

УДК 57.014+574.24+574.632+579.68+581.1

ПОГЛОЩЕНИЕ И ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА ВОДОРОСЛЮ *PALMARIA PALMATA* (LINNAEUS) F. WEBER ET D. MOHR, 1805 (RHODORHYTA) И ЕЕ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В БИОРЕМЕДИАЦИИ МОРСКОЙ ВОДЫ

© 2020 г. Г. М. Воскобойников¹*, И. В. Рыжик¹, Д. О. Салахов¹, Л. О. Метелькова²,
З. А. Жаковская², Е. М. Лопушанская³

¹Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН,
Мурманск 183010, Россия

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН,
Санкт-Петербург 197110, Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева,
Санкт-Петербург 190005, Россия

*e-mail: grvosk@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

Впервые показано, что красная водоросль *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 в условиях умеренного загрязнения дизельным топливом (ДТ) морской воды не только сохраняла физиологическую активность, но и проявляла выраженную способность к сорбции и деструкции нефтепродуктов (НП). Установлено, что содержание компонентов ДТ в воде снижалось одновременно с их накоплением в водоросли. По-видимому, весь таллом пальмарии способствовал деструкции ДТ, которая начиналась на поверхности водоросли в результате деятельности эпифитных углеводородокисляющих бактерий, обеспечивающих перевод НП в доступную для макрофитов форму. В дальнейшем НП нейтрализовались клетками водоросли. Сохранение жизнеспособности водоросли *P. palmata* под влиянием ДТ на протяжении всего эксперимента (21 сут) подтверждено стабильно высокой метаболической активностью клеток. Участие макроводоросли в биоремедиации, очевидно, обусловлено возможностью образовывать симбиотические ассоциации с углеводородокисляющими микроорганизмами.

Ключевые слова: водоросли-макрофиты, биоремедиация морской воды, дизельное топливо, симбиотическая ассоциация

DOI: 10.31857/S0134347520020102

В арктической зоне существует проблема хронического загрязнения прибрежных акваторий нефтепродуктами (НП). Это связано с увеличением объема транспортировки углеводородов от мест добычи на шельфе, со строительством на побережье предприятий по их перегрузке и переработке, а также с замедленными процессами деградации нефти и НП в условиях низких температур.

В литературе рассмотрены варианты решения проблемы ремедиации морской среды от НП с помощью диспергентов, сорбентов или путем размещения в зонах постоянного загрязнения искусственных рифов. К сожалению, диспергенты токсичны и наносят биоте больший вред, чем НП. Сорбенты в арктических морях сложны в использовании из-за частых штормов, а постоян-

ные искусственные рифы осложняют мореплавание в прибрежной зоне. В последние годы высказывалось предположение о возможности применения для очистки моря от НП морских водорослей-макрофитов (Семенов и др., 2014; Пуговкин и др., 2016; Воскобойников и др., 2017; Wrabel, Pесkol, 2000). Наиболее часто на морском транспорте используется дизельное топливо (ДТ). У макроводорослей *Fucus vesiculosus* (Phaeophyta) и *Ulvaria obscura* (Chlorophyta) выявлена сорбционная способность в отношении данного НП (Pilatti et al., 2016; Воскобойников и др., 2017, 2018). Экспериментально было показано, что уменьшение содержания ДТ в морской воде происходило одновременно с его накоплением в растениях. При этом в деструкции НП у ульварии и фукуса был задействован весь

таллом; она начиналась на поверхности водоросли с помощью эпифитных углеводородокисляющих бактерий (УОБ), что обеспечивало поглощение и нейтрализацию НП клетками макрофитов (Воскобойников и др., 2017, 2018). Известно, что УОБ, образующие с водорослями-макрофитами взаимовыгодную симбиотическую ассоциацию, способны окислять почти все нефтепродукты (Atlas et al., 1978; Семенова и др., 2009). Эти сведения подтвердили высказанные ранее предположения о том, что водоросли не только служат субстратом для УОБ, но с их помощью могут осуществлять деструкцию НП, поглощать и включать в метаболизм компоненты НП (Семенов и др., 2014; Воскобойников и др., 2017, 2018).

