

УДК 57.014+574.24+574.632+579.68+581.1

О возможной роли *Fucus vesiculosus* в очистке прибрежных акваторий от нефтяного загрязнения

Г.М. Воскобойников, Д.В. Пуговкин

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН

Аннотация. Определены биохимические и физиологические характеристики *Fucus vesiculosus* (*Phaeophyta*), способного к длительному обитанию в условиях постоянного загрязнения нефтепродуктами. Показана роль *F. vesiculosus* в очистке морской воды от нефтепродуктов (НП). Сделано предположение, что данный вид способен к аккумуляции и включению НП в метаболизм. Прослежена динамика деструкции НП фукусом. Выявлено, что нефтяное загрязнение морской среды приводит к возрастанию на поверхности фукусов общей численности бактерий, в том числе сапротрофных и углеводородоокисляющих. Получены данные о таксономической принадлежности доминирующих на поверхности фукуса углеводородоокисляющих бактерий.

Abstract. Biochemical and physiological characteristics for *Fucus vesiculosus* (*Phaeophyta*) capable to long life under conditions of constant oil pollution have been identified. The role of *F. vesiculosus* in purification of sea waters from petroleum products (PP) has been shown. Presumably, this type is able to accumulate and involve PP in metabolism. The dynamics of PP degradation by fucus has been traced. It has been found out that oil pollution of the marine environment leads to increase of total number of bacteria as well as saprotrophic and hydrocarbon-oxidizing ones in the fucus surface. Data on the taxonomic assignment of hydrocarbon bacteria dominant on the fucus surface has been obtained.

Ключевые слова: фукусковые водоросли, фотосинтетические пигменты, интенсивность фотосинтеза, нефтяные углеводороды, нефтяное загрязнение, эпифитные бактерии, сапротрофные (сапротрофные) бактерии, углеводородоокисляющие бактерии

Key words: fucoids algae, photosynthetic pigments, photosynthetic rate, oil carbohydrates, oil pollution, epiphytic bacteria, saprophyte bacteria (saprotrophic), carbon oxidizing bacteria

1. Введение

В проведённых ранее исследованиях (Воскобойников и др., 2004; Степаньян, Воскобойников, 2006) были проанализированы сведения, представленные в научной литературе, а также оригинальные данные, характеризующие воздействие нефти и нефтепродуктов на морские прибрежные экосистемы, в том числе на водоросли. В связи с расширением добычи и транспортировки нефти, газового конденсата в шельфовой зоне эта область исследования приобретает особую актуальность.

Имеющиеся в научной литературе сведения о степени влияния вредных веществ на жизнедеятельность гидробионтов противоречивы. Наряду с данными об альтерирующем воздействии минимальных доз нефти, встречаются сведения о возможной стимуляции относительно малыми концентрациями нефти роста водорослей. Остаются невыясненными механизмы сохранения жизнеспособности у водорослей в условиях загрязнения.

Для понимания механизмов устойчивости к нефтяному загрязнению, а также возможной роли макрофитов в очистке морской воды от нефтепродуктов нами было предпринято комплексное исследование морфо-функционального состояния литорального вида бурых водорослей *Fucus vesiculosus* из мест, различающихся по степени нефтяного загрязнения.

2. Материал и методы

Альгологический материал отбирался на Мурманском побережье Баренцева моря из мест с длительным постоянным загрязнением (ПЗМ) – морской порт, район причалов г. Североморска; мест, где загрязнение носило временный характер (ВЗМ) – район причала в губе Зеленецкая, в период аварии промыслового судна, и относительно чистых мест обитания (ЧМ) – губы Зеленецкая, губы Ярнышная.

Проводилось сравнение по видовому, возрастному составу и проективному покрытию. У отдельных одновозрастных растений фукуса пузырчатого – *Fucus vesiculosus*, произрастающих в ЧМ и ПЗМ анализировались интенсивность фотосинтеза, количество и соотношение пигментов, содержание общих липидов, маннита и полисахаридов (Воскобойников, 2006).

Определение концентраций НУ в воде проводилось методом газовой хроматографии и на отечественном приборе Флюорат-2М.

Массовую долю нефтепродуктов в водорослях определяли методом хромато-масс-спектрологии в секторе хроматографии и хромато-масс-спектрологии ВНИИМ им. Д.И. Менделеева (Санкт-Петербург).

