

УДК 34.35.51 34.31.15

*В.А. Румянцев**, *Ш.Р. Поздняков**, *В.Н. Рыбакин**,
*Н.Ю. Григорьева**, *И.В. Рудский**, *Е.Ю. Киселев**, *А.Н. Коровин***

МНОГОПРОФИЛЬНЫЕ НАТУРНЫЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ОЦЕНКЕ РАБОТОСПОСОБНОСТИ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ УЛЬТРАЗВУКА ПРИ РЕГУЛЯЦИИ ЦВЕТЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

* ФГБУН Институт озерадения Российской академии наук (ИНОЗ РАН),
rum.ran@mail.ru; ** АО «Концерн «Океанприбор».

*V.A. Rumyantsev, Sh.R. Pozdnyakov, V.N. Rybakin, N.Yu. Grigoryeva,
I.V. Rudskiy, E.Yu. Kiselev, A.N. Korovin*

MULTIDISCIPLINARY FIELD AND LABORATORY EXPERIMENTS ON THE POSSIBILITY OF USING ULTRASOUND AND ITS ENVIRONMENTAL SAFETY IN THE REGULATION OF CYANOBACTERIAL BLOOMS

Статья посвящена созданию перспективного метода регуляции цветения цианобактерий в водоемах, основанного на использовании ультразвука малой мощности. Проведенные лабораторные исследования впервые позволили выявить влияние ультразвука на физиологическое состояние и метаболизм цианобактерий. Установленные факты являются крайне важными. Они свидетельствуют о том, что лабораторный подход позволяет существенно сократить диапазон поиска оптимальных параметров автоматизированных ультразвуковых установок для регуляции цветения цианобактерий.

Ключевые слова: *ультразвуковое воздействие, низкая интенсивность, цианобактерии, цветение воды, автономная ультразвуковая станция, конфокальная микроскопия.*

The article is devoted to development of advanced method of regulating of cyanobacterial bloom regulation in reservoirs based on the use of low power ultrasound. Laboratory investigations for the first time revealed the influence of ultrasound on the physiological state and metabolism of cyanobacteria. The established facts are crucial. They indicate that the laboratory approach can significantly reduce the search range of optimal parameters of automated ultrasonic systems for the regulation of cyanobacterial blooms.

Keywords: *ultrasonic treatment, low-intensity, cyanobacterial blooms, autonomous ultrasonic station, confocal microscopy.*

Введение

Цветение цианобактерий (синезеленых водорослей) на водоемах является сегодня серьезной социально-экономической проблемой. Образующиеся на водоемах в период вегетации в огромных объемах цианобактерии забивают водозаборные отверстия муниципальных станций водоподготовки и различных гидротехнических и промышленных предприятий, приводя к нарушениям и сбоям в их работе, а после оседания на дно они в подледные периоды приводят к заморным явлениям и массовой гибели рыб. Кроме того, в процессе своей жизнедеятельности цианобактерии нередко вырабатывают опасные токсины. Последствиями употребления воды цветущих водоемов в питьевых целях являются, в частности, «гаффская» и «юксовская» болезни с характерным для них падежом домашнего скота и других животных, отравлением людей нередко с летальными для них исходами [7]. По этим причинам цветению в водоемах цианобактерий уделяется повышенное внимание. На сегодняшний день предложено много различных подходов, но несмотря на это универсальный метод регуляции цветения цианобактерий на водоемах пока еще не создан.

Основная часть

Борьба с цианобактериальным «цветением» водоемов требует разработки экологичных методов, минимально влияющих на экосистему в целом, но дающих заметный конечный результат в плане подавления развития цианобактерий. Наиболее перспективным из них, по мнению многих специалистов, является метод, базирующийся на применении ультразвука малой мощности [11].

Анализируя имеющиеся в литературе работы по этому направлению, следует прежде всего отметить, что наиболее слабым местом в них является отсутствие четких представлений относительно механизма воздействия ультразвука на цианобактерии. Высказанные отдельные гипотезы не получили в дальнейшем серьезного теоретического или экспериментального подтверждения. Подбор параметров и работоспособность ультразвуковых установок определяются эмпирическим путем в процессе проведения работ на том или ином водоеме. Отсюда и имеющийся большой разброс в оценке эффективности работы ультразвуковых установок, который может быть обусловлен, например, необходимостью применения различных частот для разных видов синезеленых водорослей.

Учитывая вышесказанное, в Институте озерадения РАН были развернуты многопрофильные исследования, направленные на раскрытие механизма и параметров ультразвука при воздействии на цианобактерии. Они включали в себя как «традиционные» исследования по апробации ультразвуковой установки на отобранных конкретных водоемах, так и впервые задействованный комплекс экспериментов с ультразвуком в лабораторных условиях. Этим осуществленные исследования принципиально отличаются от проводимых ранее работ с применением ультразвука. Детальное описание отдельных экспериментов не входило в задачи данной статьи. В ней основное внимание уделяется вопросам постановки многопрофильных исследований и полученным в них первым результатам.

Прежде всего следует отметить, что при регуляции цветения цианобактерий на водоемах речь идет об ультразвуке малой, докавитационной мощности. При

этом ультразвук должен: а) воздействовать только на цианобактерии; б) не сказываться на жизнедеятельности других видов гидробионтов, рыбах, водоплавающих птицах и людях. Корректно поставленных экспериментов с узконаправленным избирательным характером воздействия ультразвука, судя по литературным данным, было выполнено крайне мало.

