

УДК 582.263-11:[57.04:665.7]

**АНАЛИЗ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК
ACROSIPHONIA ARCTA (DILLWYN) GAIN
НА РАННЕЙ СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ СТРЕСС-РЕАКЦИИ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭМУЛЬСИИ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА**

© 2024 г. И. В. Рыжик¹, Д. О. Салахов¹, М. В. Макаров¹, М. Ю. Меньшакова²

¹Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Российская Федерация

²Мурманский арктический университет, Мурманск, Российская Федерация

E-mail: alaria@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.07.2022; после доработки 24.03.2023;
принята к публикации 09.10.2023; опубликована онлайн 22.03.2024.

Проведено исследование особенностей формирования стрессовой реакции в клетках зелёной водоросли *Acrosiphonia arcta* на воздействие эмульсии дизельного топлива. Проанализированы изменения показателей окислительного стресса (концентрация перекиси водорода и накопление продуктов перекисного окисления липидов), активность ферментов антиоксидантной системы, интенсивность фотосинтеза и состояние клеток. Показано, что в течение первых суток воздействия токсиканта в клетках происходит развитие плазмоллиза и нарушение структуры хлоропластов. Стрессовая реакция формируется поэтапно: на первом этапе увеличивается количество перекиси водорода, изменяется концентрация продуктов перекисного окисления липидов, повышается активность супероксиддисмутазы; на втором этапе происходит активизация каталазы; к концу первых суток воздействия на фоне снижения активности каталазы увеличивается активность пероксидазы (третий этап). Интенсивность фотосинтеза снижается к концу эксперимента. Выдвинуто предположение, что под воздействием эмульсии дизельного топлива может происходить нарушение суточной динамики биологических циклов ряда ферментов.

Ключевые слова: *Acrosiphonia arcta*, дизельное топливо, каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза, перекисное окисление липидов, перекись водорода, интенсивность фотосинтеза

Acrosiphonia arcta (Dillwyn) Gain, 1912 — вид зелёных водорослей, который широко представлен в литоральной зоне Баренцева моря [Malavenda, 2018], где может формировать достаточно большие заросли. Он относится к первопоселенцам, подготавливающим субстрат для заселения многолетними видами водорослей, например фукусовыми. *A. arcta* имеет высокие адаптационные возможности, так как выдерживает широкий диапазон колебаний факторов внешней среды (к примеру, температуры и освещённости) [Sussmann, Scrosati, 2011].

С интенсивным развитием промышленности неизбежно увеличивается антропогенная нагрузка, в том числе растёт поступление в окружающую среду нефтеуглеводородов [Патин, 2008]. В приморских городах наиболее уязвимой является прибрежная зона, поскольку на неё оказывается воздействие как с суши, так и с моря. Флора таких участков побережья бедна по видовому составу; здесь выживают растения, у которых сформированы механизмы обезвреживания токсикантов и/или адаптации к их присутствию [Мильчакова, Шахматова, 2007; Malavenda,

2018; Shakhmatova, Milchakova, 2014]. Нефтепродукты замедляют рост, что было показано на *Ascophyllum nodosum* и *Laminaria digitata* [Bokn, 1985], нарушают формирование зигот и развитие фукоидов [Thélin, 1981]. На примере фукусовых также было зарегистрировано отсутствие значительных изменений интенсивности фотосинтеза и концентрации пигментов как при длительном [Voskoboinikov et al., 2004], так и при кратковременном [Степаньян, 2014] воздействии нефтепродуктов, однако биохимический состав и активность ферментов существенно изменились под их влиянием [Shakhmatova, Ryzhik, 2020; Voskoboinikov et al., 2004]. Между тем при действии нефтепродуктов на зелёные водоросли были отмечены снижение интенсивности фотосинтеза, а также значительные повреждения и изменение биохимического состава клеток [Воскобойников и др., 2018; El Maghraby, Hassan, 2021; Klindukh et al., 2021; Pilatti et al., 2016; Ryzhik, Makarov, 2019].

У организма при встрече с токсикантом поэтапно активируются несколько систем защиты [Колупаев, 2007; Apel, Hirt, 2004]. В первую очередь происходит интенсификация образования активных форм кислорода [Pokora, Tukaj, 2010; Vega-López et al., 2013], которые активируют систему антиоксидантной защиты (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и др.) [Alscher et al., 2002]. Изменения активности супероксиддисмутаза были зафиксированы для *Chlorella vulgaris* [Calderón-Delgado et al., 2019], *Phaeodactylum tricorutum* [Wang et al., 2008] и *Ulvaria obscura* [Salakhov et al., 2020], а активности каталазы — для *Palmaria palmata* [Voskoboinikov et al., 2020] и ульвовых водорослей [Pilatti et al., 2016; Ryzhik, Makarov, 2019]. Характер изменения активности ферментов зависит от величины и продолжительности действия стрессового фактора. При хроническом воздействии запускаются глубинные перестройки циклов синтеза белков/аминокислот, липидного обмена (изменение состава жирных кислот и липидов) и т. д. [Nechev et al., 2002; Ramadass et al., 2015].

Антиоксидантные ферменты, являясь биомаркерами, могут быть использованы для выявления метаболических нарушений, вызванных ксенобиотиками [Шахматова, 2004; Díaz-Báez et al., 2004; Geret et al., 2003; Inupakutika et al., 2016; Mallick, 2004]. Скорость, с которой активируются системы защиты, важна для дальнейшей адаптации организма к токсиканту.

