ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЗЕМЛЕ, 2021, том 498, № 1, с. 101–104

ГЕОЭКОЛОГИЯ

УДК 34.35.51, 34.31.15

ВОЗДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА МАЛОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА СОСТОЯНИЕ ТОКСИГЕННЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

© 2021 г.
Академик РАН В. А. Румянцев[1, 2], В. Н. Рыбакин[1, 2, *], И. В. Рудский[1], А. Н. Коровин[1]

Поступило 02.02.2021 г.
После доработки 07.02.2021 г.
Принято к публикации 08.02.2021 г.

На специальной созданной лабораторной установке впервые были выполнены эксперименты по исследованию механизмов воздействия ультразвука малой интенсивности на токсигенные цианобактерии вида *Synechocysctis sp.*, доминирующие на Северо-Западе России. Установлено, что в случае токсигенных цианобактерий действие ультразвука вызывает запуск двух стрессозащитных метаболических механизмов: 1) синтез полисахаридов и белков для увеличения толщины клеточных стенок и слизистого чехла; 2) синтез токсинов для борьбы с внешним воздействием. Оба механизма чрезвычайно энергозатратны и приводят к истощению жизненных ресурсов цианобактерий и ускорению процесса гибели клеток.

Ключевые слова: ультразвук малой интенсивности, токсигенные, цианобактерии, “цветение” воды, механизмы воздействия

DOI: 10.31857/S2686739721050145

К одной из острейших глобальных экологических проблем относится “цветение” воды, в котором наибольшую угрозу представляет цветение токсикогенных видов цианобактерий. Последние обладают механизмом биосинтеза опасных токсинов: микроцистина, нодулярина, анатоксина и других. По характеру воздействия на человека Всемирной организацией здравоохранения они относятся к блокираторам, нейротоксинам и цитотоксинам [1].

Для внутренних водоемов наиболее перспективным и “экологически чистым” решением проблемы цианобактериального “цветения” воды считается использование ультразвука малой интенсивности.

Несмотря на достигнутые положительные результаты в использовании ультразвука в борьбе с цианобактериальным “цветением” водоемов, осталось много не выясненных моментов в отношении поведения токсигенных цианобактерий. В сообщении даны результаты впервые выполненных лабораторных исследований по воздействию ультразвука на токсигенные цианобактерии одного из доминирующих на северо-западе Российской Федерации вида *Synechocysctis sp.* В опытах использовали чистые культуры, культивируемые в 100%-ной среде Громова № 6. Штамм *Synechocystis sp.* представляет собой одноклеточные бактерии, которые достаточно равномерно распределяются по объему емкости. Это позволяло отбирать репрезентативные пробы для микроскопии, люминесцентной микроскопии и спектрофотометрии, которые применяли как методы контроля [2].

Эксперименты осуществлялись с помощью специально созданной программируемой установки с 10 каналами с ультразвуковыми излучателями с рабочим диапазоном частот – f от 40 до 300 кГц, напряжением питания – U на источнике ультразвукового излучения от 1 до 4 В и одного контрольного канала без излучателя. Излучатели АД-20 производства концерна “Океанприбор” размещались под дном стеклянных емкостей и были отделены от стола звукопоглощающим материалом и экранированы фольгой. Пространственное распределение и величина звукового давления, создаваемого ультразвуковыми колебаниями, оценивались с помощью гидрофона, откалиброванного в диапазоне 20–200 кГц. Для освещения суспензий цианобактерий использовались люминесцентные лампы Hagen Sun Glo, спектр излучения которых близок к солнечному. Равномерность светового потока и освещенность

[1] *Институт озероведения Российской Академии наук, Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

[2] *Санкт-Петербургский научный центр Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: v.n.rybakin@gmail.com*

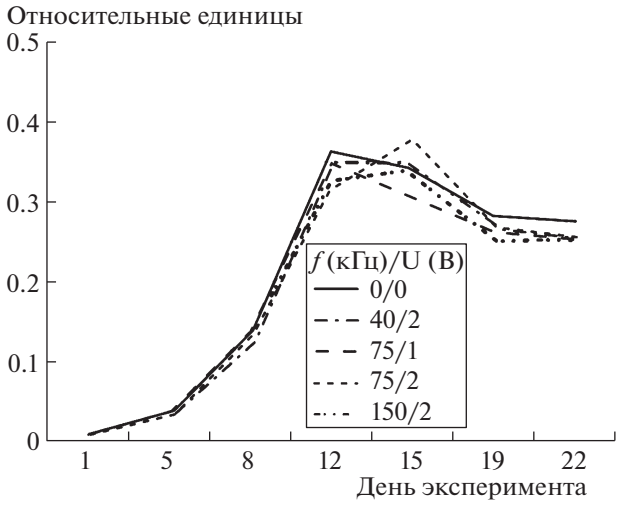

Рис. 1. Изменения показателя оптического поглощения при различных параметрах ультразвукового облучения.

