

УДК 574.2:574.5:576.08:57.084.1

ОБ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРΟΣЛИ *ULVA LACTUCA* L. И АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙ МИКРООРГАНИЗМОВ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

© 2025 г. Д. В. Пуговкин^{*@}, И. В. Рыжик^{**}, Д. О. Салахов*,
М. П. Венгер*, Г. М. Воскобойников*

^{*}Мурманский морской биологический институт РАН (ММБИ РАН),
ул. Владимирская, д. 17, Мурманск, 183038 Россия

^{**}Мурманский арктический университет, ул. Спортивная, д. 13, Мурманск, 183010 Россия
[@]E-mail: pugovkin2005@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.09.2024 г.

После доработки 23.01.2025 г.

Принята к публикации 23.01.2025 г.

Экспериментально показана способность *Ulva lactuca* Баренцева моря выживать при содержании в воде водорастворимых фракций дизельного топлива до 1 мг/л. При их содержании в среде более 4.9 мг/л у макрофитов отмечалось нарушение структуры клеток, снижение интенсивности фотосинтеза (в 2 – 16 раз относительно контроля), содержания фотосинтетических пигментов (более чем в 2 раза от контроля), увеличение содержания перекиси водорода и активности супероксиддисмутазы. Значительно изменялись количественные характеристики эпифитного бактериального сообщества. Высокое содержание нефтепродуктов в среде ограничивает распространение водорослей *U. lactuca*, однако при незначительном загрязнении они могут активно участвовать в процессах биоремедиации.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, макрофиты, интенсивность фотосинтеза, антиоксидантная система, бактериальное сообщество, эпифитные бактерии

DOI: 10.31857/S1026347025050099

Ulva lactuca является распространенным видом, обладающим устойчивостью к действию широкого спектра факторов внешней среды (Sand-Jensen, Borum, 1988; Xia *et al.*, 2004), хорошо откликается на присутствие большого количества биогенных элементов и может участвовать в формировании зеленых приливов (Dominguez, Loret, 2019).

В последнее десятилетие в прибрежной зоне мурманского побережья Баренцева моря отмечается увеличение биомассы *Ulva lactuca* (Malavenda *et al.*, 2018). На мурманском побережье водоросль обитает на границе своего ареала, поэтому очень уязвима к изменению абиотических факторов среды, в том числе антропогенного. Было отмечено, что в ряде губ с оптимальными для ульвы гидролого-гидрохимическими характеристиками данный вид не встречается (Malavenda *et al.*, 2018), это связывали с наличием значительного загрязнения, в частности присутствия нефти и нефтепродуктов.

В морях умеренной зоны *U. lactuca* выдерживает сильную антропогенную нагрузку и, в частности,

влияние нефтяных углеводородов, накапливая их в большом количестве в тканях (Zambrano, Carbal-leira, 1999; Очеретяна и др., 2015; Pilatti *et al.*, 2016; El Maghraby, Hassan, 2021).

В отличие от южных широт, условия Арктики усиливают негативное воздействие поллютантов. Более низкие температуры значительно замедляют процессы деградации нефтяных углеводородов вследствие торможения физико-химических реакций (Brown *et al.*, 2016). Снижается скорость биологического разложения, которое происходит, в первую очередь, за счет микроорганизмов, в том числе ассоциированных с макрофитами.

Комплексное исследование водорослей и микробиома необходимо для более полного представления об устойчивости ассоциации растений и микроорганизмов к загрязнению и их роли в процессах биоремедиации.

Ранее нами были показаны физиологические и морфологические перестройки, а также изменения в бактериальном сообществе, при содержании в среде с нефтью и дизельным топливом

представителей бурых водорослей Баренцева моря *Fucus vesiculosus* и зеленых водорослей *Acrosiphonia arcta*, *Ulva intestinalis* (Ryzhik *et al.*, 2019, 2022; Salakhov *et al.*, 2021). Подобные данные по *Ulva lactuca* северных широт и ее микробиоме на данный момент отсутствуют. В связи с увеличением ее биомассы на границе ареала является актуальным анализ изменений физиолого-биохимических показателей *U. lactuca* и количественных характеристик эпифитного микробного сообщества под действием токсиканта.

Целью проведенного исследования является получение данных об изменении морфологических, физиолого-биохимических показателей состояния *Ulva lactuca*, количественных характеристик эпифитного бактериального сообщества при воздействии дизельного топлива, а также возможности участия симбиотической ассоциации водоросли и микробиома в очистке морской среды от нефтяных углеводородов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

План исследования. Водоросли для исследования собирали в июле 2019 года в губе Зеленецкой Баренцева моря в районе сезонной биостанции ММБИ РАН 69°07'09" С. ш. 36°05'35" в. д. Идентификацию вида проводили в лабораторных условиях под световым микроскопом ЛОМО МИКМЕД–6, вар.7 с использованием ключей из полевого атласа (Марковская и др., 2016).

Эксперименты проводили в термостатируемом помещении при температуре 8–10°C с постоянным освещением 150 мМол м⁻² с⁻¹ (24L: 0D–период полярного дня) и аэрацией водной среды. Перед постановкой эксперимента водоросли предварительно акклимировали к лабораторным условиям в течение 3 дней в сосудах с морской водой объемом 3 литра и соленостью 34‰.

В опыте использовалось летнее дизельное топливо, которое вносили в сосуды в концентрации 1, 5, 50, 100, 150 мг/л. Соотношение свободного пространства к объему воды составляло 1 : 3, что наиболее оптимально при проведении подобных работ (Singer *et al.*, 2000) и не затрудняет процесс аэрации. Пленка нефтепродукта на поверхности воды не убиралась в течение эксперимента.

В качестве контроля использовали водоросли, содержащиеся в морской воде без добавления нефтепродукта. В каждый сосуд вносили по 6 экземпляров талломов водорослей. Длительность эксперимента составляла 10 суток.

Определение концентрации нефтепродуктов. Для определения концентрации водорастворимых фракций (ВРФ) нефтепродуктов (НП) в сосуды с фильтрованной водой добавляли дизельное топливо (ДТ). Экспонировали их при постоянной

аэрации в течение 6 часов. После этого воду отстаивали в течение часа, отбирали из середины объема 100 мл (не затрагивая пленку) и анализировали концентрацию углеводородов.

Измерение концентрации ВРФ нефтепродукта проводили флуориметрическим методом на анализаторе жидкости Флюорат-02-5М (“Люмекс”, Россия) (Ryzhik *et al.*, 2019). Измерение проводили в трех повторностях, полученные значения усреднялись.

Параллельно был поставлен эксперимент на измерение скорости деградации нефтепродукта в присутствии и без водорослей. Для этого в воду добавляли 50 мг/л ДТ, перемешивали в течение суток. Было подготовлено 6 сосудов, в три из которых добавляли по 3 таллома водорослей. Эксперимент длился 10 дней, при этом измерения концентрации ВРФ проводили на 1, 3, 6 и 10 день.

Цитологические исследования. Изучение морфологии клеток водорослей проводили с использованием светового микроскопа Микмед–6 (АО “ЛОМО”, СПб Россия) при увеличении 400 и электронного JEM-100С фирмы JEOL (ЭМ).

Для ЭМ исследования клеток из талломов водорослей делались высежки 1 см², которые помещались в пробирки Эппендорфа с фиксатором. Предфиксация проводилась 2.5% глутаровым альдегидом на какодилатном буфере (к-к-б), а постфиксация 1% OsO₄ (оксидом осмия (VIII)) на аналогичном буфере. Осмотическое давление обоих фиксаторов доводилось до осмотического давления морской воды в среде обитания (1100 мосм) с помощью сахарозы. Фиксация проходила при температуре 0–5°C по схеме: глутаровым альдегидом 18 часов, отмывка к-к-б – 2 смены по 6 часов, постфиксация OsO₄ – 18 час. Далее подготовка к просмотру в ЭМ осуществлялась по общепринятым методикам (Уикли, 1975).

Физиолого-биохимические исследования водорослей. В начале и по окончании эксперимента определяли концентрацию фотосинтетических пигментов, активность ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы). Интенсивность фотосинтеза определяли на 1, 3, 6 и 10 день.

Содержание перекиси водорода осуществляли по модифицированной спектрофотометрической методике по Беллинкампи с соавт. (Bellincampi *et al.*, 2000).