Между тем вопросы скорости формирования стресс-реакции и особенности включения разных компонентов антиоксидантной системы в процесс защиты клетки от окислительного стресса, особенно у водорослей-макрофитов, произрастающих в арктической зоне, остаются слабоизученными. Мы предполагаем, что по интенсивности развития ответной реакции и по изменению активности ферментов можно будет судить о дальнейшей судьбе растений: смогут ли они адаптироваться к воздействию токсиканта или погибнут. Как было отмечено ранее, судьба клеток будет зависеть от изменений, происходящих в момент контакта с токсикантом [Shiu et al., 2020]. Таким образом, анализ показателей антиоксидантной системы и фотосинтетической активности в первые сутки контакта клетки с нефтепродуктами имеет большое значение для понимания механизмов формирования адаптации.

Цель настоящего исследования — оценить скорость активизации антиоксидантной системы *Acrosiphonia arcta* в ответ на контакт растения с эмульсией дизельного топлива. Характер воздействия будет проанализирован по маркерам окислительного стресса (концентрация перекиси водорода и продуктов перекисного окисления липидов) и по состоянию ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные работы выполняли в июле 2020 г. на сезонной биостанции ММБИ РАН (посёлок Дальние Зеленцы, восточное побережье Баренцева моря). Данный район относится к экологически чистым местам произрастания водорослей.

Талломы водорослей собрали на литорали губы Дальнезеленецкой и поместили в лабораторные условия — в термостатируемое помещение с освещением $150 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ (24 ч свет : 0 ч темнота), температурой воды $+8 \dots +10 \text{ }^\circ\text{C}$ и постоянной аэрацией сосудов с растениями. Используемый режим освещения был обусловлен особенностями фотопериода (полярный день) в момент проведения эксперимента. Водоросли акклимировали к лабораторным условиям в течение трёх суток. В дальнейшем часть растений помещали в контрольные сосуды [чистая морская вода солёностью 33 ‰] и в экспериментальные [морская вода солёностью 33 ‰ с добавлением легкого дизельного топлива (ГОСТ 305-82) в концентрации $43 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$]. В каждый вариант эксперимента помещали по 8 талломов водорослей (общая масса не более 50 г). Используемая концентрация нефтепродукта соответствовала максимальной, которая была отмечена для вод прибрежной зоны Кольского залива в период с 2014 по 2016 г.

Длительность эксперимента составляла одни сутки. Измерения показателей проводили в течение суток через 1, 3, 7, 10 и 24 ч, в трёх повторностях. Обработано 70 проб. Физиолого-биохимические показатели определяли на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ («Экротим», Россия).

Содержание перекиси водорода определяли по модифицированной спектрофотометрической методике D. Bellincampi с соавторами [2000]. Метод основан на окислении ионов железа Fe^{2+} перекисью водорода до ионов железа Fe^{3+} , которые образуют окрашенные соединения с ксиленоловым оранжевым. Оптическую плотность измеряли при длине волны 560 нм.

Уровень перекисного окисления липидов (далее — ПОЛ) оценивали по накоплению активных продуктов тиобарбитуровой кислоты [Esterbauer, Cheeseman, 1990]. Измерение проводили при длине волны 540 нм.

Супернатант для определения активности каталазы и супероксиддисмутазы (далее — КАТ и СОД соответственно) получали следующим образом. Водоросли массой 150–200 мг растирали на льду в ступке с добавлением 2000 мкл экстракционного буфера (K/Na-фосфатный буфер). Гомогенат центрифугировали 5 мин при 12 000 g, после этого отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Активность КАТ измеряли с помощью модифицированного спектрофотометрического метода [Королук и др., 1988]: к 0,1 мл супернатанта приливали 2 мл 0,03%-ного раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо супернатанта вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Интенсивность развивающейся окраски измеряли при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды.

Активность СОД определяли по [Giannopolitis, Ries, 1977]. Оптическую плотность содержимого пробирок измеряли при длине волны 560 нм. Расчёт активности ферментов (КАТ и СОД) проводили на сухой вес.

Активность пероксидазы анализировали по методу Бояркина [Методы биохимического исследования растений, 1987], основанному на определении скорости окисления бензидина при наличии перекиси водорода и пероксидазы. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 590 нм ежесекундно в течение 120 с. При расчёте учитывали разницу между начальной и конечной оптической плотностью. Определение активности фермента проводили на сухой вес.

Интенсивность фотосинтеза (далее — ИФ) измеряли титриметрическим методом Винклера, рассчитывали изменение содержания кислорода в воде за период инкубации талломов (мкг O_2 на 1 г сырой массы таллома в ч). Контролем служили водоросли в ёмкостях без нефтепродуктов.

Содержание сухого вещества определяли согласно общепринятой методике [Методы биохимического исследования растений, 1987]. Для этого талломы водоросли после удаления с поверхности капельной влаги с помощью фильтровальной бумаги взвешивали

на весах ВЛТЭ-310 («Госметр», Россия) (точность 0,001 мг), высушивали в сушильном шкафу в течение 24 ч до постоянного веса при +105 °С и повторно взвешивали. Содержание сухого вещества оценивали как долю сухой массы от сырой.

Анализ состояния клеток водорослей проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Россия) при увеличении $\times 400$.

