. Содержание толуола и летучих органических компонентов в дисперсиях фуллеренов контролировали с помощью статического парофазного газохроматографического анализа. Средний диаметр кластеров фуллеренов в ВДФ C<sub>60</sub> составил 130±5 нм. Это часть работы по получению ВДФ C<sub>60</sub> были выполнены на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ. Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры за помощь и консультации при выполнении работы.

Тест-объектом исследования для фитопланктона служила альгологически чистая культура зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (*Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.), широко распространенная в пресных водоемах Южного и Северного полушария и являющаяся их важным звеном в трофических цепях.

Культуру выращивали на среде Успенского № в люминостате при освещенности 3 клк со сменой дня и ночи (12:12 ч), температуре 22±2 °С и перемешивали 2 раза в сутки во избежание оседания клеток.

Действие фуллеренов C<sub>60</sub> на культуру *S. quadricauda* оценивали при концентрациях 1, 5 и 10 мг/л. Опыты проводили в конических колбах емкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл среды, в трех повторностях для каждой концентрации и контроля длительностью 17 суток.

Основными показателями для оценки состояния культуры служили изменение численности клеток, соотношения живых и мертвых клеток, эффективности фотосинтеза в динамике ее развития. Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом. Определение живых и мертвых клеток в культурах осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Axioscop 2 FS Plus (Carl Zeiss, Германия).

Кривые эффективности фотосинтеза были построены на основе данных, полученных на приборе «МЕГА-25» [8]. Интенсивность флуоресценции хлорофилла была рассчитана по показателям  $F_0$  и  $F_m$  [8].

Эксперименты с *ceriodaphnia dubia* проводили в соответствии с методическими рекомендациями [9], в течение 8 суток, в полухроническом режиме. Для каждой серии исследований изначально было посажено по 4 новорожденных рачка (возраст <24 часов) в объем раствора 20 мл в 6 повторностях. В течение экспериментов смену растворов не производили. Кормление производили через день суспензией хлореллы до достижения плотности суспензии 500 тыс. кл/мл со вторых суток эксперимента. Ежедневно учитывали выживаемость особей, появление молоди, на 8 сутки измеряли линейные размеры тела рачков при помощи стереоскопического микроскопа с окуляр-микрометром. Во время наблюдения был получен один вымет молоди как в контрольной, так и в опытных выборках. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистического пакета программ STATISTICA-10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

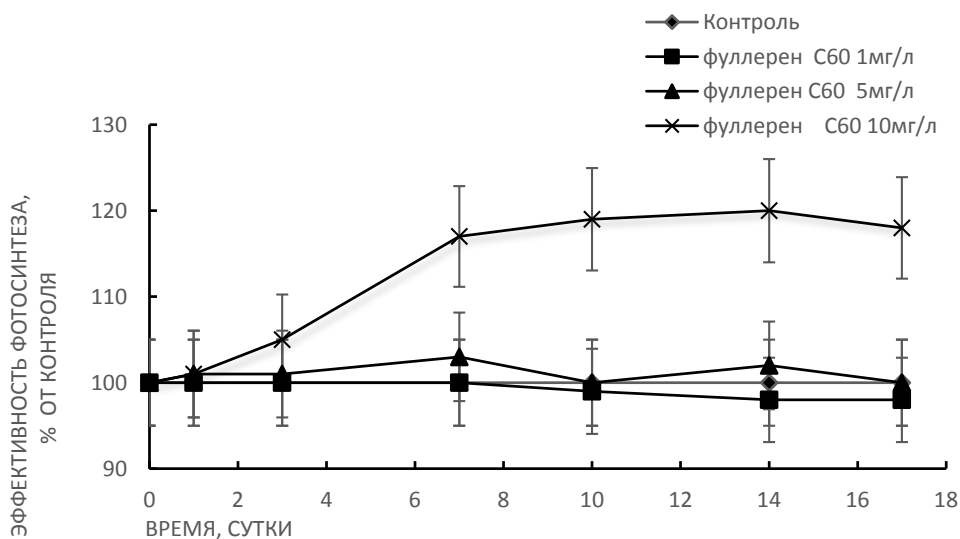
Результаты исследований влияния водных дисперсий  $C_{60}$  на водоросли представлены на рисунках 1 и 2. Как видно из рисунка 1, при концентрации 10 мг/л  $C_{60}$ , начиная с 3-х суток роста культуры, величина эффективности фотосинтеза увеличивалась и достигала максимума на 14 сутки (20% по отношению к контролю), а при концентрациях 1 и 5 мг/л достоверных различий в серии не обнаружено.

Численность клеток *S. quadricauda* во всех пробах с  $C_{60}$  во время роста культуры была на уровне или выше, чем в контроле (рис. 2). Начиная с 10 суток опыта, отмечена достоверная стимуляция роста тест-культуры в пределах 8–12% при 5 мг/л и 12–27% при 10 мг/л  $C_{60}$ . А в присутствии 1 мг/л рост культуры находился на уровне контроля на протяжении всего опыта.