Исследования воздействия ультразвука на цианобактерии и другие биотические сообщества на водоемах. Начнем с описания экспериментальных работ, выполненных в период вегетации цианобактерий в 2014 и 2016 гг. на прудах Санкт-Петербурга.

В 2014 г. был осуществлен эксперимент по оценке экологической безопасности ультразвука на пруду Михайловского сада, в котором применялась американская ультразвуковая установка SS-400 (рис. 1).

В период с 15 мая по 18 сентября на контрольном и экспериментальном участках пруда проводился еженедельный отбор проб:

- фитопланктона (89 видов водорослей, относящихся к 7 отделам: цианобактерии – 14, криптофитовые – 7, динофитовые – 8, золотистые – 5, диатомовые – 17, эвгленовые – 6 и зеленые – 32);

- зоопланктона (43 таксона рангом ниже рода);

- зообентоса (47 видов и форм, представленных 9 систематическими группами);

- микопланктона (два класса – *Zygomycetes* и *Deuteromycete*),

а также определяли общее микробное число и численность лактозоположительных кишечных палочек.

Кроме того, в ходе исследований в пробах определялись гидрохимические характеристики воды: температура, удельная электропроводность, водородный показатель, содержание растворенного кислорода (абсолютное и относительное), взвешенные вещества, неорганический и общий фосфор, азот аммония, нитриты,



Рис. 1. Ультразвуковая установка SS-400 в контрольной части пруда Михайловского сада

нитраты, общий азот, величина химического потребления кислорода и биохимического потребления кислорода в течение 5 суток (БПК₅).

В процессе проведения работ обнаружился ряд непредвиденных внешних побочных факторов, которые сказались на результатах съемок за отдельные даты и не дали возможности проследить воздействие ультразвука во временном разрезе. Вместе с тем окончательный анализ всех материалов позволил перейти к заключению о воздействии ультразвука на цианобактерии, которое, однако, оказалось меньше предполагаемого, и об отсутствии его влияния на остальные виды гидробионтов.

Используя опубликованные в научной литературе материалы, а также результаты собственных проводимых лабораторных и натурных исследований, в Институте озераведения РАН была разработана концепция автономного ультразвукового устройства, предназначенного для регуляции цианобактериального цветения водоемов. В 2015 г. совместно с Акционерным обществом «Концерн "Океанприбор"» была изготовлена и прошла испытания в лабораториях, на стенде и на полигоне автономная ультразвуковая станция для борьбы с «цветением» воды.

Основные технические характеристики автономной ультразвуковой станции следующие: диапазон частот излучаемых ультразвуковых сигналов составляет от 20 до 300 кГц, возможные формы сигналов на выходе – синус, меандр и треугольный. Выходное напряжение на керамическом ультразвуковом излучателе – 80 В, выходной импеданс – 50 Ом. Амплитудно-частотная характеристика станции приведена на рис. 2. Оригинальный ультразвуковой керамический излучатель станции, в отличие от уже реализованных в конструкциях другими разработчиками, имеет круговую диаграмму направленности. В качестве источников питания используются встроенные аккумуляторы и солнечные батареи (9В DC/200 мА и модель НН-MONO60W). Вес станции – 40 кг, автономность – 3 месяца. Размеры эффективно облучаемой акватории – 5 гектаров.

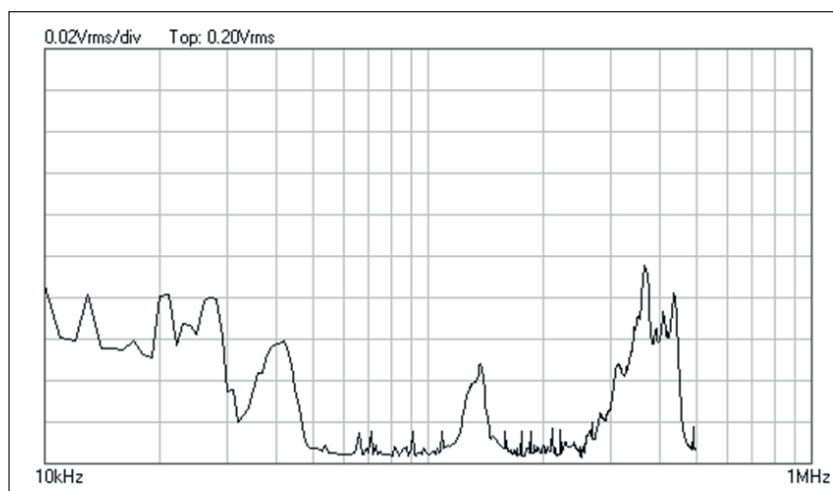


Рис. 2. Амплитудно-частотная характеристика излучателя станции

Особенностью автономной ультразвуковой станции (АУЗС), разработанной в ИНОЗ РАН и изготовленной в АО «Концерн "Океанприбор"», является реализованный в ней импульсный режим комбинированного ультразвукового излучения малой интенсивности. Диапазон частот выбирается так, чтобы узконаправленно воздействовать на жизнедеятельность цианобактерий, сохраняя нетронутыми остальные биотические сообщества водоемов.

Кроме того, созданная ультразвуковая станция может устанавливаться как на поверхности воды, так и в ее толще, что очень важно с точки зрения обеспечения сохранности станции [4, 5, 6, 10].

Для проверки работоспособности АУЗС в 2016 г. были организованы экспериментальные работы на прудах Московского парка Победы: Капитанский – контрольный и Матросский – экспериментальный (рис. 3). Эти пруды были выбраны по той причине, что ранее, в 2006–2008 гг., на них проводились сезонные гидробиологические и гидрохимические наблюдения, которые показали, что водоемы характеризуются сходным трофическим статусом, сопоставимым уровнем биогенных элементов и достаточно близкими величинами биомассы фитопланктона и массовых видов и групп, а также содержания растительных пигментов.



