НАУКА ЮГА РОССИИ 2020 Т. 16 № 1 С. 55–59
SCIENCE IN THE SOUTH OF RUSSIA 2020 VOL. 16 No 1 P. 55–59

БИОЛОГИЯ

УДК 57.014+574.24+574.632+579.68+581.1
DOI: 10.7868/S25000640200107

ВЛИЯНИЕ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ *ULVA LACTUCA* L. (CHLOROPHYTA) БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2020 г. Д.О. Салахов[1], Г.М. Воскобойников[1], И.В. Рыжик[1]

Аннотация. Проведены эксперименты по влиянию летнего дизельного топлива (ДТ) на развитие проростков *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta) Баренцева моря. Проростки *U. lactuca* устойчивы к воздействию низких концентраций ДТ в морской воде. При содержании ДТ в морской воде 1 мг/л (20 ПДК) развитие проростков и состояние фотосинтетического аппарата в их клетках аналогичны таковым контрольных экземпляров водорослей в воде без добавления ДТ. При увеличении содержания ДТ в воде скорость повреждения клеток водорослей находится в прямой зависимости от концентрации токсиканта. При содержании в воде ДТ в количестве 100 ПДК на 20 сутки эксперимента отмечается замедление развития проростков, обесцвечивание части клеток и разрушение хлоропластов. При 500 ПДК дизтоплива на 10 день эксперимента гибнет большинство клеток, а при содержании 1000 ПДК токсиканта в воде гибель проростков происходит на 5 день опыта. Предполагается, что устойчивость проростков ульвы к малым концентрациям ДТ определяется активизацией работы антиоксидантной системы в клетках водорослей.

Ключевые слова: *Ulva lactuca*, Баренцево море, антиоксидантная система, дизельное топливо, устойчивость к токсиканту.

THE INFLUENCE OF DIESEL FUEL ON THE GROWTH OF PLANTS OF *ULVA LACTUCA* L. (CHLOROPHYTA) OF THE BARENTS SEA

D.O. Salakhov[1], G.M. Voskoboinikov[1], I.V. Ryzhik[1]

Abstract. The analysis of the influence of the summer diesel fuel (DF) on the growth of plants of *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta) of the Barents Sea showed their tolerance to the toxicants in concentration 1 mg/l (20 MPC) in marine water. In such concentration the plants demonstrate the growth, the photosynthetic apparatus state, which are analogic to the observed plants in marine water with no added DF. There is also the direct dependency of the speed of damage of plants' cells from decreasing the concentration of toxicant. In case of concentration of DF in marine water of 100 MPC on the 20th day of experiment the decreasing of the growth and degradation of particular cells of plants has been observed. There is also a decreasing of number of "green cells" and increasing of diaphanous cells because of the destruction of the photosynthetic apparatus, vacuolization of cells. In concentration of 500 MPC the high percent of cells die on the 10th day, and in concentration of 1000 MPC – on the 5th day of experiment. It is supposed that tolerance of the plants of ulva to small concentrations of DF is determined by the presence of an antioxidant system in cells of algae even on the early stages of ontogenesis.

Keywords: *Ulva lactuca*, Barents Sea, antioxidant system, diesel fuel, tolerance to the toxicant.

В последние годы большое внимание уделяется исследованию влияния нефтепродуктов на водоросли Баренцева моря, что обусловлено увеличением транспортировки, перегрузки, переработки углеводородного сырья в прибрежной зоне. Загрязнение нефтепродуктами становится существенным фактором, постоянно действующим на прибрежные биоценозы – зону обитания и размножения представителей многих групп гидробионтов, одними из которых являются водоросли-макрофиты, оби-

[1] Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра Российской академии наук (Murmansk Marine Biological Institute, Kola Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Murmansk, Russian Federation), Российская Федерация, 183010, г. Мурманск, ул. Владимирская, 17, e-mail: grvosk@mail.ru

татели литорали и сублиторали. Необходимо оценивать степень влияния нефтепродуктов не только на взрослые растения, но и на стадии репродукции, раннего развития – как показано ранее, наиболее чувствительные к внешнему воздействию стадии онтогенеза [1].