Цель данного исследования – определить, обладают ли такой способностью водоросли, отличающиеся от изученных ранее систематической принадлежностью и морфологией. В настоящей работе проанализированы морфофункциональные изменения под влиянием НП у широко распространенной на литорали арктических морей красной водоросли *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 (Rhodophyta), а также определена ее роль в очистке морской среды от НП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Вегетативные талломы *Palmaria palmata*, приблизительно равные по размеру и массе, отбирали на побережье губы Зеленецкая Баренцева моря (69°07'09" с.ш., 36°05'35" в.д.), очищали от обрастателей и помещали в стеклянные емкости с морской водой объемом 1.3 л.

Морскую воду соленостью 33‰ предварительно фильтровали через ватно-марлевый фильтр и добавляли в нее летнее ДТ в количестве 1 мг/л, что составляет 20 ПДК для воды по валовому содержанию НП. Морскую воду и ДТ не стерилизовали.

Опыт проводили в термостатируемом боксе при температуре 7–8°C, освещении 16–18 Вт/м² и постоянной аэрации воды. Общая продолжительность эксперимента составила 21 сут. Каждые 7 сут образцы воды и водоросли отбирали и анализировали. У водоросли исследовали изменение морфологии и фотосинтеза; в воде и в талломах определяли содержание 17 индивидуальных алканов ДТ (включая изопреноиды пристан и фитан) и валовое содержание НП. В течение опыта изменение состояния и морфологии таллома пальмарии контролировали визуально и с помощью светооптических методов с использованием микроскопа МИКМЕД-6.

Интенсивность видимого фотосинтеза (ИФ) пальмарии определяли по изменению содержа-

ния кислорода в воде до и после инкубации талломов с помощью оксиметра HANNA HI 9141 (Германия) и йодометрическим методом Винклера. Интенсивность фотосинтеза рассчитывали в микрограммах O₂ на 1 г сырой массы таллома в час (Вознесенский и др., 1965). Активность фермента каталазы (АК) анализировали с помощью спектрофотометрического метода (Королюк, 1988). Измерения проводили на спектрофотометре JENWAY 6305 UV/VIS.

Фотосинтетические пигменты экстрагировали по общепринятым методикам (Ли, 1978). Спектры поглощения экстрактов регистрировали спектрофотометрически; концентрации пигментов рассчитывали по формулам (Seely et al., 1972; Rosenberg, 1981).

Валовое содержание НП и концентрации алканов в воде и в талломах определяли методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС).

Пробоподготовку и инструментальный анализ выполняли на основе методики EPA 8270 (Semivolatile Organic Compounds by GC/MS). Для подготовки проб воды применяли жидкостно-жидкостную экстракцию при нейтральном значении показателя кислотности среды. Образцы водоросли экстрагировали в ультразвуковой установке. Раствор внутреннего стандарта (2-фторнафталин) вводили в пробы воды и водоросли непосредственно перед экстракцией. Экстракты анализировали с использованием хроматомасс-спектрометра единичного разрешения DSQII фирмы "Thermo Finnigan" (Германия). Массовую долю содержания компонентов ДТ рассчитывали с помощью метода внутреннего стандарта. Результаты представлены в микрограммах на литр (мкг/л) для воды и в микрограммах на грамм (мкг/г) сухой массы для водорослей. При расчете концентрации учитывали коэффициент чувствительности масс-спектрометрического детектора в парах 2-фторнафталин/дейтерированный пентадекан (D₃₂) и 2-фторнафталин/дейтерированный эйкозан (D₄₂).

Для оценки фонового уровня НП анализировали пробы воды и *P. palmata* из губы Зеленецкая.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение эксперимента морфологических различий у контрольных и опытных растений не наблюдали. Интенсивность фотосинтеза (ИФ) у контрольных растений в течение всего эксперимента сохранялась приблизительно на одном уровне и составляла 0.09–0.13 мкг O₂/г сыр. массы/ч. У опытных растений после 7 сут воздействия ДТ зарегистрировано значительное повышение ИФ,

которая снижалась к 21 сут эксперимента (рис. 1). За время исследования концентрация хлорофилла *a* и каротиноидов у *Palmaria palmata* снизилась с 0.15 до 0.04 и с 0.05 до 0.01 мкг/г сыр. массы соответственно.