Достоверность различий между вариантами рассчитывали для исходных данных с применением *t*-критерия Стьюдента при вероятности 95 % ($p \leq 0,05$). Для оценки значимости влияния фактора загрязнённости использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для обработки и анализа полученных данных применяли статистический пакет программы MS Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состояние клеток водорослей. Контрольные образцы к концу эксперимента оставались в интактном состоянии (рис. 1А). У опытных образцов после 3 ч исследования наблюдали расширение структур перфорированного хлоропласта. К концу первых суток хлоропласт уменьшался, приобретая в ряде клеток зернистую структуру. Отмечено развитие плазмолиза (рис. 1Б, В).



Рис. 1. Клетки *Acrosiphonia arcta* к концу эксперимента (24 ч): А — контроль; Б, В — клетки после нахождения в воде с дизельным топливом

Fig. 1. *Acrosiphonia arcta* cells at the end of the experiment (24 h): А, the control; Б, В, cells after exposure to water containing diesel fuel

Маркеры окислительного стресса. В норме в клетках постоянно присутствуют перекись водорода, уровень которой колеблется в пределах $0,004\text{--}0,005$ кмоль·г⁻¹ сухого веса, и продукты перекисного окисления липидов, концентрация которых составляет $0,003\text{--}0,005$ у. е.·г⁻¹ сухого веса. Уменьшение и увеличение концентрации этих веществ в клетке обусловлены, скорее всего, наличием суточных ритмов изменения активности физиологических процессов (рис. 2А, Б).

Под действием дизельного топлива у экспериментальных образцов концентрация перекиси водорода в течение 1-го часа увеличивается в 1,5 раза; затем происходит постепенное её уменьшение (в 2 раза). Уровень ПОЛ у экспериментальных водорослей на протяжении 1-го часа снижается; в дальнейшем, к 7-му часу опыта, он повышается практически вдвое; к 10-му часу наблюдений уровень снижается. К концу эксперимента ПОЛ усиливается.

При этом необходимо отметить, что изменения уровня ПОЛ в контроле и опыте находятся в противофазе. Через 1 и 10 ч эксперимента в контроле зафиксировано накопление продуктов ПОЛ, тогда как в опыте в это же время концентрация продуктов ПОЛ значительно уменьшилась (рис. 2А, Б).

Активность ферментов антиоксидантной системы. Активность СОД в контроле в период с 1-го по 7-й час исследования оставалась неизменной, на 10-й час увеличивалась в 1,3 раза и до конца эксперимента не изменялась. Под воздействием дизельного топлива активность СОД росла в 1,5 раза в 1-й час эксперимента, снижалась в 2 раза на 7-й час и сравнивалась с аналогичным показателем в контроле к первым суткам (рис. 2В).