Цель исследования – определение диапазона толерантности к дизельному топливу (ДТ) у проростков зеленой водоросли *Ulva lactuca*. Данный вид, сравнительно недавно редко встречавшийся в Баренцевом море, в настоящее время активно распространяется на литорали Восточного Мурмана [2].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты по влиянию летнего ДТ, основного нефтепродукта, используемого морским транспортом, на проростки зеленой водоросли *Ulva lactica* L. проводили в июле – августе 2019 г. на сезонной биостанции Мурманского морского биологического института Кольского научного центра РАН в пос. Дальние Зеленцы. Фертильные талломы *U. lactuca* собирали на среднем и нижнем горизонте литорали г. Зеленецкой (69°7′17″ с.ш., 36°3′53″ в.д.). Для получения репродуктивного материала талломы помещали в стеклянные кюветы, на дне которых находились предметные стекла, и заливали фильтрованной морской водой соленостью 35 ‰, которую отбирали в месте обитания водорослей. Через трое суток стекла с прикрепившимися зиготами переносили в чашки Петри и заливали стерилизованной морской водой. Подготовку к экспериментам и непосредственно опыты проводили в термостатированных комнатах при температуре +8 °С и освещенности 150 Вт/м^2.

Через 10 суток, когда проростки достигали размера 4–8 клеток, в чашки Петри заливали воду с ДТ в концентрации 0,86, 4,3, 21,5, 43 мг/л, что примерно в 20, 100, 500, 1000 раз соответственно больше установленной нормы ПДК нефтепродуктов в воде для рыбохозяйственных водоемов (0,05 мг/л) [3]. Контролем служили чашки Петри с проростками, в которые добавляли стерилизованную морскую воду без обогащения нефтепродуктами, при этом фоновый уровень содержания нефтепродуктов в воде из места отбора проб водорослей составлял около 0,2 мг/л (4 ПДК). Воду с ДТ в чашках Петри меняли с периодичностью 1 раз в 3 дня.

Длительность эксперимента составляла 20–25 дней. Анализ морфологического состояния клеток проводили с использованием микроскопа ЛОМО Микмед-6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольном варианте эксперимента число клеток в проростках *U. lactuca* увеличилось с 3–7 (рис. 1*а*) в начале до 20–24 к концу опыта (20 суток) (рис. 1*б*). Клетки имели на протяжении всего эксперимента квадратную форму, относительно постоянный размер (10 × 10 мкм). 90 % объема клеток было занято хлоропластами, придающими клеткам зеленую окраску («зеленые клетки»). В конце эксперимента в некоторых проростках отмечалось появление второго ряда клеток.

При содержании ДТ в морской воде около 20 и 100 ПДК исследуемые водоросли сохраняли жизнеспособность до конца эксперимента. Вместе с тем если при 20 ПДК в воде ДТ значительных отличий в развитии проростков между опытным и контрольным вариантами эксперимента не отмечалось (рис. 2*а*), то при 100 ПДК наблюдалось постепенное замедление развития проростков. Клетки при содержании в воде 100 ПДК ДТ приобретали оваль-