Активность каталазы у контрольных образцов пальмариин в течение опыта изменялась незначительно: отмечено ее постепенное повышение до 14 сут эксперимента, но на 21-е сут она снизилась до начального уровня. У опытных образцов активность каталазы не изменялась и была выше начального уровня (рис. 2).

Валовое содержание НП в природной воде губы Зеленецкая составляло 192 мкг/л (около 4 ПДК), т.е. анализируемые нами водоросли обитали в слабо загрязненной НП среде. Качественный состав НП был представлен в основном *n*-алканами C₁₁–C₂₅, концентрация которых составляла 0.1–5.3 мкг/л. Углеводородная “гребенка” на хроматограммах при этом характеризовалась монотонным распределением гомологов. Дополнительно для выявления их генезиса использовали следующие соотношения: C₁₇/C₁₈, пристан/фитан (Pr/Ph), CPI (отношение нечетных к четным гомологам) в области C₁₃–C₂₂, а также показатель биогенности (C₁₅ + C₁₇)/2C₁₆ (Немировская, 2013). Расчетные данные показали низкие значения (<1) соотношений C₁₇/C₁₈, Pr/Ph и CPI (C₁₃–C₂₂). После внесения в морскую воду 1 мг/л ДТ (0 сут, начало эксперимента) валовое содержание НП составило 1049 мкг/л, а сумма 17 алканов достигла 386 мкг/л. В присутствии пальмариин валовое содержание НП и сумма алканов в воде на 21-е сут эксперимента снизились в несколько раз по сравнению с таковыми в начале опыта и составили соответственно 226 и 35 мкг/л, что практически соответствует показателям контрольного образца до внесения ДТ (рис. 3).

Результаты исследования индивидуальных соединений в образцах воды демонстрировали активный процесс трансформации алканов при увеличении времени. На хроматограммах наблюдалось постепенное смещение максимума углеводородного “горба” в сторону более “легких” соединений, а также увеличение относительного содержания разветвленных алканов (рис. 4). Результаты анализа также показали отсутствие в воде и в талломах окисленных структур (альдегидов, кетонов); это позволяет предположить, что деструкция внесенных НП происходила преимущественно за счет уменьшения длины алкильной цепочки.

В контрольном образце водоросли (без внесения ДТ) валовое содержание НП составляло 124 мкг/г, а сумма 17 алканов не превышала 30 мкг/г. В экспе-

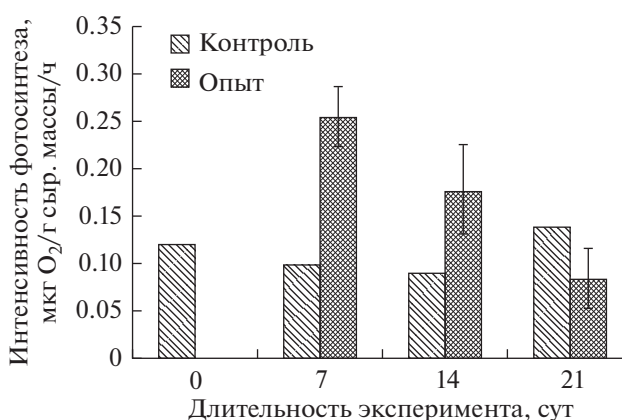


Рис. 1. Изменение интенсивности фотосинтеза у *Palmaria palmata* в течение эксперимента. Вертикальные линии – границы стандартного отклонения.

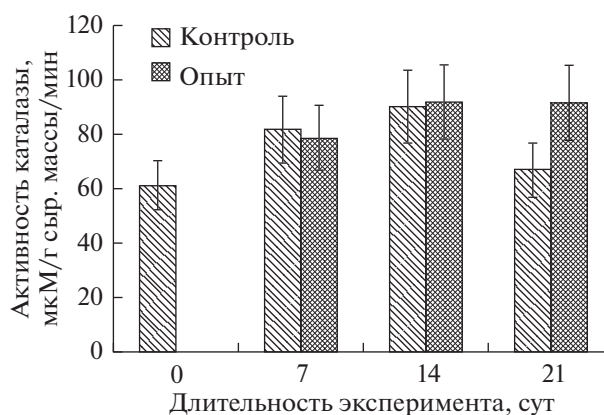


Рис. 2. Изменение активности каталазы в клетках *Palmaria palmata* в течение эксперимента.