Активность каталазы (КАТ) – спектрофотометрическим методом (Королюк и др., 1988), основанном на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) – спектрофотометрическим методом по Гианнополитису (1977). Метод основан на способности фермента ингибировать фотохимическое

восстановление нитросинего тетразолия с образованием формазана.

Фотосинтетические пигменты. Содержание фотосинтетических пигментов исследовали по методикам (Ли, 1978) с использованием спектрофотометра JENWAY 6305 UV/VIS. Концентрацию рассчитывали по формулам (Seely *et al.*, 1972) и выражали в мкг/г сырой массы водорослей.

Сырую массу растений определяли после удаления с поверхности капельной влаги с использованием весов ВЛТ-310 (класс точности II). Сухую массу талломов определяли согласно общепринятой методике.

Измерения биохимических показателей проводили в 3-ой повторности. Для анализа водоросли измельчали и брали среднюю пробу.

Интенсивность видимого фотосинтеза водорослей определяли с помощью оксиметра HANNA HI 9141 (Германия) и модифицированным методом Винклера (Salakhov *et al.*, 2020; Ryzhik *et al.*, 2022). На 1, 3, 6, 10 дни. Интенсивность фотосинтеза рассчитывали в мкг O₂ на 1 г сырой массы таллома в час. Измерение интенсивности фотосинтеза проводили в трех повторностях, использовали по 1 таллomu, после проведения измерений возвращали в эксперимент.

Микробиологические исследования. Отбор проб для микробиологических анализов проводили на 0, 3, 6 день эксперимента.

Учет общей численности бактерий (ОЧБ) и их биомассы проводили методом эпифлуоресцентной микроскопии с использованием флуорохрома DAPI и ядерных фильтров с диаметром пор 0.2 мкм (Porter, Feig, 1980). Препараты просматривали при увеличении 1000 (не менее 40 полей зрения) под микроскопом Olympus BX 51 с системой анализа изображения.

Для учета численности культивируемых гетеротрофных бактерий использовали метод предельных разведений (Руководство по методам..., 1980) с применением модифицированной среды Зобелла 2216Е (Aaronson, 1970; Ильинский, 2006) для определения культивируемых гетеротрофных бактерий.

Все измерения выполнены в 3–4 кратной повторности и представлены в виде арифметического среднего со стандартным отклонением.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета “Excel”. На рисунках представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение действующей концентрации дизельного топлива. В ходе эксперимента было показано, что чем выше концентрация внесенного нефтепродукта, тем меньше доля ВРФ от его общего количества. Если при внесении НП в концентрации 1–5 мг/л в воду переходит около 95% от общего количества токсиканта, то при внесении 50, 100 и 150 мг/л – менее 20% (табл. 1). Соответственно около 80% углеводородов ДТ остается на поверхности воды в составе пленки.

Мы предполагаем, что образование ВРФ и переход ДТ в эмульгированное состояние зависит от количества внесенного вещества: чем выше вносимая концентрация нефтепродукта, тем меньше процент образовавшихся водорастворимых соединений. Согласно литературным данным функциональное насыщение водорастворимыми фракциями достигается в течение 24 часов (Singer *et al.*, 2000), однако емкость воды не безгранична и, скорее всего, дальнейшее поступление ДТ из пленки в воду будет зависеть от скорости деструкции (в том числе биологической) водорастворимой фракции.

Так как дизельное топливо обладает низкой растворимостью в воде, то это приводит к несоответствию между внесенным в сосуд количеством нефтепродукта и реально действующей на организмы концентрацией токсиканта: действующая концентрация будет ниже той, которая внесена.

В условиях лаборатории пленка на поверхности воды остается, что приводит к постоянному поступлению новых фракций ДТ и сохранению токсического эффекта для макрофитов. В природных условиях в результате постоянного водообмена (прилив/отлив) мы этого наблюдать не будем.

Анализ экспериментальных данных валового содержания нефтепродукта в емкостях с водорослями и без них показал снижение ВРФ во всех

Таблица 1. Концентрация водорастворимой фракции дизельного топлива в зависимости от количества внесенного в среду токсиканта

Количество внесенного дизельного топлива, мг/л	Концентрация ВРФ, мг/л	% ВРФ от общего количества внесенного дизельного топлива
1	0.986 ± 0.003	98.64
5	1.001 ± 0.004	20.02
50	4.904 ± 0.021	9.81
100	6.588 ± 0.034	6.59
150	11.04 ± 0.034	7.36

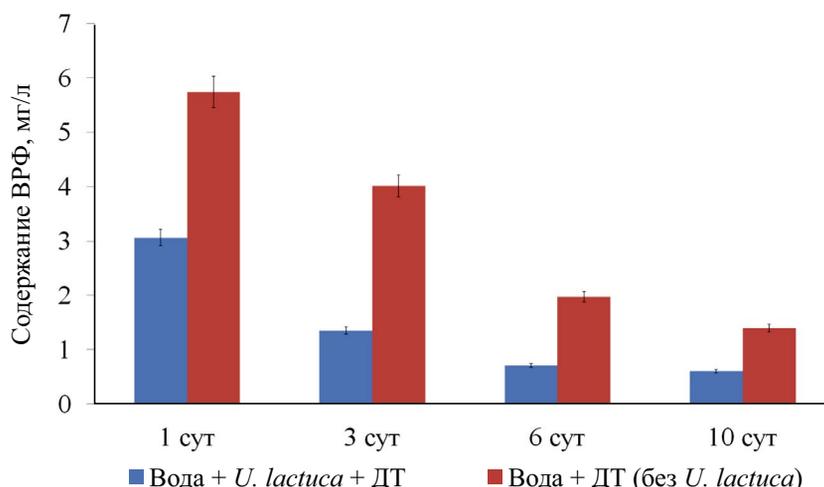


Рис. 1. Валовое содержание водорастворимых фракций ДТ при добавлении 50 мг/л дизельного топлива в присутствии водорослей и без них.

вариантах, однако в емкостях с водорослями концентрация была более чем в 2 раза ниже с первых по десятые сутки опыта (рис. 1).

Необходимо отметить, что максимальное снижение концентрации ДТ в присутствии водорослей происходило на 3 сутки опыта, а на 6 и 10 день данный показатель практически не менялся, тогда как в воде без водорослей содержание нефтепродукта продолжало уменьшаться.

Скорее всего, это происходит из-за снижения физиологической активности макрофитов. Как было отмечено ранее, при добавлении в экспериментальную емкость ДТ в концентрации 50 мг/л не все углеводороды переходят в состав ВРФ и большая их часть содержится в виде пленки на поверхности, в результате в течение 10 суток опыта в воду поступают новые порции токсиканта, что влияет на активность водорослей.

Кроме непосредственного поглощения ДТ, ульва может выступать как адсорбент, «концентрируя» на своей поверхности углеводороды ДТ.

Морфология клеток. В течение эксперимента у контрольных растений структура клеток не изменяется: цитоплазма прозрачная, хлоропласты располагаются равномерно по всему объему клетки. У опытных образцов не зависимо от действующей концентрации отмечалось уменьшение прозрачности цитоплазмы, увеличение межклеточного пространства, развитие плазмолиза, изменение цвета хлоропластов с ярко-зеленой до бледно-зеленой. Степень повреждений клеток зависит от концентрации токсиканта в среде и времени его воздействия.

При низких концентрациях ДТ (1–5 мг/л) прозрачность цитоплазмы снижается, но к концу эксперимента плазмолиз в клетках и обесцвечивание хлоропластов отсутствуют. При концентрации

токсиканта в среде до 50 мг/л в клетках увеличивается межклеточное пространство, снижается интенсивность окраски хлоропластов, к 10 суткам в некоторых клетках развивается плазмолиз. При высоких концентрациях ДТ (100 и 150 мг/л) к шестым суткам в части клеток развивается плазмолиз, хлоропласты концентрируются по периферии, в конце эксперимента окраска хлоропластов становится бледно-зеленой, некоторые клетки полностью обесцвечиваются, что свидетельствует о разрушении фотосинтетического аппарата.

Электронно-микроскопическое исследование препаратов продемонстрировало, что клетки ульвы контрольного варианта находятся в активном функциональном состоянии до конца эксперимента (10 суток). Оболочка клеток имеет ровные контуры, около 30% парциального объема среза клеток занято хлоропластом с гранулами крахмала. В хлоропластах отчетливо выявляются одноканальные пиреноиды погруженного типа. В цитоплазме ряда клеток присутствует в большом количестве мелкозернистое вещество (рис. 2).