Учет общей численности бактерий (ОЧБ) в пробах воды и смывах с талломов макрофитов проводили методом эпифлуоресцентной микроскопии на микроскопе ЛЮМАМ ИЗ с использованием красителя акридиновый оранжевый (Ильинский, 2006).

Для учета численности гетеротрофных бактерий применяли метод предельных разведений с использованием жидких питательных сред: модифицированной среды Зобелла 2216Е (для сапротрофных бактерий) и среды ММС (Mills et al., 1978) с диэтиленгликолем в качестве единственного источника углерода и энергии (Коронелли, Ильинский, 1984) – для УОБ.

Видовая идентификация выделенных штаммов была проведена на основе физиолого-биохимических тестов, морфологических исследований и генетического анализа их 16S рРНК в ФГУП ГосНИИ Генетика – ВКПМ (Москва).

3. Результаты и обсуждение

Влияние нефтепродуктов на фукусовые водоросли

Содержание нефтепродуктов в воде, отобранной с глубины до 0,5 м из ПЗМ, достигало 1,0 мг/л в апреле-мае и снижалось до 0,3-0,4 мг/л в сентябре. Отбор проб водорослей осуществляли с камней, где на поверхности фукуса постоянно присутствовали нефтепродукты. В районе причала губы Зеленецкая Баренцева моря (ВЗМ) содержание НУ в воде составляло 0,26 мг/л, а на удалении от него (ЧМ) 0,04 мг/л.

На литорали порта г. Мурманска (ПЗМ) обнаружено присутствие 4 видов водорослей, общим проективным покрытием не более 10 %. Преимущественно это *F. vesiculosus* (95 %), также встречались отдельные экземпляры *F. distichus*, *Ascophyllum nodosum* и *Pylaiella littoralis*. На камнях же у причала г. Североморска обнаруживался только *F. vesiculosus*.

На литорали относительно чистых акваторий Мурманского побережья: г. Зеленецкая, Ярнышная (ЧМ) присутствует до 12 видов водорослей, проективным покрытием 85-90 %. Соотношение видов фукусовых на верхней литорали: *F. vesiculosus* – 60 %, *A. nodosum* – 25 %, *F. distichus* – 10 %.

В ПЗМ возраст особей *F. vesiculosus* не превышал 4-6 лет, в то время как в ЧМ достигает 12-16 лет. Вес, размер, относительная скорость роста у одновозрастных талломов водорослей из ПЗМ в 1,5-2 раза меньше, чем у растений из ЧМ. Интенсивность фотосинтеза у водорослей из обоих мест обитания была одинакова и составляла $1,02 \pm 0,02$ мгСО₂/ч г сухой массы. По составу и количеству фотосинтетических пигментов также достоверных отличий не наблюдалось (табл. 1). Содержание маннита и фукоидана у фукуса из ПЗМ ниже, чем из ЧМ, а содержание липидов, наоборот, почти в 3 раза выше (табл. 2).

Таблица 1. Содержание пигментов (мг/г сухого вещества) у *F. vesiculosus*:
1 – чистое место обитания, 2 – постоянно загрязненное место обитания

Пигменты	1	2
Хлорофилла	5,30	4,83
Виолаксантин	0,39	0,40
Фукоксантин	1,85	1,58
β-каротин	0,22	0,21
Сумма каротиноидов	2,46	2,19
Хл а/сумма каротиноидов	2,15	2,21

Таблица 2. Химический состав талломов *F. vesiculosus* в % от навески:
1 – чистое место обитания, 2 – загрязненное место обитания

Место обитания	Общие липиды	Манит	Фукоидан	Альгинат
1	3,6	11,4	16,0	24,1
2	9,8	6,7	5,7	21,4

Химический анализ водорослей из ЧМ (табл. 2) показал сравнительно низкое содержание общих липидов, достаточно высокое содержание альгината и высокое содержание фукоидана. Эти результаты согласуются со сведениями, полученными для фукусовых водорослей из других акваторий (Усов и др., 2001; Хотимченко, 2003). Содержание общих липидов в фукусах из ПЗМ повышено в три раза по сравнению с ЧМ. При этом у водорослей из ПЗМ наблюдается снижение содержания маннита и фукоидана (соответственно в 2 и 3 раза). Содержание альгината падает незначительно.

