

УДК [582.263-155.7:579.2]:665.61

ВЛИЯНИЕ СЫРОЙ НЕФТИ НА СИМБИОТИЧЕСКУЮ АССОЦИАЦИЮ ЗЕЛЁНОЙ ВОДОРОСЛИ *ACROSIPHONIA ARCTA* (DILLWYN) GAIN И ЭПИФИТНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2023 г. Г. М. Воскобойников¹, Л. О. Метелькова², Д. В. Пуговкин¹, Д. О. Салахов¹

¹Мурманский морской биологический институт Российской академии наук,
Мурманск, Российская Федерация

²Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии имени Д. И. Менделеева», Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: grvosk@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2022; после доработки 07.07.2022;
принята к публикации 20.10.2022; опубликована онлайн 14.03.2023.

Экспериментально показано, что зелёная водоросль *Acrosiphonia arcta*, обитающая на литорали Баренцева моря, сохраняет жизнеспособность в течение 10 дней при воздействии сырой нефти, введённой в концентрации $5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в морскую воду. Данная концентрация соответствует слабому разливу нефти. Методами микробиологии, световой и электронной микроскопии, а также физиологии проанализированы морфофункциональные изменения у симбиотической ассоциации акросифонии и эпифитных бактерий на её поверхности. Показано сохранение высокого уровня фотосинтеза и неповреждённой ультраструктуры у большинства клеток водорослей в течение всего эксперимента. Вместе с тем к концу опыта под воздействием нефти в клетках водорослей уменьшается доля хлоропластов, исчезают пиреноид и гранулы крахмала. Прослежена динамика численности эпифитных бактерий в эксперименте и доля углеводородоокисляющих бактерий в общем количестве культивируемых гетеротрофов. Продемонстрирована способность акросифонии поглощать и трансформировать нефтепродукты. Способность данного вида водорослей развиваться в загрязнённых нефтью акваториях на любом субстрате, подготавливая его для заселения более крупными многолетними водорослями-макрофитами, определяет важную роль *A. arcta* в восстановлении прибрежных фитоценозов.

Ключевые слова: *Acrosiphonia arcta*, нефть, биоремедиация морской воды, симбиотическая ассоциация, эпифитные бактерии, фотосинтез, ультраструктура

Ранее у представителей водорослей-макрофитов, обитателей Баренцева моря, принадлежащих к различным систематическим группам, была выявлена способность к поглощению дизельного топлива [Воскобойников и др., 2018, 2020a; Pilatti et al., 2016]. В экспериментах по очистке морской воды от дизельного топлива с помощью водорослей было показано, что уменьшение содержания нефтепродукта (далее — НП) в воде происходило параллельно с его накоплением в растениях. При этом на поверхности водоросли с помощью эпифитных углеводородоокисляющих бактерий (далее — УОБ) шла деструкция НП, что обеспечивало их поглощение и нейтрализацию дизельного топлива клетками растения. Известно, что УОБ, образующие с водорослями-макрофитами взаимовыгодную симбиотическую ассоциацию, могут окислять почти все НП, скорость деградации которых зависит от соотношения составляющих их углеводов [Пуговкин, 2017; Atlas, 1978; Heitkamp, Cerniglia, 1987; Pirnik, 1977].

Немногочисленные сведения по этой тематике были получены на представителях водорослей, имеющих пластинчатый таллом [Воскобойников и др., 2018, 2020b; Пуговкин, 2017; Ryzhik et al., 2019]. Необходимо отметить, что *Acrosiphonia arcta* (Dillwyn) Gain, 1912 относится к видам-первопоселенцам, подготавливающим субстрат для его заселения многолетними видами-доминантами [Malavenda et al., 2017].

Цель данного исследования — выявить у зелёной водоросли *A. arcta* (акросифонии узкой, имеющей сифонокладальный тип таллома и обитающей в литоральной зоне) морфофункциональные изменения, происходящие под влиянием сырой нефти, проанализировать преобразование токсиканта симбиотической ассоциацией этого вида водорослей и бактериями, а также определить потенциальную роль вида в очистке морской воды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Вегетативные талломы *A. arcta*, примерно равные по размерно-массовым показателям, отбирали на побережье губы Зеленецкой Баренцева моря (69°07'09" с. ш., 36°05'35" в. д.) в летний период, очищали от обрастателей и помещали в стеклянные ёмкости с морской водой объёмом 1,3 л. Морскую воду (солёность — 33 ‰), отобранную в месте обитания водорослей, предварительно фильтровали через ватно-марлевый фильтр для удаления крупной (видимой) взвеси; затем в неё добавляли нефть с месторождения на острове Колгуев (Песчаноозёрское нефтегазоконденсатное месторождение) в количестве 5 мг·л⁻¹, что соответствует слабому разливу нефти в морской среде и составляет 100 ПДК (предельно допустимая концентрация) для воды по валовому содержанию НП. Согласно нормативным документам, ПДК по общему содержанию НП соответствует 0,05 мг·л⁻¹ [Нормативы, 2020]. Опыт проводили в термостатируемом боксе при температуре +7...+8 °С, при освещении 16–18 Вт·м⁻², с фотопериодом 24L:0D, соответствующим естественным условиям обитания водорослей летом, и с постоянной аэрацией воды воздухом. Контрольные (содержащиеся в ёмкостях с морской водой без добавления нефти) и опытные (в ёмкостях с внесённой нефтью, 5 мг·л⁻¹) образцы водорослей и воды отбирали для исследования в начале эксперимента (исходные образцы), а также через 5 и 10 суток от его начала. Анализ изменений в морфологии клеток выполняли с использованием светового микроскопа «Микмед-6» (ЛЮМО, Россия) и электронного трансмиссионного микроскопа JEM-100C (Jeol, Япония). В световом микроскопе исследовали препараты *in vivo*. Подготовку препаратов к просмотру в электронном микроскопе (срезы толщиной 20–30 нм, окрашенные толудиновым синим) осуществляли по стандартной методике [Воскобойников, Титлянов, 1978]. Интенсивность видимого фотосинтеза водорослей в ходе эксперимента определяли по изменению содержания кислорода в воде до и после инкубации таллобов с помощью оксиметра HI 9141 (Hanna Instruments, Германия) и йодометрическим методом Винклера. Расчёт проводили в мкг O₂ на 1 г сырой массы таллома в час [Salakhov et al., 2020]. Валовое содержание НП и концентрации алканов в воде и водорослях определяли методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии. Пробоподготовку и инструментальный анализ выполняли на основе методики EPA 8270 (Semivolatile Organic Compounds by GC/MS), подробно описанной ранее [Воскобойников и др., 2018]. Расчёт массовой доли содержания компонентов сырой нефти производили с применением метода внутреннего стандарта. Результаты представлены в мкг·л⁻¹ для воды и в мкг·г⁻¹ сухой массы для водорослей.