В ультраструктуре клеток с добавлением 5 мг/л ДТ на 6 сутки опыта изменений не наблюдается, а на 10 сутки в морфологии клеток отмечается значительная гетерогенность. Большая часть клеток таллома (до 70%) без признаков повреждения, но в части клеток (около 30%) уменьшается парциальный объем цитоплазмы с фотосинтетическим аппаратом и гранулами крахмала. Пиреноид выявляется лишь в единичных хлоропластах. В опыте с содержанием ДТ от 50 мг/л и выше уже на 6 сутки в большинстве клеток (до 90%) обнаруживаются признаки повреждения: уменьшение парциального объема фотосинтетического аппарата, отсутствие пиреноида. В клетках

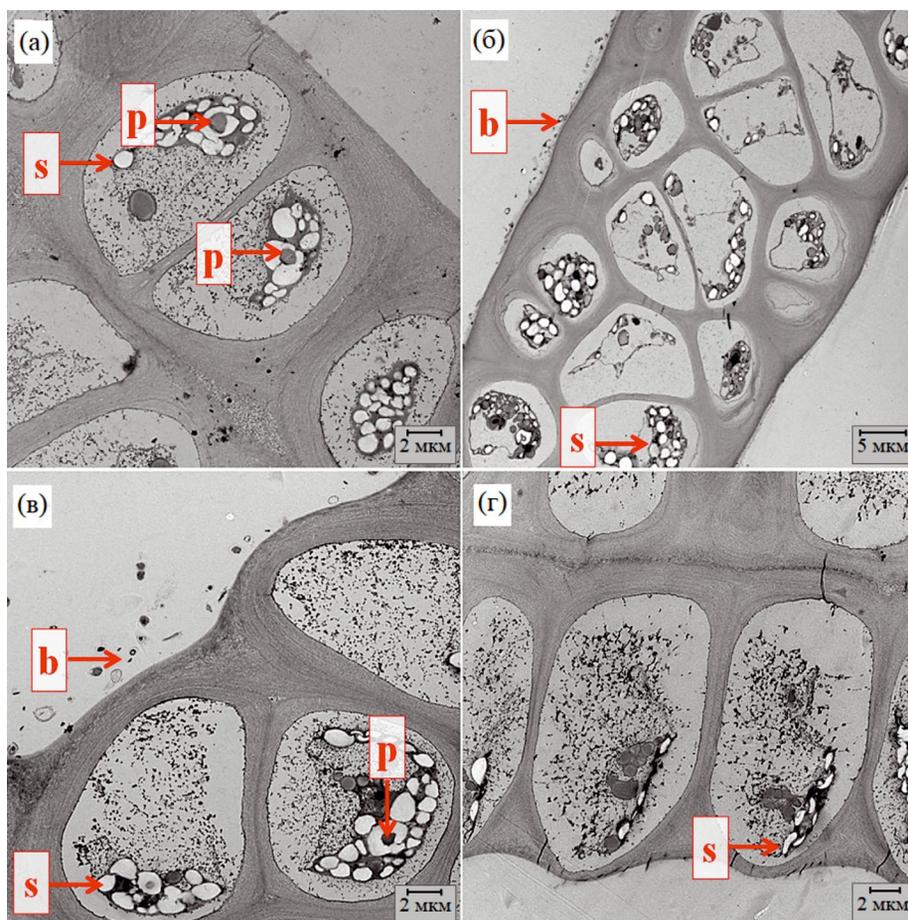


Рис. 2. Изменения в клеточном аппарате клеток в ходе эксперимента при различных концентрациях дизельного топлива: а – контроль – 0 суток; б – 6 суток – 5 мг/л. По периферии отмечаются эпифитные микроорганизмы; в – 6 суток – 100 мг/л. По периферии отмечается много бактерий. Большая часть среза – грануляное содержимое. г – 10 суток – 50 мг/л. б – эпифитные бактерии, р – периноиды, s – гранулы крахмала.

присутствует большое количество гранулярного электронно-плотного материала.

На 10 сутки эксперимента практически все клетки талломов, находящиеся под воздействием ДТ в концентрации 50 мг/л и выше, имеют признаки повреждения: разрушение внутреннего содержимого клетки, отсутствие структурированного фотосинтетического аппарата, гранул крахмала.

Необходимо отметить, что в исходном варианте (контроль) какие-либо микроорганизмы на внешней поверхности оболочки не наблюдаются. Через 6 суток в вариантах опыта с введением в морскую воду ДТ в концентрации от 5 до 150 мг/л присутствуют единичные микроорганизмы-эпифиты. На 10 сутки эксперимента при всех концентрациях ДТ число микроорганизмов у внешней поверхности клеток весьма значительно.

Таким образом, талломы ульвы контрольного варианта сохраняют жизнеспособность до конца эксперимента (10 суток). В варианте с содержанием

ДТ до 5 мг/л у части клеток таллома наблюдаются признаки повреждения, аналогичные описанным ранее при воздействии различных альтерирующих факторов на водоросли-макрофиты (ультрафиолет, температура и другие) (Воскобойников и др., 2007).

При более высоких концентрациях ДТ в среде обитания: 50, 100 и 150 мг/л на 6 сутки наблюдается негативное влияние на жизнеспособность ульвы, в клетках водоросли выявляются морфологические деструктивные перестройки, которые к 10 суткам, по-видимому, носят необратимый характер.

Физиологические реакции макрофитов на внесение ДТ

Интенсивность фотосинтеза. У контрольных образцов в первые сутки эксперимента интенсивность фотосинтеза (ИФ) составляет 0.08 мкг O_2 /г сыр. массы в час (рис. 3). На 10 день опыта ИФ в контроле ниже начальных значений в 1.5 раза.

Под воздействием ДТ в первые три дня эксперимента в опытных емкостях с концентрациями 1, 5

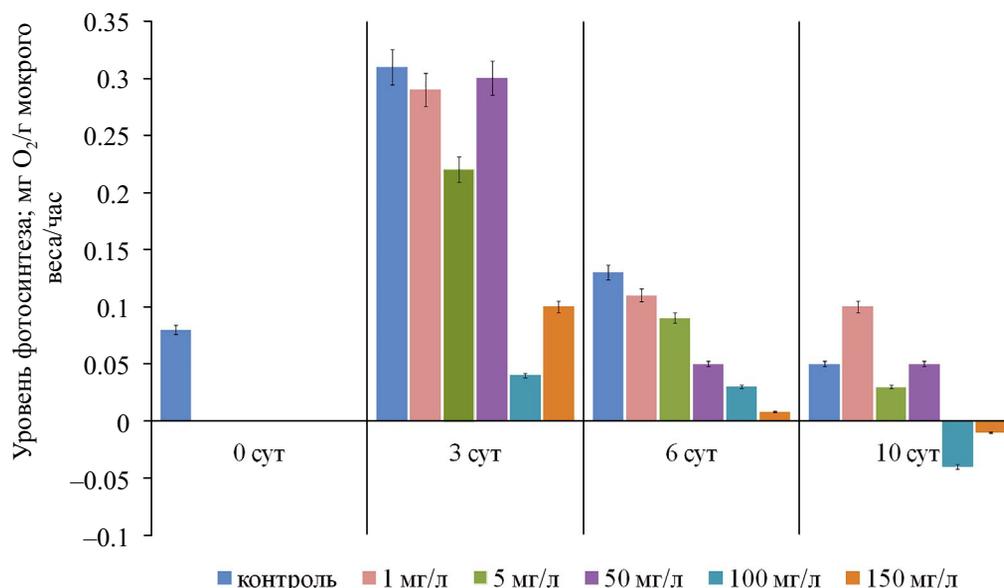


Рис. 3. Интенсивность фотосинтеза *Ulva lactuca* в ходе эксперимента при воздействии разных концентраций дизельного топлива.

и 50 мг/л не наблюдается значительных изменений по сравнению с контролем. В вариантах с концентрацией ДТ 100 мг/л скорость фотосинтеза ниже в 7.5 раз, а при 150 мг/л ДТ в 3 раза по сравнению с контрольным значением.