Рис. 3. Схема расположения Матросского и Капитанского прудов

Автономная ультразвуковая станция была установлена в центре акватории Матросского пруда с заглублением в полтора метра при общей глубине 5 м. На рис. 4 показан общий вид АУЗС.

Полевые работы в 2016 г. проводились в период июнь – август с периодичностью съемок 1 раз в две недели, во время которых изучался видовой состав фитопланктона, определялись количественные показатели (численность, биомасса), содержание хлорофилла «а» в воде, проводился расчет индексов, характеризующих состояние планктонных сообществ, и трофический статус водоемов в целом. Одновременно отбирались пробы воды для определения основных гидрохимических и гидрологических показателей – концентрации кремния, общего и минерального фосфора, форм азота, БПК₅ и кислорода, температуры, прозрачности, цветности, активной реакции воды и др. Отбор и обработку материалов проводили по стандартным методикам.

В экспериментальном Матросском пруду наблюдалось постепенное сокращение количества и роли в фитопланктоне цианобактерий в рассматриваемый период, в первую очередь нитчатых форм из родов *Limnothrix* и *Aphanizomenon*, являющихся типичными возбудителями «цветения» в водоемах Северо-Запада России [2]. Вклад *Cyanophyceae* в общей биомассе фитопланктона снизился с 78–90 % в июле до 3 % в середине августа. Начиная со второй половины лета, в водоеме возрастало количество подвижных форм из отделов *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Cryptophyta*, обладающих миксотрофным (смешанным) типом питания. Практически все они являются признанными индикаторами зон повышенного загрязнения органическим веществом [1].

В контрольном Капитанском пруду, по сравнению с экспериментальным, наблюдалось двукратное увеличение средней численности планктонных водорослей и незначительное (в среднем на 10 %) возрастание их биомассы, а также преобладание

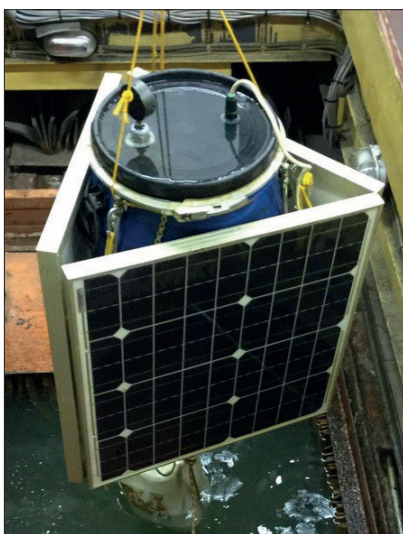


Рис. 4. Автономная ультразвуковая станция во время испытаний

в альгоценозе цианобактерий и связанное с этим резкое снижение видового разнообразия (индексы Шеннона–Уивера составляли в среднем 0,46 и 1,16 бит/мг соответственно). Концентрация хлорофилла «а» в воде контрольного пруда была в среднем на 14 % ниже, чем в экспериментальном. Состав доминирующих групп определял удельное содержание хлорофилла в единице сырой биомассы: в Капитанском пруду этот показатель составил 0,13–0,65 %, в среднем 0,22 %, в Матросском – 0,14–1,03 % и 0,28 % соответственно за счет массового развития видов, характеризующихся повышенным количеством растительных пигментов.

Наиболее заметные отличия сообществ фитопланктона экспериментального и контрольного водоемов были зарегистрированы в середине августа (рис. 5).

Фотографирование проводилось с помощью камеры AxioVision и инвертированного микроскопа AxioVert CFL 40 (Carl Zeiss) при увеличении $\times 400$. Снимки, представленные на рис. 5, хорошо иллюстрируют разницу в составе, количестве и соотношении основных доминантов планктонных альгоценозов исследованных водоемов.

Результаты эксперимента в природных условиях 2016 г. на прудах парка Победы оказались очень показательными. Численность и биомасса доминирующих видов цианобактерий родов *Limnothrix* и *Aphanizomenon* на экспериментальном пруду была намного ниже, чем на контрольном. Это свидетельствует об эффективности работы использованной нами ультразвуковой установки. Что касается остальных присутствующих на прудах видов гидробионтов, за исключением одного, о котором будет сказано ниже, то на обоих прудах расхождение в показателях находится в пределах ошибок измерений. Это дало основание утверждать, что на эти проанализированные виды ультразвук, по меньшей мере, не оказывал какого-либо заметного влияния.

Вместе с тем, обнаружился очень интересный и неожиданный факт. На экспериментальном пруду после его обработки ультразвуком существенно понизились