Численность культивируемых гетеротрофных бактерий определяли методом предельных разведений [Руководство, 1980] с использованием жидких питательных сред Зобелла для общих гетеротрофов [Практическая гидробиология. Пресноводные экосистемы, 2006] и ММС для УОБ [Коронелли, Ильинский, 1984; Mills et al., 1978]. Полученную указанным методом численность культивируемых бактерий пересчитывали на 1 г сырой массы таллома водорослей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение содержания нефтепродуктов в воде и водорослях в ходе эксперимента. Фракция сырой колгуевской нефти, растворённая в дихлорметане, характеризовалась преобладанием н-алканов в диапазоне C_8-C_{30} с максимумами в области $C_{14}-C_{16}$. Содержание изопреноидов (пристана и фитана) составляло не более 7 % от общей суммы н-алканов. Исходная морская вода содержала $495 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ НП, что составляет 10 ПДК (табл. 1). За время эксперимента (10 суток) количество НП в исходной воде без добавления нефти увеличилось до $1527 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ («вода + *A. arcta*»). Значение показателя, отражающего степень трансформации углеводов ($\Sigma\text{н-алканов} / \Sigma\text{НП}$), также возросло — с 0,06 до 0,10–0,12.

Таблица 1. Содержание и соотношение алканов и нефтепродуктов (НП) в образцах воды в течение эксперимента, $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$

Table 1. Content and proportion of alkanes and oil products in water samples during the experiment, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

	Вода	Вода + <i>A. arcta</i>	Вода + НП			Вода + <i>A. arcta</i> + НП		
	0 сут	10 сут	0 сут	5 сут	10 сут	0 сут	5 сут	10 сут
Сумма н-алканов	28,6	185	1569	247	185	1569	54	95
$\Sigma\text{н-алканов} / \Sigma\text{НП}$	0,06	0,12	0,28	0,13	0,16	0,28	0,09	0,08
Валовое содержание НП	495	1527	5552	1954	1158	5552	628	1166

При добавлении нефти содержание НП (в 1-е сутки) составило $5552 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. К 10-м суткам эксперимента валовое содержание НП в пробах воды снизилось на 79 %. В случае присутствия акросифонии валовое содержание НП в воде на 5-е сутки уменьшилось на 88 %, а на 10-е сутки оно увеличилось до $1166 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$.

Валовое содержание нефтяных углеводов (далее — НУ) в контрольном образце акросифонии (0 суток) составило $2686 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ (табл. 2). На 10-е сутки значение уменьшилось почти на 30 %.

При нахождении акросифонии в среде с НП на 5-е сутки эксперимента содержание НУ в талломе водорослей существенно увеличилось, но на 10-е сутки снизилось.

Таблица 2. Содержание и соотношение алканов и нефтепродуктов (НП) в образцах *Acrosiphonia arcta* в течение эксперимента, $\text{мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухой массы

Table 2. Content and proportion of alkanes and oil products in *Acrosiphonia arcta* samples during the experiment, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight

	Контроль		Опыт		
	0 сут	10 сут	0 сут	5 сут	10 сут
Сумма н-алканов	102	156	102	1482	867
$\Sigma\text{н-алканов} / \Sigma\text{НП}$	0,04	0,08	0,04	0,19	0,16
Валовое содержание НП	2686	1929	2686	7930	5395

Изменение жизнеспособности, морфологии и физиологии водорослей в ходе эксперимента. У водорослей контрольного (без добавления нефти) и опытных вариантов (с добавлением нефти) жизнеспособность сохранялась до конца эксперимента. В контрольном варианте талломы имели интенсивную зелёную окраску; в опыте интенсивность окраски у некоторых талломов к 10-м суткам снижалась.

Светооптические и электронно-микроскопические наблюдения после 5 и 10 суток опыта в клетках водорослей, экспонируемых без добавления нефти (контроль), не выявили каких-либо морфологических изменений по сравнению с исходным вариантом.

Цитоплазма клеток плотно прилегала к внутренней стороне плазматической мембраны. На срезах клеток были выявлены хлоропласты овальной формы (1 на рис. 1а), расположенные близко к плазмалемме.