На 6 день ИФ под действием ДТ в концентрациях 1 и 5 мг/л не отличается от контроля, а при воздействии ДТ в концентрации 50 мг/л падает в 2 раза. В вариантах с концентрацией ДТ 100–150 мг/л наблюдается дальнейшее снижение ИФ в 4–16 раз относительно контрольных значений.

На 10 сутки в варианте с 1 мг/л ДТ скорость фотосинтеза выше в 2 раза, чем в контроле, а при 5 мг/л – ниже контрольного значения практически в 2 раза. У растений, находящихся в экспериментальной среде с ДТ в концентрации 50 мг/л, ИФ сравнима с контрольными значениями. При более высоких концентрациях нефтепродукта дыхание превалирует над фотосинтезом.

Содержание фотосинтетических пигментов. К концу эксперимента содержание пигментов в контроле и у опытных образцов с минимальной концентрацией ДТ (1 мг/л) содержание хлорофиллов и каротиноидов одинаковое, при 5–50 мг/л ДТ – выше в 1.5 раза, при более высоких концентрациях – ниже по сравнению с контролем в 2 раза (рис. 4).

Антиоксидантная система водорослей. В контроле концентрация перекиси водорода в клетках водорослей незначительно увеличилась по сравнению с исходными значениями. У опытных образцов в вариантах с 1–50 мг/л ДТ содержание перекиси водорода не отличалось от контроля или

было незначительно выше. Действие более высоких концентраций (100 и 150 мг/л) вызвало увеличение количества перекиси водорода в клетках водоросли (рис. 5а).

В контроле активность СОД за время эксперимента не изменилась. У опытных образцов активность СОД увеличилась во всех вариантах. Наиболее значительно, практически в 2.5 раза, у водорослей, находящихся в емкостях с концентрацией ДТ 100 и 150 мг/л (рис. 5б).

Активность каталазы в контрольном варианте к концу эксперимента практически не изменилась. В опытных образцах отмечено, что КАТ в вариантах с концентрацией 5–50 мг/л ДТ ниже в 1.5 раза, чем в контроле, а в вариантах с ДТ 100–150 мг/л – не отличалась от контрольных значений (рис. 5в).

Численность и биомасса гетеротрофных бактерий на поверхности талломов водорослей.

Общая численность бактерий. В контроле к третьим суткам эксперимента наблюдается снижение численности бактерий в 2 раза по сравнению с исходными значениями (с 3.2×10^6 до 1.4×10^6 кл/см²). К окончанию эксперимента (6 сутки) количество бактерий увеличивается до 4.1×10^6 кл/см² и становится выше исходных значений (рис. 6).

В варианте с концентрацией ДТ 5 мг/л нефтепродуктов на третьи сутки эксперимента количество бактерий увеличивается в 3 раза по сравнению с начальными значениями и достигает 6.3×10^6 кл/см². В дальнейшем (к 6 суткам) происходит снижение практически в 2 раза до 1.9×10^6 кл/см².

При концентрации ДТ 50 и 100 мг/л общая численность бактерий на третьи сутки снижается

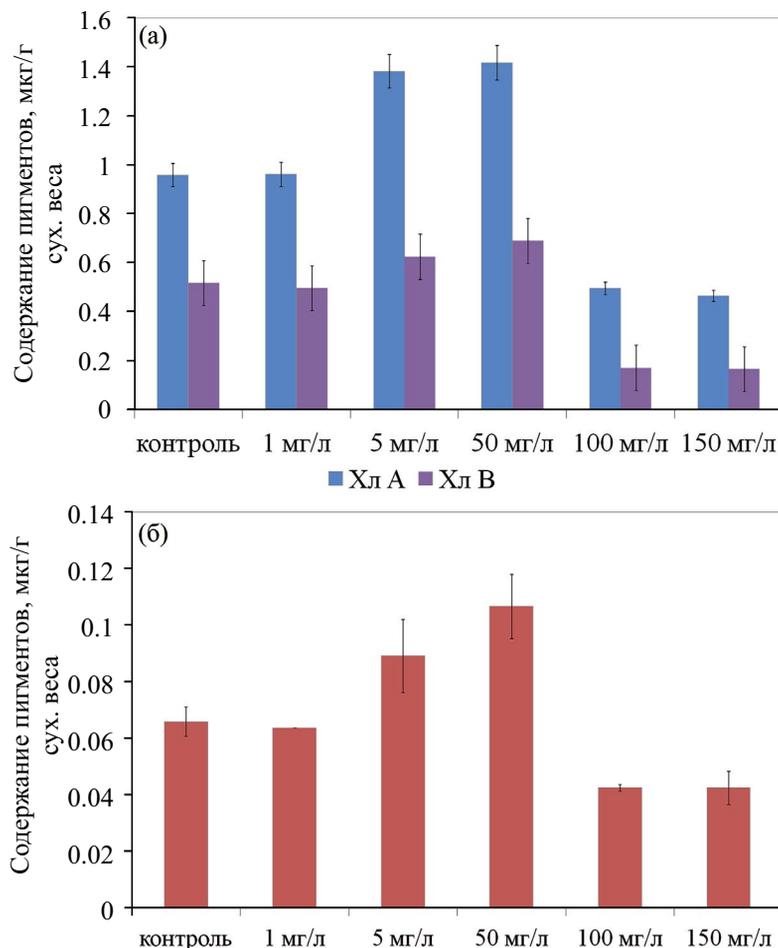


Рис. 4. Содержание фотосинтетических пигментов после 10 дней воздействия различных концентраций ДТ: а – хлорофилл (А и В); б – каротиноиды.

до 1.1×10^6 и 1.5×10^6 кл/см² соответственно. На шестые сутки в варианте с 50 мг/л ДТ происходит увеличение количества бактерий почти в 5 раз (до 5.2×10^6 кл/см²), в то время как в варианте с 100 мг/л ДТ увеличение незначительное – до 1.6×10^6 кл/см².

Биомасса бактерий и размеры бактериальных клеток. Бактериальная биомасса в эксперименте достигла максимума в варианте с 5 мг/л ДТ на третьи сутки, в варианте с 50 мг/л – на шестые сутки. Но при этом как в контрольных, так в экспериментальных емкостях биомасса эпифитных бактерий значительно меньше, чем ее исходные значения. Разница составляла более 9 раз. К третьим суткам во всех вариантах она резко снижается.

На 3 сутки минимальное количество зафиксировано в контроле и вариантах с 50 и 100 мг/л, тогда как в присутствии 5 мг/л биомасса выше в 3 раза.

На 6 сутки отмечается постепенное увеличение биомассы во всех вариантах кроме варианта

с концентрацией ДТ 5 мг/л. Но достоверно увеличилась она только при концентрации 50 мг/л (рис. 6).

В некоторых вариантах при значительном увеличении общей численности отмечалось снижение биомассы. Мы связываем это с изменением (уменьшение) среднего объема клеток. И это подтверждается сравнением отношения ОЧБ/биомасса со средним объемом бактериальных клеток, который менялся в ходе эксперимента. При уменьшении среднего объема клеток отношение ОЧБ/биомасса в основном увеличивается.

До помещения водорослей в экспериментальные условия средний объем бактериальных клеток составлял 0.151 мкм^3 , а уже к третьим суткам и до конца эксперимента во всех вариантах был ниже практически на порядок: $0.02\text{--}0.07 \text{ мкм}^3$. Более высоких значений (0.08 и 0.108 мкм^3) данный показатель достигал только к концу эксперимента в вариантах с ДТ в концентрации 5 и 100 мг/л соответственно. Однако при значительно меньшей общей численности бактерий и биомасса в данном