Уменьшение содержания углеводов у фукусов из ПЗМ, возможно, связано с особенностью их существования в стрессовых условиях. Увеличение содержания общих липидов, по всей вероятности, обусловлено тем, что при анализе учитываются нефтяные углеводороды, сорбированные на поверхности талломов. Несмотря на отмеченные уменьшение размеров, веса и продолжительности жизни, а также значительное снижение скорости роста у фукуса пузырчатого из ЗМ, практически все особи, отобранные в ЗМ, проявили способность к росту. Присутствие на загрязненной литорали преимущественно фукоидов может свидетельствовать о высокой степени устойчивости данных видов водорослей к нефтяному загрязнению.

Возможная роль фукусов в нейтрализации нефтепродуктов

Для выяснения способности *F. vesiculosus* к нейтрализации нефтепродуктов в воде была проведена серия экспериментов, результаты которых приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты лабораторного эксперимента по очистке морской воды фукусовыми водорослями (ФП)

Объект/срок выдержки	Изменение содержания НП в морской воде (мг/л) и водорослях, мг/кг					
	Вода чистая	Вода чистая + ФП	Вода + ДТ	Вода + ДТ + ФП	Вода + ДТ + ФП	Вода + ДТ + ФП
Опыт	1	2	3	4	5	6
Контроль Вода/Фукус	0,05	0,05	1,54	1,53	6,42	12,24 / 0,165
3 сут	–	–	–	0,41	1,9	–
7 сут	0,05	0,034	1,54	0,26 (0,32)	0,72	2,84 / 5,62
14 сут	0,05	0,03	1,52	0,06 (0,09)		0,09 / 8,68
21 сут	0,05	0,03	1,54	0,032 (0,04)	0,04 (0,8)	–

Примечания: ПДК содержания НП для морских вод 0,05 мг/л; использовались талломы водорослей с 6-7 дихотомиями (возраст 3 г.); использовалось "летнее" дизельное топливо; эксперимент проводился в батарейных стаканах емкостью 3 л на магнитных мешалках при температуре +8-10 °С; после внесения топлива в стакан и интенсивного перемешивания ему давали сутки отстояться, а затем удаляли поверхностную пленку; значения в скобках в колонках 4 и 5 являются результатом 2-х повторов эксперимента; в колонке 6 приведены соотношения содержания ДТ в воде и в талломах водорослей.

Результаты экспериментов, представленные в табл. 3, полученные при помощи метода ИКФ, наглядно демонстрируют, что в присутствии *F. vesiculosus* снижение концентрации нефтепродуктов происходит с гораздо большей интенсивностью. За 3 недели содержание ДТ в воде уменьшалось до 100 раз. Проведенный в ряде опытов анализ НП в водорослях показал значительное увеличение их содержания в процессе эксперимента.

Вместе с тем, если способность фукусов к сорбции и удержанию на поверхности таллома НП не вызывала сомнений, т.к. при обитании в загрязненных местах поверхность всегда была покрыта слоем НП, то возможность к поглощению фукусами НП и включению НП в метаболизм оставалась гипотетичной. В пользу такой возможности косвенно свидетельствовали данные Ю.А. Тумайкиной и коллег (2008), полученные на пресноводном макрофите элодеи канадской.

Для анализа процесса утилизации водорослями нефтепродуктов талломы *F. vesiculosus*, отобранные с камней в ПЗМ, помещались во влажную термокамеру при температуре 5-8 градусов. Было выяснено, что массовая доля нефтепродуктов в водорослях из ПЗМ составляла 6956 мг/кг, из них 3238 мг/кг находилось на поверхности, а 3718 мг/кг – в ткани. Экспериментально удалось выявить нелинейный характер снижения общего количества углеводородов, находящихся на поверхности фукусовых водорослей. При этом скорость ассимиляции и переработки углеводородов фукусовыми падает по мере снижения поверхностного загрязнения талломов водорослей, с одной стороны, и по мере насыщения их тканей продуктами переработки – с другой. За первые 7 дней выдержки образцов водорослей в условиях влажной термокамеры было преобразовано 3466 мг/кг НП при средней скорости преобразования 495 мг/кг/сутки. В последующие недели эксперимента отмечается значительное снижение скорости преобразования, т.к. переработано было всего 252 мг/кг НП при средней скорости 36 мг/кг/сутки. Приведенные данные подтверждают факт усвоения фукусовыми водорослями углеводородов нефти.

Роль микроорганизмов-симбионтов на поверхности фукуса в нейтрализации нефтепродуктов

Учитывая, что ранее было показано присутствие на поверхности фукусовых водорослей углеводородокисляющих бактерий УО-бактерий (Перетрухина, 2006), нами было высказано и частично

подтверждено предположение о возможном их участии в окислении НП на поверхности водорослей. Показано, что эпифитные УОБ, выделенные с поверхности талломов фукуса, обитающего в загрязненной акватории, потребляли на 7-9 % больше дизельного топлива, чем из чистой акватории. Это может свидетельствовать об их высокой углеводородокисляющей активности (Воскобойников и др., 2008).