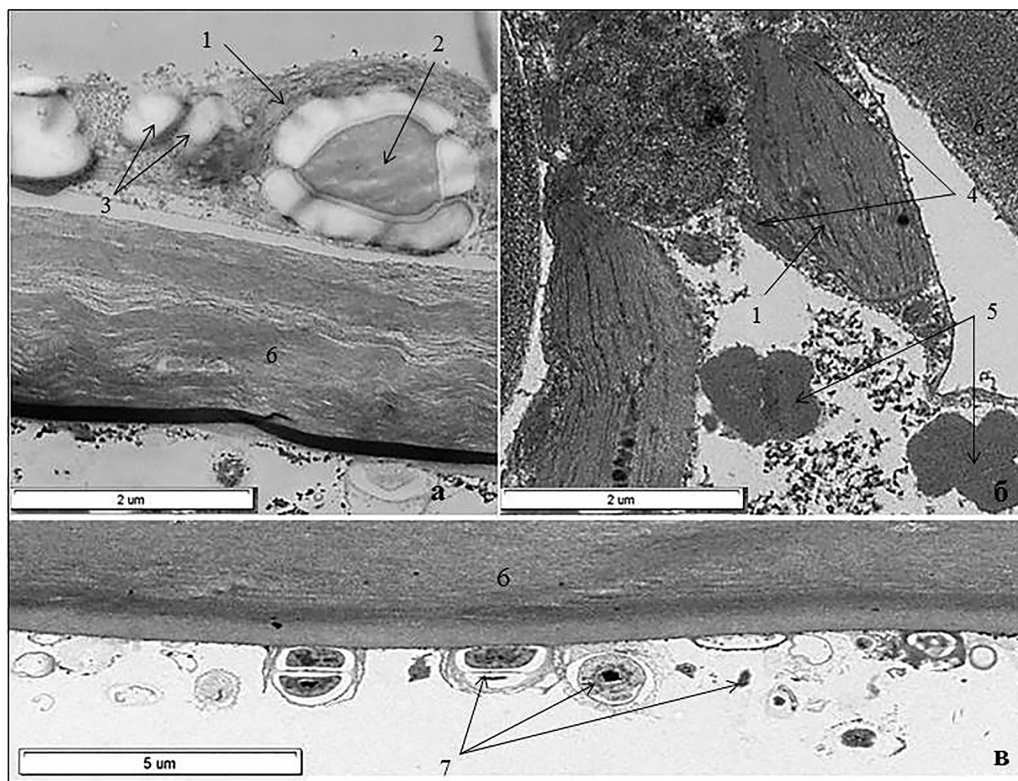


Рис. 1. Структура клетки *Acrosiphonia arcta* под влиянием нефтяного загрязнения: а — контрольный образец; б, в — опытный образец через 10 суток эксперимента. Условные обозначения: 1 — хлоропласт; 2 — пиреноид с гранулами крахмала; 3 — гранулы крахмала в строме хлоропласта; 4 — митохондрии; 5 — электронно-плотные глобулы; 6 — оболочка водорослей; 7 — эпифитные микроорганизмы на внешней поверхности оболочки клеток водорослей

Fig. 1. Cell structure of *Acrosiphonia arcta* under oil contamination: а, control; б, в, experimental sample after 10 days of exposure. Legend: 1, chloroplast; 2, pyrenoid with starch granules; 3, starch granules in the chloroplast stroma; 4, mitochondria; 5, electron-dense globules; 6, algal shell; 7, epiphytic microorganisms on the surface of the alga

В большинстве клеток хлоропласты были объединены в фотосинтетический ретикулум. В хлоропластах выявлены тилакоиды, идущие по длинной оси параллельно друг другу, и пиреноид погружённого типа с гранулами крахмала (2 на рис. 1а), образующими обкладку. Гранулы крахмала в большом количестве встречались и вне пиреноида — в строме хлоропластов (3 на рис. 1а). В цитоплазме отмечено присутствие митохондрий (до трёх на срезе клетки, размером 1–2 мкм, с единичными кристами), а также немногочисленных электронно-плотных гранул, преимущественно округлой формы, диаметром 1,5–3 мкм. С внешней стороны оболочки таллома акросифонии в исходном варианте имелись единичные бактерии.

В опыте через 10 суток после введения нефти у отдельных клеток таллома акросифонии в препаратах *in vivo* отмечен плазмолиз. Отставание плазмалеммы от внутренней поверхности оболочки клеток таллома фиксировали не только в световом микроскопе, но и на срезах в электронном. На этой стадии опыта в хлоропластах отдельных клеток регистрировали деградирующий

пиреноид; в большинстве клеток его не выявляли. Гранулы крахмала отсутствовали. Вместе с тем признаков повреждения ламеллярной системы хлоропластов не было (1 на рис. 1б). Строма хлоропластов достаточно плотная, с большим числом тилакоидов. В цитоплазме, по сравнению с таковой в контрольном варианте опыта, на срезах клеток отмечено увеличение числа (до 4–7) и размера митохондрий (до 2,5 мкм), а также размера электронно-плотных глобул (до 4 мкм) (4 на рис. 1б). С внешней стороны оболочки водоросли присутствовало большое число микроорганизмов различной формы и плотности, образующих на отдельных её участках сплошной слой (7 на рис. 1в).

Интенсивность фотосинтеза у исходных образцов *A. arcta* составляла 0,42 мкг O_2 на 1 г сырой массы в час (рис. 2).