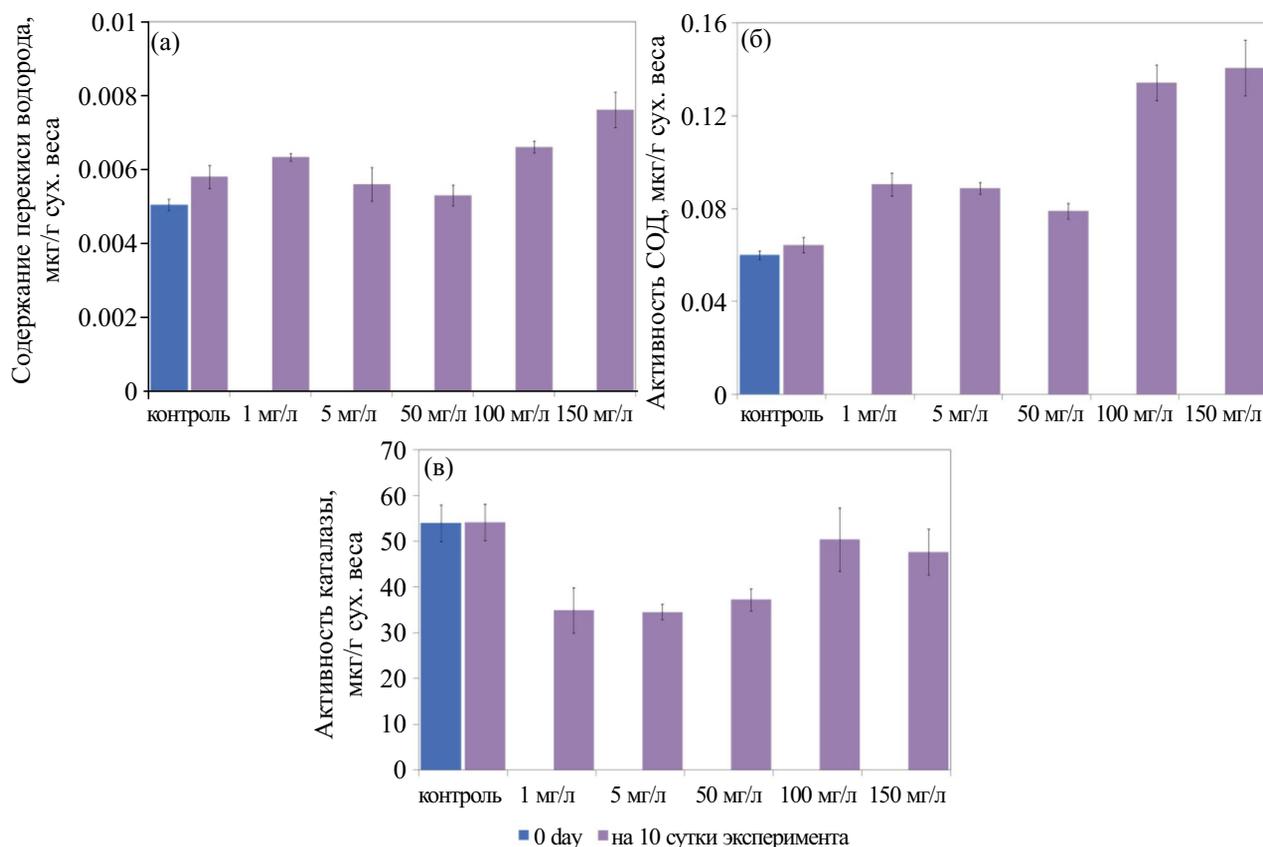


Рис. 5. Активность антиоксидантной системы под воздействием разных ДТ через 10 суток эксперимента. а – содержание перекиси водорода в клетках *U. lactuca* через 10 суток эксперимента; б – активность СОД; в – активность каталазы.

варианте также была меньше, чем до помещения в эксперимент.

Культивируемые гетеротрофные бактерии. Количество культивируемых гетеротрофных (сапротрофных) бактерий в контроле на 3 день эксперимента по сравнению с исходными показателями уменьшилось в 9 раз (466 тыс. – 65 тыс. кл/см²). Однако к концу эксперимента оно увеличилось (до 4.1 млн кл/см²), сравнявшись с показателем общей численности (рис. 6).

При концентрации нефтепродуктов 5 мг/л на 6 сутки по сравнению с началом эксперимента численность бактерий увеличивается, достигая 1.3 млн кл/см².

В присутствии 50 мг/л дизельного топлива на третьи сутки наблюдается снижение численности бактерий в 4.3 раза (до 107 тыс. кл/см²), к концу эксперимента увеличивается в 5 раз по сравнению с предыдущими значениями (до 570 тыс. кл/см²).

В варианте с ДТ в концентрации 100 мг/л количество культивируемых бактерий в течение эксперимента увеличивается по сравнению с контролем: на 3 сутки до 554 тыс. кл/см², а на 6 сутки – до 1.0 млн кл/см².

При рассмотрении описанных выше показателей можно отметить следующее: в экспериментальных вариантах наиболее значимые изменения произошли на третьи сутки в варианте с ДТ в концентрации 5 мг/л нефтепродуктов, и на 6 сутки в варианте с 50 мг/л нефтепродуктов в среде.

Количество культивируемых гетеротрофных бактерий в целом изменялось аналогично с ОЧБ (рис. 6). Значение данного показателя изменялось от 150 тыс. кл/см² до величин, сопоставимых с ОЧБ (в контроле, при 5 мг/л ДТ на шестые сутки).

Доля культивируемых гетеротрофных бактерий от их общей численности в ходе всего эксперимента так же менялась во всех вариантах. Минимальные ее значения отмечались в контроле и в варианте с 50 мг/л ДТ, как на третий (9.6%), так и на шестой (10.9%) день. В исходном (до внесения водорослей в эксперимент) варианте данный показатель составил 14.6%. Т.е. отмечается снижение доли культивируемых бактерий в исследуемом сообществе. В вариантах с 5 и 100 мг/л ДТ в среде, наоборот, отмечается увеличение их доли. В присутствии 5 мг/л она достигала 68.2 % от общей численности. А при 100 мг/л на третьи и шестые сутки – 37.8

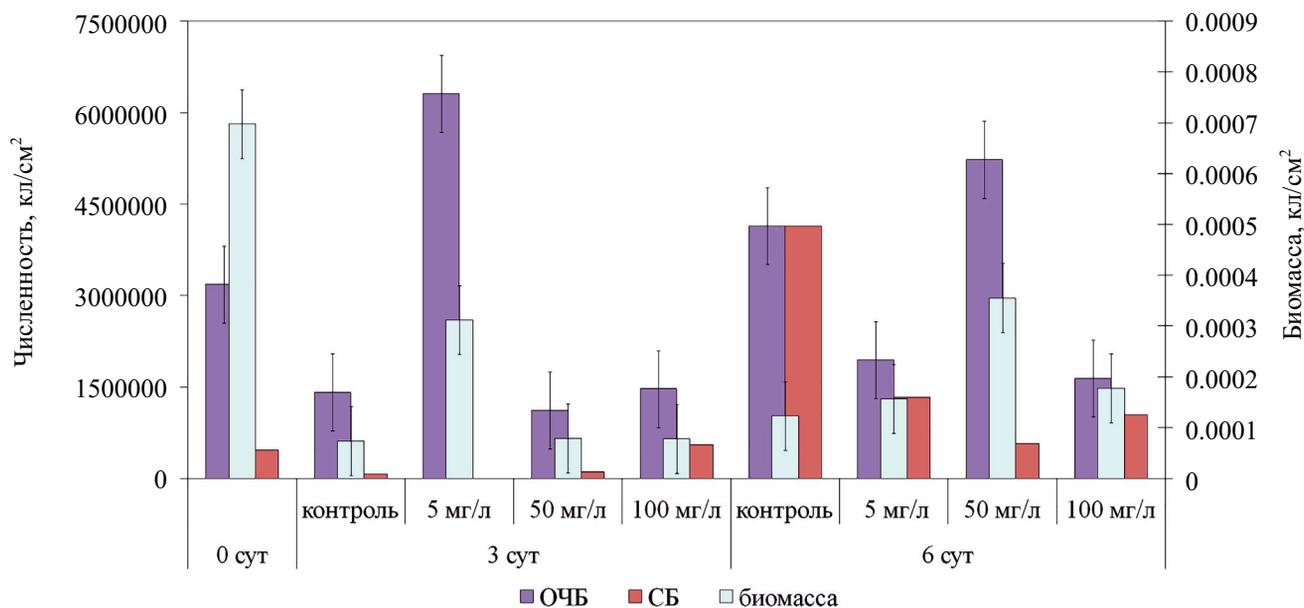


Рис. 6. Общая численность бактерий (ОЧБ), численность культивируемых гетеротрофных бактерий (СБ) и бактериальная биомасса эпифитных бактерий водорослей *Ulva lactuca*.

и 63.5 % соответственно. Отдельно стоит отметить, что в контрольном варианте численность культивируемых гетеротрофных бактерий практически сравнялась с общей численностью бактерий.