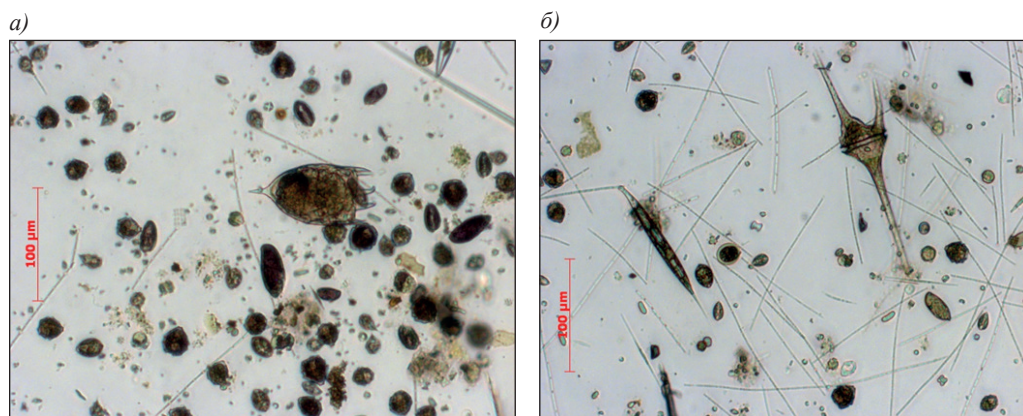


Рис. 5. Снимки препаратов из количественных проб фитопланктона, собранных 17 августа 2016 г. в экспериментальном Матросском (а) и контрольном Капитанском (б) прудах, где тонкие штрихи – основной доминант *Limnothrix redekei*, коричневые клетки – виды родов *Ceratium*, *Cryptomonas*, *Peridinium*, *Euglena*

показатели доминирующих видов цианобактерий, но резко возросли показатели другого, менее распространенного, вида нитчатых водорослей *Limnothrix redekei*, и по существу он стал играть первостепенную роль в составе экосистемы экспериментального водоема [9]. Иначе говоря, ультразвук в процессе воздействия прежде всего угнетал жизнедеятельность наиболее распространенных и, по-видимому, наиболее сильных видов цианобактерий и тем самым освободил место в пищевой «очереди» для вида *Limnothrix redekei*.

В качестве первой попытки объяснения этого факта вполне естественно предположить два обстоятельства:

1) большая часть времени работы ультразвука в вегетационный период ушла на угнетение жизнедеятельности первых преобладающих видов, а оставшегося времени работы ультразвука оказалось недостаточно для воздействия на находящейся «в тени» вид;

2) для угнетения вида водорослей *Limnothrix redekei* требуется воздействие ультразвука на другой частоте.

Очевидно, оба высказанных предположения имеют право на жизнь, и окончательный ответ может быть дан после постановки на прудах новых целенаправленных экспериментов.

Испытания автономной ультразвуковой станции, выполненные в 2016 г. на Матросском пруду Московского парка Победы, подтвердили правильность разработанных и заложенных в работу научно-методических решений. В экспериментальном Матросском пруду, по сравнению с контрольным, Капитанским, концентрация цианобактерий была снижена почти в 10 раз, что соответствует основной цели использования на водоемах АЗУС.

Изучение воздействия ультразвука на цианобактерии в лабораторных условиях. Кроме исследований по воздействию ультразвука на реальных водоемах в течение последних лет проводились работы по оценке экологической безопасности ультразвука в лабораторных условиях. Для этой цели использовались аквариумы объемом 120 л, в которые помещали как образцы отдельные виды гидробионтов, выращенных путем культивирования, так и взятых из естественных водоемов. Температура в помещении поддерживалась постоянной, а освещение осуществлялось в режиме «день – ночь» с одинаковым 12-часовым шагом смены. Несмотря на то что в аквариумах гидроакустический фон был значительно выше, чем при работе в водоемах, какого-либо заметного влияния на состояние различных тестируемых гидробионтов обнаружено не было. Серии лабораторных работ в этом направлении будут продолжены и далее при различных режимах освещения и температуры, после чего будет сделан окончательный вывод.

В 2016 г. в лаборатории были поставлены специальные эксперименты по оценке воздействия на цианобактерии ультразвука постоянной интенсивности и малой мощности в зависимости от его частоты. Эксперимент был основан на том, что развитие культуры цианобактерий в среде вызывало изменение ее химического состава. Часть изменений связана с использованием ионов в метаболизме цианобактерий, другая часть изменений является в значительной степени естественным физико-химическим процессом, который проходит без активного участия клеток культуры. Ультразвук, оказывая влияние на метаболизм цианобактерий, должен

сказываться на использовании ими ионов среды. Естественно предположить, что при разной частоте ультразвука должны наблюдаться отличающиеся изменения химического состава среды.

В качестве объекта исследования использовались цианобактерии *Microcystis Firma* CALU 398, предоставленные ресурсным центром «Культивирование микроорганизмов» научного парка СПбГУ. Эти цианобактерии были выбраны как нетоксигенный штамм рода, часто обуславливающего цветение воды в водоемах Северо-Запада России, а также других регионов. Данный штамм представляет собой одноклеточные цианобактерии (иногда агрегирующиеся), которые достаточно равномерно распределяются по объему среды, что позволяет отбирать репрезентативные пробы для микроскопирования и спектрофотометрии.

Суспензия цианобактерий *Microcystis Firma* CALU 398 была разведена в среде, по составу близкой к среде Громова № 6, разбавленной дистиллятом в соотношении 1:6.

Суспензии водорослей объемом 1 л помещались в 12 микрокосмов (стеклянных сосудов, объемом 2 л). Для ультразвукового облучения применялись излучатели АД-20 производства концерна «Океанприбор», которые размещались под дном цилиндров. Для улучшения прохождения ультразвуковых колебаний в среду в месте контакта с цилиндрами на излучатели наносилась консистентная смазка. Излучатели были зафиксированы и отделены от стола звукопоглощающим материалом. С целью исключения электромагнитных наводок излучатели были закрыты фольгой. Для генерации сигнала использовались специально разработанные программируемые генераторы.

Пространственное распределение и величина звукового давления, создаваемого ультразвуковыми колебаниями, оценивалась с помощью гидрофона производства концерна «Океанприбор», откалиброванного в диапазоне 20–300 кГц. Для освещения суспензий водорослей использовались люминесцентные лампы Nagen Sun Glo, спектр излучения которых близок к солнечному. В зависимости от эксперимента, использовалась разная продолжительность светового дня. Световой поток, проходящий на экспериментальную емкость, определялся с помощью люксметра Mastech MS 6610.