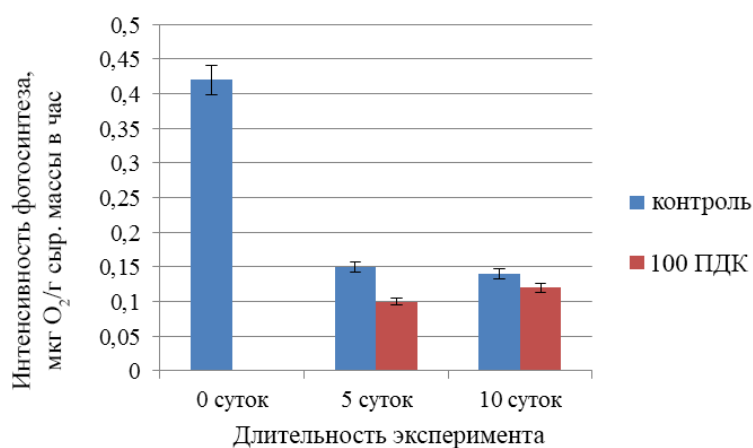


Рис. 2. Интенсивность фотосинтеза *Acrosiphonia arcta* в ходе эксперимента

Fig. 2. Intensity of *Acrosiphonia arcta* photosynthesis during the experiment

У водорослей контрольного варианта через 5 суток интенсивность фотосинтеза снизилась в 2,8 раза и не изменялась до конца эксперимента. У опытных образцов *A. arcta* на 5-й день было отмечено снижение интенсивности фотосинтеза относительно контрольного варианта в 1,5 раза; к концу эксперимента значение практически не отличалось от контрольного.

Изменение численности эпифитных бактерий. В течение опыта зарегистрировано существенное изменение численности культивируемых гетеротрофных бактерий — в пределах нескольких порядков. До помещения в экспериментальные условия у акросифонии фиксировали достаточно высокое (до 9 порядков) количество культивируемых эпифитных бактерий — более 20 млн кл. \cdot г $^{-1}$ для гетеротрофов и 4,3 тыс. кл. \cdot г $^{-1}$ для УОБ (рис. 3).

К 5-м суткам эксперимента в контрольном варианте численность эпифитных бактерий акросифонии была приблизительно в 81,5 раза больше ($1,6 \times 10^9$ кл. \cdot г $^{-1}$), чем в исходном варианте ($2,2 \times 10^7$ кл. \cdot г $^{-1}$). При добавлении НП (100 ПДК) их численность увеличилась примерно в 53,5 раза — до $1,1 \times 10^9$ кл. \cdot г $^{-1}$ (численность бактерий возросла более чем на 2 порядка). К 10-м суткам опыта отмечен спад численности эпифитных бактерий по сравнению с предыдущими значениями — в 1,2 раза в варианте с нефтью и в 1,4 раза в контроле, то есть до $7,8 \times 10^8$ и $1,3 \times 10^9$ кл. \cdot г $^{-1}$ соответственно.

Доля УОБ у водорослей до начала эксперимента составляла 0,02 % от общего числа культивируемых бактерий ($4,3 \times 10^3$ кл. \cdot г $^{-1}$). К 5-м суткам их доля в контрольном варианте уменьшилась до 0,002 % ($3,02 \times 10^4$ кл. \cdot г $^{-1}$), а в опыте — до 0,005 % ($4,9 \times 10^4$ кл. \cdot г $^{-1}$). К 10-м суткам опыта при снижении количества культивируемых бактерий относительно 5-х суток уменьшилась и доля УОБ — до 0,0002 % в контроле и до 0,002 % в эксперименте, что составило $3,1 \times 10^3$ и $1,5 \times 10^4$ кл. \cdot г $^{-1}$ соответственно.

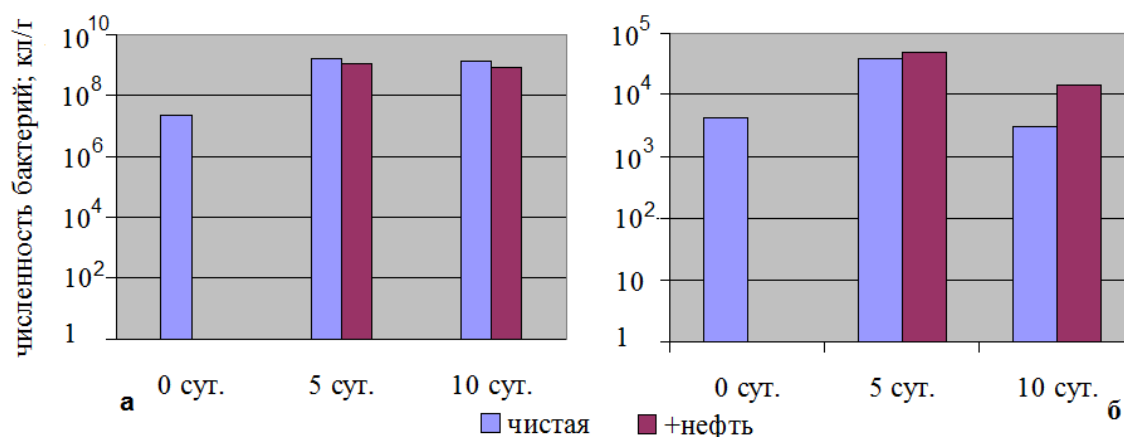


Рис. 3. Численность культивируемых эпифитных гетеротрофных (а) и углеводородокисляющих (б) бактерий в эксперименте