Возможно, что деятельность бактерий способствует поглощению НП тканями макрофитов, превращая аккумулированные на поверхности углеводороды в более доступные соединения.

Численность бактерий на поверхности фукуса

Общая численность эпифитных бактерий на фукусе из ВЗМ составляла $3,86 \times 10^7$ – $4,93 \times 10^7$ кл/см², что было примерно в 3 раза выше, чем на фукусе из чистого местообитания: $1,42 \times 10^7$ – $1,48 \times 10^7$ кл/см².

Численность сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий

На поверхности макрофитов, отобранных из ВЗМ, численность сапротрофных бактерий была выше, чем на водорослях, отобранных в чистом участке акватории. Разница составила более двух порядков (432278 кл/см² – в районе причала, 1971 кл/см² – в свободной от НУ части губы).

Сходная картина наблюдалась и для эпифитных УОБ. Их количество на талломах фукуса, отобранных из ВЗМ, оказалось на порядок выше, чем на водорослях, отобранных в ЧМ.

Таким образом, численность эпифитных бактерий как сапротрофных, так и углеводородокисляющих, существенно возрастала на участке губы, подверженном загрязнению НП.

На талломах водорослей, независимо от места их отбора, доминировали сапротрофные бактерии, численность которых значительно превосходит количество УОБ.

Таксономическая принадлежность углеводородокисляющих бактерий

Из проб воды и с поверхности талломов фукуса, отобранного из загрязненных и чистых акваторий, выделены штаммы УОБ, которые в зависимости от их культуральных свойств (физиолого-биохимических и морфологических) были разделены на группы. Затем для каждого из наиболее массовых и характерных представителей группы проводился генетический анализ 16S рРНК, на основании которого, а также культуральных свойств, отобранные штаммы были определены до вида (табл. 4).

В результате установлено, что на поверхности водорослей-макрофитов, отобранных как в ЧМ, так и в ВЗМ, встречаются два вида бактерий – *Pseudomonas fluorescens* и *Ochrobactrum anthropi*. Причем *Ochrobactrum anthropi* был выделен нами только с поверхности фукуса и не встречался в воде, тогда как *Pseudomonas fluorescens* встречался и в воде, и на талломах водорослей-макрофитов.

Кроме того, в воде и на талломах фукуса из ЧМ были обнаружены штаммы, относящиеся к виду *Pseudomonas guinea*, а в загрязненном районе – к виду *Rhodococcus fascians*. Как было показано ранее (Коронелли и др., 1994), углеводородокисляющие псевдомонады могут составлять до 90 % культур в незагрязненных морских водах, тогда как родококки обычно встречаются в местообитаниях, хронически загрязненных НП.

По данным И.В. Петрухиной (2006), углеводородокисляющие псевдомонады и родококки являются обычными компонентами углеводородокисляющего микробного сообщества на литорали как загрязненных НП, так и чистых участков Кольского залива Баренцева моря.

Таким образом, из воды и с поверхности талломов фукуса на селективной среде с углеводородами впервые удалось выделить представителей четырех доминирующих видов углеводородокисляющих бактерий, относящихся только к трем родам. Имеются данные, показывающие, что большая часть углеводородокисляющего микробного ценоза представляет собой некультивируемые формы микроорганизмов (ZoBell, 1946).

В табл. 5 представлены данные о доле каждого вида от общего числа выделенных штаммов и от количества бактерий данного вида, выделенных с поверхности фукуса пузырьчатого из ВЗМ и ЧМ.

4. Выводы

В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1) Среди водорослей-макрофитов Баренцева моря встречаются виды не только устойчивые к нефтепродуктам, но и способные к их аккумуляции и включению в метаболизм. Таким видом является *Fucus vesiculosus*.

2) Постоянное загрязнение нефтепродуктами приводит к уменьшению видового разнообразия, проективного покрытия, биомассы, размерно-массовых характеристик, содержанию углеводов. Вместе с тем, по уровню фотосинтеза и содержанию пигментов различий не наблюдалось.

3) Нефтяное загрязнение морской среды приводит к возрастанию на поверхности фукусов общей численности бактерий, в том числе сапротрофных и углеводородокисляющих.