Биомасса бактерий в эксперименте менялась незначительно, достигая максимума, как и в случае с ОЧБ, при 5 мг/л ДТ на третьи сутки и при 50 мг/л на шестые сутки. Но при этом как в контрольных, так в экспериментальных емкостях биомасса эпифитных бактерий значительно меньше, чем ее исходные значения. Разница могла составлять более чем 9 раз.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что характер воздействия нефтепродукта (НП) на живой организм зависит от вида (состава) и концентрации токсиканта (French-McCay, 2002). При попадании в воду НП претерпевают ряд значительных изменений, которые могут как усилить, так и ослабить токсический эффект.

Результаты нашего исследования показали, что ДТ в небольших концентрациях, в частности 1 мг/л, не оказывают летального воздействия на *Ulva lactuca*: до конца эксперимента водоросли не теряют физиологической активности. Несмотря на чуть более высокое по сравнению с контролем содержание перекиси водорода и активности СОД, клетки сохраняют свою структуру и не имеют повреждений, а интенсивность фотосинтеза к концу эксперимента выше в два раза по сравнению с контролем. Можно предположить, что небольшое количество токсиканта относительно быстро разлагается за счет

комплекса биохимических процессов и практически не вредит организму водорослей.

При внесении 5 мг/л ДТ гибели водорослей к концу опыта также не происходит, об этом свидетельствуют морфологические и биохимические показатели клеток, в частности, отсутствие плазмолитиза, сохраняющаяся активность фотосинтетического и пигментного аппарата, а также ферментов антиоксидантной системы (АОС). Необходимо отметить, что к концу опыта концентрация нефтяных углеводородов в экспериментальной среде падает до 0.075 мг/л. В результате снижения концентрации ДТ уменьшается его токсическое действие, у водорослей сохраняется жизнеспособность. Возможно, это обусловлено не только активной работой антиоксидантной системы и активации ряда метаболических процессов, но и является следствием резкого увеличения численности микроорганизмов на 3 день. Мы предполагаем, что значительное увеличение численности бактерий могло быть следствием повышения содержания в среде доступных для бактериальной деструкции нефтяных углеводородов. В первую очередь, это парафиновые фракции. На их долю в дизельном топливе приходится 10–40 % от общего числа углеводородов. Предпочтительными для бактерий являются n-алканы с длиной цепи до 44 атомов углерода (Walker *et al.*, 1976; Matsui *et al.*, 2014). И лишь немногие микроорганизмы способны расщеплять углеводороды с 5–10 атомами углерода.

Таким образом, при действии небольших концентраций ДТ до 5 мг/л растение к концу опыта

может активировать механизмы, которые будут снижать токсичное воздействие, о чем свидетельствует сохранение клеточных структур. Механизм может включать изменение активности АОС, усиление фотосинтеза. Похожая реакция при воздействии низких концентраций нефти и ДТ была отмечена и для *Ulva pertusa*. В экспериментах показано накопление хлорофилла А и ускорение ростовых процессов (Liu *et al.*, 2019). В работе на акросифонии выявлено, что активация АОС происходит на самых первых этапах воздействия токсиканта, и это сопровождается ступенчатыми перестройками, начиная от увеличения содержания СОД, заканчивая повышением активности каталазы и пероксидазы (Ryzhik *et al.*, 2024). Микробный комплекс также реагирует усилением деления углеводородокисляющих бактерий и изменением количественных показателей эпифитного бактериального сообщества.

Добавление в среду 50 и более мг/л ДТ будет соответствовать значениям, наблюдаемым при значительных разливах нефтепродуктов (Патин, 1997).

В нашем эксперименте действующие концентрации НП, которые в основном взаимодействуют с растениями, представлены ВРФ. Но так как пленка дизельного топлива не убиралась, а ее концентрация составляла от 1-95% от общего количества вносимого токсиканта (рис. 1), то она становилась постоянным источником поступления новых порций углеводородов, за счет чего в среде поддерживалась высокая концентрация токсиканта. Подобное явление было описано в более ранних работах (Hokstad *et al.*, 1970). В естественной среде (в природе) за счет водообмена данный процесс может частично нивелироваться. В лабораторных же условиях, особенно без смены воды в емкостях, концентрация ВРФ может регулироваться только за счет физических и биологических факторов.

В варианте с ДТ в концентрации 50 мг/л отмечается большое количество разрушенных клеток и сохраняется высокая концентрация нефтепродукта в среде обитания. При этом на третьи сутки у экспериментальных растений сохраняется высокий уровень фотосинтеза, сопоставимый с контролем. Можно предположить, что в случае помещения талломов в чистую морскую среду водоросли смогут восстановить свои физиологические параметры. Однако, учитывая, что в данном эксперименте из пленки постоянно в воду поступают новые порции углеводородов, то, вероятнее всего, при увеличении длительности эксперимента водоросли погибнут.

Увеличение концентрации пигментов у водорослей, находящихся в емкостях при содержании ДТ 5 и 50 мг/л, можно рассматривать как компенсаторный механизм при увеличении как мутности воды, так и вследствие накопления НП на поверхности таллома. В вариантах с более высокими концентрациями

токсиканта подобного явления не наблюдается, так как происходит деградация самого фотосинтетического аппарата.

В вариантах с концентрацией ДТ 100–150 мг/л наблюдались подавление биохимических процессов и разрушение клеток. Подобная реакция была отмечена у *U. lactuca* в экспериментах с разными концентрациями нефтепродуктов – от бензина до сырой нефти (Zambrano, Carballeira, 1999). Авторы пришли к выводу, что с увеличением концентрации НП физиологические процессы, протекающие в организме, тормозятся. При максимальных концентрациях (4–8 г/л) полностью останавливаются процессы роста, фотосинтеза, значительно снижается содержание хлорофилла А в клетках водорослей. Сходные изменения в клеточном аппарате при воздействии нефтяных углеводородов отмечены и для другого представителя рода ульвовые *U. pertusa* (Liu *et al.*, 2019).

В экспериментах с акросифонией – *Acrosyphonia sonderi*, *Acrosyphonia arcta*, *Acrosyphonia centralis*, отмечено, что при воздействии легкой фракции нефти в концентрации 100 мг/л скорость фотосинтеза у *A. arcta* падала уже через 2 часа после начала эксперимента. К 24 часу она снижалась практически на 40%. У *A. sonderi* фотосинтетическая активность снижалась на 48%, *A. centralis* оказалась менее восприимчива к действию токсиканта. Но все водоросли сохранили способность к восстановлению фотосинтеза после прекращения действия токсиканта (Kusk, 1980). В наших исследованиях с *Ulvaria obscura*, *Ulva intestinalis*, *A. arcta* также показано снижение скорости фотосинтеза с повышением концентрации токсиканта в воде (Salakhov *et al.*, 2020, 2021; Ryzhik *et al.*, 2022).

Изменение биомассы и численности бактерий может быть следствием использования бактериями нефтепродуктов в качестве питательного субстрата, а также активного развития бактерий на отмирающих (или больных) участках таллома водорослей (Martin *et al.*, 2014). “Донорами” нефтепродуктов в воду могут выступать и сами водоросли, так как при действии высоких концентраций происходит снижение удерживающих способностей мембран, что будет способствовать выходу в окружающую среду ранее поглощенных групп нефтеуглеводородов (El Maghraby, Hassan, 2021). Помимо нефтепродуктов водоросли являются продуцентами органики, которая к концу эксперимента может накапливаться в емкостях, что также создает предпосылки к развитию гетеротрофных бактерий.

Колебания общей численности бактерий под влиянием различных факторов в определенном водоеме обычно не превышают одного порядка. В настоящем эксперименте разница между максимальными и минимальными значениями ОЧБ была выраженной и могла превышать 5 раз. Однако и минимальные и максимальные значения укладывались

в один порядок величин: 1.1×10^6 – 6.3×10^6 кл мл соответственно. Изменение же численности гетеротрофных (сапротрофных) бактерий при изменении условий среды, в том числе и при антропогенном воздействии, может достигать нескольких порядков, что и отмечалось в эксперименте.