Fig. 3. Abundance of cultivated epiphytic heterotrophic (a) and hydrocarbon-oxidizing (б) bacteria in the experiment

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показали, что *A. arcta* сохраняет жизнеспособность в течение 10 дней при таком содержании НП в воде, которое в 10 раз превышает ПДК в месте произрастания и в 100 раз превосходит значение $0,05 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, принятое за 1 ПДК для рыбохозяйственных водоёмов [Нормативы, 2020]. В данном и в предыдущих исследованиях продемонстрировано, что уровень загрязнения морской воды НП в месте отбора проб колеблется от 2 ПДК в зимний и весенний периоды до 10 ПДК в летний сезон [Воскобойников и др., 2018, 2020b]. В акватории губы Зеленецкой находится причал дайвинг-центра, поэтому увеличение загрязнения может быть связано с усилением движения маломерного флота с началом сезона навигации в июле. По-видимому, развитие водорослей в условиях малого загрязнения НП обеспечило их устойчивость к данному фактору.

Изменение массовой доли алканов и валового содержания НП в воде в экспериментах с сырой нефтью и зелёными водорослями, а также без водорослей показано в табл. 1 и 2. Как уже отмечено выше, за 10 суток эксперимента количество НП в исходной воде без добавления нефти возросло до $1527 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ («вода + *A. arcta*»). Увеличилось и значение показателя, который отражает степень трансформации углеводов ($\Sigma \text{н-алканов} / \Sigma \text{НП}$), — с 0,06 до 0,10–0,12. Это указывает на небольшое «внесённое» нефтяное загрязнение. Вероятно, сами водоросли изначально содержали существенное количество НУ на своей поверхности.

Как также указано выше, при добавлении нефти в количестве $5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ измеренное содержание НП (в 1-е сутки) составило $5552 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. В течение опыта валовое содержание НП в пробах воды без водорослей-макрофитов постепенно снижалось, и на 10-е сутки значение составило $1158 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$, то есть уменьшилось на 79 %. В случае добавления акросифонии фиксировали снижение валового содержания НП на 5-е сутки до $628 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (на 88 %) и последующее увеличение до $1166 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. Ситуацию, когда на 10-е сутки эксперимента содержание НП в воде с макроводорослями выше, чем в контрольных образцах (без водорослей), можно объяснить тем, что водоросли не всё время поступательно поглощают НП и что существуют периоды «отдачи» поглощённых углеводов в окружающую среду до наступления некоего равновесного состояния. Возможно, это связано с циклами жизнедеятельности бактерий, обитающих на поверхности водорослей-макрофитов. Концентрации н-алканов и изопреноидов (фитана и пристана) изменялись в течение опыта в целом пропорционально валовому содержанию НП.

Таллом акросифонии изначально содержал $2686 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ НП. На 10-е сутки эксперимента содержание углеводов в акросифонии сократилось до $1929 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$. Вероятно, часть НП трансформировалась в клетках таллома, а часть перешла обратно в водную среду.

В опыте с добавлением нефти зарегистрировано поглощение НУ поверхностью водорослей. Максимальное количество НП в клетках водорослей было зафиксировано на 5-е сутки эксперимента — $7930 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$. На 10-сутки опыта валовое содержание НП в водорослях снизилось до $5395 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$. Учитывая данные по воде, можно предположить, что часть углеводов диффундировала обратно в воду.

Процессы трансформации углеводов в акросифонии можно отследить по изменению значения показателя $\Sigma \text{н-алканов} / \Sigma \text{НП}$. Его уменьшение на 10-е сутки свидетельствует об активно проходящих процессах деструкции основных компонентов нефти (н-алканов). Между тем полностью данные процессы к 10-м суткам не завершены. Изменение валового содержания НУ в воде и одновременно в водорослях отражает то, что акросифония очищает воду, поглощая НУ.

Визуальные и микроскопические наблюдения за изменениями у акросифонии, происходящими в ходе эксперимента, показали следующее. Несмотря на сохранение жизнеспособности при нефтяном загрязнении, соответствующем 100 ПДК, в отдельных клетках таллома отмечены деструктивные изменения — просветление протоплазмы, редукция оформленного пиреноида в хлоропластах и его крахмальной обкладки, уменьшение числа и парциального объёма на срезе клетки гранул крахмала, а затем их исчезновение. Однако до конца опыта хлоропласты в большинстве клеток таллома сохраняли целостность, признаков повреждений внутренней мембранной структуры зафиксировано не было. На всех стадиях эксперимента в цитоплазме выявлены электронно-плотные глобулы. Мы не можем с уверенностью говорить о природе данных образований, но не исключаем, что глобулы являются продуктом трансформации поглощённых НП. Их присутствие в клетках водорослей не только в опыте с введённой в морскую воду нефтью, но и в исходном варианте может быть обусловлено длительным обитанием водорослей до экспериментов в среде, загрязнённой НП (10 ПДК). Кроме того, сами водоросли обладают способностью синтезировать углеводы, например фитан. Интенсивность фотосинтеза снижалась у водорослей контрольного (без добавления НП) и опытного (с внесением НП) вариантов эксперимента через 5 суток почти в 3 раза по сравнению с таковой исходного варианта. Однако через 10 суток опыта значения фотосинтеза в варианте с внесённой нефтью не отличались от зафиксированных в исходном варианте. Данный факт может свидетельствовать об адаптивных способностях фотосинтетического аппарата водоросли к нефтяному загрязнению. Подтверждением этому являются минимальные изменения фотосинтетического аппарата в течение опыта. Увеличение интенсивности фотосинтеза при наличии в окружающей среде малых доз нефти было выявлено в экспериментах на ряде других видов водорослей, что подтверждает возможность поглощения и включения НУ в метаболизм водорослями-макрофитами [Степаньян, Воскобойников, 2006; Salakhov et al., 2020, 2021]. На возможные изменения метаболизма указывает увеличение числа и размеров митохондрий, а также количества митохондриальных крист на срезах клетки в процессе эксперимента.