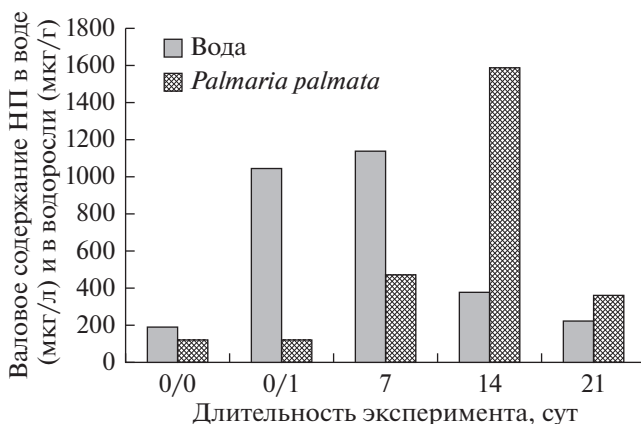


Рис. 3. Изменение валового содержания нефтепродуктов (НП) в воде и в *Palmaria palmata* в течение эксперимента. Длительность эксперимента, сут: 0/0 – образцы до внесения дизельного топлива (ДТ); 0/1 – начало эксперимента, внесение ДТ в воду; 7, 14 и 21 сут – время от начала эксперимента.

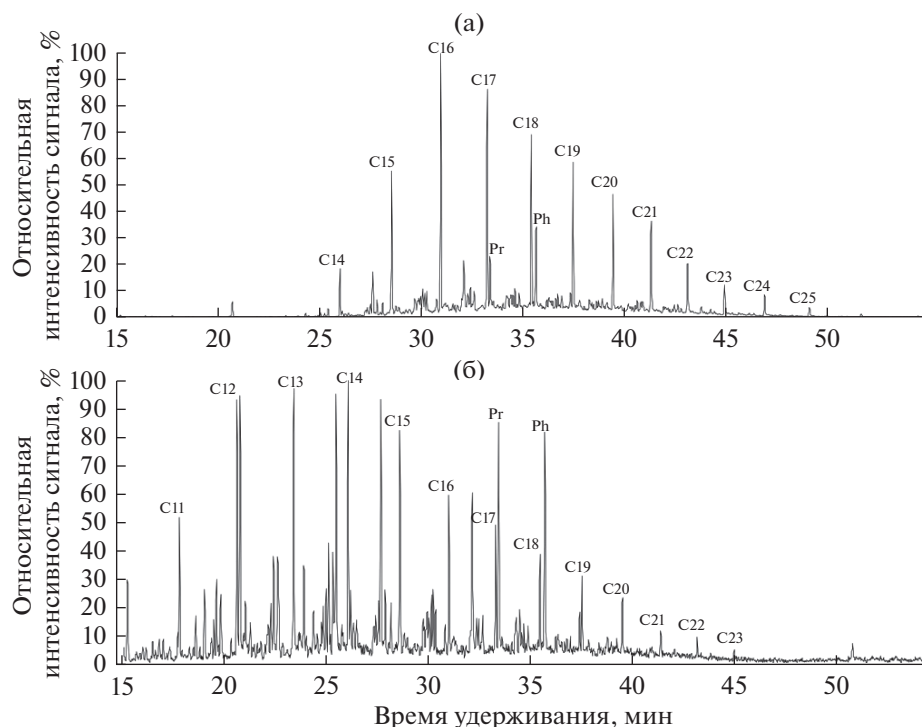


Рис. 4. Масс-хроматограммы проб воды на начальной 0 сут (а) и конечной 21 сут (б) стадиях эксперимента в режиме регистрации характеристичного для алканов иона.