Из 12 емкостей, используемых в эксперименте, 10 облучались ультразвуком на частотах (в кГц): 20, 35, 55, 75, 95, 110, 130, 150, 200 и 300, а две (контрольные) не облучались. Освещенность емкостей составляла 3400–3800 лк. Максимальное звуковое давление, создаваемое ультразвуковыми колебаниями, составляло 2500 Па. Применяемая схема освещения: 18 часов – день, 6 часов – ночь. Фотография одного из столов с шестью экспериментальными микрокосмами представлена на рис. 6.

Значения показателей химического состава среды в экспериментальных емкостях приведены в табл. 1.

В данном описании совмещены значения концентраций ионов, значения оптической плотности и частоты ультразвукового воздействия для 12 образцов воды, включая контрольные. Также приведены расчетные значения концентраций для свежеприготовленной среды Громова (1/6 обычной концентрации) и той же среды после кипячения (или при выпадении в осадок кальция, связанного карбонатом).

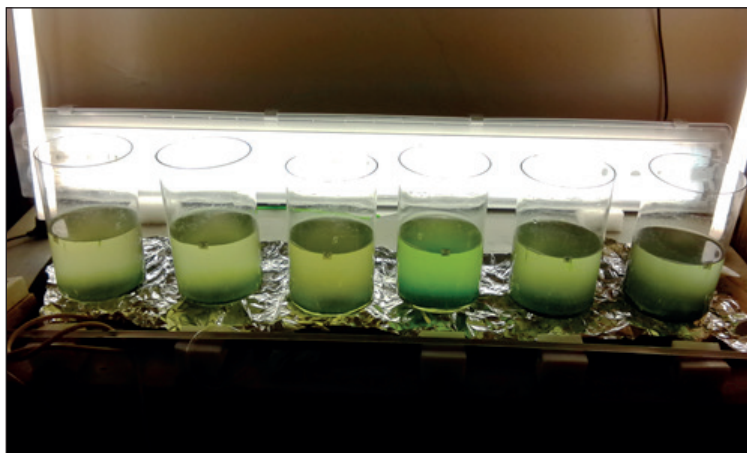


Рис. 6. Стол с микрокосмами от 03.11.16. Частоты, на которых облучали емкости (в килogerцах), увеличиваются слева направо: 110, 130, 0 (контроль), 150, 200, 300

Среда для содержания и хранения культур цианобактерий в данной концентрации несет в себе избыточное количество биогенных ионов. Они не были исчерпаны к моменту завершения эксперимента. Однако расход отдельных ионов значительно отличался в разных емкостях.

Анализируя данные, необходимо отметить следующее. Концентрация ионов Na и K практически не менялась за время всего опыта. Поскольку K – это важный биоген и в целом культура практически не использовала его для своего роста (не более 1/10 его концентрации), то можно предположить, что в условиях эксперимента она находилась в угнетенном состоянии.

Ионы Cl также слабо отличаются от расчетных для стерильной среды. Незначительное отличие в большую сторону можно связать с добавкой HCl при выравнивании pH среды.

Концентрация ионов Br не играет заметной роли для данного опыта. Она находится за пределами чувствительности детекторов (менее 10^{-5} M).

Концентрация ионов F и HCO_3 варьирует сходным образом. Более высокие значения наблюдаются в емкостях, подверженных ультразвуку более высокой частоты. Для HCO_3 диапазон 20–50 кГц соответствует известному максимуму для десорбции CO_2 из воды. Этим можно объяснить пониженную концентрацию гидрокарбоната в первых шести емкостях.

Полученные нами данные по ионам Ca и Mg не проходят тест на достоверность. Потенциометрическое определение Mg и калориметрия для совместного определения количества Ca и Mg дали более высокие значения, чем в исходном растворе. Такие данные говорят либо о возможном внесении и последующем растворении осадка карбонатов этих ионов, либо, что более вероятно, показывают инструментальную ошибку. По представленным данным для Ca и Mg можно видеть только общую тенденцию в отличиях концентраций между емкостями. Более высокие значения наблюдаются в L3, L5 и R5 емкостях, что частично соответствует минимумам

Таблица 1

Значения показателей химического состава среды в экспериментальных емкостях

Показатель	Среда Громова 1\6	--- CaCO ₃	L0	L1	L2	L3	L4	L5
Na	45,08	45,08	39,77	39,31	40,88	41,17	37,46	38,06
K	32,46	32,46	29,31	27,62	30,00	29,73	28,65	29,12
Mg	3,29	3,29	17,50	17,50	17,50	30,62	17,50	19,69
Ca + Mg, ГН			4,00	4,00	4,00	7,00	4,00	4,50
Ca	9,02	4,56						
Cl	15,97	15,97	19,89	25,62	22,71	15,97	13,03	15,90
Br			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F			0,16	0,18	0,16	0,17	0,17	0,15
NO ₃	121,59	121,59	11,00	8,00	18,00	20,00	60,00	20,00
HPO ₄	23,68	23,68	1,80	1,50	1,80	1,50	1,80	1,20
HCO ₃	20,54	0,00	111,00	124,00	122,00	135,00	144,00	12,00
SO ₄	12,99	12,99	3,90	6,50	3,25	3,90	3,90	3,90
pH	+HCL	+HCL	7,09	6,89	7,08	7,18	6,66	6,97
ПОП (перемеш.)	42551,00		0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
ПОП (перемеш.)	42583,00		0,30	0,48	0,45	0,41	0,46	0,35
ПОП (без перем.)	42592,00		0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03
ПОП (перемеш.)	42592,00		0,10	0,22	0,17	0,18	0,19	0,15
Освещенность, лк			3600,00	3600,00	3750,00	3600,00	3600,00	3360,00
Частота, кГц			-	20,00	35,00	55,00	75,00	95,00