Численность эпифитных бактерий коррелирует с изменениями концентраций НУ в водорослях. К 5-м суткам опыта отмечено возрастание количества гетеротрофных бактерий, в том числе УОБ. К окончанию эксперимента их численность уменьшалась относительно значения на 5-е сутки. НУ, которые накапливаются у водорослей, могут явиться фактором роста для микроорганизмов. Кроме того, резкое увеличение численности гетеротрофных бактерий и в эксперименте, и в контроле может быть связано с тем, что в процессе жизнедеятельности макрофитов происходит выделение в среду веществ, способствующих развитию гетеротрофных микроорганизмов.

Нужно отметить, что при значительном увеличении численности УОБ их доля относительно общего числа гетеротрофных бактерий в опыте оставалась достаточно низкой, в том числе при наличии нефти. Максимальная доля УОБ зарегистрирована у водорослей до внесения нефти в среду, в дальнейшем значение снижалось. Особенно хорошо это было заметно на 10-е сутки эксперимента: разница составила около порядка.

В процессе учёта численности культивируемых гетеротрофных бактерий в контроле и опыте возникли некоторые противоречия с результатами электронно-микроскопического анализа, при котором на поверхности водорослей при наличии нефти выявляют значительно больше бактерий, чем в контроле (рис. 1а, в). Данный факт можно объяснить тем, что бóльшая часть бактериального сообщества не растёт на питательных средах [Meyer-Reil, 1977; van Es, Meyer-Reil, 1982; ZoBell, 1946]. Считается, что к культивированию на средах способны около 10 % от всего сообщества, а к использованию НУ в качестве питательного субстрата — от 40 до более чем 70 % сообщества [Панов, 1990; Buckley et al., 1976]. Однако это вовсе не означает, что остальные («неучтённые») бактерии, присутствующие в среде, не способны к деструкции НП. Культивирование на питательных средах позволяет выявить бактерии, способные быстро адаптироваться к условиям загрязнения (в том числе в рамках лабораторного эксперимента), а также получить вполне объективные результаты и отследить тенденции, которые имеют место в бактериальных сообществах при воздействии на них различных поллютантов (в данном случае — нефти).

Заключение. Полученные результаты продемонстрировали способность зелёной водоросли *Acrosiphonia arcta* не только выдерживать в течение 10 дней нефтяное загрязнение 100 ПДК, которое по уровню сравнимо со слабым разливом нефти, но и участвовать в очистке морской воды от нефтепродуктов. Если первый выявленный факт, вероятно, определяется формированием адаптивных реакций при длительном пребывании в условиях слабого загрязнения среды обитания нефтепродуктами, то второй, по аналогии с характеристиками других изученных представителей фитобентоса, — образованием симбиотической ассоциации водоросли и углеводородокисляющих бактерий. В пользу этих фактов свидетельствуют сохранение структуры и функции фотосинтетического аппарата при уровне нефтяного загрязнения 100 ПДК и присутствие большого числа микроорганизмов на поверхности водорослей. При чрезвычайно малой биомассе акросифонии её процентный вклад в объём нейтрализованных нефтепродуктов в прибрежье Баренцева моря значительно меньше, чем у ламинариевых или фукусовых водорослей [Воскобойников и др., 2020a]. Вместе с тем *A. arcta* встречается во всех широтах Мирового океана, весьма устойчива к факторам внешней среды прибрежья Баренцева моря [Lüning, 1984; Wiencke et al., 1993] и способна развиваться в загрязнённых нефтью акваториях на любом субстрате, подготавливая его для заселения более крупными многолетними водорослями-макрофитами и прохождения ими ранних стадий развития, параллельно с этим участвуя в биоремедиации морской среды от нефти. Таким образом, роль *A. arcta* в восстановлении прибрежных фитоценозов достаточно значима.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Донные биоценозы Баренцева моря, его водосборного бассейна и сопредельных вод в современных условиях» (№ гос. регистрации 122020900044-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Воскобойников Г. М., Матишов Г. Г., Метелькова Л. О., Жаковская З. А., Лопушанская Е. М. Об участии зелёной водоросли *Ulvaria obscura* в биоремедиации морской среды от нефтепродуктов // Доклады Академии наук. 2018. Т. 481, № 1. С. 111–113. [Voskoboinikov G. M., Matishov G. G., Metelkova L. O., Zhakovskaia Z. A., Lopushanskaia E. M. The participating of the green algae *Ulvaria obscura* in the bioremediation of the sea