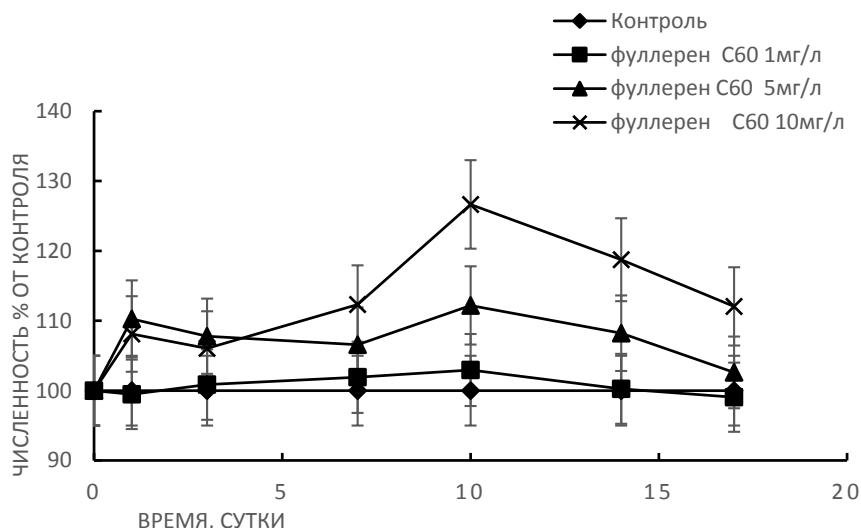
Таким образом, водная дисперсия  $C_{60}$  оказывает стимулирующее действие на изменение численности клеток водоросли, так и на величину эффективности фотосинтеза.

Результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии, при добавлении в среду в диапазоне исследованных концентраций 1–10 мг/л как для  $C_{60}$  показало, что в процессе опыта клетки оставались жизнеспособными, при этом доля живых клеток была на уровне контроля (98–99%). Ране в нашей работе было показано, стимулирующего влияния ВДФ  $C_{60}$  в концентрации 5 мг/л как на численность бактериопланктона в целом, так и на количество бактериальных клеток с активным метаболизмом в его составе [1]

На основании данных литературы можно предположить, что одна из возможных причин стимуляции роста водорослей связана с антиоксидативной активностью фуллеренов [10], 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 [11], по-видимому, влияют на темп деления клеток, способствуя усиленному росту клеток водорослей.



**Рисунок 1.** Влияние водной дисперсии фуллерена  $C_{60}$  на эффективность фотосинтеза ( $F_v/F_m$ , %) в процессе роста культуры *Scenedesmus quadricauda*



**Рисунок 2.** Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в процессе роста в присутствии водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub>

Дале было исследовано влияние фуллерена C<sub>60</sub>, планктонные ракообразные *ceriodaphnia dubia*, обладающие высокой чувствительностью к загрязнению водной среды потенциально токсичными веществами различной химической природы.

Воздействию фуллерена в концентрациях 0,1 и 1 мг/л на цериодафний не наблюдалось снижения выживаемости, напротив опытные выборки сохранили выживаемость на более высоком уровне по сравнению с контролем (92–96% от исходной).

При воздействии исследованных концентраций фуллерена зарегистрировано увеличение размеров тела до 6% и плодовитости до 144% у особей опытных групп по сравнению с контрольной (табл. 1). При воздействии большей концентрации 1 мг/л эти отличия статистически значимы. Стоит отметить, что появление молоди (первый помет) отмечено в контрольной группе особей на 6 сутки, а в присутствии фуллерена в обоих случаях несколько раньше – на 4–5 сутки, что свидетельствует о стимуляции наступления половозрелости у рачков в опытных выборках (таблица 1). Накопления частиц фуллерена в фильтрационном аппарате рачков при микроскопическом исследовании не отмечено. Морфологических изменений у исходно наблюдаемых особей и их потомства не отмечено.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы. Добавка водных дисперсий фуллеренов C<sub>60</sub> в среду культивирования водорослей приводит к лучшему росту культуры, как по интегральному общебиологическому показателю численности клеток, так и по функциональному показателю увеличению эффективности фотосинтеза, характеризующему физиологическое состояние изучаемого тест-объекта

Воздействию фуллерена в концентрациях 0,1 и 1 мг/л на цериодафний показало, что опытные выборки сохранили выживаемость на более высоком уровне по сравнению с контролем (92–96% от исходной).

Обе концентрации фуллерена увеличивают выживаемость, плодовитость и линейный рост цериодафний. При воздействии концентрации 1 мг/л описанное стимулирующее воздействие статистически более значимо.