Показатель	Среда Громова 1\6	--- CaCO ₃	R0	R1	R2	R3	R4	R5
Na	45,08	45,08	42,51	39,31	39,40	40,04	40,79	42,51
K	32,46	32,46	29,52	30,00	30,21	30,34	28,00	29,52
Mg	3,29	3,29	21,87	19,69	17,50	17,50	17,50	17,50
Ca + Mg, ГН			5,00	4,50	4,00	4,00	4,00	4,00
Ca	9,02	4,56						
Cl	15,97	15,97	13,40	12,26	7,58	8,78	11,71	13,40
Br			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F			0,32	0,16	0,20	0,18	0,22	0,32
NO ₃	121,59	121,59	7,50	5,00	80,00	11,00	9,00	7,50
HPO ₄	23,68	23,68	1,70	1,80	1,50	1,80	1,50	1,70
HCO ₃	20,54	0,00	183,00	161,00	165,00	146,00	161,00	146,00
SO ₄	12,99	12,99	3,90	5,85	2,60	3,90	3,25	3,90
pH	+HCL	+HCL	6,83	7,38	6,75	7,03	6,86	6,83
ПОП (перемеш.)	42551,00		0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
ПОП (перемеш.)	42583,00		0,61	0,40	0,35	0,52	0,52	0,37
ПОП (без перем.)	42592,00		0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
ПОП (перемеш.)	42592,00		0,35	0,20	0,21	0,31	0,32	0,24
Освещенность, лк			3500,0	3650,0	3650,0	3600,0	3600,0	3370,0
Частота, кГц			-	110,0	130,0	150,0	200,0	300,0

в концентрации HCO_3^- . Можно предположить, что при десорбции углекислоты происходило частичное растворение карбонатного осадка в этих емкостях.

Ион NO_3^- отмечается во всех емкостях в относительно стабильной невысокой концентрации 10–20 мг/л по сравнению с исходной концентрацией (122 мг/л). Возможно, живые клетки водорослей поглотили, запасли и частично усвоили наблюдаемую разницу в концентрациях. Интересно отметить более сильное поглощение азота в емкости R1 и более слабое – в емкостях R2 и L4.

Концентрация иона HPO_4^{2-} находится на относительно низком, по сравнению с изначальным, и одинаковом уровне во всех емкостях. Безусловно, часть фосфатов была использована водорослями для роста, однако это только очень небольшая часть, поскольку значительной биомассы водорослей не наблюдается. Наиболее вероятным является образование нерастворимых солей с ионами Ca и Mg, а также сорбция на органический осадок емкостей.

Ион SO_4^{2-} был в значительной степени использован культурой (либо фоновыми бактериями) для роста и представлен в относительно низкой концентрации практически во всех емкостях. Вызывает большой интерес слабое поглощение сульфата в емкостях L1 и R1.

Концентрация протонов (pH) практически одинакова во всех емкостях и незначительно отличается от нейтральной.

Наибольший интерес с точки зрения возможного воздействия на метаболизм цианобактерий вызывают следующие частоты ультразвукового воздействия: 20, 75, 110, 130 и 300 кГц. В соответствующих емкостях при этих условиях наблюдались наиболее низкие или наиболее высокие скорости усвоения биогенных ионов (NO_3^- , SO_4^{2-}). Возможно, при использовании сред, более приближенных к природным показателям, по этим ионам возникнет ограничение, которое будет препятствовать нормальному метаболизму цианобактерий.

Частота 95 кГц может быть интересна с точки зрения наибольшей подавленности культуры. Здесь были достигнуты наименьшие значения оптической плотности среды.

Сходство значений показателей химического состава воды в контрольных емкостях, особенно в отношении ионов гидрокарбоната, показывает большую вероятность проникновения эффективного ультразвукового воздействия. Значение показателей в этих емкостях совпадает или гладко вписывается в средние значения для соседних облучаемых емкостей (L2–L3 для L0 и R2–R3 для R0).

Подводя итог проведенному эксперименту, можно отметить, что в нем впервые удалось показать влияние ультразвука на метаболизм цианобактерий, выразившийся в изменении химического состава среды и предварительно наметить частоты, которые могут быть опробованы при работе с АУЗС на водоемах.

Вся таблица с (химическими) данными представлена в мг/л. Общая жесткость (Ca+Mg) дана в немецких градусах °dGH (degrees of general hardness), 1 градус равен 1 части оксида кальция (CaO), или 0,719 частей оксида магния (MgO) на 100 000 частей воды, или равен 0,18 мМ кальция или магния.

В таблице курсивом помечены значения крайне высоких или крайне низких концентраций. В рамках – перспективные частоты, серым фоном – отмечены недостоверные данные.