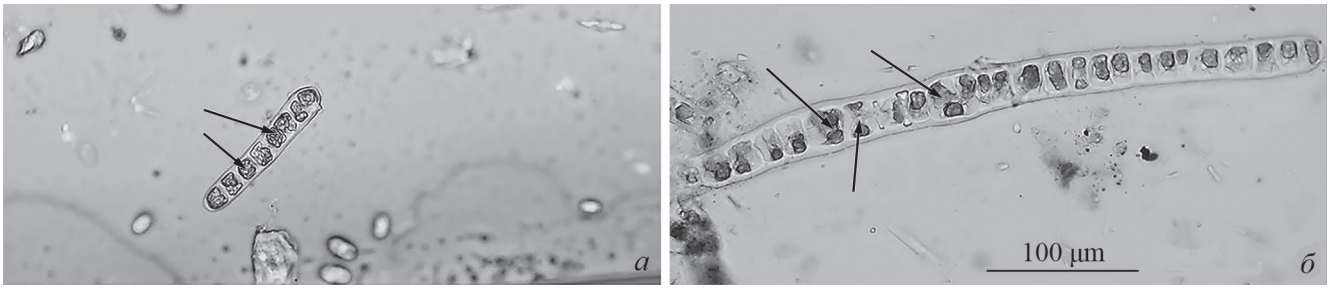

Рис. 1. Контрольные образцы проростков *U. lactuca*: *а* – клетки проростков с хлоропластами (обозначены стрелками) в первый день эксперимента; *б* – появление второго ряда клеток на 20 день эксперимента (обозначено стрелками). Увеличение 400×.
Fig. 1. Control specimen of *U. lactuca* on early stages of ontogenesis: *а* – cells of seedlings with chloroplasts (indicated by arrows) on the first day of the experiment; *б* – the occurrence of the second row of cells on day 20 of the experiment (indicated by arrows). Magnification 400×.

ную форму, их размер увеличивался до 10 × 15 мкм (рис. 2*б*). Через 20 суток эксперимента такие проростки состояли только из 7–10 клеток. Наряду с относительно неповрежденными «зелеными клетками» присутствовали клетки, потерявшие зеленую окраску.

При содержании в воде 500 ПДК ДТ через 5 суток эксперимента состояние проростков значительно отличалось от контрольного варианта опыта. Некоторые содержали 8–10 клеток, но основная масса состояла из 5–6 клеток. Встречались единичные совершенно прозрачные проростки, у которых клетки потеряли зеленую окраску. Через 10 суток число клеток в проростках не изменилось, при этом увеличилось число проростков, имеющих клетки с прозрачным содержимым. Хлоропласты в таких клетках располагались на периферии. Через 20 суток наблюдалось возрастание числа клеток с признаками деградации: потеря структурированности протоплазмы, зеленой окраски (рис. 3*а*). На 25 сутки эксперимента отмечалось увеличение объема клеток, они принимали бочонкообразную форму. В проростках присутствовали преимущественно клетки, потерявшие зеленую окраску. Центральная часть клеток была заполнена прозрачным веществом, структурные элементы клеток обнаруживались только на периферии.

При содержании 1000 ПДК ДТ на 5–6 сутки эксперимента проростки состояли из 8–9 клеток (рис. 3*б*). Только в единичных клетках в проростках присутствовали хлоропласты, занимая не более 10–15 % объема клетки. Большая часть проростков состояла из клеток с прозрачным содержимым.

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном эксперименте показано, что дизтопливо при содержании в воде около 20 ПДК не оказывает существенного влияния на раннее развитие *U. lactuca.* Об этом свидетельствует увеличение в опыте числа клеток и размеров проростков, их зеленая окраска, обеспечиваемая присутствием хлоропластов и, соответственно, хлорофиллом, структурированность цитоплазмы клеток. Однако при повышении содержания токсиканта до 100 ПДК и больше практически у всех проростков отмечалось снижение интенсивности роста, а затем и нарушение структуры клеток. При содержании ДТ в количестве 100 ПДК нарушения в отдельных клетках проявлялись на 20 сутки опыта. При 500 ПДК ДТ

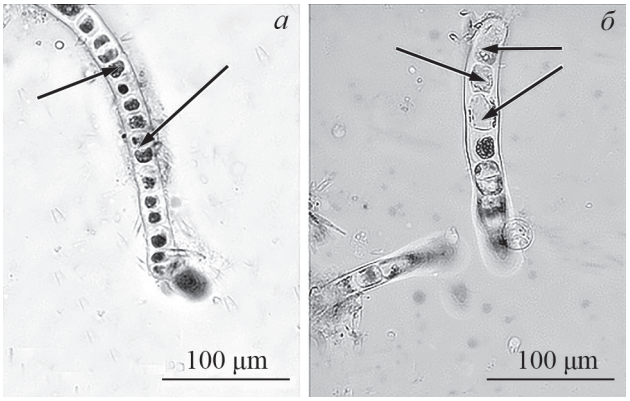

Рис. 2. Проростки *U. lactuca* под действием дизельного топлива через 20 суток эксперимента: *а* – клетки проростков, содержащие хлоропласты без признаков деградации (обозначены стрелками) под влиянием ДТ содержанием 20 ПДК; *б* – клетки проростков с признаками деградации (обозначены стрелками) под влиянием ДТ содержанием 100 ПДК. Увеличение 400×.
Fig. 2. *Ulva lactuca* seedlings under the influence of diesel fuel after 20 days of the experiment: *a* – seedling cells containing chloroplasts without signs of degradation (indicated by arrows) under the influence of DF at a concentration of 20 MPC; *б* – seedling cells with indication of degradation (indicated by arrows) under the influence of DF at a concentration of 100 MPC. Magnification 400×.