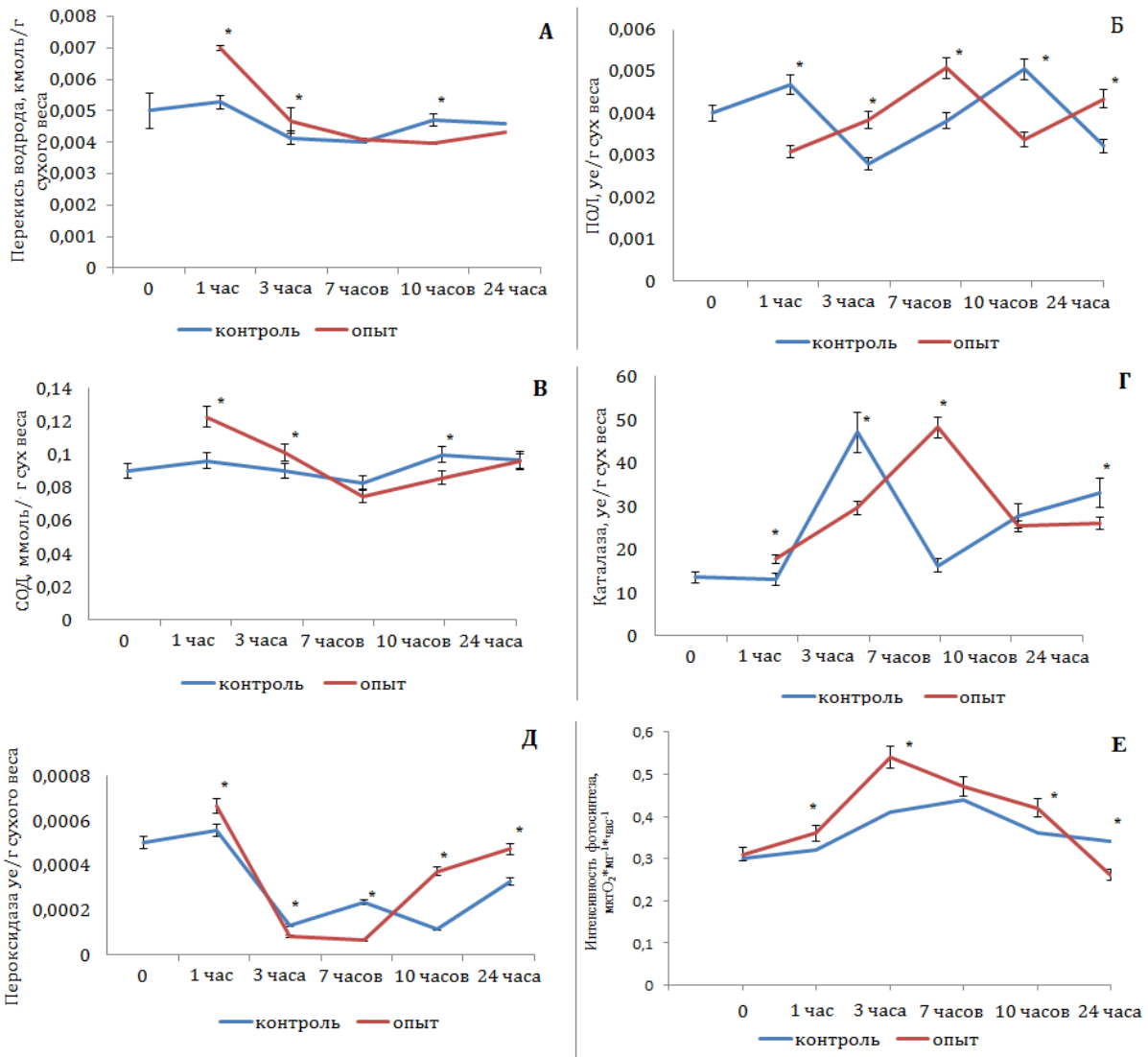


Рис. 2. Изменение основных физиолого-биохимических показателей *Acrosiphonia arcta* в течение эксперимента: А — концентрация перекиси водорода; Б — уровень перекисного окисления липидов; В — активность супероксиддисмутазы; Г — активность каталазы; Д — активность пероксидазы; Е — интенсивность фотосинтеза. Данные на графиках представлены в виде средних арифметических; бары обозначают стандартное отклонение [* — достоверные различия с контролем ($p \leq 0,05$)]

Fig. 2. Changes in the main physiological and biochemical parameters of *Acrosiphonia arcta* during the experiment: А, hydrogen peroxide concentration; Б, the level of lipid peroxidation; В, superoxide dismutase activity; Г, catalase activity; Д, peroxidase activity; Е, rate of photosynthesis. Data in the graphs are presented as arithmetic means; bars indicate standard deviation [* marks significant differences with the control ($p \leq 0.05$)]

Активность КАТ в контроле не изменялась в течение 1-го часа исследования. На 3-й час отмечено повышение активности КАТ в 3,6 раза, на 7-й час — уменьшение в 3 раза, на 10-й час — увеличение в 1,5 раза с сохранением высоких значений до конца измерений. В опытных образцах происходило постепенное повышение активности КАТ (в 3 раза) с 1-го по 7-й час измерений, на 10-й час активность фермента снижалась в 2,5 раза и до конца эксперимента оставалась неизменной (рис. 2Г).

Активность пероксидазы в течение эксперимента у контрольных и опытных образцов изменялась значительно.

В контроле наблюдали волнообразное изменение активности фермента. В течение 1-го часа отмечено незначительное повышение активности пероксидазы, а на 3-й час — снижение в 6 раз. В период с 3-го по 7-й час активность росла в 2 раза, затем снижалась в 2 раза, к концу эксперимента (24-й час) увеличивалась в 3 раза по сравнению с предыдущими значениями (рис. 2Д). У опытных образцов также происходило повышение активности пероксидазы на 1-й час эксперимента (в 1,3 раза) и снижение на 3-й час (в 7 раз). В то же время, начиная с 7-го часа эксперимента, было зарегистрировано увеличение активности пероксидазы, которая к 10-му часу исследования увеличивалась в 5 раз, а к 24-му — в 1,5 раза по сравнению с предыдущими значениями показателя и была достоверно выше контроля (рис. 2Д).

Интенсивность фотосинтеза. В ходе эксперимента была также измерена ИФ (рис. 2Е). В первые часы у опытных образцов происходило повышение ИФ по сравнению с контролем. Наиболее существенные отличия наблюдали на 3-й час измерений: значения были в 1,3 раза выше контроля. К окончанию эксперимента ИФ опытных образцов стала ниже таковой контрольных в 1,3 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение активности ферментов антиоксидантной системы в ответ на действие стрессоров разной природы — это универсальная реакция любого организма [Мильчакова, Шахматова, 2007; Шахматова, 2004; Regoli et al., 2002; Ryzhik et al., 2019; Sardi et al., 2016; Zhang et al., 2004]. В литературе в основном обсуждаются долговременное воздействие нефтепродуктов и соответствующие перестройки в организме. Например, на *Hypnea musciformis* продемонстрирован сложный характер изменения различных биохимических показателей — снижение содержания хлорофилла *a* и фенольных соединений и повышение концентрации каротиноидов. Также отмечено изменение морфологии клетки, в частности структуры поверхности клеточной стенки [Ramlov et al., 2014, 2019]. На микроводорослях *Pseudokirchneriella subcapitata* продемонстрировано, что свежее и (в большей степени) отработанное моторное масло вызывало повышение активности антиоксидантных ферментов (вначале увеличивалась активность СОД, потом — пероксидазы и КАТ); таким образом, уменьшалось окислительное повреждение биомолекул [Ramadass et al., 2015]. В клетках зелёных водорослей при длительном воздействии токсиканта показаны развитие плазмоллиза, разрушение хлоропластов и т. д. [Воскобойников и др., 2018; Salakhov et al., 2021].

Зачастую в долговременных экспериментах не удаётся выявить истинную ответную реакцию на воздействие токсиканта. Например, в работах на *Fucus vesiculosus* не было зарегистрировано увеличение активности КАТ после длительного (более 10 дней) контакта с дизельным топливом [Ryzhik et al., 2019]. Однако в природных условиях активность КАТ была достоверно выше у водорослей, подверженных хроническому действию высокого уровня загрязнения, чем у растений из экологически чистых районов [Shakhmatova, Ryzhik, 2020].