**Таблица 1.** Биологические показатели ракообразных *Ceriodaphnia dubia* в присутствии водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub>

Концентрация	Выживаемость на 8 сутки, %	Размеры тела на 8 сутки, мм			Плодовитость на 1 самку, особи		
		M±m	% от Контроля	Tст	M±m	% от Контроля	Tст
Контроль	70	0,81±0,01			2,5±0,6		
Фуллерен 0,1 мг/л	96	0,84±0,01	<b>103,9*</b>	<b>3,18</b>	2,8±0,4	112,2	0,82
Фуллерен 1 мг/л	92	0,86±0,02	<b>106,1</b>	<b>3,27</b>	3,6±0,6	<b>143,9</b>	<b>3,36</b>

\*Примечание – жирным шрифтом показаны статистически значимые отклонения опытных значения от значений в контрольной выборке

В тоже время результаты наших опытов указывают необходимость дальнейшего эколого-биохимического исследование влияние фуллеренов на рост планктонных организмов для установления возможных причины и молекулярных механизмов 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

#### Список литературы / References:

1. Mosharova I.V., Dallakyan G.A., Mikheev I.V., Il'inskii V.V., and Akulova A.Yu. Changes in the quantitative and functional characteristics of bacterioplankton under the influence of aqueous unmodified fullerene C<sub>60</sub> dispersions. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2019, vol. 487, no. 2, pp. 1-4.
2. Aquino A., Chan J., Giolma K., Loh M. The effect of a fullerene atersuspension on the growth, cell iability, and membrane integrity of Escherichia coli B23. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, 2010, vol. 14, pp. 13-20.
3. 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, vol. 329, no. 1-2, p. 68.
4. 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, vol. 76, no. 24, pp. 8239-8242.
5. Tong Zh-H., Bischoff M., Nies L., Carroll N.J., Applegate B., Turco R. Influence of fullerene (C<sub>60</sub>) on soil bacterial communities: aqueous aggregate size and solvent co-introduction effects. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, p. 28069.
6. 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, vol. 108, p. 411
7. Mikheev I.V., Khimich E.S., Rebrikova A.T., Volkov D.S., Proskurnin M.A., Korobov M.V. QuasiEquilibrium Distribution of Pristine Fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in a Water-Toluene System. *Carbon*, 2017, vol. 111, p. 191.
8. 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 number of phytoplankton and assess the state of its photosynthetic apparatus. *Voda: khimiya i ekologiya*, 2009, no. 6, pp. 34-40.
9. Lewis P., Klemm D., Lazorchak J., Norberg-King T., Peltier, W. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms*. Third edition: U.S. Environmental Protection Agency, 1994, pp. 128-173.
10. Dumpis M.A., Nikolaev D.N., Litasova E.V., Ilin V.V., Brusina M.A., Piotrovsky L.B. Biological activity of fullerenes – reality and prospects. *Reviews on ClinicalPharmacology and Drug Therapy*. 2018, vol. 16, no. 1, pp. 4-20.
11. Poletaeva D.A. *Membrantnoannye properties of water-soluble fullerene derivatives*: Author's abstract. dis. .. cand. biol. sciences. Moscow: Moscow State University 2012, 24 p.

## THE EFFECT OF FULLERENE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF AQUATIC ORGANISMS

Dallakyan G.A.

Lomonosov Moscow State University

st. Leninskie Gory, 1, b. 12, Moscow, 119234, Russia; e-mail: honaris@bk.ru

**Abstract.** At the beginning of our research, the algae *Scenedesmus quadricauda* was chosen as a test object for phytoplankton organisms in aquatic toxicology. The effect of an aqueous dispersion of fullerene C<sub>60</sub> at concentrations of 1, 5, and 10 mg / l on the number of cells, the efficiency of photosynthesis and the proportion of living cells in the enrichment culture was studied. The concentration of 10 mg / l of fullerene C<sub>60</sub> in the nutrient medium stimulated the efficiency of photosynthesis up to 25% in comparison with the control, while the number of algal cells increased by 27%. The stimulating effect was less pronounced at concentrations of 1 and 5 mg / l of fullerene. The second stage of our research was planktonic crustaceans *ceriodaphnia dubia*, which are highly sensitive to pollution of the aquatic environment with potentially toxic substances of various chemical nature. The effect of the investigated fullerene concentrations of 0.1 and 1 mg / l on *ceriodaphnium* showed an increase in body size up to 6% and fertility up to 144% in individuals of the experimental groups compared with the control. When exposed to a higher concentration of 1 mg / l, these differences are more significant. Thus, in the studied organisms, the stimulation of biological parameters is observed when fullerene is added to the nutrient medium, while the crustaceans *ceriodaphnia dubia* are more sensitive.

**Key words:** fullerene C<sub>60</sub>, stimulation, crustaceans, algae, photosynthesis, abundance.