в 260 Лм на боковой поверхности экспериментальных емкостей контролировались с помощью люксметра Mastech MS 6610. В эксперименте поддерживались условия, близкие к оптимальным для роста цианобактерий в природной среде по концентрации растворенных минеральных веществ – в 5.0%-среде Громова № 6 и диапазоне температур 22–26°С.

Оценка концентраций клеток во всех экспериментальных емкостях проводилась посредством измерения оптического поглощения суспензии цианобактерий на однолучевом сканирующем спектрофотометре “Shimadzu” UV-mini 1240. Была выявлена высокая корреляция показателя оптического поглощения с концентрацией клеток, что было также отмечено в работах [3, 4].

На рис. 1 можно видеть достаточно идентичный ход показателя оптического поглощения независимо от параметров ультразвука. Учитывая отмеченную выше корреляцию, можно заключить, что концентрация клеток в экспериментальных емкостях под воздействием ультразвука начинает снижаться примерно с 12-го по 15-й день облучения.

С помощью флуоресцентного микроскопа МИКМЕД-2.16 был проведен учет количества живых и мертвых клеток цианобактерий (табл. 1). В качестве начального состояния были приняты характеристики цианобактерий в первый день эксперимента: процент мертвых клеток 2.2, состояние клеток – ярко-красные, почти все делящиеся.

Воздействие ультразвука на цианобактерии ускоряет естественный процесс отмирания клеток.

Цианобактерии вида *Synechocysctis sp.* обладают слаборазвитым слизистым чехлом, напрямую связанным с функциональными особенностями всех внеклеточных структур. Клеточная стенка и слизистый чехол у цианобактерий становятся более толстыми под влиянием факторов внешней среды: в случаях солевого стресса (хлорид натрия), воздействия тяжелых металлов (кобальт, кадмий) и недостатка биогенов (железо) [5]. Рост толщины чехла был обнаружен и после воздействия на цианобактерии ультразвука (рис. 2).

В связи с этим важным становится факт наличия или отсутствия биосинтеза токсинов. Для его выяснения использовали метод биоиндикации с помощью дафний *Daphnia magna* [6], в котором уровень токсичности воды определяется относительным количеством погибших организмов. Данные по токсичности проб при разных параметрах ультразвукового облучения представлены в табл. 2.

Представленные данные позволяют отметить несколько важных моментов. Высокий процент гибели дафний на первом этапе эксперимента свидетельствует о том, что токсигенные ци-

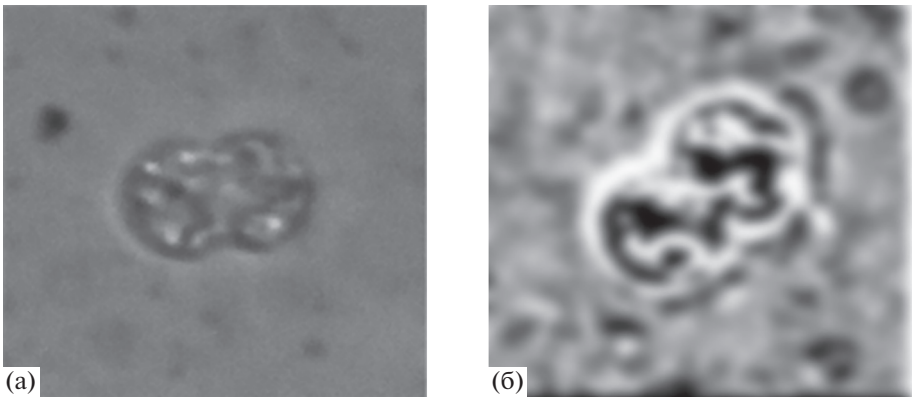

Рис. 2. Микрофотографии клеток цианобактерий *Synechocysctis sp.* (а) контроль – $f = 0$ кГц, U = 0 В; (б) после акустического облучения – $f = 75$ кГц, U = 2 В.

Таблица 1. Изменения состояния клеток, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии

Параметры ультразвука, кГц/В	Процент мертвых клеток	Состояние клеток
8-й день эксперимента		
контроль	2.2	Клетки ярко-красные в небольших скоплениях. Состояние культуры хорошее.
150/2	0.5	Клетки ярко-красные с зеленоватым центром. В скоплениях. Состояние культуры хорошее.
300/4	2.3	Большинство клеток розовые с зеленым центром. Встречаются темно-красные, старые клетки. Культура угнетена.
22-й день эксперимента		
контроль	7.9	80% клеток темно-красные, остальные – ярко-красные. Клетки в скоплениях. Культура старая с ослабленной жизненной активностью.
150/2	42.3	Половина клеток очень темные, половина розово-красные. Клетки в небольших скоплениях. Культура в стационарной фазе, начинается отмирание клеток.
300/4	33	Клетки очень темные (99%), в скоплениях по 2–3 клетки. Умирающая культура.