В данном исследовании показано изменение активности антиоксидантных ферментов в клетках *A. arcta* в ответ на воздействие дизельного топлива в течение первых суток эксперимента. К настоящему времени установлено, что интенсификация образования активных форм

кислорода приводит к увеличению активности антиоксидантных ферментов, участвующих в формировании долговременных адаптаций [Колупаев, 2007; Колупаев, Карпец, 2010; Рогожин, 2004; Migdal, Serres, 2011].

Результаты нашего исследования показали, что к 1-му часу воздействия в клетках растений начинают формироваться стрессовые реакции, в частности развивается плазмолиз и нарушается структура хлоропластов.

В ходе первых суток можно выделить три блока быстрых стрессовых реакций, которые запускаются поэтапно. Один из первых, реализуемый сразу после начала воздействия, — интенсификация процессов ПОЛ. Малоновый диальдегид и другие продукты ПОЛ являются своеобразными сигналами для усиления синтеза ферментов антиоксидантной системы. После 1-го часа эксперимента были отмечены уменьшение уровня ПОЛ и повышение активности СОД по сравнению с контролем. Процессы ПОЛ развиваются с большой скоростью; как показано на примере высших растений (проростки пшеницы), значительное накопление продуктов ПОЛ может происходить уже в течение первых 10–15 мин воздействия [Рогожин, 2004]. Для их обезвреживания используется тот пул СОД, который присутствовал в клетке до начала воздействия. Также запускается синтез *de novo*, поскольку СОД относится к индуцируемым ферментам. Согласно литературным данным, на примере исследования влияния ультрафиолетового излучения на проростки пшеницы продемонстрировано, что на начальных этапах воздействия для утилизации активных форм кислорода используется имеющийся запас СОД, а затем уже запускается синтез фермента [Рогожин, 2004]. Параллельно мы можем наблюдать в клетках *Acrosiphonia* увеличение концентрации перекиси водорода. Также в этот период активируется синтез КАТ, максимум активности которой приходится на 7-й час измерений (второй блок реакций).

В дальнейшем у исследуемых водорослей уменьшается концентрация КАТ и повышается уровень пероксидазы (третий этап). Выявленные особенности могут быть следствием ингибирования активности КАТ высокими концентрациями перекиси водорода и/или продуктами расщепления нефтеуглеводородов и возможным переходом этого фермента в другую форму, которая позволяет выполнять оксигеназную функцию [Колупаев, Карпец, 2010; Колупаев и др., 2011]. При этом снижение активности КАТ сопровождалось увеличением активности пероксидазы, что с учётом сходства выполняемых ими функций свидетельствует о компенсаторном характере изменений. В публикациях ряда авторов были показаны компенсаторные перестройки одних компонентов антиоксидантной системы при ингибировании активности / снижении содержания других её компонентов [Мирошниченко, 1992; Apel, Hirt, 2004].

Также в работе отмечено повышение ИФ у опытных растений в первые часы измерений (1, 3, 7 и 10-й) и снижение к концу эксперимента.

Наблюдаемое нами повышение ИФ в первые часы опыта, возможно, связано с особенностями метода Винклера, в котором для измерения фотосинтеза растения переносят в среду без токсиканта на период от 30 мин до 1 ч. Мы предполагаем, что перенесение растений в чистую воду для измерения вызвало временную активацию фотосинтеза, так как снизилось токсическое влияние дизельного топлива. Между тем при более длительном нахождении растений в эксперименте данный эффект не был зарегистрирован, поскольку в их клетках накапливаются необратимые изменения. Таким образом, смещение прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону процессов ПОЛ в клетках опытных растений после суток эксперимента, вероятно, привело к изменению структуры хлоропластов, плазмолизу и, соответственно, снижению ИФ.

Изменения физиологических показателей в течение первых часов действия стрессоров были отмечены для разных групп организмов, и затрагивали они не только состояние антиоксидантной системы, но и белоксинтезирующий и энергетический аппараты клетки. Например, для микроводорослей и микроорганизмов были продемонстрированы значительные изменения

в соотношениях белки/углеводы и скорость роста / выживаемость клеток, которые происходят при контакте с растворённым дизельным топливом в течение первых суток воздействия [Shiu et al., 2020]. В исследованиях влияния плёнки нефтепродуктов показано, что при кратковременном её воздействии (один приливно-отливной цикл) у зелёных водорослей регистрируют плазмолиз клеток, снижение ИФ и увеличение интенсивности дыхания [Ryzhik, Makarov, 2019].

В то же время нами установлен сдвиг суточного цикла КАТ и уровня ПОЛ в опытных образцах по сравнению с контрольными. Это может свидетельствовать о нарушении суточных ритмов активности фермента КАТ и процессов ПОЛ. В ряде публикаций было показано существование у водорослей биологических ритмов выработки антиоксидантов, имеющих большое значение для функционирования клеток [Carvalho et al., 2004]. Аналогичный эффект был отмечен в работах по изучению влияния ультрафиолетового излучения на состояние антиоксидантного комплекса злаковых растений [Рогожин, 2004]. Нарушение ритмов может негативно сказываться на устойчивости растений в меняющихся условиях внешней среды, что подтверждают полученные нами результаты.