На эпифитные микроорганизмы влияют и дополнительные факторы. В первую очередь – состояние субстрата (в нашем случае макрофита), на котором они развиваются и формируют биопленку (Goeseke *et al.*, 2013). Эпифитные бактерии могут быть достаточно тесно ассоциированы с макрофитами (Pasmore, Costerton 2003), в том числе и за счет формирования растениями “полисахаридной матрицы” – экзополисахаридного слоя (Donlan, 2002). Изменение доли культивируемых эпифитных бактерий в эксперименте может объясняться накоплением в среде продуктов жизнедеятельности водорослей. Об этом свидетельствует и увеличение доли культивируемых бактерий до показателей ОЧБ в контроле на шестые сутки эксперимента. Однако остается открытым вопрос, за счет каких групп микроорганизмов был этот рост.

Также отмечено резкое уменьшение биомассы бактерий в разных вариантах концентрации нефтепродуктов по сравнению с исходными значениями численности, особенно в начале эксперимента. Вероятно, это может быть связано с размерными характеристиками бактериальных клеток в эпифитном сообществе. При чрезмерном разрастании биопленки ее части могут “отшелушиваться” от поверхности макрофитов. Возможно, этому процессу может способствовать активная аэрация воды в эксперименте. Механическое воздействие на биопленку и накопление органики в среде в результате жизнедеятельности водорослей стимулирует дальнейшее развитие бактерий. Однако при этом “молодые” клетки в формирующейся части биопленки могут иметь меньший размер, чем клетки в исходном варианте. Данный факт подтверждается и изменением объема бактериальных клеток в эксперименте. Возможность “сбрасывания” бактериальной пленки макрофитами была показана ранее (Moss, 1982). Особенно подробно этот процесс описан для другой ульвовай водоросли *Enteromorpha intestinalis* (в современной классификации – *Ulva intestinalis*) (McArthur, Moss, 1977).

В настоящем эксперименте при значительных колебаниях численности бактерий, особенно культивируемых гетеротрофов, и увеличении доли культивируемых бактерий относительно общей их численности, особенно в вариантах с 5 и 100 мг/л, не удалось выявить линейную зависимость характеристик бактериального сообщества от концентрации нефтепродуктов в среде. Накопление в экспериментальных емкостях органики, в том числе за счет отмирания бактерий и разрушения клеток водорослей, особенно при высоких

концентрациях нефтепродуктов, также обеспечивает развитие микроорганизмов.

Проведенное исследование показывает, что в системе «водоросли–микроорганизмы–среда с ДТ» происходят различные процессы: испарение, эмульгирование (переход в водную фазу), фотодеградация. Наибольшая скорость формирования водорастворимой фракции отмечается в течение первых 24 часов (Патин, 2008).

Если анализировать непосредственно водную фазу, то к физическим процессам подключаются как химические (окисление), так и биологические (разложение за счет деятельности микроорганизмов и водорослей). Разложение нефтепродуктов в воде идет по пути уменьшения углеродной цепочки, в результате в среде становится больше легких фракций нефтепродукта. Данный процесс описан в литературе (Zambrano, Carballeira, 1999). Экспериментально показано, что при концентрации дизельного топлива 3 мг/л через 21 день большинство компонентов представлено в виде легких фракций (Воскобойников и др., 2020).

При сравнении результатов настоящего эксперимента с результатами более ранних исследований, проведенных нами как на родственных видах (*U. obscura*, *U. intestinalis*), так и представителе улотриксальных (Ulothrichales) – *A. arcta*, отмечается сходная реакция макрофитов на внесение токсиканта (Salakhov *et al.*, 2020, 2021; Ryzhik *et al.*, 2022). При высоких концентрациях ДТ происходит угнетение физиологических процессов и в дальнейшем – гибель организмов. В целом устойчивость макрофитов к воздействию углеводородов ДТ возрастает в ряду *A. arcta*–*U. intestinalis*–*U. obscura*–*U. lactuca*.

Что касается эпифитных бактерий, во всех проведенных нами экспериментах, включая настоящий, отмечались значительные изменения в количественных показателях эпифитного бактериального сообщества. Мы считаем, что помимо внесения дополнительного субстрата на сообщество могут влиять и условия культивирования водорослей, в первую очередь, замкнутость экспериментальной системы. В природных условиях, в случае попадания в среду нефтяных углеводородов, бактериальное сообщество может реагировать на данный фактор более предсказуемо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате эксперимента показано, что при внесении дизельного топлива в количестве 1 мг/л в первые сутки в эмульгированную форму переходит 85% нефтепродукта, который относительно быстро подвергается деградации. Это доказывает анализ хроматограмм, показавший, что при малых концентрациях нефтепродукта на 6 день эксперимента

его основу составляют фракции от C11 до C25, с преобладанием C19–C24. На 10 день снижается общее количество нефтепродуктов и происходит увеличение доли C13–C15. Все эти фракции легко подвергаются микробному окислению.

При более высоких концентрациях 50 мг/л – в течение всего эксперимента соотношение фракций остается практически неизменным и количество углеводов не уменьшается, что происходит из-за постоянного поступления в воду нефтепродукта из пленки. Таким образом, поступающие в среду тяжелые фракции углеводов постепенно трансформируются до среднемолекулярных и низкомолекулярных соединений, которые наиболее токсичны для гидробионтов.

В данном эксперименте отмечаются значительные колебания численности бактерий, однако выявить линейную зависимость от концентрации или каких-то других факторов не удается. При этом отмечается увеличение доли культивируемых бактерий относительно общей их численности, особенно в вариантах с 5 и 100 мг/л. Присутствие избытка нефтяных углеводов стимулирует рост микроорганизмов. Это может быть связано также и с особенностями лабораторных условий, в первую очередь, отсутствием смены воды. В итоге за счет жизнедеятельности водорослей, а также деструкции клеточных структур (бактерий и клеток водорослей), особенно при высоких концентрациях нефтепродуктов, происходит накопление органики в среде, стимулирующей развитие бактерий.

Характер реакции макрофитов на влияние токсиканта зависит от его вида, концентрации и длительности воздействия. Анализ экспериментальных данных позволяет сказать, что *U. lactuca* способна выжить при концентрации водорастворимых фракций дизельного топлива менее 5 мг/л в течение 10 суток, при этом действующая концентрация достигает 95% от внесенной. При более высоких концентрациях у макрофитов происходят изменения, которые вызывают их гибель. Основные изменения, отмечающиеся в клетках ульвы, – усиление синтеза ферментов АОС, уменьшение интенсивности фотосинтеза, нарушение структуры клеток.

Адаптивные реакции ульвы к нефтяному загрязнению включают в себя и изменения в микробном сообществе, обитающем на поверхности водорослей. Эпифитные микроорганизмы активно взаимодействуют, как друг с другом, так и с «растением-субстратом», а экзополисахаридный слой на поверхности водорослей многократно усиливает эти взаимодействия.

В ходе эксперимента показано, что высокое содержание нефтепродуктов в среде может ограничивать распространение водорослей *U. lactuca*. В то же время система «водоросль–микроорганизмы», комплексно реагируя на внесение дизельного

топлива, вырабатывает соответствующие адаптации, позволяющие эффективно участвовать в процессах естественного очищения среды от нефтепродуктов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства высшего образования и науки РФ в рамках государственного задания ММБИ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воскобойников Г.М., Макаров М.В., Рыжик И.В., Малавенда С.В. Влияние абиотических факторов на структуру фитоценозов, морфологические и физиологические особенности водорослей-макрофитов Баренцева моря // Динамика морских экосистем и современные проблемы сохранения биологического потенциала морей России. Владивосток. Дальнаука, 2007. С. 357–386.
- 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 ее возможная роль в биоремедиации морской воды // Биол. моря. 2020. Т. 46. № 2. С. 135–141.
- Ильинский В.В. Гетеротрофный бактериопланктон // Практическая гидробиология: Учеб. для ун-тов. Под ред. В.Д. Федорова и В.И. Капкова. М.: ПИМ, 2006. 367 с.
- Королюк М.А., Иванова Л., Майорова И., Токарев В. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
- Ли Б.Д. Разделение, идентификация и количественное определение фотосинтетических пигментов макробентосных водорослей // Экологические аспекты фотосинтеза морских растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1978. С. 38–54.
- Очеретяна С.О., Клочкова Н.Г., Клочкова Т.А. Сезонный состав «зеленых приливов» в Авачинской губе и влияние антропогенного загрязнения