рименте максимальные значения валового содержания НП и суммы алканов в водоросли отмечены на 14-е сут – 1586 и 249 мкг/г соответственно. На 21-е сут концентрации анализируемых показателей в *P. palmata* значительно снизились (рис. 3–5). Исключение составлял н-гептадекан, который, будучи эндогенным соединением, накапливался в тканях водоросли. В ходе эксперимента наряду с изменением концентрации н-алканов изменялся профиль их распределения (рис. 5; для сравнения отдельно приведен характерный профиль распределения алканов ДТ). Это может свидетельствовать не только о накоплении НП таллом водоросли, но и об их деструкции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обитание *Palmaria palmata* в природной среде (губа Зеленецкая) с незначительным загрязнением (4 ПДК), по-видимому, способствовало выработке у водоросли определенного диапазона толерантности к НП. Именно этим можно объяснить сохранение функциональной активности у пальмариид в течение всего эксперимента при концентрации НП 20 ПДК. При длительном пребывании (21 сут) водоросли под влиянием НП отмечено незначительное снижение фотосинтеза. У “контрольных” растений, которые

росли в воде без добавления НП, интенсивность фотосинтеза к концу опыта повысилась, что свидетельствует о влиянии на их функциональное состояние именно НП. Аналогичный эффект наблюдался в опытах на ульвари (Воскобойников и др., 2018). Полученные результаты согласуются с опубликованными данными (Степаньян, 2008) о возможном стимулирующем действии низких концентраций ДТ на фотосинтез морских макрофитов. Повышение содержания кислорода в воде, отмеченное на 7-е сут опыта (рис. 1), по-видимому, обеспечивали и цианобактерии. Увеличение выделяемого ими кислорода в ответ на повышение в воде содержания НП наблюдали и ранее (Гусев и др., 1981).

В исследованиях, посвященных определению активности каталазы у водорослей-макрофитов, отмечено, что этот фермент реагирует на комплексное загрязнение, в том числе органикой (Мильчакова, Шахматова, 2007). Его активность выше в условиях загрязнения. В экспериментах на микроводорослях было показано, что каталаза реагирует на более высокие концентрации дизельного топлива в среде по сравнению с другими ферментами антиоксидантной системы, например, с супероксиддисмутазой (Ramadass et al., 2017).

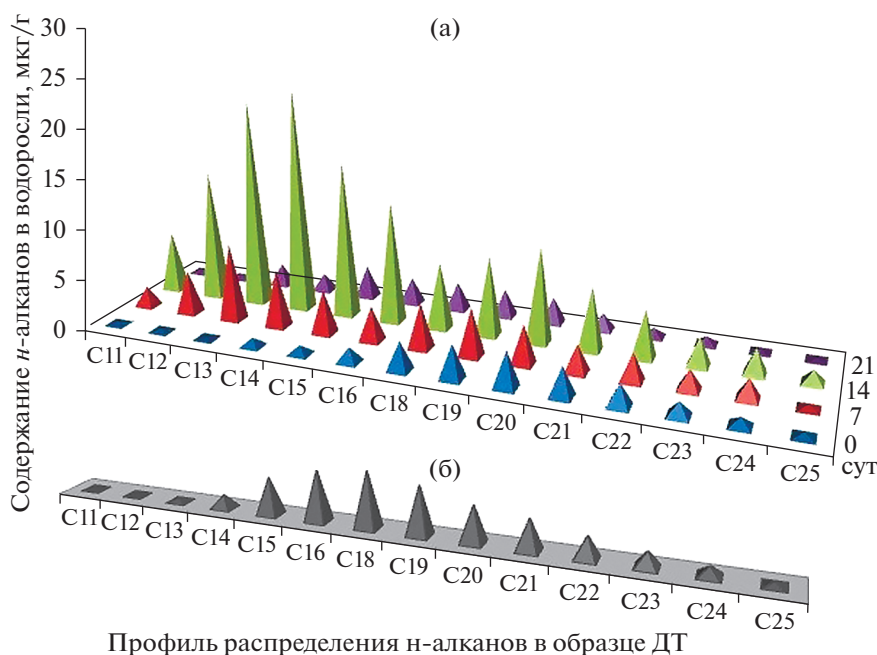


Рис. 5. (а) — содержание индивидуальных алканов в *Palmaria palmata* на разных стадиях эксперимента: 0, 7, 14, 21 сут (исключены изопреноиды пристан и фитан), а также н-гептадекан С₁₇ как эндогенный компонент. (б) — профиль распределения н-алканов в образце дизельного топлива (ДТ).