Таким образом, результаты исследований позволили установить, что увеличение активности антиоксидантных ферментов в клетках *Acrosiphonia arcta*, подвергавшихся действию дизельного топлива, происходит в течение 1-го часа опыта и является адаптивной реакцией растений на повышение концентрации перекиси водорода. На протяжении эксперимента установлены разные временные максимумы активности СОД, КАТ и пероксидазы, что соответствует современным представлениям о последовательности реализации антиоксидантного ответа: СОД → КАТ/пероксидаза.

При этом негативное воздействие дизельного топлива обусловлено нарушением не только физиологических процессов в клетках, но и, вероятно, биоритмов, позволяющих организмам адаптироваться к периодически изменяющимся факторам.

Это особенно актуально для литоральных растений, подвергающихся воздействию периодически изменяющихся факторов среды, в частности приливно-отливного цикла, когда нарушение синхронизации может привести к гибели водорослей.

Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда № 22-17-00243 «Радиационная океанология и геоэкология прибрежного шельфа Баренцева и Белого морей. Биокосные взаимодействия в системе донные отложения — вода — макроводоросли — микроорганизмы, их роль в ремедиации морской прибрежной экосистемы при радиационном и химическом загрязнении в условиях Арктики».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Воскобойников Г. М., Лопушанская Е. М., Жаковская З. А., Метелькова Л. О., Матишов Г. Г. 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., Lopushanskaya E. M., Zhakovskaya Z. A., Metelkova L. O., Matishov G. G. Participation of the green algae *Ulvaria obscura* in bioremediation of 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. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2007. Вип. 3 (12). С. 6–26. [Kolupaev Yu. Ye. Reactive oxygen species in plants at stressors action: Formation and possible functions. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu imeni V. N. Karazina. Seriiia "Biologhiia"*, 2007, iss. 3 (12), pp. 6–26. (in Russ.)]
3. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. *Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров*. Киев : Основа, 2010. 352 с. [Kolupaev Yu. Ye., Karpets Yu. V.

- Formirovanie adaptivnykh reaktsii rastenii na deistvie abioticheskikh stressorov.* Kyiv : Osnova, 2010, 352 p. (in Russ.)
4. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В., Обозный А. И. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров // *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2011. Вип. 1 (22). С. 6–34. [Kolupaev Yu. Ye., Karpets Yu. V., Oboznii O. I. Plants antioxidative system: Participation in cell signaling and adaptation to influence of stressors. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu imeni V. N. Karazina. Seriiia "Biologiia"*, 2011, iss. 1 (22), pp. 6–34. (in Russ.)]
 5. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16–19. [Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Maiorova I. G., Tokarev V. E. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy. *Laboratornoe delo*, 1988, no. 1, pp. 16–19. (in Russ.)]
 6. *Методы биохимического исследования растений* / под ред. А. Е. Ермакова ; 3-е издание, переработанное и дополненное. Ленинград : Агропромиздат, Ленинградское отделение, 1987. 429 с. [*Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii* / A. I. Ermakov (Ed.) ; 3rd edition, revised & enlarged. Leningrad : Agropromizdat, Leningradskoe otdelenie, 1987, 429 p. (in Russ.)]
 7. Мильчакова Н. А., Шахматова О. А. Каталазная активность массовых видов черноморских макроводорослей в градиенте хозяйственно-бытового загрязнения // *Морской экологический журнал*. 2007. Т. 6, № 2. С. 44–57. [Milchakova N. A., Shakhmatova O. A. Catalase activity of the widely-distributed macroalgae of the Black Sea by gradient of the sewage pollution. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2007, vol. 6, no. 2, pp. 44–57. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/906>
 8. Мирошниченко О. С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // *Биополимеры и клетка*. 1992. Т. 8, № 6. С. 3–25. [Miroshnichenko O. S. Biogenesis, physiological role, and properties of catalase. *Biopolimery i kletka*, 1992, vol. 8, no. 6, pp. 3–25. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.7124/bc.00033C>
 9. Патин С. А. *Нефтяные разливы и их воздействие на морскую среду и биоресурсы*. Москва : Изд-во ВНИРО, 2008. 508 с. [Patin S. A. *Oil Spills and Their Impact on the Marine Environment and Living Resources*. Moscow : VNIRO Publishing, 2008, 508 p. (in Russ.)]
 10. Рогожин В. В. *Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов*. Санкт-Петербург : ГИОРД, 2004. 240 с. [Rogozhin V. V. *Peroksidaza kak komponent antioksidantnoi sistemy zhivykh organizmov*. Saint Petersburg : GIORD, 2004, 240 p. (in Russ.)]
 11. Степаньян О. В. Воздействие нефтяной плёнки на фотосинтез бурых водорослей Баренцева моря // *Ботанический журнал*. 2014. Т. 99, № 10. С. 1095–1100. [Stepanyan O. V. The oil film influence on photosynthesis of brown algae in the Barents Sea. *Botanicheskii zhurnal*, 2014, vol. 99, no. 10, pp. 1095–1100. (in Russ.)]
 12. Шахматова О. А. *Активность антиоксидантной системы некоторых черноморских гидробионтов в прибрежной акватории Севастополя* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.17. Севастополь, 2004. 21 с. [Shakhmatova O. A. *Aktivnost' antioksidantnoi sistemy nekotorykh chernomorskikh gidrobiontov v pribrezhnoi akvatorii Sevastopolya* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.17. Sevastopol, 2004, 21 p. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/9708>
 13. Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2002, vol. 53, iss. 372, pp. 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
 14. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, vol. 55, pp. 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
 15. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 2000, vol. 122, iss. 4, pp. 1379–1386. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
 16. Bokn T. Effects of diesel oil on commercial benthic algae in Norway. In: *1985 Oil Spill Conference (Prevention, Behavior, Control,*