- water from oil products. *Doklady Akademii nauk*, 2018, vol. 481, no. 1, pp. 111–113. (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S086956520000064-3>
2. Воскобойников Г. М., Малавенда С. В., Метелькова Л. О. Роль фукусовых водорослей в биоремедиации прибрежных акваторий от нефтепродуктов на примере Кольского залива // *Морские исследования и образование (MARESEDU-2020)* : труды IX Международной научно-практической конференции. Тверь : ПолиПРЕСС, 2020а. Т. 3. С. 320–323. [Voskoboinikov G. M., Malavenda S. V., Metelkova L. O. Rol' fukusovykh vodoroslei v bioremediatsii pribrezhnykh akvatorii ot nefteproduktov na primere Kol'skogo zaliva. In: *Morskie issledovaniya i obrazovanie (MARESEDU-2020)* : trudy IX Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Tver : Poli-PRESS, 2020a, vol. 3, pp. 320–323. (in Russ.)]
 3. Воскобойников Г. М., Рыжик И. В., Салахов Д. О., Метелькова Л. О., Жаковская З. А., Лопушанская Е. М. Поглощение и преобразование дизельного топлива водорослью *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 (Rhodophyta) и её возможная роль в биоремедиации морской воды // *Биология моря*. 2020b. Т. 46, № 2. С. 135–141. [Voskoboinikov G. M., Ryzhik I. V., Salakhov D. O., Metelkova L. O., Zhakovskaya Z. A., Lopushanskaya E. M. Absorption and conversion of the diesel fuel by the red alga *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 (Rhodophyta): The potential role of the alga in bioremediation of sea water. *Biologiya morya*, 2020b, vol. 46, no. 2, pp. 135–141. (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0134347520020102>
 4. Воскобойников Г. М., Титлянов Э. А. Изучение анатомии и ультраструктуры красной водоросли *Grateloupia turuturu* из различных по освещённости мест обитания // *Экологические аспекты фотосинтеза морских макроводорослей*. Владивосток : Изд-во ДВНЦ АН СССР, 1978. С. 83–87. [Voskoboinikov G. M., Titlyanov E. A. A study on the anatomy and ultrastructure of the red alga *Grateloupia turuturu* from habitats of different illumination. In: *Ekologicheskie aspekty fotosinteza morskikh makrovodoroslei*. Vladivostok : Izd-vo DVNTs AN SSSR, 1978, pp. 83–87. (in Russ.)]
 5. Коронелли Т. В., Ильинский В. В. Об учёте численности углеводородокисляющих бактерий в морской воде методом предельных разведений // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 1984. № 3. С. 54–56. [Koronelli T. V., Iljinsky V. V. About the enumeration of hydrocarbon-oxidizing bacteria in seawater by a considered method. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*, 1984, no. 3, pp. 54–56. (in Russ.)]
 6. Панов Г. В. *Состояние микробиологических процессов в импактных и фоновых районах Мирового океана (на примере Балтийского и Берингова морей)* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16. Москва, 1990. 22 с. [Panov G. V. *Sostoyanie mikrobiologicheskikh protsessov v impaktnykh i fonovykh raionakh Mirovogo okeana (na primere Baltiiskogo i Beringova morei)* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.16. Moscow, 1990, 22 p. (in Russ.)]
 7. *Практическая гидробиология. Пресноводные экосистемы* / под ред. В. Д. Федорова, В. И. Капкова. Москва : ПИМ, 2006. 367 с. [*Prakticheskaya gidrobiologiya. Presnovodnye ekosistemy* / V. D. Fedorov, V. I. Kapkov (Eds). Moscow : PIM, 2006, 367 p. (in Russ.)]
 8. Пуговкин Д. В. *Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 25.00.28. Мурманск, 2017. 26 с. [Pugovkin D. V. *Epifitnye bakterio-tsenozy Fucus vesiculosus L. Barentseva morya i ikh rol' v degradatsii neftyanykh zagryaznenii* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 25.00.28. Murmansk, 2017, 26 p. (in Russ.)]
 9. *Руководство по методам биологического анализа морской воды и донных отложений* / под ред. А. В. Цыбань. Ленинград : Гидрометеиздат, 1980. 191 с. [*Rukovodstvo po metodam biologicheskogo analiza morskoi vody i donnykh otlozhenii* / A. V. Tsyban (Ed.). Leningrad : Gidrometeoizdat, 1980, 191 p. (in Russ.)]
 10. Степаньян О. В., Воскобойников Г. М. Влияние нефти и нефтепродуктов на морфофункциональные особенности морских макроводорослей // *Биология моря*. 2006. Т. 32, № 4. С. 241–248. [Stepanyan O. V., Voskoboinikov G. M. The effects of oil and oil products on the morphofunctional