Можно предположить, что используемая в эксперименте добавка ДТ вызывала окислительный стресс в клетках водорослей, что подтверждено повышением активности каталазы. Однако значительного усиления/подавления активности фермента не происходило, что также свидетельствует о толерантности пальмарии к содержанию НП в воде на уровне 20 ПДК. Синтез антиоксидантных ферментов находится в обратной зависимости от концентрации хлорофиллов. Такие данные получены для микроводорослей (Ramadass et al., 2017). В нашей работе под действием ДТ концентрации хлорофилла *a* и каротиноидов снизились в 3–4 раза по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о более активной выработке антиоксидантных ферментов, в частности супероксиддисмутазы, у растений в опыте.

Установлено, что у пальмарии, так же как у фукуса и ульварии (Воскобойников и др., 2017, 2018), накопление НП происходило одновременно с уменьшением их содержания в воде (рис. 3). Проведенный качественный анализ выявленных НП в морской воде показал преимущественно нефтяной источник поступления алканов. Можно предположить, что превышение ПДК по содержанию НП в воде в губе Зеленецкая связано с работой в июле–августе маломерного флота, используемого дайвинг-клубом, расположенным на побережье губы. Однако было показано, что часть

алканов имеет биогенную природу. Анализ углеводородов, содержащихся в пальмарии, указал на нефтяное происхождение алканов, сорбированных водорослью из водной среды. Выявленный н-гептадекан (С₁₇), по-видимому, продуцируется самой водорослью (Миронов, 1985; Немировская, 2013). Повышенное содержание н-С₁₇ типично для природных сред с автохтонным (морским) биогенным составом углеводородов (Немировская, 2013).

Таким образом, в эксперименте *P. palmata* продемонстрировала выраженную способность к постепенной очистке воды от внесенных НП. В условиях умеренного загрязнения нефтепродуктами пальмария сохраняла физиологическую активность, проявляла выраженную способность к сорбции и деструкции НП. При этом уменьшение содержания компонентов ДТ в воде происходило одновременно с их накоплением в талломах водоросли. В деструкции ДТ у пальмарии, как и у исследованных ранее водорослей (ульварии и фукуса), по-видимому, задействован весь таллом. Она начинается на поверхности водоросли с помощью эпифитных УОБ, что обеспечивает поглощение и нейтрализацию НП клетками растения. Об этом свидетельствовала стабильная метаболическая активность клеток *P. palmata* под влиянием ДТ в течение всего эксперимента (21 сут). Данное предположение подтверждено увеличением