анобактерии для защиты от ультразвукового облучения, кроме роста слизистого чехла, запускают второй механизм – биосинтез токсинов и их выделение в водную среду. Он наиболее отчетливо проявляется в течение примерно двух недель, а затем процент гибели дафний падает, что свидетельствует о снижении и полном прекращении биосинтеза токсинов, несмотря на продолжающееся ультразвуковое облучение. Объяснение этому факту состоит в том, что возникшее под воздействием ультразвука стрессовое состояние цианобактерий приводит к резкому возрастанию энергозатрат на синтез экзополисахаридов для роста слизистого чехла и белков для обновления разрушаемых акустической вибрацией внеклеточных белковых структур. К серьезным энергетическим потерям приводит и биосинтез клетками токсинов, которые токсигенные цианобактерии используют в наиболее опасные для их существования моменты. Одновременное поддержание двух механизмов биосинтеза приводит к истощению накопленного и невосполнимого энергетического запаса, и наступает фаза отмирания и гибели цианобактерий.

Таблица 2. Результаты определения токсичности проб воды

Параметры ультразвука, кГц/В	Процент гибели дафний		
	8-й день	15-й день	22-й день
75/1	70	10	20
75/2	90	50	0
75/4	60	20	0
0/0	80	50	50
40/2	30	70	0
40/4	90	70	30
150/2	70	30	0
150/4	20	30	10
300/1	20	10	10
300/2	80	40	0
300/4	80	0	0

Полученные результаты, кроме научного интереса, представляются крайне важными с практической точки зрения, так как свидетельствуют о возможности создания на базе ультразвука малой интенсивности инновационных технологий борьбы с токсигенными цианобактериями.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою благодарность Н.Г. Медведевой за предоставленную культуру клеток, Л.Л. Капустиной, Г.Г. Митруковой и А.О. Загребину за помощь при проведении данного исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Темы № 0154-2019-0002 Плана НИР ИНОЗ РАН – СПб ФИЦ РАН на 2019–2023 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments. V. 1. Coastal and fresh waters. Chapter 8. Algae and Cyanobacteria In Fresh Water. 2003. P. 136–158.
2. *Сиделев С.И., Голоколенова Т.Б., Чернова Е.Н. и др.* Анализ фитопланктона Цимлянского водохранилища (Россия) на наличие цианобактериальных гепато- и нейротоксинов // Микробиология. 2015. Т. 84. № 6. С. 732–742. https://doi.org/10.7868/S0026365615060130
3. *Волошко Л.Н., Пиневич А.В.* Разнообразие токсинов цианобактерий // Астраханский вестник экологического образования. 2014. № 1 (27). С. 68–80.
4. *Гладышев М.И., Колмаков В.И., Кравчук Е.С. и др.* Прорастание акинет цианобактерий из донных отложений в эксперименте в водах “цветущего” и “нецветущего” водоемов // ДАН. 2001. Т. 378. № 1. С. 134–137.

5. *Fisher M.L., Allen R., Luo Yingqin, et al.* Export of Extracellular Polysaccharides Modulates Adherence of the Cyanobacterium Synechocystis // PLOS ONE. P. 1–10. September 2013. V. 8 /Issue 9//. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074514

6. *Загребин А.О., Румянцев В.А., Тонкопий В.Д.* Разработка методов биоиндикации ксенобиотиков для оценки качества вод // Водные ресурсы. 2016. Т. 43. № 1. С. 92–96. https://doi.org/10.7868/S0321059616010181

EFFECT OF LOW-INTENSITY ULTRASOUND ON THE STATE OF TOXICOGENIC CYANOBACTERIA

Academician of the RAS V. A. Rumyantsev[a,b], V. N. Rybakin[a,b,#], I. V. Rudskiy[a], and A. N. Korovin[a]

[a] *Institute of Limnology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

[b] *St. Petersburg Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

[#] *E-mail: v.n.rybakin@gmail.com*

Experiments aimed to investigate the mechanisms of low-intensity ultrasound effects on the toxic cyanobacteria of the *Synechocysctis sp.* species, which dominates in North-West of Russia, were performed for the first time on the special laboratory installations. It has been established that in the case of toxic cyanobacteria, the action of ultrasound causes the launch of two stress-protective metabolic mechanisms: 1. Synthesis of polysaccharides and proteins to increase the thickness of cell walls and mucous cover. 2. Synthesis of toxins to combat external effects. Both mechanisms are extremely energy consuming and lead to the depletion of the life resources of cyanobacteria and accelerate the process of cell death.

Keywords: low-intensity ultrasound, toxic, cyanobacteria, water blooming, mechanisms of influence