- characteristics of marine macroalgae. *Biologiya morya*, 2006, vol. 32, no. 4, pp. 241–248. (in Russ.)]
11. Нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. Приложение. Табл. № 2 // *Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения* : приказ Минсельхоза России от 13.12.2016 № 552 [в ред. от 10.03.2020]. [Normativy predel'no dopustimyykh kontsentratsii vrednykh veshchestv v vodakh vodnykh ob'ektov rybokhozyaistvennogo znacheniya. Prilozhenie. Tabl. no. 2. In: *Ob utverzhdenii normativov kachestva vody vodnykh ob'ektov rybokhozyaistvennogo znacheniya, v tom chisle normativov predel'no dopustimyykh kontsentratsii vrednykh veshchestv v vodakh vodnykh ob'ektov rybokhozyaistvennogo znacheniya* : prikaz Minsel'khoza Rossii ot 13.12.2016 no. 552 [v red. ot 10.03.2020]. (in Russ.)]. URL: <https://sudact.ru/law/prikaz-minselkhoza-rossii-ot-13122016-n-552/prilozhenie/tablitisa-n-2/> [accessed: 21.03.2022].
 12. Atlas R. M. Microorganisms and petroleum pollutants. *BioScience*, 1978, vol. 28, iss. 6, pp. 387–391. <https://doi.org/10.2307/1307454>
 13. Buckley E. N., Jonas R. B., Fraender F. K. Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: Relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, vol. 32, no. 2, pp. 232–237. <https://doi.org/10.1128/aem.32.2.232-237.1976>
 14. Heitkamp M. A., Cerniglia C. E. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1987, vol. 6, iss. 7, pp. 535–546. <https://doi.org/10.1002/etc.5620060706>
 15. Lüning K. Temperature tolerance and biogeography of seaweeds: The marine algal flora of Helgoland (North Sea) as an example. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 1984, vol. 38, iss. 2, pp. 305–317. <https://doi.org/10.1007/BF01997486>
 16. Malavenda S. V., Mitayev M. V., Malavenda S. S., Gerasimova M. V. Fouling of coarse-clastic sediments with macrophytes depending on the rate of abrasion, Murmansk coast. *Doklady Earth Sciences*, 2017, vol. 474, iss. 1, pp. 557–560. <https://doi.org/10.1134/S1028334X17050063>
 17. Meyer-Reil L.-A. Bacterial growth rates and biomass production. In: *Microbial Ecology of a Brackish Water Environment* / G. Rheinheimer (Ed.). Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag, 1977, pp. 223–235. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66791-6_16
 18. Mills A. L., Breul C., Colwell R. R. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, vol. 24, pp. 552–557. <https://doi.org/10.1139/m78-089>
 19. Pilatti F., Ramlov F., Schmidt E., Kreuzsch M., Pereira D., Costa Ch., de Oliveira E., Bauer Cl., Rocha M., Bouzon Z., Maraschin M. *In vitro* exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline – Biochemical and morphological alterations. *Chemosphere*, 2016, vol. 156, pp. 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.126>
 20. Pirnik M. P. Microbial oxidation of methyl branched alkanes. *Critical Reviews in Microbiology*, 1977, vol. 5, iss. 4, pp. 413–422. <https://doi.org/10.3109/10408417709102812>
 21. Ryzhik I., Pugovkin D., Makarov M., Roleda M. Y., Basova L., Voskoboinikov G. Tolerance of *Fucus vesiculosus* exposed to diesel water-accommodated fraction (WAF) and degradation of hydrocarbons by the associated bacteria. *Environmental Pollution*, 2019, vol. 254 (Pt. B), art. no. 113072 (6 p.). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113072>
 22. Salakhov D., Pugovkin D., Ryzhik I., Voskoboinikov G. The influence of diesel fuel on morpho-functional state of *Ulvaria obscura* (Chlorophyta). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, vol. 539, iss. 1, art. no. 012202 (7 p.). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/539/1/012202>
 23. Salakhov D., Pugovkin D., Ryzhik I., Voskoboinikov G. The changes in the morpho-functional state of the green alga *Ulva intestinalis* L. In the Barents Sea under the influence of diesel fuel. *IOP Conference Series:*

- Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 937, iss. 2, art. no. 022059 (8 p.). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022059>
24. van Es F. B., Meyer-Reil L.-A. Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. In: *Advances in Microbial Ecology* / K. C. Marshall (Ed.). New York ; London : Plenum Press, 1982, vol. 6, pp. 111–170. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8318-9_4
25. Wiencke C., Rahmel J., Karsten U., Weykam G., Kirst G. O. Photosynthesis of marine macroalgae from Antarctica: Light and temperature requirements. *Botanica Acta*, 1993, vol. 106, iss. 1, pp. 78–87. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00341.x>
26. ZoBell C. E. *Marine Microbiology. A Monograph on Hydrobacteriology*. Waltham, MA : Chronica Botanica Co., 1946, 240 p.

THE EFFECT OF CRUDE OIL ON THE SYMBIOTIC ASSOCIATION OF THE GREEN ALGA *ACROSIPHONIA ARCTA* (DILLWYN) GAIN AND EPIPHYTIC BACTERIA

G. M. Voskoboinikov¹, L. O. Metelkova², D. V. Pugovkin¹, and D. O. Salakhov¹

¹Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences, Murmansk, Russian Federation

²D. I. Mendeleev Institute for Metrology, Saint Petersburg, Russian Federation

E-mail: grvosk@mail.ru

It was experimentally shown that the green alga *Acrosiphonia arcta*, inhabiting the Barents Sea littoral zone, remains viable for 10 days in case of exposure to crude oil introduced into seawater at a concentration of 5 mg·L⁻¹. This concentration corresponds to a weak oil spill in the marine environment. Morphological and functional changes in the symbiotic association of *A. arcta* and epiphytic bacteria on its surface were traced by the techniques of microbiology, light and electron microscopy, and physiology. During the experiment, most algal cells maintained a high level of photosynthesis, and their ultrastructure was preserved. Interestingly, by the end of the exposure, under the effect of crude oil, the proportion of chloroplasts decreased in algal cells, and the pyrenoid and starch granules disappeared. The dynamics of the abundance of epiphytic bacteria in the experiment and the proportion of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the total abundance of cultivated heterotrophs were traced. The capability of *A. arcta* to absorb and transform oil products was shown. This algal species is capable of developing in oil-contaminated water areas on any substrate, preparing it for colonization by larger perennial macrophyte algae, and this determines the significant role of *A. arcta* in the restoration of coastal phytocoenoses.

Keywords: *Acrosiphonia arcta*, oil, seawater bioremediation, symbiotic association, epiphytic bacteria, photosynthesis, ultrastructure