численности эпифитных УОБ на поверхности нескольких видов водорослей в условиях загрязнения НП среды обитания (Пуговкин и др., 2016; Воскобойников и др., 2017). Результаты проведенного исследования и полученные ранее данные позволяют говорить о способности большой группы макроводорослей к очистке морской среды от НП независимо от строения и систематической принадлежности водорослей. Предполагается, что основным фактором участия макроводорослей в биоремедиации является возможность образовывать симбиотические ассоциации с углеводородокисляющими микроорганизмами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-05-80058, программа “Опасные явления”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вознесенский В.Л., Заленский О.В., Семихатова О.А.* Методы исследования фотосинтеза и дыхания растений. Л.: Наука. 1965. 305 с.
- Воскобойников Г.М., Ильинский В.В., Лопушанская Е.М. и др.* Санитарная водорослевая плантация для очистки прибрежных акваторий от нефтепродуктов: от теории к практике // *Вопр. соврем. альгологии*. 2017. № 3 (15). <http://algology.ru/1184>
- Воскобойников Г.М., Матишов Г.Г., Метелькова Л.О. и др.* Об участии зеленой водоросли *Ulvaria obscura* в биоремедиации морской среды от нефтепродуктов // *Докл. РАН*. 2018. Т. 481. № 1. С. 139–141.
- Гусев М.В., Коронелли Т.В., Линькова М.А., Ильинский В.В.* Изучение ассоциации цианобактерий и нефтеокисляющих бактерий в условиях нефтяного загрязнения // *Микробиология*. 1981. Т. 50. № 6. С. 1092–1097.
- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* 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 макроводорослей*. Владивосток: Изд-во ДВНЦ АН СССР. 1978. С. 38–54.
- Мильчакова Н.А., Шахматова О.А.* Каталазная активность наиболее массовых видов черноморских водорослей-макрофитов в градиенте хозяйственно-бытового загрязнения // *Мор. экол. журн.* 2007. Т. 6. № 2. С. 44–57.
- Миронов О.Г.* Взаимодействие организмов с нефтяными углеводородами. Л.: Гидрометеиздат. 1985. 127 с.
- Немировская И.А.* Нефть в океане (загрязнение и природные потоки). М.: Научный мир. 2013. 432 с.
- Пуговкин Д.В., Ляймер А.В., Йенсен Дж.Б.* Эпифитные бактериальные сообщества водорослей *Fucus vesiculosus* в разных по степени загрязнения нефтепродуктами акваториях Баренцева моря // *Докл. РАН*. 2016. Т. 471. № 3. С. 371–373.
- Семенов А.М., Федоренко В.Н., Семенова Е.В.* Микроорганизмы на поверхности морских макрофитов в северных морях России и их возможное практическое использование // *Биосфера*. 2014. Т. 6. № 1. С. 60–76.
- Семенова Е.В., Семенов А.М., Иванов М.Н. и др.* Роль микроорганизмов – эпифитов фукусовых водорослей в деградации углеводородных загрязнений акваторий северных морей // *Экология и пром-ть*. 2009. № 3. С. 16–18.
- Степаньян О.В.* Влияние сырой нефти на основные функциональные параметры макроводорослей Баренцева моря // *Биол. моря*. 2008. Т. 34. № 2. С. 144–147.
- Atlas R.M., Horowitz A., Busdosh M.* Prudhoe crude oil in Arctic marine ice, water and sediment ecosystems: Degradation and interaction with microbial and benthic communities // *J. Fish. Res. Board Can.* 1978. V. 35. № 5. P. 585–590.
- Pilatti F.K., Ramlo F., Schmidt E.C. et al.* In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline – Biochemical and morphological alterations // *Chemosphere*. 2016. № 156. P. 428–437.
- Ramadass K., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R.* Toxicity of diesel water accommodated fraction toward microalgae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella* sp. MM3 // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017. V. 142. P. 538–543.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.052>
- Rosenberg G.* Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria folifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae) // *PhD Thesis*, New Haven, Connecticut: Yale University. 1981. 163 p.
- Seely G.R., Duncan M.J., Vidaver W.E.* Preparation and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide // *Mar. Biol.* 1972. V. 12. P. 184–188.
- Wrabel M.L., Peckol P.* Effects of bioremediation on toxicity and chemical composition of № 2 fuel oil: growth responses of the brown alga *Fucus vesiculosus* // *Mar. Pollut. Bull.* 2000. V. 40. № 2. P. 135–139.

Absorption and Conversion of the Diesel Fuel by the Red Alga *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 (Rhodophyta): the Potential Role of the Alga in Bioremediation of Sea Water

**G. M. Voskoboinikov^a, I. V. Ryzhik^a, D. O. Salakhov^a, L. O. Metelkova^b,
Z. A. Zhakovskaya^b, and E. M. Lopushanskaya^c**

^a*Murmansk Marine Biological Institute of Kola Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Murmansk 183010, Russia*

^b*Saint-Petersburg Scientific-Research Centre for Ecological Safety of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg 197110, Russia*

^c*Mendeleyev Research Institute for Metrology, Saint-Petersburg 190005, Russia*

For the first time, it was shown that the red alga *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber et D. Mohr, 1805 not only retained its physiological activity under the conditions of moderate pollution of the seawater with diesel fuel (DF), but also exhibited a pronounced ability for sorption and destruction of petroleum products (PPs). The content of DF components in seawater decreased simultaneously with their accumulation in the algae. Apparently, the entire thallus of *P. palmata* participated in destruction of DF: this process began on the algal surface owing to the activity of epiphytic hydrocarbon-oxidizing bacteria (HOB) that ensure the conversion of PPs into a plant-accessible form available for macrophytes. Subsequently, the PPs were neutralized by algal cells. The resilience of *P. palmata* under the DF influence was confirmed by a consistently high metabolic activity of *P. palmata* cells throughout the 21-day experiment. It is assumed that the ability of macroalgae to form symbiotic associations with hydrocarbon-oxidizing microorganisms is the main factor in the bioremediation activity.

Keywords: algae-macrophytes, bioremediation of marine water, diesel fuel, symbiotic association