Исследование результатов слабого ультразвукового воздействия методами флуоресцентной спектроскопии. Результаты упомянутых выше экспериментов, проведенных как в естественных, так и в лабораторных условиях, еще раз подтвердили факт воздействия ультразвука на цианобактерии, но они мало что дали для понимания произошедших в них физиологических изменений. Задача исследования воздействий малой интенсивности при их постоянном, но слабом влиянии на биофизические параметры исследуемых объектов является чрезвычайно сложной. Дело в том, что эти изменения обычно приходится выявлять на фоне более значительных шумов, оказываемых на испытываемые объекты со стороны применяемых измерительных средств. Поэтому для выявления возможных изменений после ультразвукового воздействия как в отдельных клетках, так и в цианобактериальной культуре в целом, прежде всего необходимо было выполнить серьезные проработки методического характера. В результате была создана инновационная методика мониторинга физиологического состояния цианобактерий *in vivo* [3].

Исследования воздействия ультразвука малой интенсивности на цианобактерии методами флуоресцентной спектроскопии проводились на живых цианобактериальных культурах штамма *Microcystis firma* CALU 398. Цианобактерии, используемые в эксперименте, были взяты из коллекции CALU и инкубировались на базе Ресурсного центра «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ в жидкой среде № 6 в течение недели при комнатной температуре и постоянном освещении белыми флуоресцентными лампами.

Ультразвуковое воздействие осуществлялось с помощью экспериментальной установки, состоящей из пластиковой чашки Петри диаметром 40 мм, помещенной на керамический ультразвуковой излучатель, подключенный к генератору частоты Velleman 1MHz Pocket Function Generator HPG1. На излучатель подавался синусоидальный сигнал частотой 60 кГц. Мощность сигнала подбиралась так, чтобы обеспечить звуковое давление в экспериментальном объеме порядка 9,3 кПа, что соответствует мощности 5,85 мВт/мл. Продолжительность облучения составляла 50 часов.

Представленные далее результаты исследований методами флуоресцентной спектроскопии получены с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ и ЦКП «Хромас».

Для исследования спектров собственной флуоресценции отдельных клеток цианобактерий в ходе эксперимента использовался конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Leica TCS-SP5. Параметры мощности лазеров и пропускания акустооптического фильтра были одинаковы во всех экспериментах. Спектры флуоресценции в диапазоне 590–785 нм снимались с помощью стандартной операции лямбда-сканирования программного обеспечения 'Leica Confocal Software'. Серия из 38 пространственных распределений интенсивности флуоресценции с размером 512×512 пикселей снималась при полосе пропускания 6 нм и с шагом 6 нм. В качестве объектива использовался иммерсионный объектив HCX PL APO 63,0×1,30 GLYC 37 °C UV с апертурой 1,3 и с глицериновой иммерсией. При обработке спектров флуоресценции использовалось графическое усреднение по так называемой области интереса (ROI), охватывающей отдельную клетку. Эта функция

позволяет исключить паразитные сигналы от соседних клеток и от растворенных в культуральной среде веществ.

Параллельно с исследованиями изменений физиологического состояния отдельных клеток проводилось исследование спектров собственной флуоресценции цианобактериальных культур в целом и измерение параметров фотосинтетической активности по протоколам, описанным в [3].

При оценке результатов ультразвукового воздействия применялась методика определения жизнеспособности клеток цианобактерий, основанная на том, что, при прочих равных условиях, изменения в спектре флуоресценции живых клеток напрямую связаны с нарушениями в работе фотосинтетической цепи, которые в свою очередь являются следствием нарушений функционирования других клеточных структур [3, 8]. С помощью данного экспресс-метода можно зафиксировать изменения физиологического состояния как отдельных клеток, так и культуры в целом, при наличии различных внешних воздействий. Показателем ухудшения физиологического состояния культуры после внешнего воздействия служит усиление флуоресценции экспериментальной пробы по сравнению с контрольной в области длин волн флуоресценции пигментов антенного комплекса при неизменном уровне флуоресценции хлорофилла.

Изначально суспензия живых клеток цианобактерий была разделена на три части и в течение 50 часов развивалась в одинаковых условиях освещенности и температуры. При этом экспериментальная часть культуры подвергалась воздействию ультразвукового излучения.

На рис. 7 представлены спектры собственной флуоресценции живых клеток цианобактерий *Microcystis firma* CALU 398, снятые на Leica TCS SP5 при возбуждении двумя разными лазерными линиями 488 нм и 543 нм в диапазоне 590–785 нм и усредненные по 35 клеткам для получения каждого результирующего спектра. Тонкими линиями показаны спектры для контрольной части культуры, жирными – для экспериментальной, после ультразвукового облучения.

Наблюдающееся изменение в соотношении интенсивности пиков флуоресценции показывает нарушение отдельных связей внутри цепочки усвоения световой энергии (антенный комплекс – реакционный центр). Согласно разработанной нами методике, у исходной здоровой клетки флуоресценция хлорофилл-белковых комплексов при возбуждении лазерной линией 488 нм превалирует над флуоресценцией пигментов антенного комплекса. При ухудшении физиологического состояния клетки фотосинтетический аппарат начинает работать нестабильно, и часть поглощенной световой энергии теряется в виде флуоресцентного излучения на более ранних стадиях усвоения световой энергии, поэтому пик в области излучения фикоцианина (на 656 нм) начинает расти. Возбуждение лазерной линией 543 нм, близкой к максимуму возбуждения фикоцианина, отражает этот эффект значительно сильнее. Разница в интенсивностях флуоресценции вблизи 656 нм показывает, что облучаемые ультразвуком клетки цианобактерий находятся в угнетенном физиологическом состоянии по сравнению с контрольными клетками.