- на физиологию и рост некоторых зеленых водорослей // Вестн. КамчатГТУ. 2015. № 33. С. 30–36.
- Патин С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа. М.: ВНИРО. 1997. 350 с.
- Патин С.А. Нефтяные разливы и их воздействие на морскую среду и биоресурсы. М.: Изд-во ВНИРО. 2008. 508 с.
- Марковская Е.Ф., Малавенда С.В., Рыжик И.В., Сергиенко Л.А., Сони́на А.В., Стародубцева А.А., Воскобойников Г.М. Растения и лишайники Мурманского побережья Баренцева моря: полевой атлас. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ. 2016. 191 с.
- Руководство по методам биологического анализа морской воды и донных отложений // Под ред. Цыбань А.В. Л.: Гидрометеиздат, 1980. 191 с.
- Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 1975. 324 с.
- Aaronson, A. A. Experimental Microbial Ecology. New York and London: Academic Press. 1970. 236 p.
- Bellincampi D., Dipperro N., Salvi, G., Cervcone 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 Physiol. 2000. № 122. 1379–1385. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
- Brown K.E. King C.K., Kotzakoulakis K., George S.C., Harrison P.L. Assessing fuel spill risks in polar waters: Temporal dynamics and behaviour of hydrocarbons from Antarctic diesel, marine gas oil and residual fuel oil // Mar. Pollut. Bull. 2016. V. 110. № 1. P. 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.042>
- Dominguez H., Lorei E.P. *Ulva lactuca*, a source of troubles and potential riches // Mar. Drugs. 2019. V. 17. № 6. 357 P. <https://doi.org/10.3390/md17060357>
- Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces // Emerg. Infect. Dis. 2002. T. 8. № 9. С. 881.
- 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 // Egypt. J. Bot. 2021. V. 61. № 2. P. 467–478. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2021.37571.1531>
- French-McCay D. P. Development and application of an oil toxicity and exposure model, OilToxEx // Environ. Toxicol. Chem. 2002. V. 21. № 10. P. 2080–2094. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211011>
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. 1977. № 59. 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Goecke F., Labes A., Wiese J., Imhoffe J.F. Phylogenetic analysis and antibiotic activity of bacteria isolated from the surface of two cooccurring macroalgae from the Baltic Sea // Eur. J. Phycol. 2013, V. 48, №1. P. 47–60. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.767944>
- Hokstad J.N., Faksness L.-G., Daling P.S., Buffagni M. Chemical and toxicological characterisation of water accommodated fractions relevant for oil spill situations // WIT Transactions on Ecology and the Environment. 1970. V. 27. <https://doi.org/10.2495/OIL980131>
- Kusk K.O. Effects of crude oil and aromatic hydrocarbons on the photosynthesis of three species of *Acrosiphonia* grown in the laboratory // Bot. Mar. 1980. V. 23. P. 587–593. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb01558.x>
- Liu Y. X, Liu Y., Lou Y.D., Li N. Toxic effect of oil spill on the growth of *Ulva pertusa* by stable isotope analysis // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2019. V. 344. № 1. P. 012062. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/344/1/012062>
- Malavenda S., Makarov M., Ryzhik I., Mityaev M., Malavenda S. Occurrence of *Ulva lactuca* L. 1753 (Ulvaceae, Chlorophyta) at the Murman Coast of the Barents Sea // Pol. Res. 2018. V. 37. № 1. P. 1503912. <https://doi.org/10.1080/17518369.2018.1503912>
- Martin M., Portetelle D., Michel G., Vandenberg M. Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 2917–2935. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5557-2>
- Matsui T., Yamamoto T., Shinzato N., Mitsuta T., Nakano K., Namihira, T. Degradation of oil tank sludge using long-chain alkane-degrading bacteria // Ann. Microbiol. 2014. V. 64. P. 391–395. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0643-8>
- McArthur D. M., Moss B.L. The ultrastructure of cell walls in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link // Br. Phycol. J. 1977. V. 12. № 4. P. 359–368. <https://doi.org/10.1080/00071617700650381>
- Moss B.L. The control of epiphytes by *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. (Phaeophyta, Cystoseiraceae) // Phycologia. 1982. V. 21. № 2. P. 185–188. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-21-2-185.1>
- Pasmore M., Costerton J.W. Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 30. P. 407–413. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0069-6>
- Pilatti F.K. Ramlov F., Schmidt E.C., Kreusch M., Pereira D.T., Costa C., de Oliveira E.R., Bauer C.M., Rocha M., Z. L. Bouzon, Maraschin, M. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline–Biochemical and morphological alterations // Chemosphere. 2016. V. 156. P. 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.126>
- Porter K.G., Feig Y.S. The use DAPI for identifying and counting of aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. 1980. V. 25 № 5 P. 943–948. <https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943>
- Ryzhik I., Pugovkin D., Makarov M., Roleda M.Y., Basova L., Voskoboynikov G. Tolerance of *Fucus vesiculosus* exposed to diesel water-accommodated fraction (WAF) and degradation of hydrocarbons by the associated bacteria // Environ. Pollut. 2019. V. 254. P. 113072. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113072>

- Ryzhik I.V., Pugovkin D.V., Salakhov D.O., Klindukh M.P., Voskoboynikov G.M. Physiological changes and rate of resistance of *Acrosiphonia arcta* (Dillwyn) Gain upon exposure to diesel fuel // *Heliyon*. 2022. V. 8. № 8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10177>
- Ryzhik I., Salakhov D., Makarov M., Menshakova M. 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 // *Mar. Biol. J.* 2024. V. 9. № 1. P. 86–97. <https://doi.org/10.21072/mbj.2024.09.1.07>
- Salakhov D., Pugovkin D., Ryzhik I., Voskoboynikov G. The influence of diesel fuel on morpho-functional state of *Ulvaria obscura* (Chlorophyta) // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2020. V. 539. № 1. P. 012202. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/539/1/012202>
- Salakhov D., Pugovkin D., Ryzhik I., Voskoboynikov 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*. IOP Publishing, 2021. V. 937. № 2. P. 022059. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022059>
- Sand-Jensen K., Borum J. Photosynthetic responses of *Ulva lactuca* at very low light // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Oldendorf. 1988. V. 50. № 1. P. 195–201.
- Seely G.R., Duncan M.J., Vidaver W.E. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide // *Mar. Biol.* 1972. V. 12. P. 184–188. <https://doi.org/10.1007/BF00350754>
- Singer, M. M., Aurand, D., Bragin, G. E., Clark, J. R., Coelho, G. M., Sowby, M. L., Tjeerdema R.S. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing // *Mar. Pollut. Bull.* V. 40. № 11. P. 1007–1016. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00045-X)
- Walker J.D., Colwell R.R. Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1976. V. 31. P. 189–197.
- Xia J., Li Y., Zou D. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements // *Aquatic Botany*. 2004. V. 80. № 2. P. 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2004.07.006>
- Zambrano J., Carballeira A. Effects of hydrocarbons on the physiology and growth of *Ulva sp.* (Chlorophyta) // *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* — 1999. V. 15. № 1. P. 373–381.

On the resistance of the green alga *Ulva lactuca* L. and associated microorganisms to the effects of diesel fuel under experimental conditions

© 2025 г. D. V. Pugovkin^{1, #}, I. V. Ryzhik^{1, 2}, D. O. Salakhov¹,
M. P. Venger¹, G. M. Voskoboynikov¹

[#]*Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (MMBI RAS),
Vladimirskaia 17, Murmansk, 183010 Russia*

^{**}*Murmansk Arctic University (MAU) Kapitana Egorova 15, Murmansk, 183038 Russia
#e-mail: pugovkin2005@yandex.ru*

It has been experimentally observed that *Ulva lactuca* from the Barents Sea, is capable of surviving in a laboratory environment when the concentration of water soluble fractions of diesel fuel in water is up to 1 mg/l. A concentration of more than 4.9 mg/l was critical for algae. During these treatments, decreases in photosynthetic rate (2–16 times relative to the control) and the amount of photosynthetic pigments (more than 2 times of the control), an increase the hydrogen peroxide content and the activity of superoxide dismutase were observed in macrophytes. The number, biomass and size characteristics of heterotrophic bacteria associated with algae changed significantly. Thus, the high content of petroleum products in the environment limits the spread of *U. lactuca* algae, however, with minor contamination, they can actively participate in bioremediation processes.

Keywords: oil pollution, macrophytes, photosynthetic rate, antioxidant system, bacterial community, epiphytic bacteria