в воде деградационные изменения в клетках проростков (обесцвечивание в результате разрушения хлорофилла, просветление цитоплазмы, вакуолизация с оттеснением клеточных структур на периферию клетки) проявлялись уже на 10 сутки. Увеличение содержания токсиканта в воде до 1000 ПДК приводит к разрушению большинства клеток уже на 5 сутки эксперимента.

В литературе описаны сходные изменения в развитии проростков у разных видов водорослей при воздействии нефтепродуктов. О.В. Степаньян [4] в экспериментах показал, что при небольших концентрациях эмульсии нефти (10 ПДК) проростки *Enteromorpha* (= *Ulva*) *prolifera* с литорали Баренцева моря в течение 15 суток хорошо развивались и увеличивались в размерах до 20–30 клеток. При повышении содержания нефти до 600 ПДК происходило подавление развития и разрушение 2–3 клеточных проростков на 3 сутки эксперимента. Прямую зависимость повреждений в клетках проростков черноморских макроводорослей от величины концентрации нефти наблюдал О.Г. Миронов [5]. По его данным, содержание нефти в морской воде в количестве 20 и 200 ПДК снижало число продуцируемых клеток у водоросли *Polysiphonia breviarticulata* (*Rhodophyta*) за трое суток в 1,4 и 12,4 раза соответственно. Развитие повреждений в клетках, как и в нашем эксперименте, сопровождалось изменением окраски

Рис. 3. Проростки *U. lactuca* под действием дизельного топлива: *а* – клетки проростков, потерявшие зеленую окраску (обозначены стрелками) под влиянием ДТ содержанием 500 ПДК через 20 дней эксперимента; *б* – клетки проростков с прозрачным содержимым под влиянием ДТ содержанием 1000 ПДК через 5 дней эксперимента. Увеличение 400×.

Fig. 3. *Ulva lactuca* seedlings under the influence of diesel fuel: *a* – modified seedling cells that lost their green color (indicated by arrows) under the influence of DF at a concentration of 500 MPC after 20 days of the experiment; *б* – cells of seedlings with colorless substance under the influence of DF at a concentration of 1000 MPC after 5 days of the experiment. Magnification 400×.

водорослей, уменьшением фотосинтетической активности, нарушением структурированности протоплазмы, плазмолизом.

В опытах на взрослых растениях *U. lactuca* авторами настоящей работы было определено, что водоросли выдерживают краткосрочное (10 суток) загрязнение дизтопливом до 1000 ПДК. При содержании в воде ДТ выше 1000 ПДК у ульвы подавляется развитие таллома и фотосинтез, в клетках наблюдаются деструктивные процессы.

Диапазон толерантности у морских макрофитов зависит от разных факторов: морфологии, биохимического состава, состава токсиканта и его концентрации, условий среды, в которых обитает организм [1]. Проростки, состоящие из быстро растущих молодых клеток, имеют тонкую клеточную стенку, слабо препятствующую проникновению токсиканта внутрь клеток. На ранних стадиях развития растения, по-видимому, основным компонентном защиты клетки от разрушающего действия нефтепродуктов является уже сформированная антиоксидантная система [7]. Нефтепродукты – комплексные соединения, в состав которых входят агенты разной природы, от которой зависит скорость проникновения в клетку. Они, проникая через мембраны, вызывают разрушение липидного слоя мембран и усиление перекисного окисления липидов в клетке. Продукты его окисления, активные формы кислорода, в свою очередь активируют антиоксидантную систему. В клетках происходит обезвреживание токсиканта и включение в обмен [8; 9]. С возрастом происходит утолщение клеточных стенок водорослей, что может препятствовать проникновению токсиканта внутрь клеток. У многих водорослей-макрофитов на поверхности присутствуют углеводородокисляющие бактерии, способные разлагать нефтепродукты, превращая их в соединения, доступные для поглощения клетками водорослей с последующим включением в метаболизм растения [10; 11].