- Cleanup*), 25–28 February, 1985, Los Angeles, California. Washington DC : American Petroleum Institute, 1985, pp. 491–496. (International Oil Spill Conference (IOSC) proceedings ; vol. 1985, iss. 1).
17. Calderón-Delgado I. C., Mora-Solarte D. A., Velasco-Santamaría Y. M. Physiological and enzymatic responses of *Chlorella vulgaris* exposed to produced water and its potential for bioremediation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2019, vol. 191, iss. 6, art. no. 399 (13 p.). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7519-8>
 18. Carvalho A. M., Neto A. M. P., Tonon A. P., Pinto E., Cardozo K. H. M., Brigagão M. R. P. L., Barros M. P., Torres M. A., Magalhães P., Campos S. C. G., Guaratini T., Sigaud-Kutner T. C. S., Falcão V. R., Colepicolo P. Circadian protection against oxidative stress in marine algae. *Hypnos*, 2004, [vol.] 1 (suppl. 1), pp. 142–157.
 19. Díaz-Báez M. C., Bustos Lopez M. C., Espinosa-Ramírez A. J. *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos*. Bogotá, Colombia : Universidad Nacional de Colombia, 2004, 118 p.
 20. El Maghraby D., Hassan I. Photosynthetic and biochemical response of *Ulva lactuca* to marine pollution by polyaromatic hydrocarbons (PAHs) collected from different regions in Alexandria city, Egypt. *Egyptian Journal of Botany*, 2021, vol. 61, no. 2, pp. 467–478. <http://dx.doi.org/10.21608/ejbo.2021.37571.1531>
 21. Esterbauer H., Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 186, pp. 407–421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
 22. Geret F., Serafim A., Bebianno M. J. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology*, 2003, vol. 12, iss. 5, pp. 417–426. <https://doi.org/10.1023/A:1026108306755>
 23. Giannopolitis C. N., Ries S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 1977, vol. 59, iss. 2, pp. 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
 24. Inupakutika M. A., Sengupta S., Devireddy A. R., Azad R. K., Mittler R. The evolution of reactive oxygen species metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 2016, vol. 67, iss. 21, pp. 5933–5943. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw382>
 25. Klindukh M., Dobychina E., Makarov M., Ryzhik I. Influence of diesel fuel on the composition and content of free amino acids in the green alga *Acrosiphonia arcta*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 937, art. no. 022010 (5 p.). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022010>
 26. Malavenda S. V. Macroalgae's flora of the Kola Bay (the Barents Sea). *Vestnik Murmanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*, 2018, vol. 21, no. 2, pp. 245–252. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-2-245-252>
 27. Mallick N. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: Response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 2004, vol. 161, iss. 5, pp. 591–597. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01230>
 28. Migdal C., Serres M. Reactive oxygen species and oxidative stress. *Médecine/Sciences*, 2011, vol. 27, no. 4, pp. 405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
 29. Nechev J. T., Khotimchenko S. V., Ivanova A. P., Stefanov K. L., Dimitrova-Konaklieva S. D., Andreev S., Popov S. S. Effect of diesel fuel pollution on the lipid composition of some wide-spread Black Sea algae and invertebrates. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2002, vol. 57, iss. 3–4, pp. 339–343. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-3-401>
 30. Pilatti F. K., Ramlov F., Schmidt E. C., Kreuzsch M., Pereira D. T., Costa C., de Oliveira E. R., Bauer C. M., Rocha M., Bouzon Z. L., 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>
 31. Pokora W., Tukaj Z. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus* (Chlorophyta) species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, vol. 73, iss. 6, pp. 1207–1213. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.013>
 32. Ramadass K., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. Toxicity and oxidative stress induced by used and unused motor oil on freshwater microalga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Science and Pollution*