4) В результате таксономического исследования микроорганизмов-доминантов определено, что на поверхности водорослей-макрофитов, отобранных как в чистом, так и в загрязненном НУ местообитании, встречаются два вида бактерий – *Pseudomonas fluorescens* и *Ochrobactrum anthropi*. *Ochrobactrum anthropi* был выделен нами только с поверхности фукуса и не встречался в воде, тогда как *Pseudomonas fluorescens* встречался и в воде, и на талломах водорослей-макрофитов.

5) Наряду с определенным возможным участием фукусовых водорослей в очистке морской воды от нефтепродуктов, механизм деструкции, поглощения НП водорослями остается гипотетичным.

6) Выявленная устойчивость фукуса пузырчатого к нефтяному загрязнению, а также способность к нейтрализации нефтепродуктов, наряду с отмеченной ранее чрезвычайно высокой устойчивостью данного вида к другим альтерирующим факторам внешней среды (опреснению, отрицательной температуре, ультрафиолету) создает возможность использования *F. vesiculosus* для переработки поверхностных пленок нефтепродуктов, в том числе в санитарной аквакультуре (плантация-биофильтр).

Новые сведения о природной симбиотической ассоциации водорослей и нефтеокисляющих бактерий значительно расширяют понимание роли биологического фактора в очистке морской акватории от нефтепродуктов и могут являться основой для развития санитарной аквакультуры.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за научные консультации при подготовке работы к печати профессору МГУ им. М.В. Ломоносова В.В. Ильинскому, а также за помощь в проведении экспериментов сотрудникам ММБИ КНЦ РАН д.б.н. М.В. Макарову, к.б.н. И.В. Рыжик, А.А. Метельскому, Н. Мишиной.

Литература

- Mills A.L., Breul C., Colwell R.R.** Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probably number method. *Can. J. Microbiol.*, v.24, p.552, 1978.
- ZoBell C.E.** Marine microbiology. *Waltham, Mass., Chron. Bot. Press*, 240 p., 1946.
- Воскобойников Г.М.** Механизмы адаптации, регуляции роста и перспективы использования макрофитов Баренцева моря. *Автореф. дис ... докт. биол. наук, Мурманск, ММБИ*, 46 с., 2006.
- Воскобойников Г.М., Ильинский В.В., Лопушанская Е.М., Пуговкин Д.В.** О возможной роли морских макрофитов в очистке поверхности воды от нефтяного загрязнения. *Нефть и газ арктического шельфа. Мат. междунар. конференции, Мурманск*, с.63-68, 2008.
- Воскобойников Г.М., Матишов Г.Г., Быков О.Д., Маслова Т.Г., Усов А.И.** Об устойчивости морских макрофитов к нефтяному загрязнению. *Доклады АН. Общая биология*, т.397, с.842-844, 2004.
- Ильинский В.В.** Гетеротрофный бактериопланктон. *Практическая гидробиология. М., ПИМ*, 367 с., 2006.
- Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В., Комарова Т.И., Поршнева О.В.** Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон. *Микробиология*, т.63, вып. 5, с.917-923, 1994.
- Коронелли Т.В., Ильинский В.В.** Об учете численности углеводородокисляющих бактерий в морской воде методом предельных разведений. *Вестник МГУ, сер. 16, Биология*, № 3, с.54-56, 1984.
- Перетрухина И.В.** Гетеротрофный бактериопланктон литорали Кольского залива и его роль в процессах естественного очищения вод от нефтяных углеводородов. *Автореф. дис ... канд. биол. наук. М.*, 18 с., 2006.
- Степаньян О.В., Воскобойников Г.М.** Влияние нефти и нефтепродуктов на морфофункциональные особенности морских макроводорослей. *Биология моря*, т.32, № 4, с.241-248, 2006.
- Тумайкина Ю.А., Туровская О.В., Игнатов В.В.** Деструкция углеводородов и их производных растительно-микробной ассоциацией на основе Элодеи канадской. *Прикладная биохимия и микробиология*, т.44, № 4, с.422-429, 2008.
- Усов А.И., Смирнова Г.Л., Клочкова Н.Г.** Полисахариды водорослей. Полисахаридный состав некоторых бурых водорослей Камчатки. *Биоорганическая химия*, т.27, № 6, с.444-448, 2001.
- Хотимченко С.В.** Липиды морских водорослей-макрофитов и трав: структура, распределение, анализ. *Владивосток, Дальнаука*, 234 с., 2003.