Возможно, что фактором, обеспечивающим устойчивость проростков к малым концентрациям нефтепродуктов, является произрастание «родительских» растений в условиях постоянного загрязнения и формирование устойчивых спор [12; 13]. Ульвовые водоросли можно отнести к *r*-стратегам, которые способны быстро адаптироваться к меняющимся условиям среды, что обеспечивает им возможность выдерживать небольшие уровни загрязнения морской воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-05-80058\18 в рамках программы «Опасные явления».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степаньян О.В., Воскобойников Г.М. 2006. Влияние нефти и нефтепродуктов на морфофункциональные особенности морских макроводорослей. *Биология моря*. 32(4): 241–248.

2. Malavenda S., Makarov M., Ryzhik I., Mityaev M., Malavenda S. 2018. Occurrence of *Ulva lactuca* L. 1753 (Ulvaceae, Chlorophyta) at the Murman Coast of the Barents Sea. *Polar Research*. 37(1): 1503912. doi: 10.1080/17518369.2018.1503912

3. Нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. 2016. *Судебные и нормативные акты РФ*. URL: https://sudact.ru/law/prikaz-minselkhoza-rossii-ot-13122016-n-552/prilozhenie/tablitsa-n-2/ (дата обращения: 21.02.2020).

4. Степаньян О.В. 2013. Влияние сырой нефти на ранние стадии развития макроводорослей Баренцева моря. *Ботанический журнал*. 98(7): 903–912.

5. Миронов О.Г. 1985. *Взаимодействие морских организмов с нефтяными углеводородами.* Л., Гидрометеоиздат: 127 с.

6. Рыжик И.В. 2012. Метаболическая активность клеток *Fucus vesiculosus* Linnaeus, 1753 (Phaeophyta: Fucales) из Баренцева моря в условиях нефтяного загрязнения. *Биология моря*. 38(1): 86–88.

7. Рыжик И.В., Макаров М.В., Воскобойников Г.М. 2014. Физиологическое состояние литоральных бурых водорослей *Fucus serratus* Linnaeus, 1753 и *Fucus distichus* Linnaeus, 1767, произраставших на плантации-биофильтре в Баренцевом море. *Биология моря*. 40(2): 131–136.

8. Pilatti F.K., Ramlov F., Schmidt E.K., Kreusch M., Pereira D.T., Costa C., de Oliveira E.R., Bauer C.M., Rocha M., Bouzon Z.L., Maraschin M. 2016. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline - Biochemical and morphological alterations. *Chemosphere.* 156: 428–437. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.126

9. Ryzhik I.V., Makarov M.V. 2019. Effect of diesel fuel film on green algae *Ulva lactuca* L. and *Ulvaria obscura* (Kützing) Gayral ex Bliding of the Barents Sea. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 302(1): 012029. doi: 10.1088/1755-1315/302/1/012029

10. Voskoboinikov G.M., Matishov G.G., Metelkova L.O., Zhakovskaya Z.A., Lopushanskaya E.M. 2018. Participation of the green algae *Ulvaria obscura* in bioremediation of sea water from oil products. *Doklady Biological Sciences*. 481: 139–141. doi: 10.1134/S0012496618040026

11. Pugovkin D.V., Liaimer A. Jensen J.B. 2016. Epiphytic bacterial communities of the alga *Fucus vesiculosus* in oil-contaminated water areas of the Barents Sea. *Doklady Biological Sciences.* 471: 269–271. doi: 10.1134/S0012496616060053

12. Степаньян О.В. 2015. Хроническое загрязнение повышает устойчивость бурой водоросли *Fucus vesiculosus* (L.) к действию углеводородов нефти. *Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе*. 2: 22–25.