Кроме исследований отдельных клеток, стандартными методами флуориметрии были сняты спектральные характеристики культуры в целом, а также

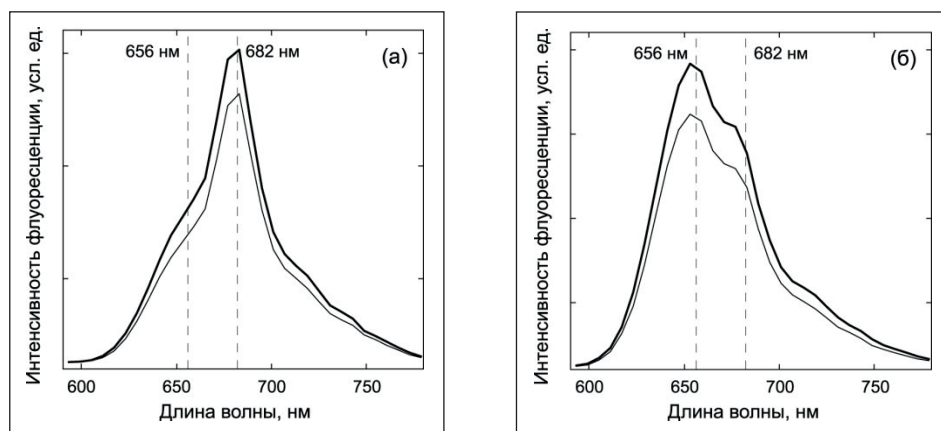


Рис. 7. Спектры собственной флуоресценции клеток цианобактерий *Microcystis firma* CALU 398, полученные при возбуждении двумя лазерными линиями: а – 488 нм; б – 543 нм. Жирные линии – спектры клеток, подвергавшихся ультразвуковому воздействию, тонкие линии – спектры клеток из контрольной части. Для получения каждого спектра проводилось усреднение по 35 клеткам

измерены параметры фотосинтетической активности для контрольной и экспериментальной культур. Все три применяемых флуоресцентных метода показали идентичные результаты, а именно то, что в экспериментальной группе присутствуют нарушения в работе фотосинтетического аппарата цианобактерий, вызванные ультразвуковым облучением.

Несмотря на то что проведенный анализ в значительной мере носит качественный характер, устойчивость и достоверность результатов в рамках применяемого метода обеспечивается тем, что анализ проводится сразу по серии спектров и изменения спектральных характеристик регистрируется тремя различными способами.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов впервые было показано, что облучение маломощным ультразвуком на частоте 60 кГц производит угнетающее воздействие на цианобактерии на клеточном уровне, которое может быть зафиксировано методами конфокальной микроспектроскопии. Чувствительность спектров собственной флуоресценции отдельных клеток к ингибированию процесса фотосинтеза делает этот показатель эффективным средством мониторинга любых стрессорных воздействий на цианобактерии.

Заключение

В заключение следует подчеркнуть, что результаты впервые осуществленных многопрофильных исследований в естественных и лабораторных условиях воздействия ультразвука на цианобактерии свидетельствуют о целесообразности комплексного подхода. В дальнейшем предполагается продолжить комплекс подобных экспериментов, главным образом ориентированных на выполнение единой цели. Представляется, что в этом случае удастся добиться большего прогресса в создании для регулирования цветения цианобактерий ультразвуковых

установок, параметры которых будут задаваться, исходя из понимания характера их воздействия на физиологическое состояние и метаболизм цианобактерий.

Авторы выражают свою благодарность всем сотрудникам ИНОЗ РАН, принимавшим участие в проведении работ.

Литература

1. *Баринова С.С., Медведева Л.А., Анисимова О.В.* Биоразнообразии водорослей-индикаторов окружающей среды. – Тель-Авив, 2006. – 356 с.
2. *Белякова Р.Н. и др.* Водоросли, вызывающие «цветение» водоемов Северо-Запада России. – СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 367 с.
3. *Григорьева Н.Ю., Румянцев В.А., Чистякова Л.В.* Спектроскопические методы определения жизнеспособности синезеленых водорослей после слабых внешних воздействий // *Океанология*. – 2017. Т. 5. (в печати).
4. *Киселев Е.Ю., Румянцев В.А., Рыбакин В.Н.* Применение ультразвукового излучения низкой интенсивности для борьбы с «цветением» воды в водоемах. Механизмы воздействия на водоросли // *Учен. зап. РГГМУ*, 2014. № 34. – С. 115–122.
5. *Киселев Е.Ю., Румянцев В.А., Рыбакин В.Н.* Применение ультразвукового излучения низкой интенсивности для борьбы с «цветением» воды в водоемах. Эффективность воздействия на водоросли и другие организмы // *Учен. зап. РГГМУ*, 2014. № 37. – С. 222–230.
6. *Производитель* ультразвуковых устройств Sonic Solutions. Электронный ресурс: <http://www.sonicsolutionsllc.com>.
7. *Румянцев В.А., Крюков Л.Н., Поздняков Ш.Р., Жуковский А.В.* Цианобактериальное «цветение» воды – источник проблем природопользования и источник инноваций в России // *Общество. Среда. Развитие (Terra Humana)*, 2011. № 2. – С. 222–228.
8. *Румянцев В.А., Григорьева Н.Ю., Чистякова Л.В.* Исследование изменений физиологического состояния цианобактерий после слабого ультразвукового воздействия // *Доклады Академии наук*. – 2017. (в печати).
9. *Трифонов И.С.* Экология и сукцессия озерного фитопланктона. – Л.: Наука, 1990. – 184 с.
10. *Ультразвуковое устройство для очистки водоемов.* Патент РФ № 130602.
11. *Wu X., Joyce E.M., Mason T.J.*, 2011. The effects of ultrasound on cyanobacteria // *Harmful Algae*, 10 (2011), 738–743.