- Research*, 2015, vol. 22, iss. 12, pp. 8890–8901. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3403-9>
33. Ramlov F., Carvalho T. J. G., Costa G. B., de Oliveira Rodrigues E. R., Bauer C. M., Schmidt É. C., Kreuzsch M. G., Moresco R., Bachiega Navarro B., Cabral D. Q., Bouzon Z. L., Antunes Horta P., Maraschin M. *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta) responses to gasoline short-term exposure: Biochemical and cellular alterations. *Acta Botanica Brasilica*, 2019, vol. 33, iss. 1, pp. 116–127. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0379>
34. Ramlov F., Carvalho T. J. G., Schmidt É. C., Martins C. D. L., Kreuzsch M. G., de Oliveira Rodrigues E. R., Bauer C. M., Bouzon Z. L., Antunes Horta P., Maraschin M. Metabolic and cellular alterations induced by diesel oil in *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2014, vol. 26, iss. 4, pp. 1879–1888. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0209-y>
35. Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S., Winston G. W. Oxidative stress in ecotoxicology: From the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, 2002, vol. 54, iss. 3–5, pp. 419–423. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00146-0)
36. 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>
37. Ryzhik I. V., Makarov M. V. Effect of diesel fuel film on green algae *Ulva lactuca* L. and *Ulvaria obscura* (Kützinger) Gayral ex Bliding of the Barents Sea. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, vol. 302, art. no. 012029 (6 p.). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/302/1/012029>
38. 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, art. no. 022059 (8 p.). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022059>
39. 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, art. no. 012202 (7 p.). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/539/1/012202>
40. Sardi A. E., Sandrini-Neto L., da S. Pereira L., Silva de Assis H., Martins C. C., da Cunha Lana P., Camus L. Oxidative stress in two tropical species after exposure to diesel oil. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, vol. 23, iss. 20, pp. 20952–20962. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7280-2>
41. Shakhmatova O., Ryzhik I. Seasonal dynamics of catalase activity in *Cystoseira crinita* (Black Sea) and *Fucus vesiculosus* (Barents Sea). *Ecological Chemistry and Engineering S*, 2020, vol. 27, iss. 4, pp. 643–650. <http://dx.doi.org/10.2478/eces-2020-0041>
42. Shakhmatova O. A., Milchakova N. A. Effect of environmental conditions on Black Sea macroalgae catalase activity. *International Journal on Algae*, 2014, vol. 16, iss. 4, pp. 377–391. <http://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i4.70>
43. Shiu R.-F., Chiu M.-H., Vazquez C. I., Tsai Y.-Y., Le A., Kagiri A., Xu C., Kamalanathan M., Bacosa H. P., Doyle S. M., Sylvan J. B., Santschi P. H., Quigg A., Chin W.-C. Protein to carbohydrate (P/C) ratio changes in microbial extracellular polymeric substances induced by oil and Corexit. *Marine Chemistry*, 2020, vol. 223, art. no. 103789 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103789>
44. Sussmann A. V., Scrosati R. A. Morphological variation in *Acrosiphonia arcta* (Codiolales, Chlorophyta) from environmentally different habitats in Nova Scotia, Canada. *Rhodora*, 2011, vol. 113, no. 953, pp. 87–105. <https://doi.org/10.3119/10-06.1>
45. Thélin I. Effets, en culture, de deux pétroles bruts et d'un dispersant pétrolier sur les zygotes et les plantules de *Fucus serratus* Linnaeus (Fucales, Phaeophyceae) = Effects in culture of two crude oils and one oil dispersant on zygotes and germlings of *Fucus serratus* Linnaeus (Fucales, Phaeophyceae). *Botanica Marina*, 1981, vol. 24, pp. 515–519. <https://doi.org/10.1515/botm.1981.24.10.515>

46. Vega-López A., Ayala-López G., Posadas-Espadas B. P., Olivares-Rubio H. F., Dzul-Caamal R. Relations of oxidative stress in freshwater phytoplankton with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, vol. 165, iss. 4, pp. 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.01.026>
47. Voskoboinikov G. M., Matishov G. G., Bykov O. D., Maslova T. G., Sherstneva O. A., Usov A. I. Resistance of marine macrophytes to oil pollution. *Doklady Biological Sciences*, 2004, vol. 397, iss. 1–6, pp. 340–341. <https://doi.org/10.1023/B:DOBS.0000039711.48557.16>
48. Voskoboinikov G. M., Ryzhik I. V., Salakhov D. O., Metelkova L. O., Zhakovskaya Z. A., Lopushanskaya E. M. Absorption and conversion of diesel fuel by the red alga *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 (Rhodophyta): The potential role of alga in bioremediation of sea water. *Russian Journal of Marine Biology*, 2020, vol. 46, iss. 2, pp. 113–118. <https://doi.org/10.1134/S1063074020020108>
49. Wang L., Zheng B., Meng W. Photo-induced toxicity of four polycyclic aromatic hydrocarbons, singly and in combination, to the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, vol. 71, iss. 2, pp. 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.019>
50. Zhang J. F., Sun Y. Y., Shen H., Liu H., Wang X. R., Wu J. C., Xue Y. Q. Antioxidant response of *Daphnia magna* exposed to no. 20 diesel oil. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 2004, vol. 16, iss. 4, pp. 139–144. <https://doi.org/10.3184/095422904782775027>

**ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS
OF ACROSIPHONIA ARCTA (DILLWYN) GAIN CELLS
AT THE EARLY STAGE OF STRESS REACTION FORMATION
UNDER THE EFFECT OF DIESEL FUEL EMULSION**

I. Ryzhik¹, D. Salakhov¹, M. Makarov¹, and M. Menshakova²

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

²Murmansk Arctic University, Murmansk, Russian Federation

E-mail: alaria@yandex.ru

Features of stress reaction formation were studied in cells of the green alga *Acrosiphonia arcta* under the effect of diesel fuel emulsion. Changes in indicators of oxidative stress (concentration of hydrogen peroxide and accumulation of products of lipid peroxidation) were analyzed; activity of antioxidant enzymes, intensity of photosynthesis, and condition of cells were investigated. As shown, during the first day of exposure to the toxicant, plasmolysis and disruption of the chloroplast structure occur in cells. The stress reaction develops in stages. At the first stage, the amount of hydrogen peroxide increases, the concentration of products of lipid peroxidation changes, and the activity of superoxide dismutase rises. At the second stage, catalase activity increases. By the end of the first day of exposure, against the backdrop of a drop in catalase activity, peroxidase activity rises (the third stage). The intensity of photosynthesis decreases by the end of the experiment. As suggested, under the effect of diesel fuel emulsion, the daily dynamics of the biological cycles of a number of enzymes may be disrupted.

Keywords: *Acrosiphonia arcta*, diesel fuel, catalase, superoxide dismutase, peroxidase, lipid peroxidation, hydrogen peroxide, photosynthesis intensity