13. Lewis M., Pryor R. 2013. Toxicities of oils, dispersants and dispersed oils to algae and aquatic plants: Review and database value to resource sustainability. *Environmental Pollution*. 180: 345–367. doi: 10.1016/j.envpol.2013.05.001

REFERENCES

1. Stepanyan O.V., Voskoboinikov G.M. 2006. Effect of oil and oil products on morphofunctional parameters of marine macrophytes. *Russian Journal of Marine Biology*. 32(Suppl. 1): S32–S39. doi: 10.1134/S1063074006070042

2. Malavenda S., Makarov M., Ryzhik I., Mityaev M., Malavenda S. 2018. Occurrence of *Ulva lactuca* L. 1753 (Ulvaceae, Chlorophyta) at the Murman Coast of the Barents Sea. *Polar Research*. 37(1): 1503912. doi: 10.1080/17518369.2018.1503912

3. [Standards for maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of fishery water bodies]. 2016. *Sudebnye i normativnye akty RF.* [*Judicial and regulatory acts of the Russian Federation*]. Available at: https://sudact.ru/law/prikaz-minselkhoza-rossii-ot-13122016-n-552/prilozhenie/tablitsa-n-2/ (accessed 21 February 2020). (In Russian).

4. Stepanjan O.V. 2013. [Effect of crude oil on early stages of macroalgae development in the Barents Sea]. *Botanicheskiy zhurnal*. 98(7): 903–912. (In Russian).

5. Mironov O.G. 1985. *Vzaimodeystvie morskikh organizmov s neftyanymi uglevodorodami.* [*Interaction of marine organisms with petroleum hydrocarbons*]. Leningrad, Gidrometeoizdat: 127 p. (In Russian).

6. Ryzhik I.V. 2012. The metabolic activity of cells of *Fucus vesiculosus* Linnaeus, 1753 (Phaeophyta Fucales) from the Barents Sea under conditions of oil pollution. *Russian Journal of Marine Biology*. 38(1): 96–99. doi: 10.1134/S1063074012010117

7. Ryzhik I.V., Makarov M.V., Voskoboinikov G.M. 2014. The physiological state of intertidal brown seaweeds *Fucus serratus* Linnaeus, 1753 and *Fucus distichus* Linnaeus, 1767 cultivated on a biofiltration system in the Barents Sea. *Russian Journal of Marine Biology*. 40**:** 119–124. doi: 10.1134/S1063074014020084

8. Pilatti F.K., Ramlov F., Schmidt E.K., Kreusch M., Pereira D.T., Costa C., de Oliveira E.R., Bauer C.M., Rocha M., Bouzon Z.L., Maraschin M. 2016. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline - Biochemical and morphological alterations. *Chemosphere.* 156: 428–437. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.126

9. Ryzhik I.V., Makarov M.V. 2019. Effect of diesel fuel film on green algae *Ulva lactuca L*. and *Ulvaria obscura* (Kützing) Gayral ex Bliding of the Barents Sea. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 302(1): 012029. doi: 10.1088/1755-1315/302/1/012029

10. Voskoboinikov G.M., Matishov G.G., Metelkova L.O., Zhakovskaya Z.A., Lopushanskaya E.M. 2018. Participation of the green algae *Ulvaria obscura* in bioremediation of sea water from oil products. *Doklady Biological Sciences*. 481: 139–141. doi: 10.1134/S0012496618040026

11. Pugovkin D.V., Liaimer A. Jensen J.B. 2016. Epiphytic bacterial communities of the alga *Fucus vesiculosus* in oil-contaminated water areas of the Barents Sea. *Doklady Biological Sciences.* 471: 269–271. doi: 10.1134/S0012496616060053

12. Stepanyan O.V. 2015. [Chronic pollution increases the resistance of the brown algae *Fucus vesiculosus* (L.) to the action of petroleum hydrocarbons]. *Environment Protection in Oil and Gas Complex*. 2: 22–25. (In Russian).

13. Lewis M., Pryor R. 2013. Toxicities of oils, dispersants and dispersed oils to algae and aquatic plants: Review and database value to resource sustainability. *Environmental Pollution*. 180: 345–367. doi: 10.1016/j.envpol.2013.05.001

Поступила 20.01.2020